

*Bordetella bronchiseptica* の Bcr4 は  
BspR の転写抑制作用を減弱させる

*Bordetella bronchiseptica* Bcr4 antagonizes the  
negative regulatory function of BspR via its role  
in type III secretion

北里大学大学院感染制御科学府  
感染制御・免疫学履修コース 分子細菌学  
学籍番号 DI-16001 西村隆太郎  
指導教授 阿部章夫

## 目次

1. 緒言	3
2. 材料と方法	8
3. 結果	15
4. 考察	22
5. 要約	27
6. 図表	28
7. 謝辞	45
8. 引用文献	46

## 1. 緒言

*Bordetella* 属細菌はグラム陰性の偏性好気性短桿菌であり、現在 9 種が同定されている (1)。*B. pertussis*、*B. parapertussis*、*B. holmesii* はヒトに感染し、百日咳を引き起こす。*B. bronchiseptica* は稀にヒトに感染するが、イヌに伝染性気管気管支炎、ウサギにスナッフ、ブタに萎縮性鼻炎等の慢性的な感染症を引き起こす (2)。また *B. pertussis*、*B. parapertussis*、*B. bronchiseptica* の塩基配列が既に解析されており、その結果から *B. pertussis* ならびに *B. parapertussis* は *B. bronchiseptica* から派生したことが示唆され、この 3 菌種間において各遺伝子は高い相同性を有しており、遺伝学的にきわめて近縁であること、また多くの病原因子を共有することが明らかになっている (3, 4)。

*Bordetella* 属細菌において多くの病原因子は、膜貫通型のセンサーキナーゼ BvgS ならびにレスポンスレギュレーターの BvgA から成る BvgAS の二成分制御系により支配される (5, 6)。*B. pertussis* ならびに *B. bronchiseptica* を SS (Stainer-Scholte) 液体培地と呼ばれる培地を用いて 37°C で培養したときに BvgS の菌体内領域に存在するヒスチジンが自己リン酸化される (7)。その後 BvgS 内のアスパラギン酸、ヒスチジン、最後に BvgA のアスパラギン酸へと次々にリン酸基が受け渡される (6)。リン酸化された BvgA は付着因子、毒素、III 型分泌装置 (T3SS) の構成因子等の病原因子をコードする遺伝子上流部位に結合し、転写を活性化する。この状態は Bvg<sup>+</sup> phase と呼ばれる (8)。一方、*B. bronchiseptica*、*B. pertussis* を 50 mM の MgSO<sub>4</sub> を含有する培地で培養したときに BvgS は活性化しないことが知られており、この状態は Bvg<sup>-</sup> phase と呼ばれる (9)。Bvg<sup>-</sup> phase の状態では毒素、付着因子、III 型分泌装置のような病原因子は発現せず、鞭毛の構成成分をコードする遺伝子群などの発現が上昇する (10)。このように BvgAS 二成分制御系は、*Bordetella* 属細菌の病原性に重要な役割を果たしている (11)。

多くのグラム陰性病原菌は III 型分泌装置を保有する。III 型分泌装置は菌体外から突出したニードル様構造と菌体の内膜および外膜を貫通する基部構造より構成されている(図 1)。III 型分泌装置を保持する菌は宿主細胞に接触すると、III 型分泌装置を介して宿主細胞膜上に孔を形成する因子を分泌し、この孔を通してエフェクターを宿主細胞内に直接輸送することにより宿主の生理的機能を攪乱する (12)。*Bordetella* 属細菌では、III 型分泌装置から分泌されるエフェクターが宿主の気道に定着するために必要であることが報告されており、エフェクターが重要な病原因子であることが知られている (13)。

III 型分泌装置を構成する各タンパク質は III 型分泌装置を保有する細菌の間において高度に保存されている。その例としてセクレチン(secretin)と呼ばれる外膜リングを構成するタンパク質は、腸管病原性大腸菌(EPEC)では EscC、ペスト菌などを含む *Yersinia* 属細菌では YscC、赤痢菌である *Shigella* 属細菌では MxiD であり、それぞれ高い相同性を有しているが各細菌においてタンパク質の名称が異なる (14)。そのため、III 型分泌装置を構成する各タンパク質の一般的な呼称として 1998 年に Hueck らにより提案された Sct (Secretion and cellular translocation) が用いられ、例えばセクレチンを構成するタンパク質は SctC と呼ばれる (15)。III 型分泌装置は以下のように構築される(図 2)。最初に SctR、SctS などから構成される輸送装置(export apparatus)と呼ばれる複合体が内膜に構築され(図 2-①)、その後に内膜リング(IM ring, inner membrane rings)が輸送装置の周囲に構築される(図 2-②)(14)。内膜リングが構築された後、内膜と外膜の間に III 型分泌装置の基部構造を局在させるためにペプチドグリカン開裂酵素により、ペリプラズム内のペプチドグリカン層は部分的に除去される(図 2-③)。その後、外膜に SctC により構成される構造であるセクレチンが構築され(図 2-④)、セクレチンは内膜に局在する内膜リングと直接的に接触する(図 2-⑤)。そして ATPase 複合体と C リング(C-ring)は内膜リングの細胞質面に局



在し、輸送装置と相互作用する(図 2-⑥)。またソーティングプラットフォーム(Sorting platform)と呼ばれる部位を構成するタンパク質である SctP、SctU、SctW、SctN(ATPase)は、III 型分泌装置から分泌されるタンパク質(以下、III 型分泌タンパク質と記述する)の分泌を制御する重要な因子であると考えられている(図 3)(14)。早期に分泌されるニードル SctF ならびにインナーロッド SctI は基部を通して分泌される(図 3-①)。ニードルが一定の長さに達すると中期分泌タンパク質(トランスロケーター)の分泌に切り替わる(図 3-②)。宿主細胞膜上に孔が形成された後、後期分泌タンパク質(エフェクター)の分泌に切り替わるために、菌体内のエフェクターは分泌装置基部にある ATPase(SctN)による ATP の加水分解エネルギーによってエフェクターの高次構造がほどかれ、分泌装置の基部に装填される。最終的にプロトン駆動力をエネルギー源としてエフェクターはニードル内を通過し、宿主細胞内に直接的にエフェクターが輸送される(図 3-③)。ネズミチフス菌などを含む *Salmonella* 属細菌が保有し腸管上皮細胞への侵入や炎症惹起に関与する III 型分泌装置 T3SS-1 (16)、そして腸管病原性大腸菌(EPEC)(17)、腸管出血性大腸菌(EHEC)(18)の III 型分泌装置はこのモデルにより III 型分泌装置が構築されと考えられている (14)。

これまでに *Bordetella* 属細菌の III 型分泌タンパク質として BteA(BopC)(19-22)、BopB (23)、BopD (24)、BopN (25, 26)、Bsp22 (27, 28)、BspR(BtrA)(29-31)の 6 つが同定されている。BopB と BopD は複合体を形成し、宿主細胞膜に孔を形成する孔形成因子である (24)。Bsp22 はニードル構造の先端にさや状構造を構成し、BopD と相互作用している (27)。エフェクターである BteA は N 末端領域を介して宿主細胞の脂質ラフトに局在すること (22)が報告されており、アクチン細胞骨格系シグナル伝達経路を介してネクローシス様の細胞死を誘導し、またマクロファージの貪食作用を抑制することが明らかとなっている (20)。BopN は BteA とは異なる機能を有するエフェクターであり (25, 26)、宿主細胞質へ移行後、核内に移行する (25)。核内

に移行した BopN は NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 の核移行を阻害する一方で、同じく NF- $\kappa$ B のサブユニットである p50 の核移行を促進する (25)。BopN は NF- $\kappa$ B の p65 と p50 の核内における存在比を制御することで IL-10 の産生を誘導し、感染組織への好中球の浸潤を抑制することが報告されている (25)。また BopN は BteA が媒介するネクローシス様の細胞死を補助する機能を有することが明らかとなっている (26)。BspR は III 型分泌タンパク質である一方で、菌体内において III 型分泌装置の機能を負に制御する転写調節因子として機能する (29)。BspR をコードする遺伝子は *btr* 遺伝子座に存在し(図 4)、*btr* 遺伝子座には BspR を含めて 5 つのタンパク質 (BtrS、BspR、BtrU、BtrW、BtrV) がコードされる(図 4)。これら 5 つのタンパク質は *bsc* 遺伝子座などの III 型分泌装置に関連する遺伝子の発現を制御する (32, 33)。*bsc* 遺伝子座の転写には *btr* 遺伝子座にコードされるシグマ因子である BtrS が必要である (33)。近年の研究により BspR が BtrS と相互作用し、BtrS の抗シグマ因子として機能を果たすことにより *bsc* 遺伝子座に存在する遺伝子の転写を抑制することが示唆されている (31)。

*btr* 遺伝子座に隣接して存在する *bsc* 遺伝子座(図 4)には III 型分泌装置の構成因子、機能未知のタンパク質をコードする 29 種類の遺伝子が存在する (3)。機能未知のタンパク質である Bcr4 をコードする遺伝子は *bsc* 遺伝子座に含まれる (3)。Bcr4 は 174 アミノ酸残基からなる 18.1 kDa のタンパク質である。Bcr4 は 58-86、91-124、129-155、129-155 の各アミノ酸領域に TPR (tetratricopeptide repeat) モチーフ (34)と呼ばれるシャペロンの機能やタンパク質間の相互作用に関与するモチーフを保有する。Bcr4 は環境日和見病原体として知られる *Achromobacter xylosoxidans* (35) の機能未知タンパク質 NH44784\_14631、緑膿菌である *Pseudomonas aeruginosa* (36) の Pcr4、腸炎エルシニアとして知られる *Yersinia enterocolitica* (37) の YscY とそれぞれ 49.1%、26.6%、18.4%のアミノ酸の相同性を有する。Pcr4 は

109 アミノ酸残基からなる 12 kDa のタンパク質であり、III 型分泌装置より分泌される (36, 38)。YscY は TPR モチーフを有し *Yersinia* 属細菌において III 型分泌装置の分泌に必須な YscX というタンパク質のシャペロンであると考えられている (37)。*Bordetella* 属細菌のゲノム上には YscX と相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子は認められていない。Bcr4 は *Bordetella* 属細菌の III 型分泌機構にどのように関与しているか不明であったため、本研究では Bcr4 の機能を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 菌株と培養条件

本実験で使用した菌株は表 1 に示した。クローニングを行うための宿主として大腸菌 *Escherichia coli* DH10B 株 (Invitrogen) を用いた。スーサイドベクター pABB-CRS2 を複製するための宿主として *E. coli* SM10 $\lambda$ pir を用いた (39)。豚萎縮性鼻炎に感染している豚の鼻粘膜から単離した気管支敗血症菌 *B. bronchiseptica* S798 を野生株として用いるとともに、すべての *B. bronchiseptica* 変異株の親株として用いた (23, 40)。III 型分泌能喪失株として III 型分泌装置の ATPase である BscN をコードする *bscN* の内部配列を欠失した BscN 欠損株 ( $\Delta bscN$ ) を (23)、また *bspR* 遺伝子が破壊された BspR 欠損株 ( $\Delta bspR$ ) を用いた (29)。*B. bronchiseptica* は Bordet-Gengou (BG) 寒天培地 (41-43) で 2 日間、37°C で培養し、シングルコロニーを滅菌済のプラスチックループで釣菌した。これを Stainer-Scholte (SS) 液体培地 (44) に懸濁し、600 nm での吸光度が 0.2 になるように調整後、37°C で 18 時間振盪培養した。*B. bronchiseptica* からの RNA 精製においては、菌を同様の条件で SS 液体培地に懸濁し、37°C で 7 時間振盪培養した。

### 2-2. 哺乳類培養細胞株と培養条件

ラット肺上皮由来の L2 細胞 (ATCC CCL-149) の培養は、10% のウシ胎児血清を含む F-12K (Invitrogen) の培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

### 2-3. 遺伝子欠損変異株の作製

本研究で使用したプライマーを表 2、プラスミドを表 3 に示した。*B. bronchiseptica* 野生株より調製したゲノム DNA を鋳型として、プライマー B1-*bcr4*、B2-*bcr4* を用いて PCR を行い、*bcr4* 遺伝子上流および下流にそれぞれ約 2 kbp の隣接領域を有す

る DNA の断片を PCR 産物として得た。この PCR 産物と pDONR-201 の BP 反応 (Gateway Cloning System; Invitrogen) を行い pDONR-*bcr4* を作製した。pDONR-*bcr4* を鋳型として *bcr4* 遺伝子の内部配列に相補するプライマー R1-*bcr4*、R2-*bcr4* による inverse PCR を行なった。得られた PCR 産物を EcoRI により消化した後にライゲーション反応を行い、pDONR- $\Delta bcr4$  を作製した。次に pDONR- $\Delta bcr4$  とスーサイドベクター pABB-CRS2 との LR 反応 (Gateway Cloning System; Invitrogen) により、pDONR- $\Delta bcr4$  に含まれる内部配列を欠失した *bcr4* 遺伝子とその隣接領域を含む DNA 断片を pABB-CRS2 に移行させた。LR 反応後、*E. coli* SM10 $\lambda$ *pir* を宿主としたエレクトロポレーションを行い、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含有する LB 培地に塗布し、*E. coli* SM10 $\lambda$ *pir*/pABB-CRS2- $\Delta bcr4$  を得た。

上記の方法で得られた *E. coli* SM10 $\lambda$ *pir*/pABB-CRS2- $\Delta bcr4$  と *B. bronchiseptica* 野生株を LB プレート上で混合後、ストレプトマイシン 30  $\mu$ g/ml およびアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含有する LB 寒天培地上に塗布し 37°C で二晩培養した。生育してきたコロニーをさらにストレプトマイシン 30  $\mu$ g/ml およびアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含有する LB 寒天培地上に塗布してコロニーを単離し、同様の操作を再度行いコロニーを純化した。得られたコロニーをストレプトマイシン 10  $\mu$ g/ml を含有する LB 液体培地に植菌し、37°C で 3.5 時間培養後、ストレプトマイシン 15  $\mu$ g/ml を含有するシュクロース寒天培地に塗布した。その後 30°C で二晩培養し、生育した菌を Bcr4 欠損候補株とした。候補株の染色体 DNA を鋳型としてプライマー 5-os-*bcr4*、3-os-*bcr4* を用いて PCR を行い、増幅断片が 4.6 kbp から 4.3 kbp にシフトしていること、またその PCR 産物を EcoRI 制限酵素処理することで *bcr4* 遺伝子内に 270 bp の欠失を有していることを確認した株を Bcr4 欠損株 ( $\Delta bcr4$ ) とした。

*E. coli* SM10 $\lambda$ *pir* に導入した pABB-CRS2- $\Delta bcr4$  を接合伝達により BspR 欠損株 ( $\Delta bspR$ ) へ導入し、Bcr4 かつ BspR の二重欠損候補株とした。候補株の染色体

DNA は鋳型としてプライマー5-os-*bb1639* と 3-os-*bb1639*、および 5-os-*bcr4* と 3-os-*bcr4* を用いて PCR を行い、増幅断片がそれぞれ 4.6 kbp から 4.3 kbp に、4.7kbp から 4.2kbp にシフトしていることを確認し、Bcr4 かつ BspR の二重欠損株 ( $\Delta bcr4\Delta bspR$ )を得た。

BscN かつ BspR の二重欠損株 ( $\Delta bscN\Delta bspR$ )を作製するために、*E. coli* SM10 $\lambda$ pir に導入した pABB-CRS2- $\Delta bscN$  を接合伝達により  $\Delta bspR$  へ導入し、BscN かつ BspR の二重欠損候補株とした。候補株の染色体 DNA は鋳型としてプライマー5-os-*bb1639*と 3-os-*bb1639*、および 5-os-*bscN*と 3-os-*bscN*を用いて PCR を行い、増幅断片がそれぞれ 4.6 kbp から 4.3 kbp に、3.6 kbp から 2.4 kbp にシフトしていることを確認し、Bcr4 かつ BspR の二重欠損株 ( $\Delta bcr4\Delta bspR$ )を得た。

#### 2-4. pRK-*bcr4*ならびに pABB-*bcr4*

*B. bronchiseptica* 野生株の染色体 DNA を鋳型とし、プライマーB1-*bcr4* comp と B2-*bcr4* comp を用いたアダプターPCR を行い、*bcr4* 遺伝子とその上流領域を含む 627 bp の DNA 断片を増幅した。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を使用して精製した。得られた DNA 断片を BP 反応により pDONR201 に挿入し、pDONR-*bcr4*-comp を得た。*fha* プロモーター配列が挿入された pDONR-*fhaP*、pDONR-*bcr4*-comp、ならびに *rrnB*ターミネーターが挿入された pDONR-*rrnB*を混合し、MultiSite Gateway system(Invitrogen)を用いて、*fhaP-bcr4-rrnB*断片を pRK415-R4-R3-F プラスミド上に挿入し (19)、*bcr4* を高発現させるためのプラスミド pRK-*bcr4*を得た。また、*lac*プロモーターを有する発現ベクターである pABB-415 (24)と pDONR-*bcr4* comp との LR 反応により、*bcr4* を中程度に発現させるためのプラスミド pABB-*bcr4*を得た。

組換え BopN タンパク質を精製するために S798 ゲノム DNA を鋳型とし、

*bopN*-BamHI、*bopN*-XhoI をプライマーとして用いた PCR を行い *bopN* 遺伝子を含む DNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を pQE-30 (Qiagen) の BamHI 認識配列と XhoI 認識配列の間に挿入し pQE-30-*bopN* を得た。

## 2-5. 全菌体画分と培養上清画分の調製

### (1) 全菌体画分の調製

*B. bronchiseptica* の培養液 50  $\mu$ l を遠心し、上清を除去した菌体を 1 ml の氷冷純水に懸濁した。そこに 100%トリクロロ酢酸を 100  $\mu$ l 添加後、氷上で 15 分間冷却した。4°C、15000 rpm、5 分間の遠心後に上清を除去した。得られた沈渣に 5  $\mu$ l の 2 M Tris-base と 95  $\mu$ l の 2xSDS sample buffer を添加し、95°C で 3 分間加熱して試料を得た。

### (2) 培養上清画分の調製

*B. bronchiseptica* の培養液を遠心し得られた上清を孔径 0.22  $\mu$ m フィルター (Millipore) を用いて 1 ml の濾過した上清を得た。そこに 5%デオキシコール酸を 5  $\mu$ l 添加し、さらに 100%トリクロロ酢酸を 100  $\mu$ l 添加後、氷上で 15 分間冷却した。4°C、15000 rpm、5 分間の遠心後に上清を除去した。得られた沈渣に 2  $\mu$ l の 2 M Tris-base と 13  $\mu$ l の 2xSDS sample buffer を添加し、95°C で 3 分間加熱して試料を得た。

## 2-6. SDS-PAGE およびウエスタンブロット

SDS-PAGE は Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press) に記述されている方法に準じて行った。クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色はバイオカラフト社の CBB 染色液を用いて行なった。ウエスタンブロットは、まず SDS-PAGE によって展開したゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (Millipore) に転写し、その膜を一次抗

体溶液に室温で一晩浸した。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識プロテイン A (Invitrogen) あるいは anti-mouse IgG HRP (Sigma) を用いた。抗体の希釈は Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA (nakalai tesque) を用いた。シグナルの検出には Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) を用いた。

SDS-PAGE のゲルにアプライするサンプル量は、各サンプル間で同じ細菌数から調製されたサンプル量になるように OD 値を基にして調整した。

## 2-7. 抗体

本研究では抗 BteA 抗体 (19)、抗 BopB 抗体 (23)、抗 BopD 抗体 (24)、抗 Bsp22 抗体 (28)、抗 BspR 抗体 (29)、抗 FHA 抗体 (45)、抗 CyaA 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。また抗 Bcr4 抗体は Bcr4 の 157-173 アミノ酸に一致する Bcr4 の C 末端ペプチド (CMMRPAPLQQSEPLPGAPAG) を免疫原とし、抗 BscC 抗体は BscC の 583-600 アミノ酸に一致する BscC の C 末端ペプチド (CLVPDGLHVEYGEAGEASP) を免疫原とした。キャリアタンパク質として用いたキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) (Sigma) との架橋のためにシステイン残基をペプチドの N 末端に付加した。ウサギにキャリアタンパク質と結合させたペプチドをそれぞれ接種して抗体を得た。抗 BopN 抗体を作製するために、pQE-30-*bopN* を *E. coli* へ導入しヒスチジンタグが付与された BopN (His-BopN) を精製した。精製した His-BopN を免疫原としてウサギに接種し、血清を得た。抗 BopN 抗体の精製は BIO RAD の推奨する方法にしたがって His-BopN を吸着させたアフィゲル 15 (BIO RAD) を用いて行った。

## 2-8. RT-PCR



*B. bronchiseptica* の菌体より Trizol (Thermo Fisher Scientific)、RNeasy Mini Kit (Qiagen) ならびに RNase-free DNase Kit (Qiagen) を用いて全 RNA を調製した。RNA を鋳型とした逆転写反応は、Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) を用いて行った。得られた cDNA サンプルについて、FastStart Essential DNA Probe Master (Roche) と以下に示すプライマーセットを用い、LightCycler 96 system (Roche) を用いてリアルタイム PCR 反応を行った。*bteA*、*bopB*、*bopD*、*bsp22* ならびに *recA* 遺伝子内の配列を増幅するために、5-*bteA* と 3-*bteA*、5-*bopB* と 3-*bopB*、5-*bopD* と 3-*bopD*、5-*bsp22* と 3-*bsp22* ならびに 5-*recA* と 3-*recA* のプライマーセットをそれぞれ用いた。*recA* は内因性コントロールとして用いた。各菌株において得られた測定値について *recA* の mRNA 量で標準化した後、野生株に対する相対量を算出した。

#### 2-9. 培養細胞への感染と乳酸デヒドロゲナーゼの遊離試験

*B. bronchiseptica* の感染実験には L2 細胞を使用した。細胞密度が  $5 \times 10^4$  cells/well になるように、24 ウェルプレート各ウェルに 0.5 ml ずつ L2 細胞の懸濁液を添加して 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 20 時間培養した。*B. bronchiseptica* の各菌株を SS 液体培地にて培養した後、multiplicity of infection (MOI) が 50 または 200 となるように F-12K で希釈した菌液を 24 ウェルプレート中の L2 細胞に 0.5 ml/well で添加した。室温で 1700 rpm、5 分間の条件で遠心後、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 1 時間インキュベートした。BteA による細胞傷害を測定するために、細胞傷害の指標となる細胞内乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の放出を CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay を用いて測定した。菌を感染させた後、24 ウェルプレート各ウェルから上清を 200  $\mu$ l ずつ丸底の 96 ウェルプレートに回収し、室温で 1700 rpm、5 分間遠心した。その上清を 50  $\mu$ l ずつ平底の 96 ウェルプレートに移し、Reconstitute

Substrate Mix を 50  $\mu$ l ずつ添加した。その後プレートを遮光した状態で 30 分間室温に放置した後、50  $\mu$ l の停止液を添加して 492 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。遊離した LDH 量は 0.1% Triton X-100 で処理した細胞の培養上清の測定値を 100%として、その相対値を示した。

#### 2-10. 統計解析

統計学的解析には Prism 5.0f software (Graphpad) による片側検定(one-tailed)を用いたノンパラメトリック  $t$  検定を用いた。 $P$  値が 0.05%未満( $P < 0.05$ )を有意差とした。

### 3. 結果

#### 3-1. Bcr4 は III 型分泌タンパク質の分泌に必須である

*B. bronchiseptica* を SS 液体培地で培養すると III 型分泌タンパク質、毒素、付着因子など、多くの病原因子が分泌されることが知られている。*bsc* 遺伝子座にコードされる Bcr4 が III 型分泌タンパク質の産生と分泌に関与しているかを調べるために、野生株 (wild-type)、Bcr4 欠損株 ( $\Delta bcr4$ )、Bcr4 過剰発現株 ( $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ )、Bcr4 相補株 ( $\Delta bcr4/pABB-bcr4$ )、III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN$ )、Bcr4 過剰発現・III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN/pRK-bcr4$ ) を 18 時間、SS 液体培地でそれぞれ培養した。各菌株の培養上清画分を調製し、SDS-PAGE で展開後、CBB 染色 (図 5a) ならびに 6 種類の III 型分泌タンパク質 (BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22、BspR) および Bcr4、アデニル酸シクラーゼ毒素 (CyaA)、繊維状赤血球凝集素 (FHA) に対する抗体を用いたウエスタンブロットを行った (図 5b)。Bsp22、BopD、BopB、Bcr4、BopN はいずれも *bsc* 遺伝子座上に位置するが、Bsp22、BopD、BopB、Bcr4 をコードする 4 つの遺伝子は同じ方向の転写ユニットに含まれる一方、BopN をコードする遺伝子は 4 つの遺伝子とは逆向きの転写ユニットに含まれる (図 4)。

培養上清画分において Bcr4 欠損株 ( $\Delta bcr4$ ) の培養上清画分において III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN$ ) と同様に、III 型分泌タンパク質のバンド (図 5a) およびシグナル (図 5b) が認められなかった。その一方で、Bcr4 過剰発現株 ( $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ ) の培養上清画分において III 型分泌タンパク質のバンド強度 (図 5a) およびシグナル強度 (図 5b) は野生株と比較し著しく増加した。また Bcr4 過剰発現・III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN/pRK-bcr4$ ) の培養上清画分において III 型分泌タンパク質のシグナルは認められなかった (図 5b)。

*bsc* 遺伝子座にコードされるタンパク質の産生量を調べるために、各菌株より全菌体画分を調製し BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22、BspR、Bcr4、BscC、CyaA、

FHA に対する抗体を用いたウエスタンブロットを行った。BscC は *bsc* 遺伝子座にコードされ、*Yersinia* 属細菌が産生する YscC と相同性を有するタンパク質である。YscC は III 型分泌装置のセクレチンと呼ばれる外膜リングを構成するタンパク質である(図 6)(46)。全菌体画分において Bcr4 欠損株( $\Delta bcr4$ )の全菌体画分において III 型分泌能喪失株( $\Delta bscN$ )と同様に、III 型分泌タンパク質(BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22)ならびに BscC のシグナル強度は野生株と比較して著しく低下した(図 5c)。その一方で、Bcr4 過剰発現株( $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ )の全菌体画分において *bsc* 遺伝子座にコードされるタンパク質のシグナル強度は野生株と比較し著しく増加した(図 5c)。全菌体画分の BspR、CyaA、FHA のシグナル強度は各菌株間において有意な差は認められなかった(図 5c)。

これらの結果より、Bcr4 が III 型分泌タンパク質の分泌に不可欠な因子であることが示唆された。また III 型分泌タンパク質の分泌能を喪失すると *bsc* 遺伝子座上にコードされるタンパク質の産生が抑制されること、さらに過剰な Bcr4 の産生により *bsc* 遺伝子座上にコードされるタンパク質の産生が促進されることが示唆された。

*B. bronchiseptica* はエフェクター BteA を哺乳類細胞内に移行させることによりネクロシスを誘導することが知られている (19, 21)。Bcr4 が BteA 依存的な細胞傷害に必要なであることを調べるために、野生株、 $\Delta bcr4$ 、 $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ 、 $\Delta bcr4/pABB-bcr4$ 、 $\Delta bscN$  をラット肺上皮由来の培養細胞株である L2 細胞に感染させ、培養上清中に遊離した乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)量を測定した。その結果、野生株を multiplicity of infection (MOI) が 50 または 200 の条件で L2 細胞に感染させた場合、培地中に遊離する LDH 量はそれぞれ 19%(図 7a)、58%(図 7b)であった。一方、 $\Delta bcr4$  および  $\Delta bscN$  を L2 細胞に感染させた場合、培地中に LDH はほとんど検出されなかった(図 7a, b)。また、 $\Delta bcr4/pRK-bcr4$  を L2 細胞に感染させた場合に培地中に遊離する LDH 量は、野生株を感染させた場合と比較し有意に増加した(図

7a, b)。以上の結果より、Bcr4 は III 型分泌装置依存的な BteA の宿主内移行に必須であることが示唆された。

### 3-2. III 型分泌能の喪失は III 型分泌タンパク質の mRNA 量を減少させる

図 5c の結果より、 $\Delta bcr4$  や  $\Delta bscN$  のような III 型分泌能を喪失した株では III 型分泌タンパク質の産生量が低下することが示唆された。この産生量の低下は転写段階で起きているかを調べるために、*B. bronchiseptica* の各菌株より全 RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA 量を測定した。その結果、野生株と III 型分泌能を喪失した株 ( $\Delta bcr4$ 、 $\Delta bscN$ 、 $\Delta bscN/pRK-bcr4$ ) を比較した場合、III 型分泌タンパク質をコードする *bteA* (図 8a)、*bopB* (図 8b)、*bopD* (図 8c)、*bsp22* (図 8d) の mRNA 量はいずれも有意に減少した。一方、Bcr4 過剰発現株 ( $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ ) における *bteA* (図 8a)、*bopB* (図 8b)、*bopD* (図 8c)、*bsp22* (図 8d) の mRNA 量は Bcr4 欠損株 ( $\Delta bcr4$ ) と比較して有意に増加した。Bcr4 過剰発現・III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN/pRK-bcr4$ ) の菌体内における Bcr4 の産生量を調べるために全菌体画分に対する抗 Bcr4 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、Bcr4 が過剰に産生されていることを確認した (図 9)。

以上の結果、III 型分泌能の喪失により III 型分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写が野生株と比較して抑制されることが強く示唆された。また Bcr4 過剰発現・III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN/pRK-bcr4$ ) では III 型分泌タンパク質の mRNA 量が減少していたことから、Bcr4 の過剰発現による III 型分泌タンパク質の産生促進は III 型分泌装置が機能的である場合に誘導されることが示唆された。

### 3-3. Bcr4 欠損は BspR の抗シグマ因子としての機能を増強する

BtrS は *bsc* 遺伝子座に隣接する *btr* 遺伝子座 (図 4) にコードされるシグマ因子の一つで、*bsc* 遺伝子座の転写を担っている (33)。一方、BtrS と同様に *btr* 遺伝子座にコードされる BspR は BtrS の抗シグマ因子として機能し *bsc* 遺伝子座の転写を抑制することが報告されている (29, 31)。 $\Delta bcr4$  において III 型分泌タンパク質をコードする遺伝子群の mRNA 量は野生株と比較して減少していた (図 8) ことから、Bcr4 が欠損すると BspR の抗シグマ因子としての機能が増強されることが推察された。この仮説を検証するために Bcr4 かつ BspR の二重欠損株 ( $\Delta bcr4\Delta bspR$ ) を作製した。

野生株、 $\Delta bcr4$ 、BspR 欠損株 ( $\Delta bspR$ )、 $\Delta bscN$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR$  に Bcr4 を過剰発現させた株 ( $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bcr4$ )、 $\Delta bcr4\Delta bspR$  に BspR を相補した株 ( $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bspR$ ) を 18 時間、SS 液体培地でそれぞれ培養し、各培養液より上清画分を調製して SDS-PAGE で展開後、CBB 染色を行った。

その結果、 $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bcr4$  は III 型分泌タンパク質のバンドが培養上清画分に認められた一方、Bcr4 を欠損させた株  $\Delta bcr4$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bspR$  の各菌株ならびに  $\Delta bscN$  は培養上清画分に III 型分泌タンパク質のバンドが認められなかった (図 10)。さらに各菌株より全菌体画分を調製し BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22、BspR、Bcr4 に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、野生株と比較して BspR を欠損させた株 ( $\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bcr4$ ) の全菌体画分における III 型分泌タンパク質のシグナル強度は増大していた (図 10)。これらの結果は Bcr4 が III 型分泌タンパク質の分泌にとって必須であり、Bcr4 の過剰発現株により III 型分泌タンパク質の産生が促進されることを改めて示唆するとともに、Bcr4 欠損による *bsc* 遺伝子座の転写抑制は BspR の作用によるものであることが強く示唆された。

### 3-4. BscN と BspR の二重欠損株では III 型分泌タンパク質の産生量が増加する

本研究の前項までの実験結果より、Bcr4 欠損株において III 型分泌能が喪失し III 型分泌タンパク質の菌体外分泌が阻害されること(図 5a, b)、および抗シグマ因子である BspR の作用が増強され *bsc* 遺伝子座の転写がより強く抑制されること(図 8、10)が示唆された。さらに Bcr4 過剰発現における BspR の転写抑制効果の解除は III 型分泌装置が機能的である場合に誘導される(図 8)ことが推察された。そこで Bcr4 欠損株と同様に III 型分泌能を喪失している株、つまり III 型分泌能に必須な因子を欠損している株ではいずれの菌株においても、BspR による *bsc* 遺伝子座の転写抑制作用が増強されるのかについて調べるために、BscN かつ BspR の二重欠損株 ( $\Delta bscN\Delta bspR$ )を作製した。野生株ならびに  $\Delta bspR$ 、 $\Delta bscN$ 、 $\Delta bscN\Delta bspR$  を 18 時間、SS 液体培地でそれぞれ培養し、各培養液より上清画分を調製して SDS-PAGE で展開後、CBB 染色ならびに BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22、BspR、Bcr4 に対する抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

その結果、Bcr4 を欠損している株である  $\Delta bcr4$  ならびに  $\Delta bcr4\Delta bspR$  と同様に、BscN を欠損している株である  $\Delta bscN$  ならびに  $\Delta bscN\Delta bspR$  の培養上清画分において III 型分泌タンパク質のバンド(図 11a)ならびにシグナル(図 11b)は予想通り認められなかった。BspR のシグナルは野生株の培養上清画分においてのみ検出された(図 11b)。Bcr4 のシグナルは  $\Delta bspR$  の培養上清画分において検出された一方で、 $\Delta bscN\Delta bspR$  の培養上清画分においても微弱なシグナルが検出された(図 11b)。さらに各菌株より全菌体画分を調製し BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22、BspR、Bcr4 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、BscN と BspR の二重欠損株 ( $\Delta bscN\Delta bspR$ ) の全菌体画分における III 型分泌タンパク質(BteA、BopB、BopN、BopD、Bsp22)のシグナル強度は、 $\Delta bcr4\Delta bspR$ (図 10)と同様に野生株と比較して増加した(図 11c)。以上の結果より、Bcr4 の欠損によって III 型分泌



能が喪失した場合だけでなく、BscN の欠損によって III 型分泌能を喪失した場合においても BspR の *bsc* 遺伝子座に対する転写抑制作用が増強されることが示唆された。

#### 4. 考察

本研究結果により、*Bordetella* 属細菌において Bcr4 は III 型分泌タンパク質の分泌に不可欠な因子であり、Bcr4 の過剰発現は III 型分泌装置の機能依存的に BspR の転写抑制作用を解除することが強く示唆された。さらに *Bordetella* 属細菌において III 型分泌能を喪失した場合、BspR が *bsc* 遺伝子座の転写を野生株と比較してより強く抑制することが強く示唆された。

*B. bronchiseptica* 野生株の培養上清画分において Bcr4 のシグナルは検出されなかった(図 5b, 11b)のために、Bcr4 は III 型分泌装置依存的に分泌されないことが示唆された。一方、Bcr4 過剰発現株( $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ ) (図 5b)ならびに  $\Delta bspR$  (図 11b) の培養上清画分において Bcr4 のシグナルは検出された。また、III 型分泌能が喪失した  $\Delta bscN/pRK-bcr4$  (図 5b) および  $\Delta bscN\Delta bspR$  (図 11b) の培養上清画分においても、Bcr4 の微弱なシグナルが検出された。これらの結果より、Bcr4 を過剰に発現する株において Bcr4 は培養上清画分に Bcr4 のシグナルが検出されるが、Bcr4 は III 型分泌装置依存的に分泌されないことが示唆された。

*Bordetella* 属細菌が産生するシグマ因子 BtrS は、III 型分泌タンパク質ならびに III 型分泌装置の構成因子となるタンパク質がコードされる *bsc* 遺伝子座の転写を担う (33)。また BspR はシグマ因子 BtrS と結合し、*bsc* 遺伝子座の転写を低下させることが報告されている (29, 31)。図 8 ならびに図 10 の結果より、III 型分泌能を喪失した株( $\Delta bcr4$ 、 $\Delta bscN$ 、 $\Delta bscN/pRK-bcr4$ )において BspR の転写抑制機能が増強されることが推察され、*bsc* 遺伝子座上の遺伝子にコードされるタンパク質の産生量が低下したことが示唆された。このことからそのメカニズムは不明であるが、*Bordetella* 属細菌は III 型分泌機構の機能に依存して BspR の作用レベルを制御していることが考えられた。

$\Delta bcr4\Delta bspR$  の全菌体画分において BopB、BopN、BopD、Bsp22 のような他の III

型分泌タンパク質のシグナル強度は  $\Delta bspR$  と同程度であった(図 10)。したがって、 $\Delta bcr4\Delta bspR$  において *bsc* 遺伝子座にコードされる III 型分泌タンパク質の産生量の増加は、 $\Delta bspR$  における III 型分泌タンパク質の産生量の増加と同程度だと考えられる。このことから  $\Delta bcr4$  における *bsc* 遺伝子座の転写抑制は BspR に依存することが推察される。しかしながら、 $\Delta bcr4\Delta bspR$  の全菌体画分において BteA のシグナル強度は  $\Delta bcr4$  と  $\Delta bspR$  の中間のシグナル強度であった(図 10)。この理由は不明であるが、BteA をコードする遺伝子は *bsc* 遺伝子座に局在しないため BspR を介さない転写抑制経路が存在する可能性も考えられる。

*Bordetella* 属細菌とは対照的に、志賀赤痢菌などを含む *Shigella* 属細菌 (47)、ネズミチフス菌などを含む *Salmonella* 属細菌 (48)、ペスト菌などを含む *Yersinia* 属細菌 (49)、腸管病原性大腸菌 Enteropathogenic *E. coli* (17, 50)において野生株ならびに III 型分泌能が喪失した菌株間で III 型分泌タンパク質の産生量はほぼ同程度であることが示されている (17, 47-50)。これらの病原細菌は III 型分泌装置を有しているが、BspR と相同性を有するタンパク質を保有していない。したがって、*Bordetella* 属細菌は III 型分泌タンパク質の産生において Bcr4 ならびに BspR を介した独自の制御機構を有していると考えられる。

図 5 のデータより Bcr4 が III 型分泌タンパク質の産生量を増加させる作用を持つことが示唆された。一方で、 $\Delta bcr4\Delta bspR$  の菌体内において III 型分泌タンパク質は菌体内で過剰に産生された(図 10)。このことから Bcr4 が BspR と結合し、Bcr4 が BspR による III 型分泌タンパク質の産生抑制を直接的に解除することによって III 型分泌タンパク質の産生量を増加させることが考えられた。そこで BspR と Bcr4 との相互作用を調べるために、フラッグ(FLAG)タグを付加した BspR-FLAG を  $\Delta bspR$  の菌体内で発現させ、全菌体可溶化画分を調製後、抗 FLAG 抗体を用いたプルダウン試験を試みた。しかしながら、これまでのところ BspR と Bcr4 の相互作用は認められて

いない(データ未掲載)。一方で Bcr4 過剰発現・III 型分泌能喪失株 ( $\Delta bscN/pRK-bcr4$ ) (図 9) の *bsc* 遺伝子座上に局在する遺伝子の転写量は III 型分泌能が喪失した株 ( $\Delta bcr4$ ,  $\Delta bscN$ ) と同程度であった(図 8)。このことから、Bcr4 は BspR の転写抑制効果を直接的に解除しないが、III 型分泌装置が機能している場合に BspR の機能を間接的に解除する可能性が考えられる。

BspR やシグマ因子 BtrS の遺伝子が局在する *btr* 遺伝子座ならびに III 型分泌タンパク質や III 型分泌装置構成因子の遺伝子が局在する *bsc* 遺伝子座は、病原因子制御システムである BvgAS 二成分制御機構により正に制御されている (33)。*bsc* 遺伝子座に局在する *bopB*, *bopN*, *bopD*, *bsp22*, *bcr4* の遺伝子、また *bsc* 遺伝子座とは離れた遺伝子座に局在する *bteA* 遺伝子、*btr* 遺伝子座の *bspR* 遺伝子は、BtrS 依存的に転写される (29, 31, 33)。図 5c で示したように、野生株、 $\Delta bcr4$ 、 $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ 、 $\Delta bcr4/pABB-bcr4$ 、 $\Delta bscN$  の全菌体画分における BspR のシグナル強度に有意差が認められなかった。したがって、*bspR* 遺伝子は BtrS 依存的に転写の活性化を受けるが (31)、BspR の抑制を受ける III 型分泌タンパク質の遺伝子とは異なり、そのメカニズムは不明であるが *bspR* 遺伝子は BspR により転写の抑制を受けないことが示唆された。また Ahuja らの報告 (31) では、*bspR* 遺伝子を除く BtrS によって活性化される *btr* 遺伝子座上の遺伝子 (*btrS*, *btrM*, *btrN*, *btrU*, *btrO*, *alr*) のうち、*btrS* および *btrM* の転写は BspR 欠損株において増加していない。このことから、*bspR*, *btrS*, *btrM* の遺伝子は *bspR* 遺伝子と同様に BspR による転写の制御を受けないことが示唆される。一方、*btrN*, *btrU*, *btrO*, *alr* のような *btr* 遺伝子座に局在する他の遺伝子は BspR による転写の制御を受けることが示されている (31)。このことから *btr* 遺伝子座の発現制御機構は *bsc* 遺伝子座と異なることが推察される。

ネズミチフス菌などの *Salmonella* 属細菌は、独立した2つの III 型分泌装置

(T3SS-1 および T3SS-2)を保有する (16)。また *Salmonella* 属細菌の産生する鞭毛の基部は III 型分泌装置の基部構造と類似した構造を有する (51)。鞭毛の形成は前期と後期に分かれ、前期では鞭毛のフック基部(hook-basal body, HBB)の形成、後期では鞭毛繊維の形成が行われる(図 12)(52, 53)。HBB 形成後に分泌される FlgM は、鞭毛構築に不可欠な因子であることが知られている (54)。HBB が構築されている間、FlgM は鞭毛繊維構成因子をコードする遺伝子群の転写を促進するシグマ因子  $\sigma^{28}$  (FliA)と相互作用することによって、HBB 完成後に必要とされる鞭毛繊維構成因子をコードする遺伝子群の転写を抑制する(図 12)(54)。HBB 完成後、菌体から FlgM が分泌されることによって FlgM の制御がなくなると、 $\sigma^{28}$  が鞭毛繊維構成因子の遺伝子を転写し、鞭毛繊維が構築される(図 12)(55, 56)。BspR も FlgM と同様にシグマ因子である BtrS に相互作用し、III 型分泌装置から分泌される (29, 30)。図 5c において、 $\Delta bcr4/pRK-bcr4$  の菌体内の BspR の産生量が野生株と比較して同程度であるにもかかわらず、III 型分泌タンパク質の産生量が野生株と比較して増加した。したがって、BspR は FlgM のように菌体内の濃度により  $\sigma^{28}$  を抑制する制御機構とは異なるメカニズムにより、*bsc* 遺伝子座の転写を抑制することが推察される。

Bcr4 は *Yersinia* 属細菌の YscX のシャペロンである YscY と 18.4%の同一性を有する。YscX は 122 アミノ酸残基からなる 13.6 kDa のタンパク質であり、YscX をコードする遺伝子は YscY の直上流にコードされる。YscX は *Yersinia* 属細菌がもつ III 型分泌能に必須であるが詳細な機能は明らかになっていない (57)。YscX に相同性を有するタンパク質は *Bordetella* 属細菌のゲノムに存在しないが、Bcr4 はシャペロンである YscY と相同性を有することから、III 型分泌装置の分泌能に必須な構成因子を基質とするシャペロンとして機能する可能性がある。そこで Bcr4 と III 型分泌装置構成因子との相互作用を調べるために、Bcr4 にヒスチジン(His)タグを付加した His-Bcr4 を組換えタンパク質として大腸菌より精製後、*B. bronchiseptica* 野生株の

全菌体可溶化画分と混合しプルダウン試験を試みた。しかしながら、現在までのところ Bcr4 と相互作用するタンパク質を検出することはできていない(データ未掲載)。

Bcr4 の詳細な分子レベルの機能は不明であるが、Bcr4 をコードする遺伝子の直下流には BscI をコードする遺伝子が位置している(図 4)。III 型分泌機構におけるシャペロン分子は、シャペロン遺伝子に隣接してコードされるタンパク質をパートナー分子とすることが知られている (58)。BscI(図 1)は *Yersinia* 属細菌の III 型分泌装置のインナーロッドを構成する YscI(図 5)(46)と 18.3%の相同性を有するタンパク質であり、YscI は III 型分泌タンパク質の分泌において必須であることが知られている (59)。つまり BscI のシャペロンが欠損していた場合、BscI が構成する Inner rod は構築されないため III 型分泌装置の構築が基部のみが構築された状態で停止し、III 型分泌装置の不完全な構築により III 型分泌タンパク質は分泌されないと想定される(図 13)。*Yersinia* 属細菌において YscI のシャペロンに関する報告は存在しない。これまでに報告されている III 型分泌機構に関与するシャペロンの基質は、全て III 型分泌装置から分泌されるタンパク質である。BscI と相同性を有する YscI は III 型分泌装置から分泌されることから (59)、Bcr4 の基質が BscI であることが推察される。

さらなる解析は必要ではあるが、本研究により Bcr4 は III 型分泌装置の機能に必須のタンパク質であり、III 型分泌装置が機能的である場合に BspR の転写抑制効果を解除するというこれまでに報告のない新規の機能を有するユニークなタンパク質であることが強く示唆された(図 14)。今後は Bcr4あるいは BspR と相互作用する因子を同定し、どのようにして BspR の抑制機構が解除されるかを解析することが、*Bordetella* 属細菌における菌体内の病原因子の発現制御機構を理解するために必要である。

## 5. 要約

百日咳菌を含む *Bordetella* 属細菌は、多くのグラム陰性細菌に高度に保存されている III 型分泌装置をもつ。III 型分泌装置の構成タンパク質をコードする遺伝子は染色体上の *bsc* 病原遺伝子座に位置している。本研究では、*Bordetella* 属細菌の感染機構を分子レベルで解明し、百日咳に対する薬剤開発のための分子基盤を構築することを目的として、気管支敗血症菌 *Bordetella bronchiseptica* の *bsc* 病原遺伝子座にコードされる機能未知タンパク質 Bcr4 の機能解析を行った。Bcr4 欠損株では、BopB、BopN、Bsp22などのIII型分泌タンパク質の分泌が認められなかった。またIII型分泌タンパク質の産生量は野生株と比較し低下した。Bcr4 を過剰に発現する菌株は、野生株と比較しIII型分泌タンパク質の分泌量ならびに産生量が増加した。III型分泌タンパク質のひとつであるBspRは*bsc*遺伝子座の転写を負に制御することにより、III型分泌タンパク質の産生量を減少させることが報告されている。Bcr4 と BspR の両方を欠損させた二重欠損株はBcr4欠損株と同様にIII型分泌タンパク質の分泌は認められなかったが、III型分泌タンパク質の産生量は野生株と比較して増加した。以上の結果より、Bcr4は*B. bronchiseptica*のIII型分泌機構の機能に必須な因子であることが強く示唆された。またIII型分泌能が機能を喪失したときにBspRの*bsc*病原遺伝子座に対する転写抑制作用が増強されることが示唆された。さらにBcr4はBspRの転写抑制効果を解除し、III型分泌タンパク質の産生量を促進することが強く示唆された。

表 1 本研究で使⽤した菌株

菌株	⽤途・性質	⽂献
DH10B	DNA のクローニング	Invitrogen
SM10 $\lambda$ <i>pir</i>	pABB-CRS2 を複製させるための宿主	(39)
S798	<i>B. bronchiseptica</i> 野生株	(23)
$\Delta bcr4$	S798 <i>bcr4</i> 欠損株	本研究
$\Delta bscN$	S798 <i>bscN</i> 欠損株:III 型分泌能喪失株	(23)
$\Delta bspR$	S798 <i>bspR</i> 欠損株	(29)
$\Delta bcr4\Delta bspR$	S798 <i>bcr4</i> と <i>bspR</i> の二重欠損株	本研究
$\Delta bscN\Delta bspR$	S798 <i>bscN</i> と <i>bspR</i> の二重欠損株	本研究



表 2 本研究で使したプライマーの塩基配列

プライマー名	配列	文献
B1- <i>bcr4</i>	5'-AAAAAGCAGGCTCTGGACGTCTGAAGCGAAGG-3'	本研究
B2- <i>bcr4</i>	5'-AGAAAGCTGGGTGCTCGGCGTAGTCTTCGGCG-3'	本研究
B1- <i>bcr4</i> comp	5'-AAAAAGCAGGCTGCCAGGTCCGGTCTCGCACCG-3'	本研究
B2- <i>bcr4</i> comp	5'-AGAAAGCTGGGTAGATCCAAATTCATCCAGGAGC-3'	本研究
R1- <i>bcr4</i>	5'- <u>GGAATT</u> CGCCAGAAAGCCCACTTCGG-3'	本研究
R2- <i>bcr4</i>	5'- <u>GGAATT</u> CGCGGGTGGCGAGGCGGCAAG-3'	本研究
5-os- <i>bb1639</i>	5'-GCATCCCCATCGCCACAGCA-3'	本研究
3-os- <i>bb1639</i>	5'-TTACGCCGGGGATGGCCACC-3'	本研究
5-os- <i>bcr4</i>	5'-GCAGCGCGTATCGAGCGTTG-3'	本研究
3-os- <i>bcr4</i>	5'-TAGCCTCGCCTGCGCTCGCG-3'	本研究
5-os- <i>bscN</i>	5'-GCCATTGGTCGCGCTGGATCTTGTG-3'	本研究
3-os- <i>bscN</i>	5'-TCGCGCGCCATGGCATGCAATCCTC-3'	本研究
<i>bopN</i> -BamHI	5'-CG <u>GGATCC</u> ATGACTCGTATCGATGCCGCCCCC-3'	本研究
<i>bopN</i> -XhoI	5'-CCGCTCGAGCGGTCATGCGTTCTCCATTGCTA-3'	本研究
5- <i>recA</i>	5'-ATGAAGATCGGCGTGATGT-3'	本研究
3- <i>recA</i>	5'-TAGAACTTGAGCGCGTTGC-3'	本研究
5- <i>bsp22</i>	5'-AAGTGCCTACACCACCGTAAA-3'	本研究
3- <i>bsp22</i>	5'-TCCATCTGTTGCGTATTGGA-3	本研究
5- <i>bopD</i>	5'-CGGCTCGGTGAAGACATC-3'	本研究
3- <i>bopD</i>	5'-CCTCCCGCATCTGTTGAC-3'	本研究
5- <i>bopB</i>	5'-GTCTGCTGACAGCGTTGG-3'	本研究
3- <i>bopB</i>	5'-GGTTCGATCAGCAAGACGA-3'	本研究
5- <i>bteA</i>	5'-AATGGCCTTGGTGGGAAC-3'	本研究
3- <i>bteA</i>	5'-ATTCAGCGCCGTGATCTT-3'	本研究

下線部は制限酵素認識配列を示す

表 3 本研究で使用したプラスミド

プラスミド	用途・性質	文献
pDONR201	クローニングベクター	Invitrogen
pRK415-R4-R3-F	MultiSite Gateway 法 が 使 用 可 能 な <i>Bordetella</i> 用の発現ベクター	(19)
pABB415	<i>lac</i> プロモーターを有する <i>Bordetella</i> 用の発現ベクター	(24)
pABB-CRS2	スーサイドベクター	(60)
pDONR- <i>fhaP</i>	pDONR-P4-P1R に <i>fhaB</i> のプロモーターを挿入したプラスミド	(19)
pDONR- <i>rrnB</i>	pDONR-P2R-P3 に pTrc99A 由来のターミネーター配列 <i>rrnB</i> を挿入したプラスミド	(19)
pDONR- <i>bcr4</i>	<i>bcr4</i> 遺伝子と隣接領域を pDONR201 に挿入したプラスミド	本研究
pDONR- $\Delta bcr4$	pDONR- <i>bcr4</i> に含まれる <i>bcr4</i> 遺伝子の内部配列を欠失させたプラスミド	本研究
pDONR- <i>bcr4</i> -comp	<i>bcr4</i> 遺伝子とその SD 配列を pDONR201 に挿入したプラスミド	本研究
pQE-30	6xヒスチジンタグ付加タンパク質を産生させるための発現ベクター	Qiagen
pQE-30- <i>bopN</i>	<i>bopN</i> 遺伝子を発現ベクターpQE-30 に挿入したプラスミド	本研究
pRK- <i>bcr4</i>	<i>bcr4</i> 遺伝子を pRK415-R4-R3-F に挿入したプラスミド	本研究
pRK- <i>bspR</i>	<i>bspR</i> 遺伝子を pRK415-R4-R3-F に挿入したプラスミド	(29)
pABB- <i>bcr4</i>	<i>bcr4</i> 遺伝子とその SD 配列を pABB415 に挿入したプラスミド	本研究
pABB-CRS2- $\Delta bcr4$	pABB-CRS2 に内部配列を欠損した <i>bcr4</i> 遺伝子と隣接領域を挿入したプラスミド	本研究
pABB-CRS2- $\Delta bscN$	pABB-CRS2 に内部配列を欠損した <i>bscN</i> 遺伝子と隣接領域を挿入したプラスミド	(23)

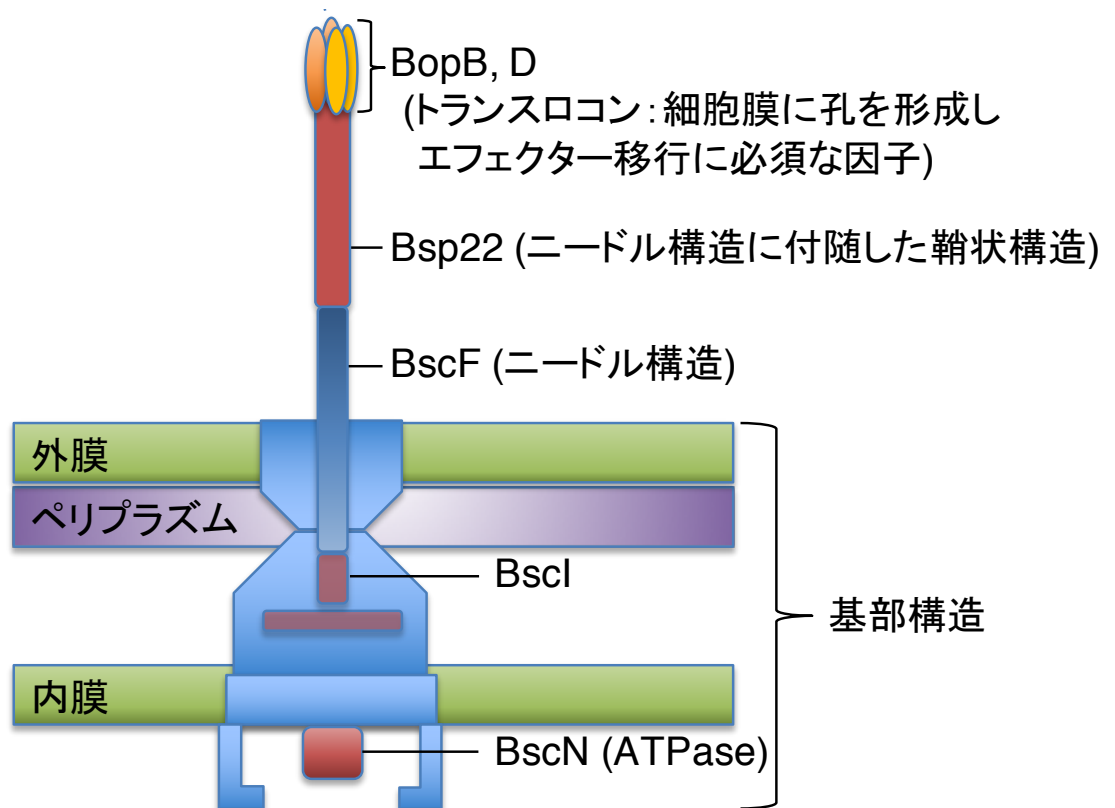
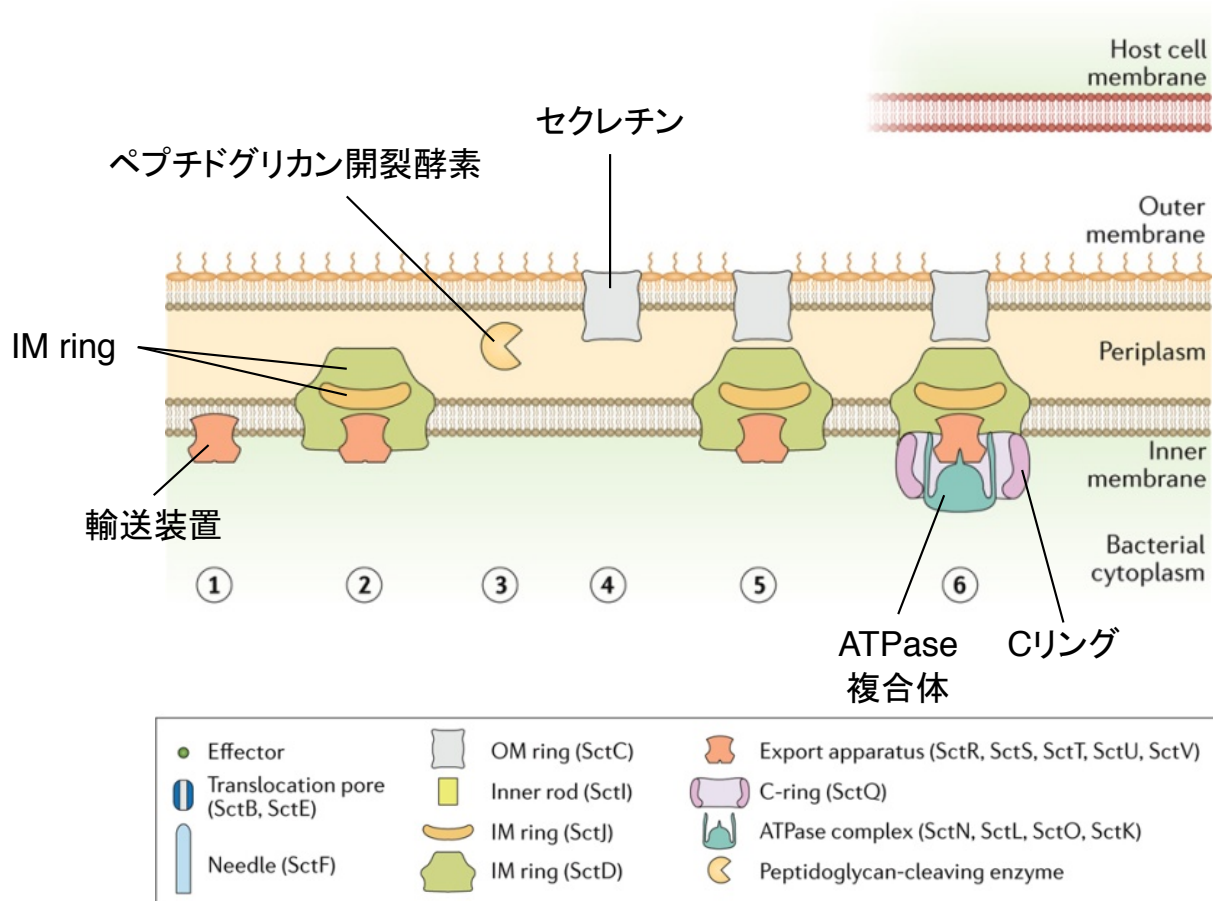


図1 *Bordetella*属細菌のIII型分泌装置のモデル図

III型分泌装置の構成タンパク質を描いたイラスト。BscIはインナーロッド(inner rod)を構成すると推測される。



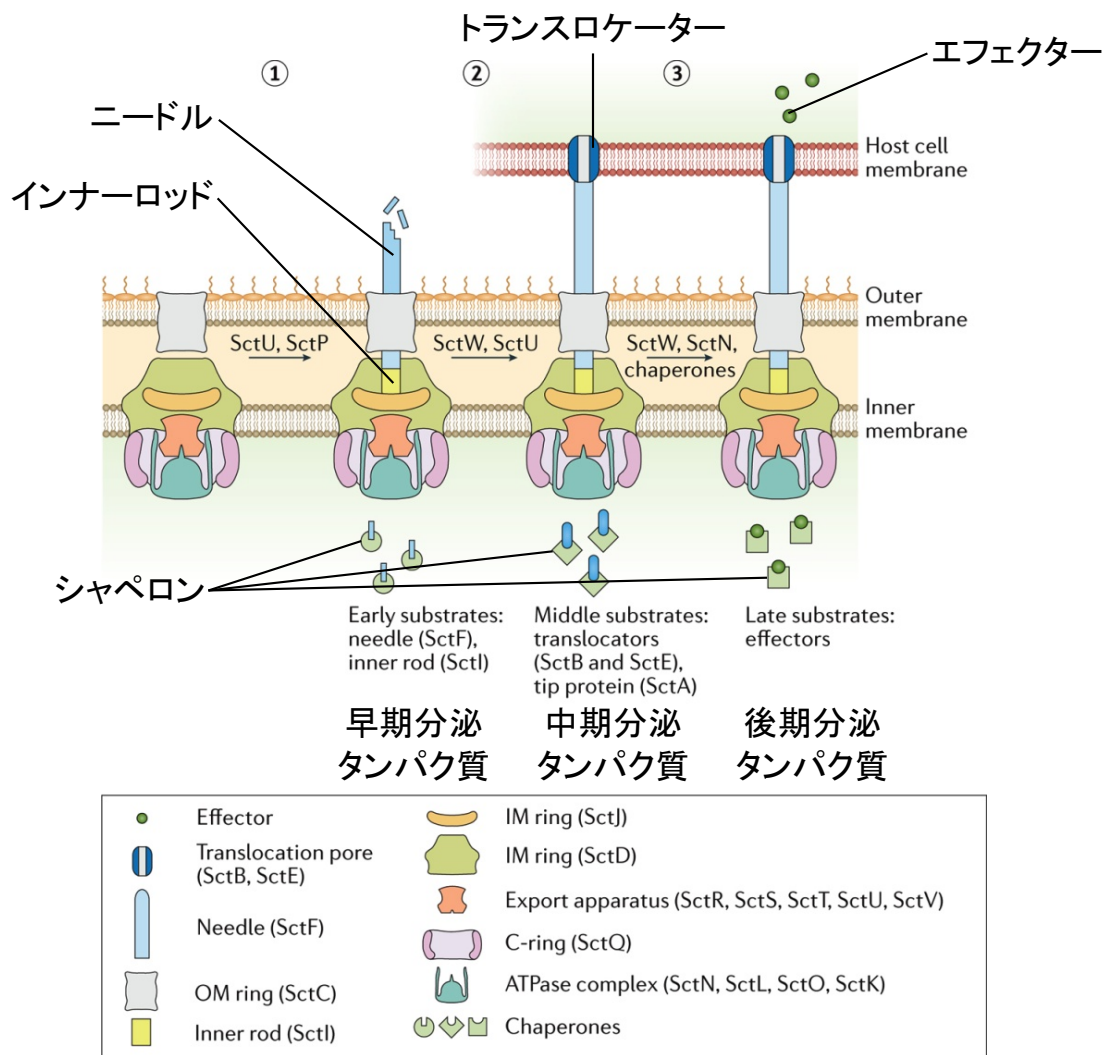
IM ring, inner membrane ring (内膜リング); OM ring, outer membrane ring (外膜リング)

下記文献内の図を一部改変:

Wanyin Deng, et al. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/nrmicro.2017.20.

## 図2 III形分泌装置における構築順序のモデル

- ① 輸送装置 (export apparatus) が最初に内膜に局在する。
- ② 内膜リング (IM ring, inner membrane rings) が輸送装置の周囲に構築される。
- ③ 内膜と外膜の間にIII型分泌装置の基部構造を局在させるために、ペプチドグリカン開裂酵素 (扇形のイラスト) はペリプラズム内のペプチドグリカン層を部分的に除去する。
- ④ その後、セクレチンは外膜に局在する。
- ⑤ セクレチンのアミノ末端により形成されたリング構造は内膜リングと直接的に接触する。
- ⑥ ATPase複合体とCリング (C-ring) は内膜リングの細胞質面に局在し、輸送装置と相互作用する。



C-ring, cytoplasmic ring (Cリング); IM ring, inner membrane ring (内膜リング); OM ring, outer membrane ring (外膜リング)

下記文献内の図を一部改変:

Wanyin Deng, et al. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro.2017.20.

### 図3 III型分泌タンパク質の分泌制御

III型分泌装置の基質は連続して起こる段階的な方法により分泌される。

① 自己プロテアーゼ (SctU) とニードルレングスルーラー (SctP) は早期分泌タンパク質 (ニードルとインナーロッド) の分泌の制御に関与し、III型分泌タンパク質のニードルは伸長する。

② ゲートキーパー SctW は SctU とともに中期分泌タンパク質 (トランスロケーター) の分泌の制御に関与し、ニードルが一定の長さに達するとトランスロケーターは分泌される。

③ SctW、SctN (ATPase)、後期分泌タンパク質に特異的なシャペロンは後期分泌タンパク質 (エフェクター) の輸送や菌体内での分解抑制などに関与し、エフェクターをニードル内部ならびに孔を通して宿主細胞内へと輸送する。

III型分泌装置から分泌されるタンパク質はシャペロンを必要とする。

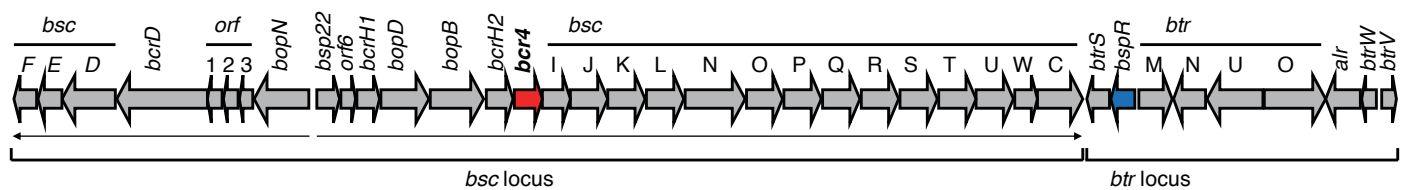
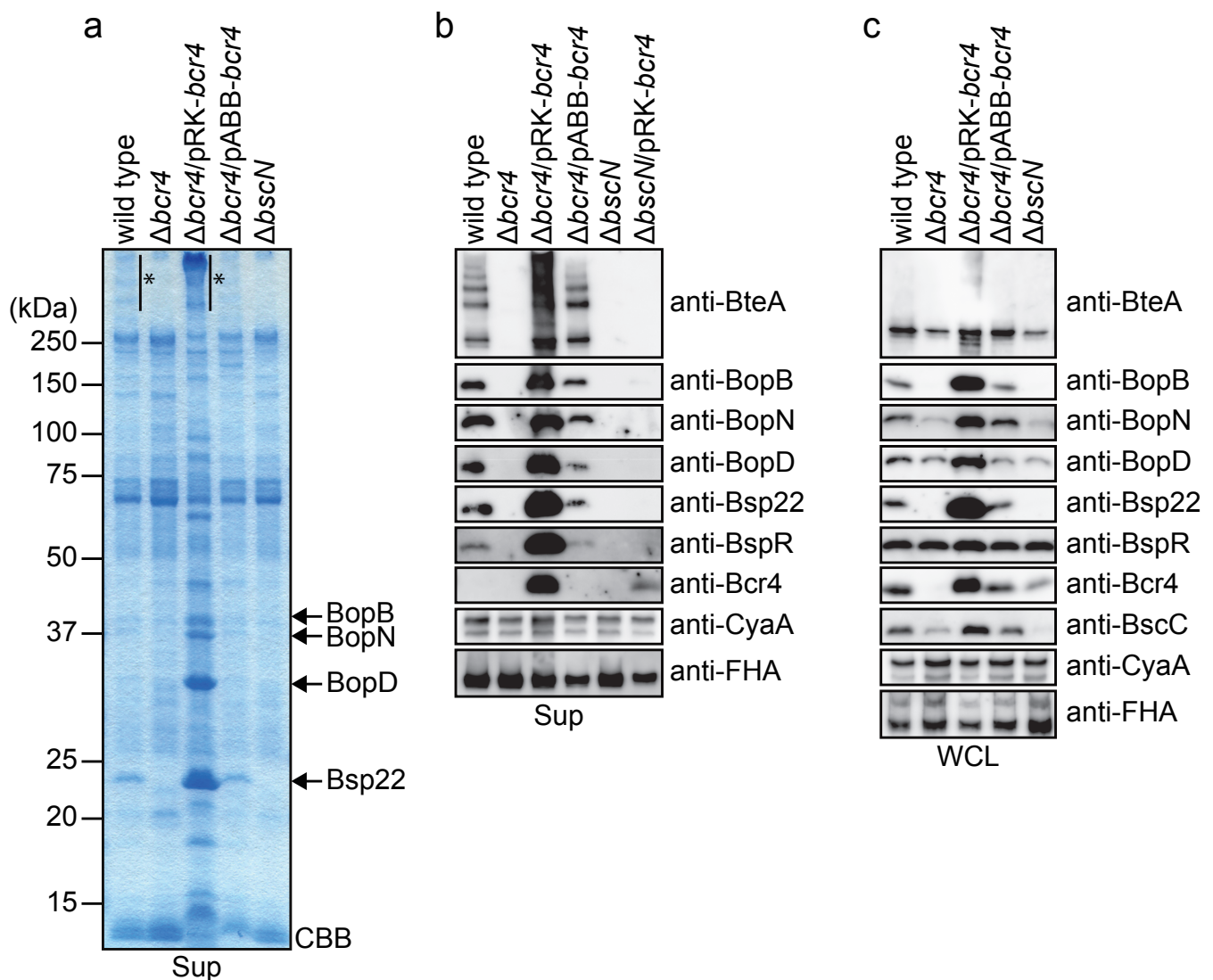


図4 *bsc*と*btr*遺伝子座に局在する遺伝子

*bsc*遺伝子座は2つの転写ユニットから成る。一つは*bopN*を含む転写ユニット(左向き矢印)、もう一つは*bsp22*、*bopD*、*bopB*、*bcr4*、*bscC*を含む転写ユニット(右向き矢印)から構成される。*bteA*は*bsc*と*btr*遺伝子座とは異なる領域に存在する。

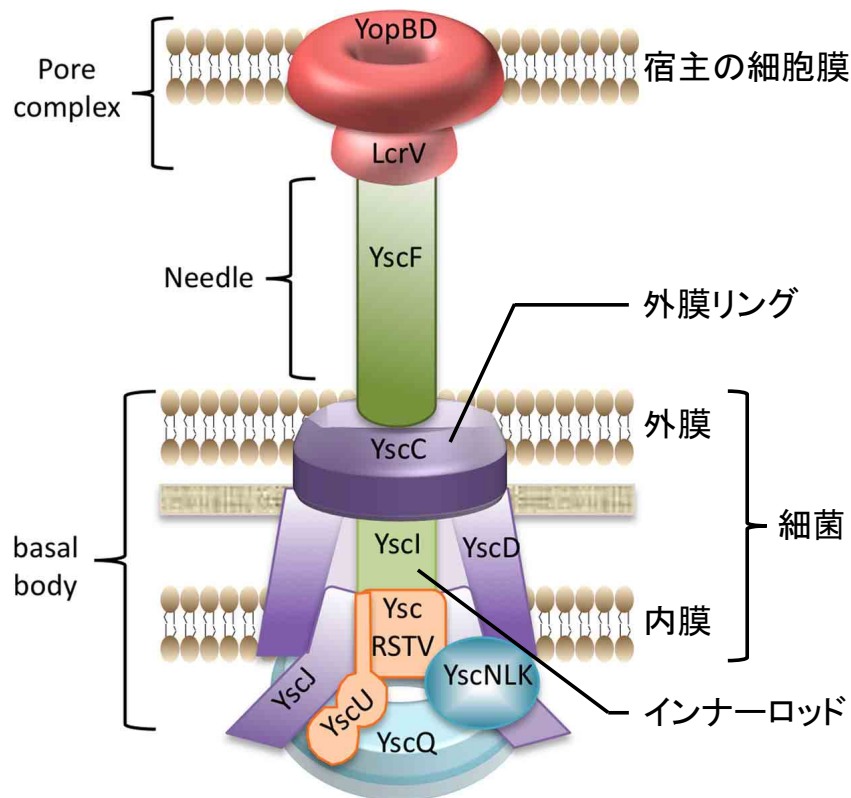


**図5 Bcr4はIII型分泌タンパク質の分泌に必須である**

(a) 培養上清画分(Sup)を12.5% SDS-PAGEで展開後、CBB染色を行った結果を示す。

\* はBteAの多量体を示す。III型分泌タンパク質は矢印で示した。

(b) 培養上清画分(Sup)ならびに(c) 全菌体画分(WCL)をSDS-PAGEで展開後、図右側に示す抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果を示す。(b) BteA、BopBに対する抗体を用いたウエスタンブロットでは過剰なシグナル強度にならないように、 $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ の培養上清画分は他のサンプルの1/30に相当する量をアプライした。一方、(c) BteA、BopB、Bcr4に対する抗体を用いたウエスタンブロットでは $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ の全菌体画分は他のサンプルの1/30、1/4、1/3に相当する量をそれぞれアプライした。



下記文献内の図を一部改変：

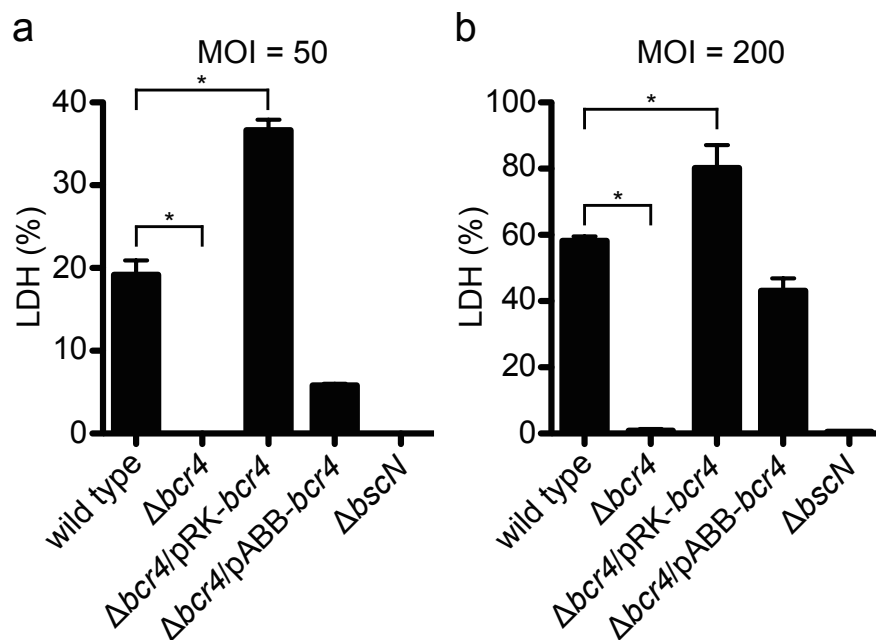
Rebecca S. Dewoody , Peter M. Merritt and Melanie M. Marketon. (2013). Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi: 10.3389/fcimb.2013.00004

## 図6 *Yersinia*属細菌のIII型分泌装置のモデル図

III型分泌装置の構成タンパク質を描いたイラスト。

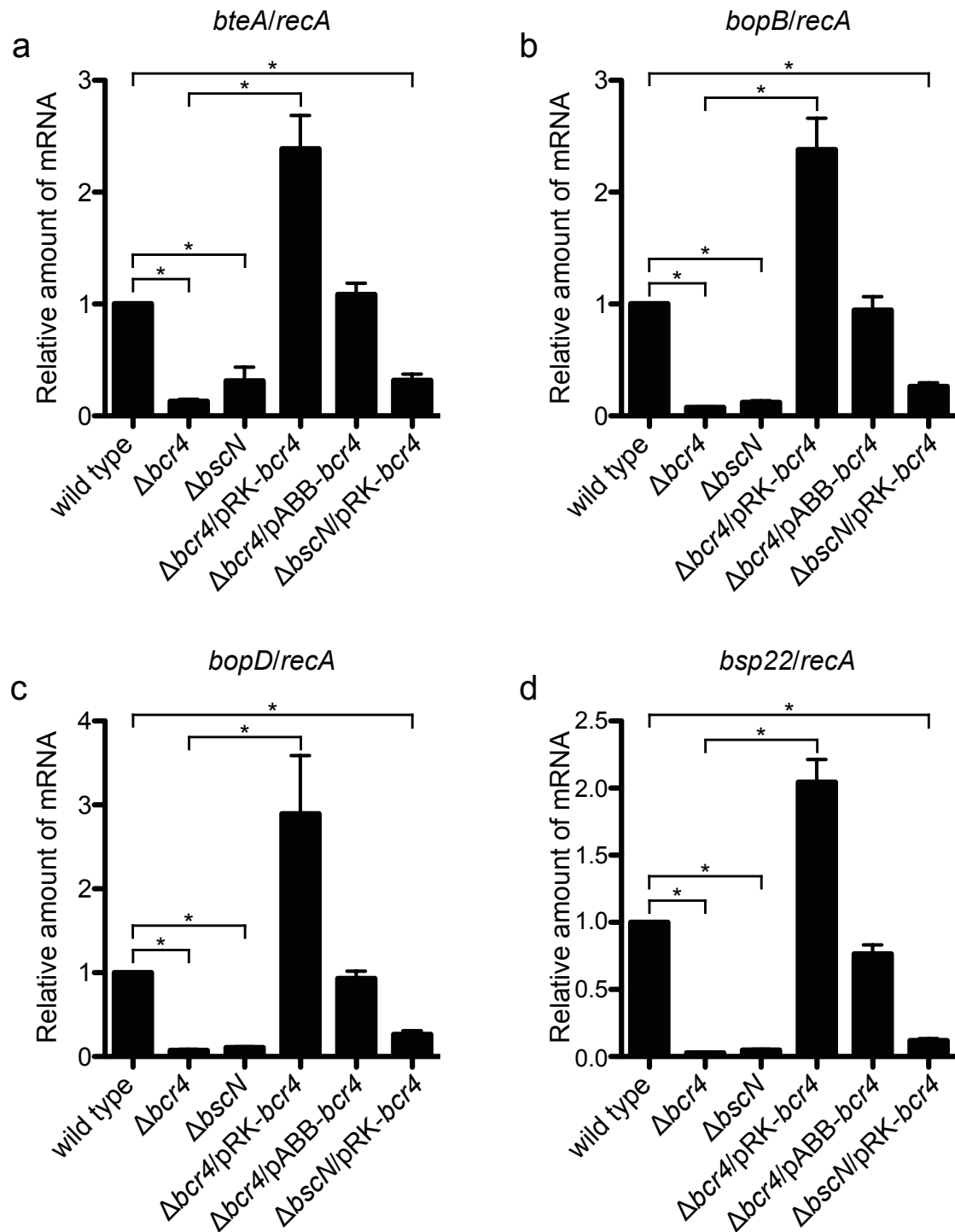
紫, 足場タンパク質: YscC, YscD, YscJ; 橙, export apparatusタンパク質: YscR, YscS, YscT, YscU, YscV; 青, 細胞質コンポーネント (cytoplasmic components): YscQ (C-ring)ならびにYscN, YscL, YscK (ATPase複合体); 緑, YscI (rod), YscF (needle); 赤, ポア複合体 (pore complex): LcrV (needle tip complex), YopB/YopD (translocation pore)





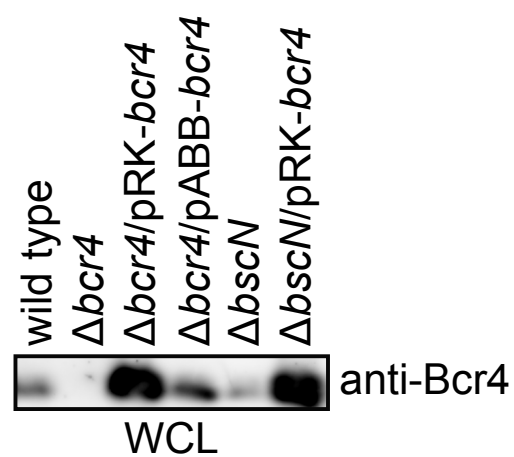
**図7 Bcr4はエフェクターBteAの宿主細胞内移行に必要である**

*B. bronchiseptica*の各菌株を(a)MOI 50 または(b)MOI 200 で、L2細胞に1時間感染させた後、培地中に遊離したLDH量を測定した結果をヒストグラムで示した。データは3回の実験結果の平均値を示す。 $*P < 0.05$ 。



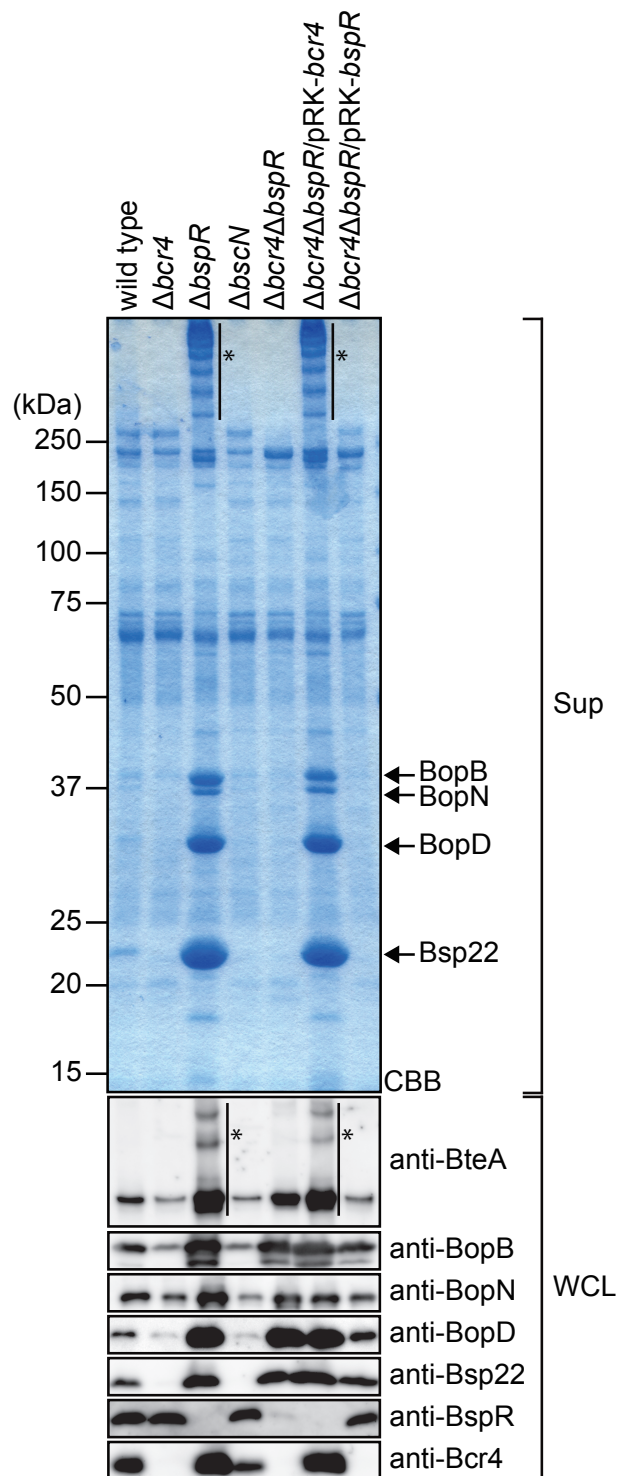
**図8 III型分泌能の喪失はIII型分泌タンパク質の転写を抑制する**

(a, b, c, d) *B. bronchiseptica*の各菌株から調製した細胞質内の全RNAを調製し、リアルタイムPCR法を行った。グラフは野生株に対する*bteA*(a)、*bopB*(b)、*bopD*(c)、*bsp22*(d)のmRNA量の相対値を示す。各mRNA量はハウスキーピング遺伝子である*recA*のmRNA量より標準化した。データは3回の実験結果の平均値を示す。\* $P < 0.05$ 。



**図9  $\Delta bscN/pRK-bcr4$ におけるBcr4の産生**

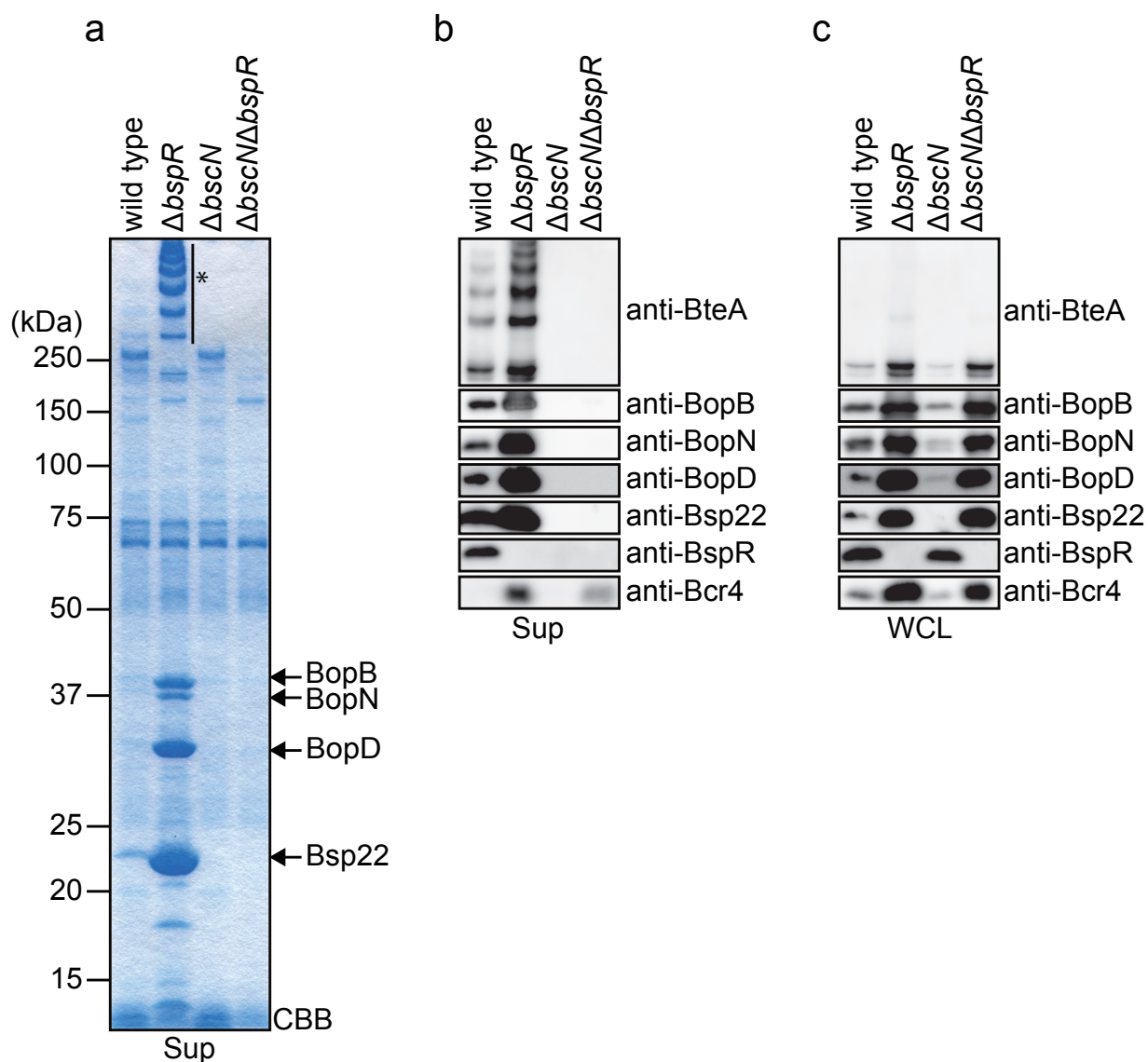
全菌体画分(WCL)をSDS-PAGEで展開後、抗Bcr4抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果を示す。



**図10  $\Delta bcr4\Delta bspR$ ではIII型分泌タンパク質の産生が促進される**

培養上清画分 (Sup) ならびに全菌体画分 (WCL) を 12.5% SDS-PAGE で展開後、CBB 染色ならびに図右側で示す抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果を示した。\* は BteA の多量体を示す。III 型分泌タンパク質は矢印で示した。

BopB、Bsp22 に対する抗体を用いたウエスタンブロットでは過剰なシグナル強度にならないように  $\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bcr4$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bspR$  の全菌体画分は他のサンプルの 1/2 に相当する量をアプライした。一方、Bcr4 に対する抗体を用いたウエスタンブロットでは  $\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bcr4$  の全菌体画分は他のサンプルの 1/5 に相当する量をアプライした。

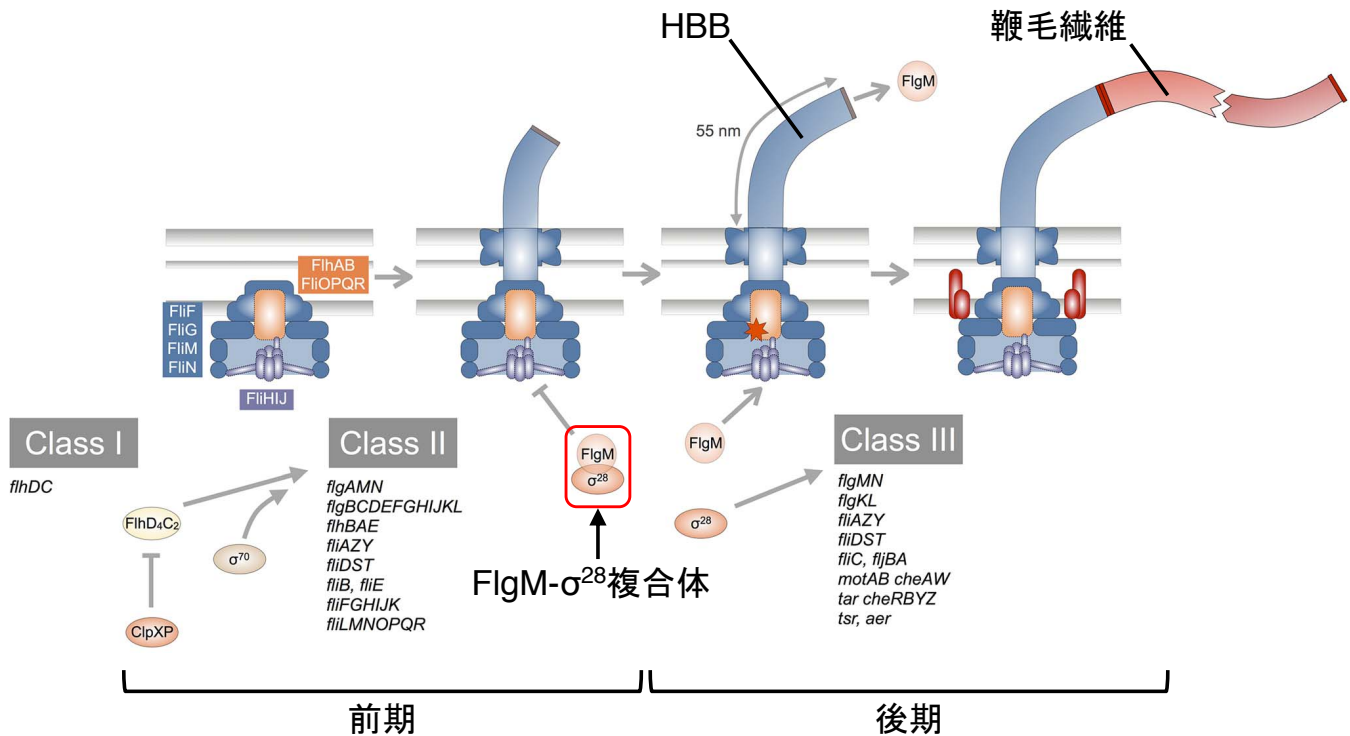


**図11  $\Delta bscN\Delta bspR$ ではIII型分泌タンパク質の産生が促進される**

(a) 培養上清画分(Sup)を12.5% SDS-PAGEで展開後、CBB染色を行った結果を示す。

\* はBteAの多量体を示す。III型分泌タンパク質は矢印で示した。

(b) 培養上清画分(Sup)ならびに(c) 全菌体画分(WCL)をSDS-PAGEにより展開後、図右側に示す抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果を示す。(b) BopD、Bsp22に対する抗体を用いたウエスタンブロットでは過剰なシグナル強度にならないように、 $\Delta bspR$ の培養上清画分は他のサンプルの1/3に相当する量をアプライした。一方、(c) Bsp22、Bcr4に対する抗体を用いたウエスタンブロットでは $\Delta bspR$ 、 $\Delta bscN\Delta bspR$ の培養上清画分は他のサンプルの1/4に相当する量をアプライした。



下記文献内の図を一部改変：

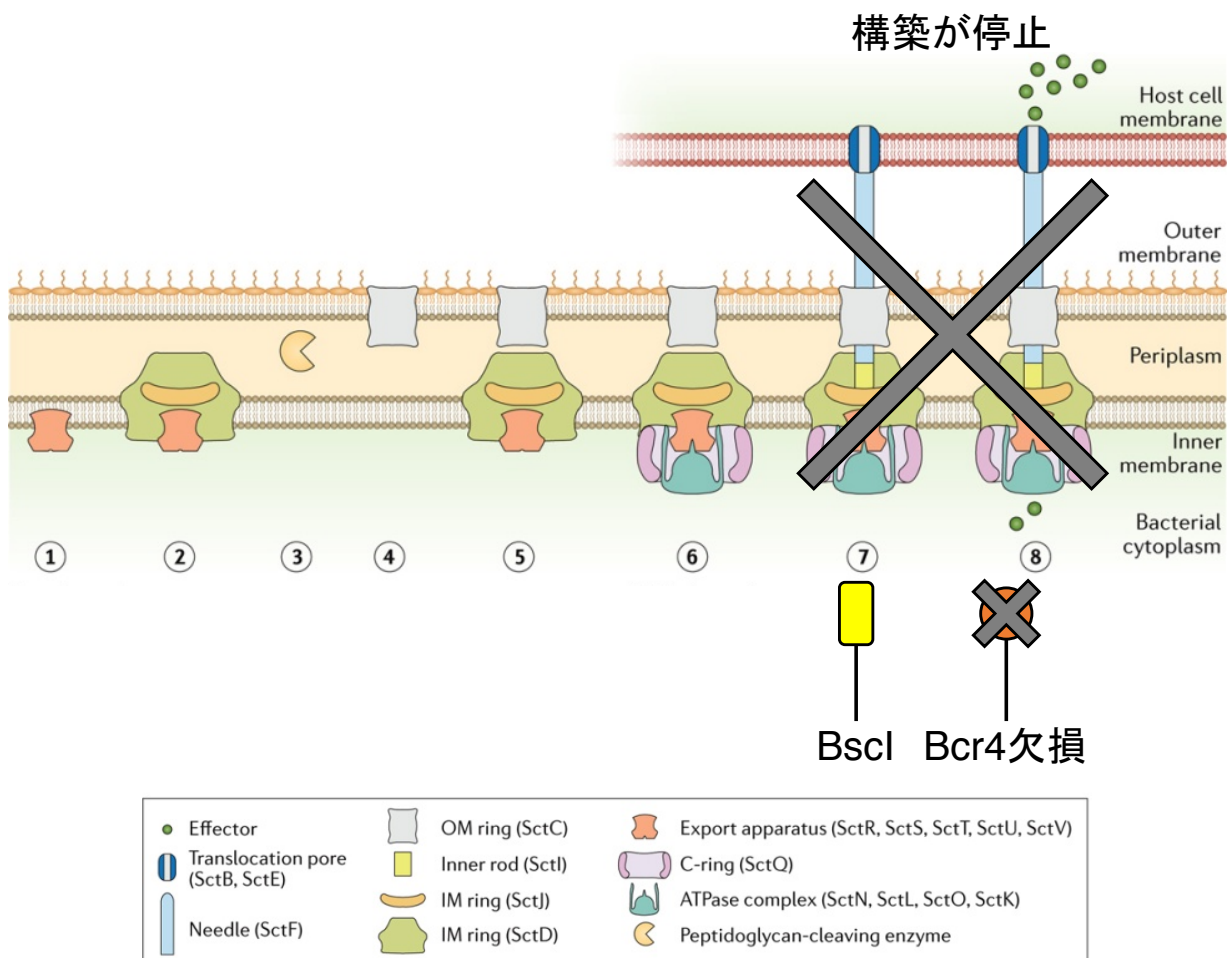
Marc Erhardt, et al. (2014) ATPase-independent type-III protein secretion in *Salmonella enterica*. *PloS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1004800.

## 図12 *Salmonella*属細菌の鞭毛構築

鞭毛の形成は前期と後期に分かれる。前期では鞭毛のフック基部(HBB)の形成、後期では鞭毛繊維の形成が行われる。

前期：HBBが構築されている間、FlgMは鞭毛繊維構成因子をコードする遺伝子の転写を促進するシグマ因子 $\sigma^{28}$ (FliA)と相互作用することにより、HBB完成後に必要とされる鞭毛繊維構成因子をコードする遺伝子群の転写を抑制する。

後期：HBB完成後、菌体からFlgMが分泌されることにより $\sigma^{28}$ が鞭毛繊維構成因子の遺伝子を転写し、鞭毛繊維が構築される。



下記文献内の図を一部改変:

Wanyin Deng, et al. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro.2017.20.

### 図13 Bcr4が欠損していた場合のIII型分泌装置構築モデル

BscIのシャペロンであるBcr4が欠損している場合、BscIの安定性が低下し、また分泌装置内にBscIが輸送されないため、III型分泌装置の構築はステップ⑥で停止すると考えられる。

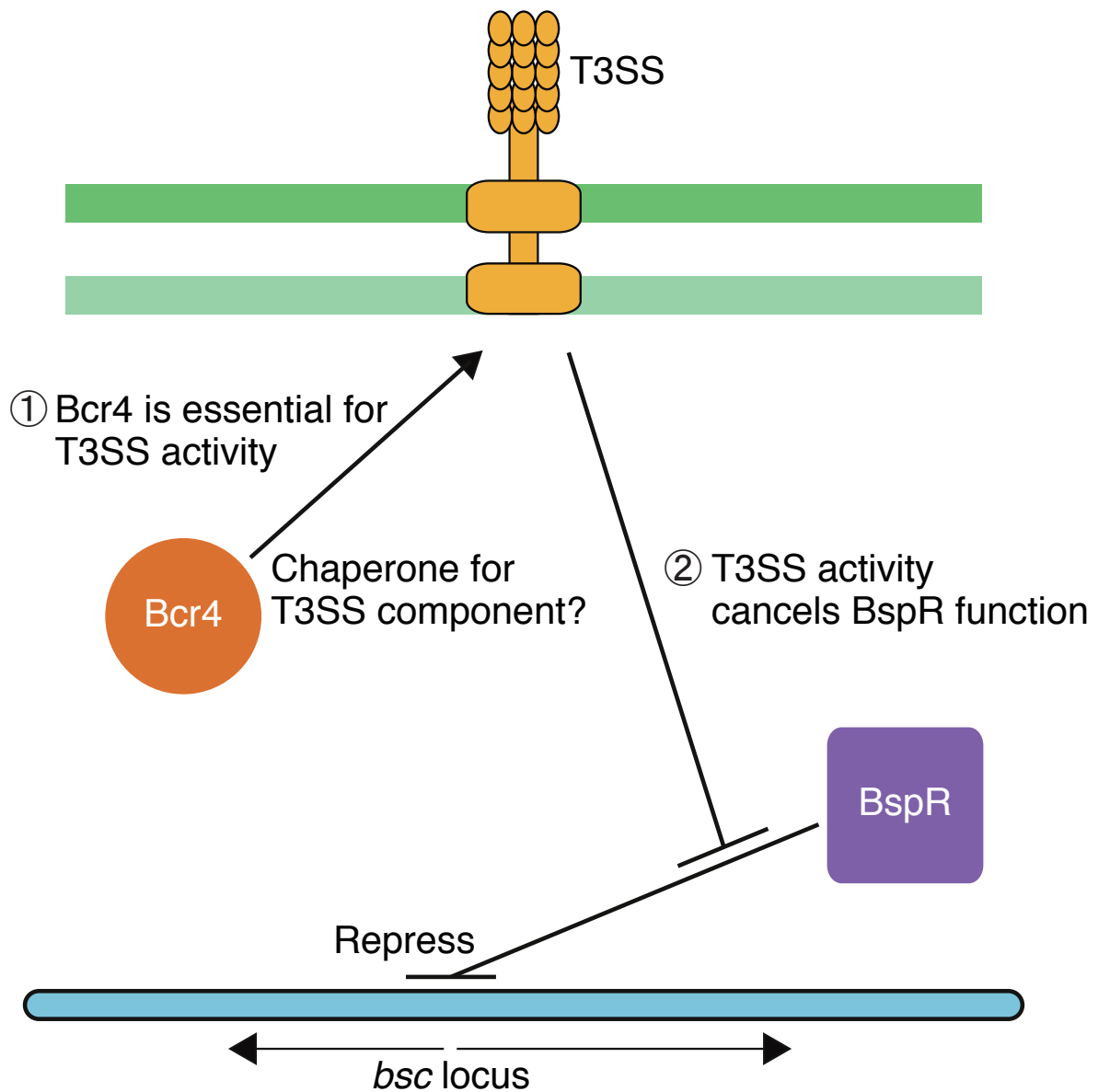


図14 Bcr4とBspRの機能に関する作業仮説

①Bcr4はIII型分泌装置の機能にとって必要な因子であり、②III型分泌装置が機能的な条件下においてBspRの転写抑制効果が解除され、III型分泌タンパク質の産生が促進されることが推察された。



## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました北里大学大学院感染制御科学府細菌感染制御学研究室 阿部章夫博士に厚く御礼申し上げます。また、貴重なるご指導、ご助言を賜りました同研究室の桑江朝臣博士、薬学部微生物学教室 岡田信彦博士、ウイルス感染制御学研究室1 片山和彦博士、感染症学研究室 高橋孝博士、ウイルス感染制御学研究室2 森川裕子博士に厚く御礼申し上げます。最後に、研究生生活において数々のご配慮、ご協力下さいました北里大学生命科学研究所の皆様ならびに家族に深く感謝致します。

2019 年 3 月

西村隆太郎

## 8. 引用文献

- 1 Mattoo, S. & Cherry, J.D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev, **18**: 326-82.
- 2 Goodnow, R.A. (1980) Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev, **44**: 722-38.
- 3 Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G. & Maskell, D.J. (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet, **35**: 32-40.
- 4 Stevens, A., Ray, D., Alansari, A., Hajeer, A., Thomson, W., Donn, R., Ollier, W.E., Worthington, J. & Davis, J.R. (2001) Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, **44**: 2358-66.
- 5 Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D. & Falkow, S. (1989) Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. Nature, **338**: 266-9.
- 6 Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. Curr Opin Microbiol, **3**: 165-70.
- 7 Uhl, M.A. & Miller, J.F. (1994) Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. Proc Natl Acad Sci U S A, **91**: 1163-7.
- 8 Boucher, P.E., Murakami, K., Ishihama, A. & Stibitz, S. (1997) Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the fha promoter. J Bacteriol, **179**:

- 1755-63.
- 9 Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1991) Differential response of the bvg virulence regulon of *Bordetella pertussis* to MgSO<sub>4</sub> modulation. *J Bacteriol*, **173**: 7401-4.
  - 10 Akerley, B.J., Monack, D.M., Falkow, S. & Miller, J.F. (1992) The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*, **174**: 980-90.
  - 11 Abe, A., Matsuzawa, T. & Kuwae, A. (2005) Type-III effectors: sophisticated bacterial virulence factors. *C R Biol*, **328**: 413-28.
  - 12 Finlay, B.B. & Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, **276**: 718-25.
  - 13 Fennelly, N.K., Sisti, F., Higgins, S.C., Ross, P.J., Van Der Heide, H., Mooi, F.R., Boyd, A. & Mills, K.H. (2008) *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun*, **76**: 1257-66.
  - 14 Deng, W., Marshall, N.C., Rowland, J.L., McCoy, J.M., Worrall, L.J., Santos, A.S., Strynadka, N.C.J. & Finlay, B.B. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, **15**: 323-37.
  - 15 Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 379-433.
  - 16 Ibarra, J.A. & Steele-Mortimer, O. (2009) *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol*, **11**: 1579-86.
  - 17 Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. & Abe, A. (2006) Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **188**: 2801-11.
  - 18 Kurushima, J., Nagai, T., Nagamatsu, K. & Abe, A. (2010) EspJ effector in enterohemorrhagic *E. coli* translocates into host mitochondria via an atypical mitochondrial targeting signal. *Microbiol Immunol*, **54**: 371-9.
  - 19 Kuwae, A., Matsuzawa, T., Ishikawa, N., Abe, H., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. & Abe, A. (2006) BopC is a novel type III effector secreted by *Bordetella bronchiseptica* and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death. *J Biol Chem*, **281**: 6589-600.
  - 20 Kuwae, A., Momose, F., Nagamatsu, K., Suyama, Y. & Abe, A. (2016)

- BteA Secreted from the *Bordetella bronchiseptica* Type III Secetion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. PLoS One, **11**: e0148387.
- 21 Panina, E.M., Mattoo, S., Griffith, N., Kozak, N.A., Yuk, M.H. & Miller, J.F. (2005) A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. Mol Microbiol, **58**: 267-79.
  - 22 French, C.T., Panina, E.M., Yeh, S.H., Griffith, N., Arambula, D.G. & Miller, J.F. (2009) The *Bordetella* type III secretion system effector BteA contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts. Cell Microbiol, **11**: 1735-49.
  - 23 Kuwae, A., Ohishi, M., Watanabe, M., Nagai, M. & Abe, A. (2003) BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. Cell Microbiol, **5**: 973-83.
  - 24 Nogawa, H., Kuwae, A., Matsuzawa, T. & Abe, A. (2004) The type III secreted protein BopD in *Bordetella bronchiseptica* is complexed with BopB for pore formation on the host plasma membrane. J Bacteriol, **186**: 3806-13.
  - 25 Nagamatsu, K., Kuwae, A., Konaka, T., Nagai, S., Yoshida, S., Eguchi, M., Watanabe, M., Mimuro, H., Koyasu, S. & Abe, A. (2009) *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. J Exp Med, **206**: 3073-88.
  - 26 Abe, A., Nishimura, R. & Kuwae, A. (2017) *Bordetella* effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues. Microbiol Immunol, **61**: 206-14.
  - 27 Medhekar, B., Shrivastava, R., Mattoo, S., Gingery, M. & Miller, J.F. (2009) *Bordetella* Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. Mol Microbiol, **71**: 492-504.
  - 28 Kurushima, J., Kuwae, A. & Abe, A. (2012) Btc22 chaperone is required for secretion and stability of the type III secreted protein Bsp22 in *Bordetella bronchiseptica*. FEMS Microbiol Lett, **331**: 144-51.
  - 29 Kurushima, J., Kuwae, A. & Abe, A. (2012) The type III secreted protein BspR regulates the virulence genes in *Bordetella bronchiseptica*. PLoS One, **7**: e38925.

- 30 Abe, A., Nishimura, R., Tanaka, N., Kurushima, J. & Kuwae, A. (2015) The *Bordetella* Secreted Regulator BspR Is Translocated into the Nucleus of Host Cells via Its N-Terminal Moiety: Evaluation of Bacterial Effector Translocation by the *Escherichia coli* Type III Secretion System. PLoS One, **10**: e0135140.
- 31 Ahuja, U., Shokeen, B., Cheng, N., Cho, Y., Blum, C., Coppola, G. & Miller, J.F. (2016) Differential regulation of type III secretion and virulence genes in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* by a secreted anti-sigma factor. Proc Natl Acad Sci U S A, **113**: 2341-8.
- 32 Kozak, N.A., Mattoo, S., Foreman-Wykert, A.K., Whitelegge, J.P. & Miller, J.F. (2005) Interactions between partner switcher orthologs BtrW and BtrV regulate type III secretion in *Bordetella*. J Bacteriol, **187**: 5665-76.
- 33 Mattoo, S., Yuk, M.H., Huang, L.L. & Miller, J.F. (2004) Regulation of type III secretion in *Bordetella*. Mol Microbiol, **52**: 1201-14.
- 34 Blatch, G.L. & Lasse, M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. Bioessays, **21**: 932-9.
- 35 Schoch, P.E. & Cunha, B.A. (1988) Nosocomial *Achromobacter xylosoxidans* infections. Infect Control Hosp Epidemiol, **9**: 84-7.
- 36 Yang, H., Shan, Z., Kim, J., Wu, W., Lian, W., Zeng, L., Xing, L. & Jin, S. (2007) Regulatory role of PopN and its interacting partners in type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, **189**: 2599-609.
- 37 Day, J.B. & Plano, G.V. (2000) The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. J Bacteriol, **182**: 1834-43.
- 38 Broms, J.E., Edqvist, P.J., Carlsson, K.E., Forsberg, A. & Francis, M.S. (2005) Mapping of a YscY binding domain within the LcrH chaperone that is required for regulation of *Yersinia* type III secretion. J Bacteriol, **187**: 7738-52.
- 39 Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. (1991) Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect Immun, **59**: 4310-7.
- 40 Horiguchi, Y., Sugimoto, N. & Matsuda, M. (1993) Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. Infect Immun, **61**: 3611-5.
- 41 Cotter, P.A. & Miller, J.F. (1994) BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica*

- in a rabbit model. *Infect Immun*, **62**: 3381-90.
- 42 Cotter, P.A. & Miller, J.F. (1997) A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol*, **24**: 671-85.
  - 43 Martinez De Tejada, G., Miller, J.F. & Cotter, P.A. (1996) Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol*, **22**: 895-908.
  - 44 Stainer, D.W. & Scholte, M.J. (1970) A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol*, **63**: 211-20.
  - 45 Watanabe, M., Nagai, M., Funaishi, K. & Endoh, M. (2000) Efficacy of chemically cross-linked antigens for acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, **19**: 1199-203.
  - 46 Dewoody, R.S., Merritt, P.M. & Marketon, M.M. (2013) Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front Cell Infect Microbiol*, **3**: 4.
  - 47 Kuwae, A., Yoshida, S., Tamano, K., Mimuro, H., Suzuki, T. & Sasakawa, C. (2001) *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. Functional analysis of IpaC. *J Biol Chem*, **276**: 32230-9.
  - 48 Lefebvre, M.D. & Galan, J.E. (2014) The inner rod protein controls substrate switching and needle length in a *Salmonella* type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**: 817-22.
  - 49 Ross, J.A. & Plano, G.V. (2011) A C-terminal region of *Yersinia pestis* YscD binds the outer membrane secretin YscC. *J Bacteriol*, **193**: 2276-89.
  - 50 Romo-Castillo, M., Andrade, A., Espinosa, N., Monjaras Feria, J., Soto, E., Diaz-Guerrero, M. & Gonzalez-Pedrajo, B. (2014) EscO, a functional and structural analog of the flagellar FliJ protein, is a positive regulator of EscN ATPase activity of the enteropathogenic *Escherichia coli* injectisome. *J Bacteriol*, **196**: 2227-41.
  - 51 Erhardt, M., Namba, K. & Hughes, K.T. (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**: a000299.
  - 52 Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Wozniak, C.E. & Hughes, K.T. (2006) A

- little gene with big effects: a serT mutant is defective in flgM gene translation. J Bacteriol, **188**: 297-304.
- 53 Erhardt, M., Mertens, M.E., Fabiani, F.D. & Hughes, K.T. (2014) ATPase-independent type-III protein secretion in *Salmonella enterica*. PLoS Genet, **10**: e1004800.
  - 54 Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. & Lino, T. (1992) A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. Mol Microbiol, **6**: 3149-57.
  - 55 Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J. & Karlinsey, J.E. (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. Science, **262**: 1277-80.
  - 56 Kutsukake, K. (1994) Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet, **243**: 605-12.
  - 57 Iriarte, M. & Cornelis, G.R. (1999) Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia yop* virulon. J Bacteriol, **181**: 675-80.
  - 58 Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T. & Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. Proc Natl Acad Sci U S A, **91**: 10493-7.
  - 59 Cao, S.Y., Liu, W.B., Tan, Y.F., Yang, H.Y., Zhang, T.T., Wang, T., Wang, X.Y., Song, Y.J., Yang, R.F. & Du, Z.M. (2017) An Interaction between the Inner Rod Protein YscI and the Needle Protein YscF Is Required to Assemble the Needle Structure of the *Yersinia* Type Three Secretion System. J Biol Chem, **292**: 5488-98.
  - 60 Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. & Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci U S A, **98**: 11638-43.