

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

感染制御科学専攻 感染制御・免疫学履修コース・分子細菌学

西村 隆太郎

【背景と目的】

百日咳菌を含む *Bordetella* 属細菌は、多くのグラム陰性菌に保存されている III 型分泌装置 (T3SS) をもつ (図1)。T3SS 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。本研究は、*Bordetella* 属細菌の感染機構を分子レベルで解明し、薬剤開発の分子基盤を構築することを目的として、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。

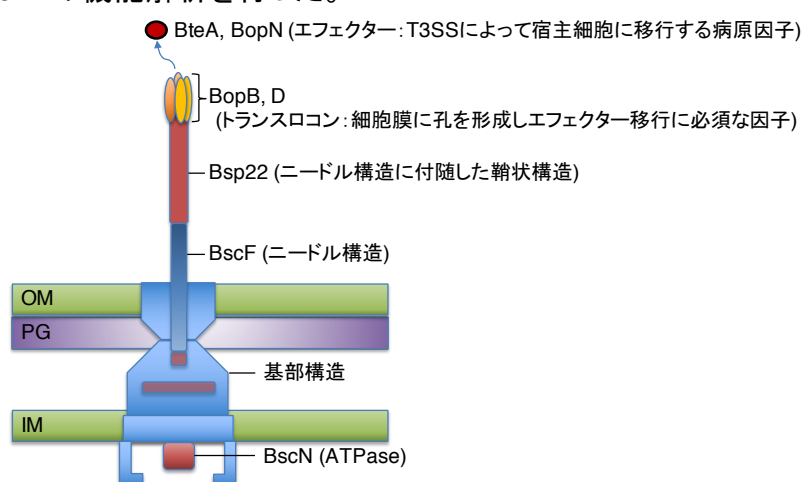


図1 III型分泌装置の構成

【方法】

本実験で使用した菌株は表1に示した。*B. bronchiseptica* は Bordet-Gengou (BG) 寒天培地で2日間、37℃で培養し、シングルコロニーを白金耳で釣菌した。これを Stainer-Scholte (SS) 液体培地に懸濁し、600 nm での吸光度が 0.2 になるよう調整後、37℃で18時間振盪培養した。RNA 精製においては、SS 液体培地を使用し、37℃で7時間振盪培養した。

表1 菌株

| 菌株名 | 遺伝子型 |
|-----------------------------------|--|
| S798 | <i>B. bronchiseptica</i> 野生株 |
| $\Delta bcr4$ | S798 <i>bcr4</i> 欠損株 |
| $\Delta bscN$ | S798 <i>bscN</i> 欠損株: III 型分泌能喪失株 |
| $\Delta bspR$ | S798 <i>bspR</i> 欠損株 |
| $\Delta bcr4\Delta bspR$ | S798 <i>bcr4 bspR</i> の二重欠損株 |
| $\Delta bscN\Delta bspR$ | S798 <i>bscN bspR</i> の二重欠損株 |
| $\Delta bcr4/pRK-bcr4$ | $\Delta bcr4$ に <i>bcr4</i> を過剰発現させた株 |
| $\Delta bcr4/pABB-bcr4$ | $\Delta bcr4$ に <i>bcr4</i> を相補した株 |
| $\Delta bscN/pRK-bcr4$ | $\Delta bscN$ に <i>bcr4</i> を過剰発現させた株 |
| $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bcr4$ | $\Delta bcr4\Delta bspR$ に <i>bcr4</i> を過剰発現させた株 |
| $\Delta bcr4\Delta bspR/pRK-bspR$ | $\Delta bcr4\Delta bspR$ に <i>bspR</i> を相補した株 |

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 μ 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 μ l 添加後、氷上で 15 分間冷却した。4°C、15000 rpm、5 分間の遠心を行ない上清を除去した。得られた沈渣に 5 μ l の 2 M Tris-base と 95 μ 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) 上清画分の調製

B. bronchiseptica の培養液を遠心し得られた上清の 1 ml を、孔径 0.22 μ m フィルター (Millipore) を用いて濾過した。そこに 5%デオキシコール酸を 5 μ l 添加し、さらに 100%トリクロロ酢酸を 100 μ 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 μ l の 2 M Tris-base と 13 μ l の 2xSDS sample buffer を添加し、95°C で 3 分間加熱して試料を得た。

RT-PCR

B. bronchiseptica の菌体より 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 Real-time PCR 反応を行った。

bteA、*bopB*、*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-*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。

【結果】

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 培地で培養すると III 型分泌タンパク質、毒素、接着因子など、多くの病原因子が分泌されることが知られている。気管支敗血症菌の III 型分泌タンパク質の産生と分泌に Bcr4 が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 ($\Delta bscN/pRK-bcr4$) を培養した。各菌株の培養上清・全菌体画分を調製し、SDS-PAGE で展開後、CBB 染色ならびに BteA、BopB、Bsp22、BspR、Bcr4 に対する抗体を用いうエスタンプロット法で解析した (図 2)。

その結果、Bcr4 欠損株 ($\Delta bcr4$) においては III 型分泌能喪失株 ($\Delta bscN$) と同様に、T3SS 依存的なタンパク質の分泌が認められず菌体内での III 型分泌タンパク質の産生量も著しく低下した。その一方で、Bcr4 過剰発現株 ($\Delta bcr4/pRK-bcr4$) における III 型分泌タンパク質の分泌量と産生量は野生株と比べて著しく増加した。また Bcr4 過剰発現・III 型分泌能喪失株 ($\Delta bscN/pRK-bcr4$) の III 型分泌タンパク質の分泌は認められなかった (図 2b)。

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 III 型分泌タンパク質の産生が抑制

されること、過剰な Bcr4 の産生は III 型分泌タンパク質の産生を高めることを明らかにした。

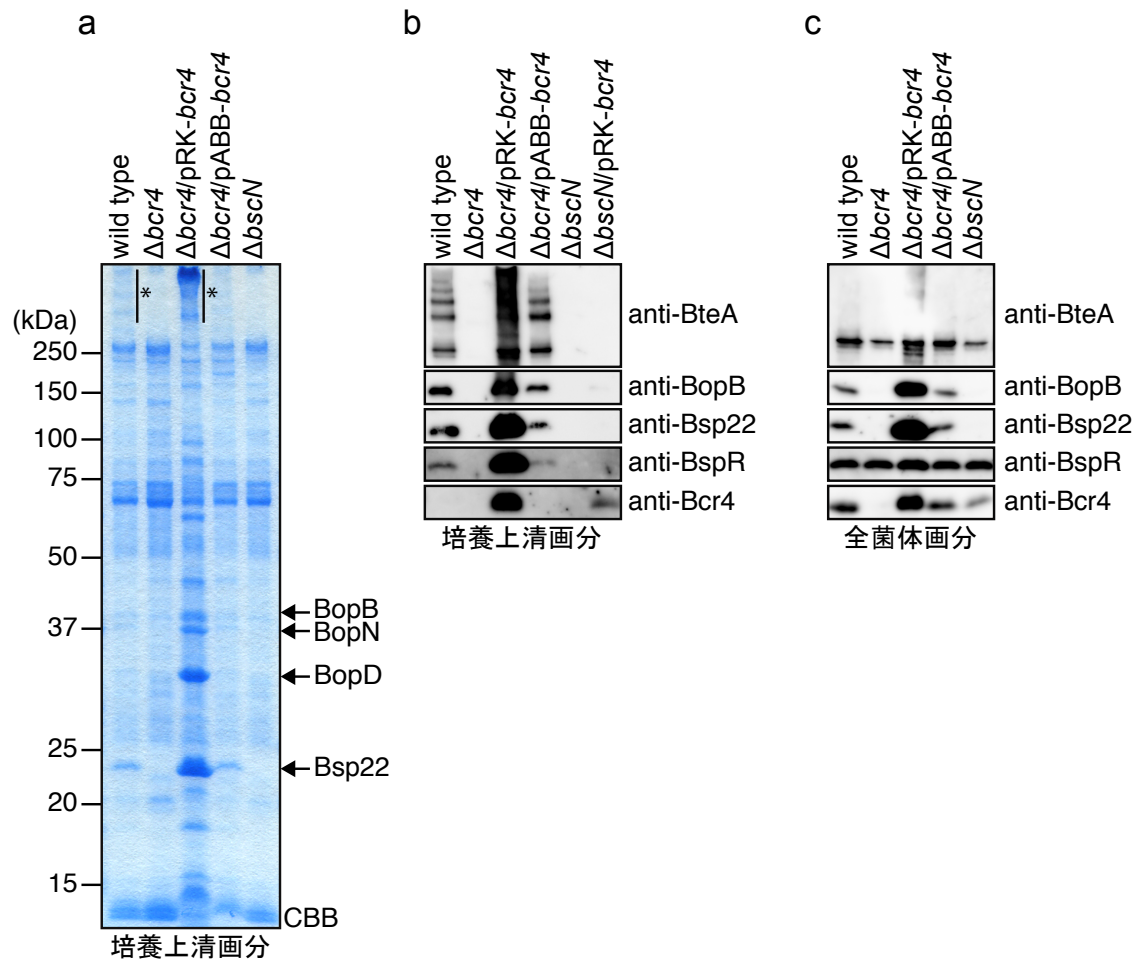


図 2 Bcr4 は III 型分泌タンパク質の分泌に必須である

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

上記の実験より、 $\Delta bcr4$ や $\Delta bscN$ のような III 型分泌能の喪失した株では III 型分泌タンパク質の産生量が低下することを明らかにした。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* から全 RNA を調製し、Real-time PCR 法を用いて mRNA 量を測定した(図 3)。その結果、野生株と III 型分泌能喪失株($\Delta bcr4$ 、 $\Delta bscN$ 、 $\Delta bscN/pRK-bcr4$)を比較した場合、*bteA*、*bopB*、*bsp22* の III 型分泌タンパク質の mRNA 量は有意に減少した。一方、Bcr4 過剰発現株($\Delta bcr4/pRK-bcr4$)における *bteA*、*bopB*、*bsp22* の mRNA 量は、Bcr4 欠損株($\Delta bcr4$)と比べて有意に増加した。

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抑制されることを明らかにした。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。

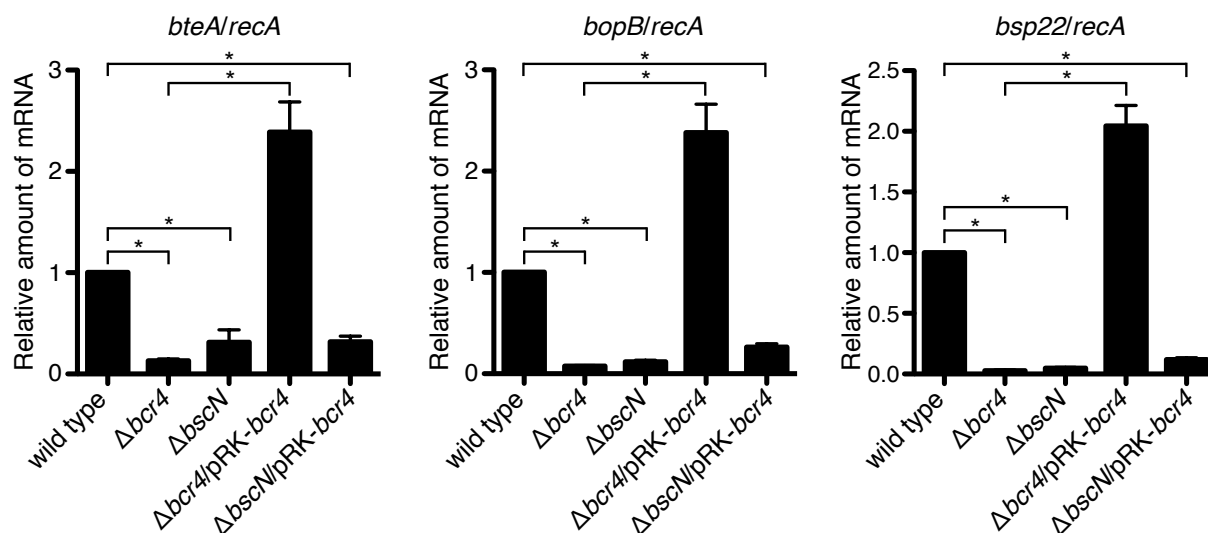


図3 III型分泌能の喪失はIII型分泌タンパク質の転写を抑制する

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 はシグマ因子の一つで、III 型分泌タンパク質をコードする *bsc* 遺伝子座(図 4)の転写を担っている。一方、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。

$\Delta bcr4$ において III 型分泌タンパク質の産生量ならびに mRNA 量は野生株と比較して減少していたことから、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、野生株ならびに各欠損株の培養液より上清画分を調製し SDS-PAGE で展開後、CBB 染色を行った(図 5)。

その結果、Bcr4 の過剰発現株($\Delta bcr4 \Delta bspR$ /pRK-*bcr4*)は III 型分泌タンパク質の分泌が認められた一方で、Bcr4 欠損株($\Delta bcr4$ 、 $\Delta bcr4 \Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4 \Delta bspR$ /pRK-*bspR*)ならびに III 型分泌能喪失株($\Delta bscN$)は、III 型分泌タンパク質の分泌が認められなかった。さらに各菌株より全菌体画分を調製しウエスタンブロット法で III 型分泌タンパク質の産生量を調べたところ、野生株と比較して BspR の欠損ではいずれの株($\Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4 \Delta bspR$ 、 $\Delta bcr4 \Delta bspR$ /pRK-*bcr4*)においても全菌体画分における III 型分泌タンパク質の産生量が増大していた。これらのことから、抗シグマ因子 BspR の欠損で *bsc* 遺伝子座の転写が増大することが示唆された。

以上の結果、Bcr4 欠損において抗シグマ因子である BspR の作用が増強され、*bsc* 遺伝子座の転写が強く抑制されることが示唆された。

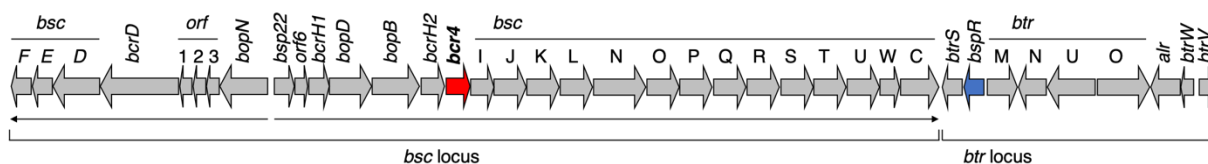


図4 *bsc*と*btr*遺伝子座

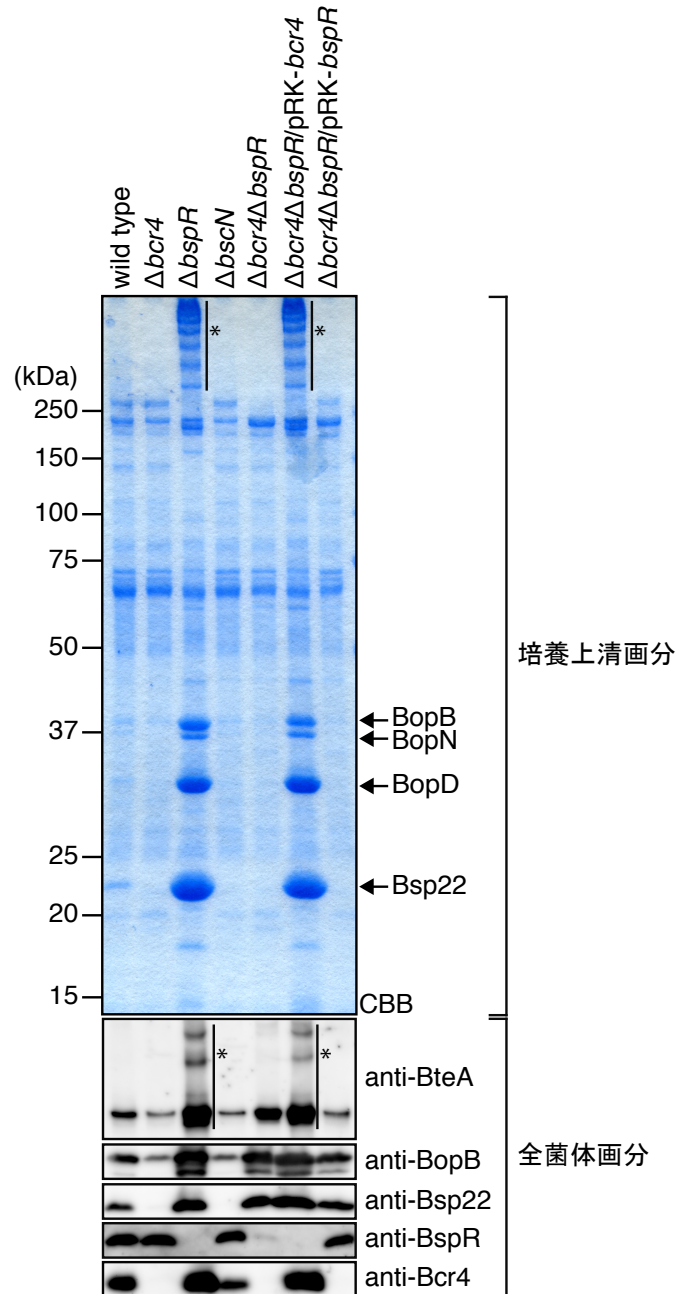


図 5 $\Delta bcr4\Delta bspR$ では III 型分泌タンパク質の産生が促進される

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

これまでの実験より、Bcr4 の欠損では 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、さらに、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を明らかにしてきた。これらの結果をさらに精査するために、Bcr4 欠損株と同様に III 型分泌能の喪失を引き起こす BscN 欠損株を用いて、BspR の作用が増強されるのかについて実験を行った(図 6)。

その結果、Bcr4 欠損株と同様に、BscN 欠損株($\Delta bscN$ 、 $\Delta bscN\Delta bspR$)において III 型分泌タンパク質の菌体外分泌が阻害されることを明らかにした。さらに、ウエスタンブロット法の結果より(図 6c)、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、Bsp22) の産生量は Bcr4 と BspR の二重欠損株 ($\Delta bcr4\Delta bspR$) (図 5)と同様に著しく増加した。これらの結果、Bcr4 以外の III 型分泌装置の喪失によっても、BspR の作用が増強されることが強く示唆された。

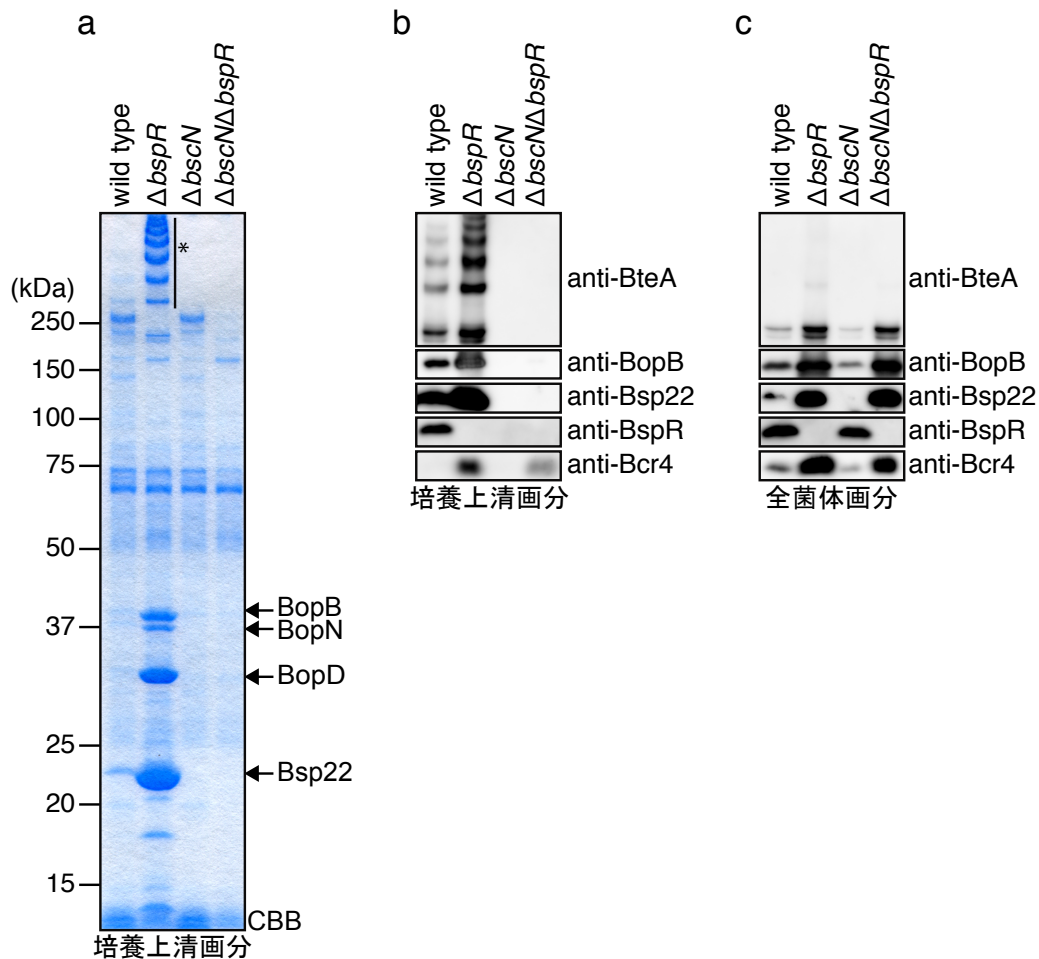


図 6 $\Delta bscN\Delta bspR$ では III 型分泌タンパク質の産生が促進される

【考察】

本研究結果により、Bcr4 は 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明らかとなった。さらに、Bcr4 によって BspR による III 型分泌タンパク質の産生抑制が解除されることが推察された(図 7)。

Bcr4 は III 型分泌タンパク質の産生を正に制御することが示唆されたが、 $\Delta bcr4\Delta bspR$ において 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ことから、Bcr4 は BspR との相互作用することで BspR の機能を抑制することが示唆された。この仮説を検証するために、FLAG タグを付加した BspR を産生する $\Delta bspR$ の菌体ライセートを調製し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行った。しかしながら、沈降画分において Bcr4 は検出されず、Bcr4-BspR の相互作用に関してはさらなる検証が必要である。

一方で、III 型分泌能喪失株に Bcr4 を過剰に発現($\Delta bscN/pRK-bcr4$)させても III 型分泌タンパク質の転写量は、III 型分泌能喪失株($\Delta bcr4$ 、 $\Delta bscN$)と同程度であったことから、Bcr4 は BspR の機能を直接的に解除しないことが示唆された。

Bcr4 は *Yersinia* 属細菌の YscX のシャペロンである YscY と 18.4% の同一性がある。YscX のホモログは *Bordetella* 属細菌のゲノムに存在しないが、Bcr4 は T3SS の分泌能に必須な構成因子のシャペロンである可能性も考えられる。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。BscI は *Yersinia* 属細菌の T3SS の Inner rod を構成する YscI とホモログであり、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。*Yersinia* 属細菌において、YscI のシャペロンは確認されていないが、ニードル構成タンパク質である YscF のシャペロン YscE/YscG が報告されている。YscF は T3SS から分泌され T3SS のニードルを構成する。これまでに報告されている T3SS に特異的なシャペロンは、全て T3SS から分泌されるタンパク質においてのみ確認されている。BscI ホモログである YscI は T3SS から分泌されることが報告されていることから、Bcr4 は BscI のシャペロンであることが推察される。

今後、Bcr4 が BscI と相互作用するか否かを詳細に解析する必要があるが、本研究では Bcr4 が III 型分泌タンパク質の産生を促進するこれまでにないユニークな機能を有するタンパク質であることを明らかにした。

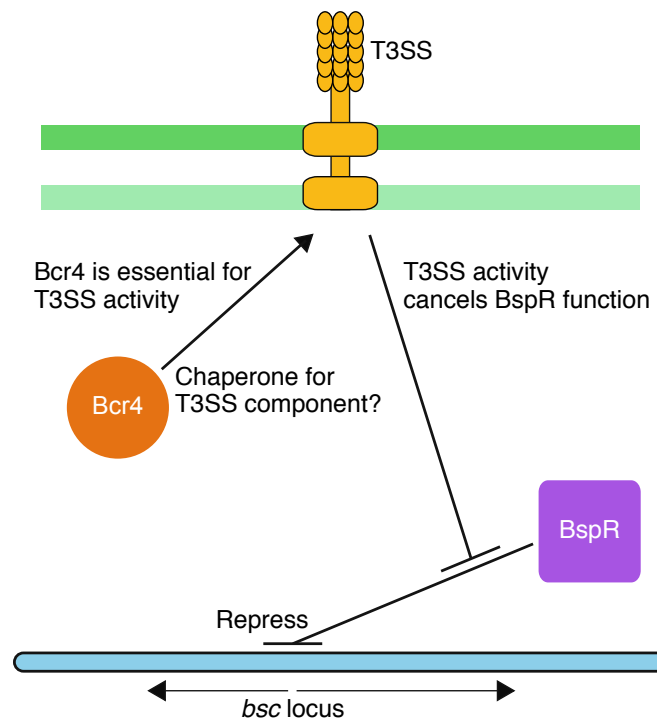


図 7 Bcr4 と BspR の関係の模式図