

***Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置制御における 還元剤の影響および Bcr4 タンパク質の機能解析**

感染制御科学専攻 分子細菌学
後藤 雅貴

第一章は、「Goto *et al.* (2020), Transcriptional Downregulation of a Type III Secretion System under Reducing conditions in *Bordetella pertussis*, J. Bacteriol., doi: 10.1128/JB.00400-20」の内容である。この論文の著作権は雑誌社が持つが、レポジトリへ掲載することの許可を得ている。

第二章の図表は、「Goto *et al.* (2022), Bcr4 is a Chaperone for the Inner Rod Protein in the *Bordetella* Type III Secretion System, Microbiol. Spectr., doi: 10.1128/spectrum.01443-22」を改変したものである。この論文の著作権は雑誌社ではなく著者が持つ。クリエイティブ・コモンズ・ライセンス (CC BY 4.0) のもと出版されており、著者のクレジットを表示することで二次利用が許可される。

目次

1. 略語一覧	3
2. 緒言	4
3. 第一章 百日咳菌における III 型分泌タンパク質の産生および分泌条件の検討	
3-1. 緒言	6
3-2. 材料と方法	7
3-3. 結果	13
3-4. 考察	19
4. 第二章 気管支敗血症菌が産生する Bcr4 による III 型分泌装置制御機構の解析	
4-1. 緒言	23
4-2. 材料と方法	24
4-3. 結果	29
4-4. 考察	34
5. 総括	37
6. 図表	38
7. 引用文献	65
8. 謝辞	71

1. 略語一覽

Bvg	<i>Bordetella</i> virulence gene
FCS	fetal calf serum
PCR	polymerase chain reaction
CBB	coomassie brilliant blue
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
RT-PCR	reverse transcription PCR
LDH	lactate dehydrogenase
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
DTE	dithioerythritol
DTT	dithiothreitol
ELF	epithelial lining fluid
GSH	glutathione

2. 緒言

Bordetella 属細菌はグラム陰性の偏性好気性短桿菌で、百日咳菌 (*B. pertussis*)、パラ百日咳菌 (*B. parapertussis*)、気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) の3菌種が主な病原菌種として知られている (1, 2)。百日咳菌はヒトのみを自然宿主とし、痙攣性の咳嗽発作とレプリナーゼを特徴とする百日咳の原因菌であり、乳幼児の感染では特に重篤化しやすい。パラ百日咳菌はヒトに感染し、百日咳菌と同様の症状を起こすが、ヒツジなどの動物からの単離も報告されている (3)。気管支敗血症菌は哺乳類に広く感染し、ブタの萎縮性鼻炎などを惹起する。

これまでに同定されている *Bordetella* 属細菌の病原因子は主に毒素と付着因子である。毒素としては百日咳毒素 (4)、アデニル酸シクラーゼ毒素 (5) 等が、付着因子としては繊維状赤血球凝集素 (6)、パータクチン (7) 等が報告されている。これらの毒素や付着因子発現は *Bordetella* 属細菌の有する BvgAS 二成分制御系によって制御される (8)。また、毒素や付着因子と同様に BvgAS によって制御され病原性に関与するシステムとして、III型分泌装置と呼ばれる病原因子分泌装置を有する (9)。

III型分泌装置は菌の内膜と外膜を貫通した基部構造と、菌体外に突出したニードル構造によって構成され (図 1)、*Yersinia* 属細菌、*Salmonella* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌などの多くのグラム陰性細菌に保存されている。これらの病原細菌はIII型分泌装置を利用してエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内に注入し、宿主細胞の生理機能を攪乱させる (10)。III 型分泌装置の基部構造および export apparatus が完成すると、III 型分泌タンパク質は決まった順序で分泌されることが明らかとなっている。まず、ニードル構造の構成因子および、ニードル構造を基部構造に結びつけるインナーロッドが分泌される。ニードルが完成した後、トランスロケーターが分泌され、宿主細胞膜に小孔を形成することでエフェクターの通り道を作る。最後に、エフェクターがIII型分泌装置を經由し宿主細胞内へ移行する (11, 12)。これまで *Bordetella* 属細菌においていくつかの III 型分泌タンパク質が同定されている。BopB (13)、BopD (14)、Bsp22 (15) はトランスロケーターとして、BteA (BopC と同一分子 (16, 17))、BopN (18, 19)、BspR (BtrA と同一分子 (20, 21)) はエフェクターとして機能する。BopB、BopD は複合体を形成し、孔形成因子として宿主細胞膜に小孔を形成する (14)。Bsp22 は *Bordetella* 属細菌のニードル状構造の先端に存在する鞘状構造であり、孔形成因子とニードル状構造を結合させるのに必要である (22)。BteA は 658 アミノ酸からなるエフェクターである。気管支敗血症菌は BteA 依存的に

哺乳類細胞にネクローシス様の細胞死を誘導する (16)。BteA を哺乳類細胞内で産生させた場合、菌を感染させた場合と同様に細胞死を誘導することから、BteA 単独で細胞死を誘導可能であることが明らかとなっている (16)。最近、BteA に貪食細胞の貪食運動を阻害する作用があることが明らかとなった。*Bordetella* 属細菌は BteA の作用によりマクロファージなどが有する殺菌作用から回避していることが考えられる (23)。BopN は 365 アミノ酸からなるエフェクターである。BopN は NF κ B p50 の核内移行を促進させ、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を誘導し、宿主の炎症反応を抑制する。BopN は宿主の免疫応答を抑制し、菌の気道への定着に貢献していることが考えられる (19)。BspR は近年同定されたIII型分泌装置から分泌される制御因子である。気管支敗血症菌の BspR を欠損させた株と野生株が産生するタンパク質の網羅的な比較解析の結果から、BspR によって制御される因子は多岐にわたり、BspR は BvgAS の下流で病原因子のグローバルレギュレーターとして機能していることが強く示唆されている (21)。百日咳菌の BscF、BscI と呼ばれるタンパク質は *Yersinia* 属細菌のニードル YscF、インナーロッド YscI とそれぞれ 18.4%、18.3% の同一性を示したことから、*Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置のニードル、インナーロッドであると推測されている。

これまで百日咳菌において、III 型分泌装置から分泌される III 型分泌タンパク質は宿主への定着に重要であることが示唆されている。しかし、試験管内で百日咳菌から BteA が効率的に分泌される条件は見出されていない。本研究の第一章では、百日咳菌感染における BteA の役割を明らかにするために、III 型分泌タンパク質が効率的に産生および分泌される培地成分の検討を行った。

また、これまで気管支敗血症菌において Bcr4 と呼ばれるタンパク質が III 型分泌装置の機能に必要であることが示唆されている。しかし、Bcr4 が III 型分泌系においてどのように機能するかは明らかとなっていない。第二章では気管支敗血症菌において Bcr4 がどのように III 型分泌装置の制御に関与するのかを調べるために、Bcr4 と相互作用する因子の同定を試みた。

3. 第一章 百日咳菌における III 型分泌タンパク質の産生および分泌条件の検討

3-1. 緒言

2008 年に Fennelly らは、百日咳菌の野生株と III 型分泌装置欠損株をマウスに感染させ、野生株と比較して III 型分泌装置欠損株ではマウスの肺への定着能が低下することを示した (24)。すなわち、百日咳菌において III 型分泌装置は宿主への定着に関わる重要な因子であることが示唆された。一方、気管支敗血症菌では BteA が病原性発現に重要な因子であることが強く示唆され (23)、百日咳菌においても完全な *bteA* 遺伝子が保存されていることから、BteA が病原性に重要であると考えられる。しかし、これまで百日咳菌のワクチン標準株である Tohama I 株を *Bordetella* 属細菌培養用の培地である SS 培地 (25) で培養しても、培地中に III 型分泌タンパク質である BteA がほとんど分泌されない (24)。非ワクチン型の百日咳菌臨床分離株である BP157 株を SS 培地で培養した場合、BteA は分泌されるが、BP157 株をラット肺上皮細胞株 L2、マウスマクロファージ様細胞 J774 およびヒト子宮頸癌上皮細胞である HeLa 細胞に感染させても、細胞傷害性はみられない (26)。したがって、百日咳菌感染における BteA の役割を明らかにするためには、どのような環境下において BteA が産生されるのか明らかにする必要がある。そこで本章では、BteA が効率的に産生および分泌される培養条件について検討を行った。

3-2. 材料と方法

菌株と培養条件

本研究で使用した菌株を表 1 に示した。Tohama I 株 (27) は百日咳菌の野生株として使用した。百日咳患者からの臨床分離株についての詳細は表 2 に示した。*Bordetella* 増殖用の培地は Bordet-Gengou 寒天培地 ((2) 以下、BG 培地と記述)、と Stainer-Scholte 液体培地 ((25) 以下、SS 培地と記述)、Cyclodextrin Solid Medium (CSM (28)) の成分から寒天を除いた液体培地である LCA 培地を使用した。また、SS 改変培地としてアスコルビン酸を除いた SS 培地 (以下、SS_AsA⁻と記述)、カザミノ酸を除いた SS 培地 (以下、SS_CaA⁻と記述)、アスコルビン酸とカザミノ酸の両方を除いた SS 培地 (以下、SS_AsA⁻_CaA⁻と記述)、アスコルビン酸の濃度を 1/20 にした SS 培地 (以下、SS_1/20AsA と記述)、アスコルビン酸とカザミノ酸の濃度をそれぞれ 1/20、1/2 にした SS 培地 (以下、SS_1/20AsA_1/2CaA と記述) を使用した。各液体培地の成分を表 3 に示した。百日咳菌は BG 培地で、37°C で 5 日間培養後、シングルコロニーをループで回収した。これを各液体培地に懸濁し、600 nm の吸光度が 0.23 になるよう調整後、37°C で 22 時間、静置培養を行なった。大腸菌 DH10B は、DNA のクローニングの宿主として、SM10 λ pir (13) はスーサイドベクターの宿主、接合ドナーの菌株として使用した。

細胞株と培養条件

本研究ではラット肺上皮細胞株 L2 を使用した。L2 細胞を 10% の非働化牛胎児血清 (FCS) を含有する Ham's F-12K 培地 (以下、F-12K/FCS と記述) に、ペニシリン G とストレプトマイシンをそれぞれ終濃度 62.5 μ g/mL と 100 μ g/mL で添加した培地を使用し、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。

プラスミドおよびプライマー

本研究で使用したプラスミドを表 4、プライマーを表 5 に示した。

PCR

PCR には PrimeSTAR HD DNA Polymerase (TaKaRa) を用い、反応液組成は TaKaRa の推奨するプロトコルに従った。サーマルサイクラーは T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いた。GATEWAY cloning system (Invitrogen) を使用する場

合は Invitrogen の推奨するプロトコルに従ってアダプターPCR を行なった。

その他の DNA 操作

PCR 産物などの DNA はアガロースゲル電気泳動によって展開後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてアガロースゲルから DNA 断片を回収した。DNA の連結には ligation high (TOYOBO) を用いた。GATEWAY cloning system における BP 反応、LR 反応は Invitrogen の推奨する方法で行なった。大腸菌からのプラスミド調製は QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いた。

Tohama I ナリジクス酸耐性株の単離

Tohama I 株を BG 培地上で、37°C で 5 日間培養後、シングルコロニーをループで回収した。これを 20 mL の SS 培地に懸濁し、600 nm の吸光度が 0.23 になるように調整後、37°C で 24 時間、振盪培養した。培養液 20 mL を遠心し上清を除去した菌体を 2 mL の SS 培地で懸濁し、ナリジクス酸を 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有する BG 培地 (以下、BG (Nal) 培地と記述) に 200 μL ずつ塗布し、37°C で 6 日間培養した。生育してきたコロニーをさらに BG (Nal) 培地で 2 回選択し、Tohama I 株のナリジクス酸耐性株 (以下、Tohama Nal^r 株と記述) を単離した。

pABB-CRS2- $\Delta bspR$ プラスミドの作製

BspR 欠損株を作製するために pABB-CRS2- $\Delta bspR$ を作製した。Tohama I 株より調製したゲノム DNA を鋳型としてプライマー B1-bspR、B2-bspR、続いてプライマー attB1、attB2 を用いて PCR を行い、*bspR* の上流および下流にそれぞれ約 1.5 kbp の隣接領域を有する DNA 断片を PCR 産物として得た。この PCR 産物と pDONR201 の BP 反応を行い pDONR201-*bspR* を作製した。pDONR201-*bspR* を鋳型として *bspR* 遺伝子の内部配列に相補するプライマー R1-bspR、R2-bspR による inverse PCR を行なった。得られた PCR 産物を BamHI によって消化した後にセルフライゲーションを行い、pDONR201- $\Delta bspR$ を作製した。pDONR201- $\Delta bspR$ とスーサイドベクター pABB-CRS2 (29) の LR 反応を行い、pABB-CRS2- $\Delta bspR$ を作製した。

BspR 欠損株、BscN 欠損株、BteA 欠損株の作製

pABB-CRS2- $\Delta bspR$ 、pABB-CRS2- $\Delta bscN$ (13)、pABB-CRS2- $\Delta bteA$ (16) をそ

それぞれ大腸菌 SM10 λ pirに導入し、この菌株と Tohama NaI^r 株を BG 培地上で混合後、ナリジクス酸及びアンピシリンを含有する BG 培地上で選択を行なった。生育してきたコロニーをさらにナリジクス酸およびアンピシリンを含有する BG 培地で 2 回選択し、スクロース含有 BG 培地上に生育してきたコロニーから *bspR* 欠損株、*bscN* 欠損株、*bteA* 欠損株の候補となる株を取得した。BspR 欠損株候補株の染色体 DNA を鋳型としてプライマー 5-os-bspR、3-os-BspR を用いて PCR を行なった。増幅断片の大きさが野生株では 3953 bp になるところ BspR 欠損株候補株では 3485 bp になること、またその PCR 産物を BamHI 制限酵素処理し、1700 bp 付近にそれぞれバンドが認められることを確認した株を、BspR (全長 191 アミノ酸) の 18 番目から 175 番目のアミノ酸が欠損した BspR 欠損株 (Δ BspR 株) とした。BscN 欠損株候補株の染色体 DNA を鋳型としてプライマー 5-os-bscN、3-os-bscN を用いて PCR を行なった。増幅断片の大きさが野生株では 3623 bp になるところ BscN 欠損株候補株では 2363 bp になること、またその PCR 産物を EcoRI 制限酵素処理し、1200 bp 付近にそれぞれバンドが認められることを確認した株を、BscN (全長 444 アミノ酸) の 11 番目から 432 番目のアミノ酸が欠損した BscN 欠損株 (Δ BscN 株) とした。BteA 欠損株候補株の染色体 DNA を鋳型としてプライマー 5-os-bteA、3-os-bteA を用いて PCR を行なった。増幅断片の大きさが野生株では 2326 bp になるところ BteA 欠損株候補株では 2151 bp になること、またその PCR 産物を BamHI 制限酵素処理し、1100 bp 付近にそれぞれバンドが認められることを確認した株を *bteA* 遺伝子の開始コドンの上流約 100 bp から下流約 100 bp が欠損した BteA 欠損株 (Δ BteA 株) とした。

全菌体タンパク質溶液と培養上清タンパク質溶液の調製

前項の方法で培養した菌株について以下の操作を行なった。

(1) 全菌体画分

培養液 1 mL を遠心し上清を除去した菌体を 1 mL の氷冷純水で懸濁し、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。遠心により上清を除去後、2 M Tris-base と 2 \times SDS sample buffer をそれぞれ 5 μ L、95 μ L 添加し、95°C で 5 分間加熱して試料を得た。

(2) 上清画分

培養液を遠心後、孔径 0.22 μ m のフィルター (Millipore) を用いて濾過した 1.0 mL の培養上清に 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、遠心により上清を除去後 2 M Tris-base と

2×SDS sample buffer をそれぞれ 2 μ L、13 μ L 添加し、95°Cで 5 分間加熱して試料を得た。

SDS-PAGE およびウエスタンブロットイング

前項の方法で調製したタンパク質溶液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により展開した。Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色はワンステップCBB染色液 (バイオクラフト) を用いた。ウエスタンブロットイングは、まずゲル中のタンパク質をPVDF膜 (Millipore) に転写した。このPVDF膜を3% スキムミルク (nacalai tesque) を含有するTris-buffered saline (TBS) に15分浸して、ブロッキングを行なった後、一次抗体溶液に室温で一晩浸した、その後TBSに終濃度が0.05% となるようにTween20を添加したTBS-Tで洗浄し、二次抗体溶液に37°Cで1時間浸した。抗体の希釈にはSignal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA Solution A, B (Millipore) を用いた。また、シグナルの検出にはLuminata forte Western HRP Substrate (TaKaRa) を用いた。一次抗体には、ウサギ抗BteA抗体 (16)、ウサギ抗BopB抗体 (13)、ウサギ抗Bsp22抗体 (30)、マウス抗FHA抗体 (31)、マウス抗CyaA抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗BtrS抗体を用いた。抗BtrS抗体は、BtrSのC末端ペプチド (CALREALRERGYDSVP) 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 (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。二次抗体には ProteinA-HRP (GE Healthcare)、ヤギ抗マウスIgG抗体-HRP (Sigma-Aldrich) を用いた。

RNA の単離および RT-PCR

百日咳菌培養液より Trizol Max Bacterial RNA isolation Kit (Invitrogen)、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)、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) に含まれる逆転写酵素およびバッファーを用いて反応液を調製し、T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行なった。得られた cDNA サンプル、FastStart Essential DNA Probes Master (Roche)、プライマー、プローブを混合し反応溶液を調製した。*bteA*、*bopB*、*recA* 遺伝子を増幅するために、それぞれプライマーセット 5-*bteA* および 3-*bteA*、5-*bopB* および 3-*bopB*、5-*recA* および 3-*recA* を

用いた。定量 RT-PCR 反応は Light Cycler 96 (Roche) を用いて行なった。*recA* は内部標準として用いた。各菌株において得られた測定値について *recA* で標準化後、野生株に対する相対量を求めた。

哺乳類細胞への感染と乳酸脱水素酵素の測定

細胞傷害性の指標となる細胞外への乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) の放出を、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) を用いて測定した。L2 細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度になるように F-12K/FCS によって調整後、24 well plate の各 well に 0.5 mL ずつ添加した。37°C、5% CO₂ の条件で一晩培養した。菌を感染させる直前に L2 細胞の培地を、感染させる菌の培養に用いた液体培地 (表 3) に交換した。BG 培地上で培養した菌株を SS 改変培地に植菌して 22 時間培養した後、multiplicity of infection (MOI) が 125、250、500 となるように菌の培養に用いた液体培地で希釈した菌液を各 well に 0.5 mL 添加した。1700 rpm で 5 分間遠心後、37°C、5% CO₂ の条件下で 3 時間インキュベートした。その後、上清を 200 μ L ずつ 96 well round bottom plate に回収し、1700 rpm で 5 分間遠心した。その上清を 50 μ L ずつ ELISA plate に移し、50 μ L の基質溶液を添加した。遮光して 30 分間反応させた後、50 μ 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。非感染の well に 10% TritonX-100 を 50 μ L 加え、この well から得られた LDH 量の値を 100% とし、各 well の値から非感染の well の値を引いた値を相対値として算出した。

免疫蛍光染色

L2 細胞を 5×10^4 cells/mL の濃度になるように F-12K/FCS によって調整後、カバーグラスを入れた 6 well plate に 2 mL ずつ添加した。一晩培養後、SS 培地あるいは SS_AsA⁻培地交換を行なった。BG 培地上で培養した菌株を SS 培地あるいは SS_AsA⁻培地に植菌して 22 時間培養した後、SS 培地あるいは SS_AsA⁻培地で希釈した菌液を各 well に MOI が 125 となるように 0.5 mL 添加した。1700 rpm で 5 分間遠心後、37°C、5% CO₂ の条件下で 3 時間インキュベートし、PBS で洗浄した。その後、サンプルを固定するために 4% パラホルムアルデヒド溶液 (WAKO) を添加して室温で 15 分間静置した。固定したサンプルに 50 mM NH₄Cl を添加して 10 分間処理し、0.2% TritonX-100 を用いて 10 分間の細胞膜透過処理を行なった。PBS で洗浄後、4% BSA 溶液 (sigma) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体と

して TBS で希釈した抗 Bsp22 抗体溶液に浸し、37°Cで 1 時間インキュベートした。TBS-T で洗浄後、二次抗体として TBS で希釈した Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse IgG Antibodies (invitrogen) 溶液に浸し、37°Cで 1 時間インキュベートした。TBS-T で洗浄後、TBS により 100 倍希釈した Rhodamine Phalloidin (invitrogen) 溶液に浸し37°Cで 1 時間インキュベートした。その後 TBS-T、滅菌水で洗浄し、ProLong Gold antifade reagent with DAPI (invitrogen) を用いて封入し、蛍光顕微鏡 Axioplan2 (zeiss) を使用し解析した。

統計解析

統計解析には、Prism 5.0f ソフトウェア (Graphpad) による片側検定を用いたノンパラメトリック検定を用いた。P 値が 0.05%未満 ($p < 0.05$) を統計的に有意であるとみなした。

3-3. 結果

LCA 培地を用いた培養における III 型分泌タンパク質の分泌

百日咳菌の培養には一般的に SS 培地が用いられるが、SS 培地では BteA の分泌がほとんど認められていない (24)。これまで百日咳菌の単離培地として CSM 培地が報告されている (28)。この CSM 培地で百日咳菌を培養した場合、エフェクターやIII型分泌タンパク質の産生および分泌が促進されるかを調べた。

CSM 培地の成分から寒天を除去して低カザミノ酸培地 (以下、LCA 培地と記述) を調製した (表 3)。百日咳菌のワクチン標準株である Tohama I 株を SS 培地あるいは LCA 培地で培養した後、各培養液から全菌体画分と上清画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、III型分泌タンパク質である BteA、BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった (図 2)。その結果、LCA 培地で培養した Tohama I 株の全菌体画分および上清画分において、BteA および BopB のシグナルが検出された (図 2)。一方、SS 培地で培養した Tohama I 株の全菌体画分において BteA と BopB のシグナルが薄く検出され (図 2)、SS 培地で培養した Tohama I 株と ΔBscN 株 (III 型分泌装置不活化株) の上清画分においては BteA と BopB のシグナルが検出されなかった (図 2)。

以上の結果より、百日咳菌を LCA 培地で培養すると、III 型分泌タンパク質が分泌されることが示唆された。

BteA と BopB の産生に対するアスコルビン酸およびカザミノ酸の影響

LCA 培地と SS 培地の成分は同一であるが、アスコルビン酸とカザミノ酸の量は SS 培地と比較し LCA 培地では少ない (表 3)。そこで、アスコルビン酸とカザミノ酸のどちらが III 型分泌タンパク質の産生および分泌に関与しているかを調べた。

Tohama I 株を SS 培地、アスコルビン酸を除去した SS 培地 (SS_AsA-培地)、カザミノ酸を除去した SS 培地 (SS_CaA-培地)、アスコルビン酸とカザミノ酸の両方を除去した SS 培地 (SS_AsA-CaA-培地) で培養した後、全菌体画分と上清画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、BteA および BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 3)。その結果、全菌体画分の BteA 多量体のシグナルは、SS 培地と比較し使用したいずれの改変 SS 培地においてより強く検出された (図 3)。上清画分の BteA のシグナルは SS 培地と比較し SS_AsA-培地、SS_AsA-CaA-培地においてより強く検出された (図 3)。また、全菌体画分および上清画分における BopB のシグナルは SS 培地と比較し SS_AsA-培地、

SS_AsA⁻_CaA⁻培地においてより強く検出された (図 3)。

以上の結果より、百日咳菌を、アスコルビン酸を除いた培地で培養すると III 型分泌タンパク質の産生および分泌が増加することが示唆された。

付着因子、毒素の産生および分泌に対するアスコルビン酸およびカザミノ酸の影響

SS 液体培地で百日咳菌を培養することで付着因子である繊維状赤血球凝集素 (FHA)、毒素であるアデニル酸シクラーゼ (CyaA) など多くの病原因子の発現が誘導されることが知られている (28)。そこで、アスコルビン酸やカザミノ酸がこれらの病原因子の産生および分泌に関与しているか調べた。

Tohama I 株を SS 培地、SS_AsA⁻培地、SS_CaA⁻培地、SS_AsA⁻_CaA⁻培地で培養した後、全菌体画分と上清画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、FHA および CyaA に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 3)。その結果、全菌体画分と上清画分において使用したいずれの培地でも、FHA、CyaA のシグナル強度に有意な差は見られなかった (図 3)。

以上の結果より、アスコルビン酸は付着因子、毒素の産生および分泌に関与しないことが示唆された。

BteA と BopB の産生に対するアスコルビン酸の影響

標準的な SS 培地に含まれるアスコルビン酸の濃度は 2,270 μ M である。アスコルビン酸が III 型分泌タンパク質の生産および分泌に影響を与えるかをより詳しく調べるために、Tohama I 株をアスコルビン酸の濃度が 91、454、2,270 μ M の SS 培地で培養した後、全菌体画分と上清画分を SDS-PAGE で展開後、BteA および BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 4)。

その結果、全菌体画分と上清画分において BteA と BopB のシグナルは、アスコルビン酸の濃度が 0 から 454 μ M の SS 培地で検出された (図 4)。しかし、アスコルビン酸の濃度が 2,270 μ M の SS 培地では、アスコルビン酸の濃度が 0 から 454 μ M の SS 培地と比較し BteA と BopB のシグナルは顕著に減弱した (図 4)。

以上の結果より、百日咳菌をアスコルビン酸の濃度が低い条件下で培養すると、III 型分泌タンパク質の産生および分泌が増加することが示唆された。

他の百日咳菌の臨床分離株における BteA と BopB の分泌量

百日咳菌臨床分離株がアスコルビン酸の濃度が低い条件で、III 型分泌タンパク質

を分泌するかを調べるために、百日咳菌臨床分離株である BP344 株、BP348 株、BP350 株、BP351 株を SS 培地、SS_{AsA}-培地で培養した後、各培養液から全菌体画分と上清画分を調製した。全菌体画分と上清画分を SDS-PAGE で展開後、BteA と BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった (図 5)。その結果、BP350 株および BP351 株の上清画分において、BteA と BopB のシグナルは、SS 培地と比較し SS_{AsA}-培地で培養したより強く検出された (図 5)。

以上の結果より、BP350 株および BP351 株などの臨床分離株の一部も Tohama I 株と同様に、アスコルビン酸の濃度が低い条件下で培養した場合に、III 型分泌タンパク質を分泌することが示唆された。

bteA と bopB 遺伝子の転写に対するアスコルビン酸の影響

アスコルビン酸が低濃度の条件における III 型分泌タンパク質をコードする遺伝子の発現を調べるために、SS 培地、SS_{AsA}-培地で培養した Tohama I 株、BP350 株の菌体より全 mRNA を調製し、qRT-PCR を行い *bteA*、*bopB* の mRNA の相対量を解析した。その結果、SS 培地で培養した場合と比較して SS_{AsA}-培地で培養した場合に *bteA* の mRNA 量は Tohama I 株では約 2 倍に増加し、BP350 株では有意な差は認められなかった (図 6A)。また、SS 培地で培養した場合と比較して SS_{AsA}-培地で培養した場合に *bopB* の mRNA 量は Tohama I 株と BP350 株において約 2 倍に増加した (図 6B)。

以上の結果より、アスコルビン酸を含有しない培地で培養した百日咳菌において BopB の産生量は転写レベルで上昇することが示唆された。

百日咳菌感染による細胞傷害性の解析

これまでに百日咳菌の野生株による III 型分泌装置依存的な細胞傷害が検出された報告は存在しない。本研究では、百日咳菌が BteA を効率良く産生および分泌する条件は、アスコルビン酸を除去した SS 培地における培養であることを見出した。そこで、百日咳菌野生株がこの条件で哺乳類細胞に対して細胞傷害性を示すかを調べた。細胞傷害性の指標として L2 細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) の量を測定した。SS 培地、SS_{AsA}-培地、SS_{1/20AsA} 培地、SS_{1/20AsA}_CaA-培地で培養した Tohama I 株、BP350 株の懸濁液を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間感染させ、培地中の LDH 量の測定を行なった。

その結果、SS_{1/20AsA} 培地あるいは SS_{1/20AsA}_CaA-培地を用いた場合、菌

を感染させなくても、培地中に LDH の遊離が認められた (図 7)。したがって、これらの培地は LDH の遊離試験には使用できなかった。一方、SS_1/20AsA 培地あるいは SS_1/20AsA_1/2CaA 培地については、培地単独で LDH の遊離は認められなかった。SS_1/20AsA 培地あるいは SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した Tohama I 株を L2 細胞に感染させた場合、培地中に LDH が検出された (図 7)。以上の結果より、SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した百日咳菌野生株は哺乳類細胞に対して膜破壊を伴う細胞傷害性を発揮することが示唆された。

百日咳菌を感染させた哺乳類細胞上における Bsp22 の局在解析

細胞傷害性を発揮する条件で培養した百日咳菌を哺乳類細胞に感染させた場合、実際に菌体膜上に III 型分泌装置が構築されているかを調べた。Bsp22 は *Bordetella* 属細菌のニードル構造の先端に付随する鞘状構造を構成する III 型分泌タンパク質であり (図 1)、エフェクターが宿主内に移行するために不可欠な因子である。Tohama I 株を SS 培地、SS_1/20AsA_CaA 培地で培養し、L2 細胞に moi が 125 となるように 3 時間感染させた後、Bsp22 に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

その結果、L2 細胞に対する菌の付着量は、SS 培地と SS_1/20AsA_CaA 培地において有意差が認められない一方で (データ未掲載)、L2 細胞上に認められた Bsp22 の蛍光シグナル (図 8A、緑色) の量は、SS 培地と比較し SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した Tohama I 株および BP350 株を感染させた場合に有意に増加した (図 8)。

以上の結果より、百日咳菌を SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した場合に III 型分泌装置が菌体膜上に構築されることが強く示唆された。

百日咳菌感染による BteA 依存的な細胞傷害性の解析

気管支敗血症菌は、哺乳類細胞に対して BteA 依存的な膜破壊を伴う細胞死を誘導することが報告されている (16)。そこで、百日咳菌野生株が哺乳類細胞に対して引き起こす細胞傷害も BteA に依存的かを調べた。L2 細胞に Tohama I ナリジクス酸耐性株 (Tohama Nal^r 株、各欠損株の親株)、BscN 欠損株 (Δ BscN 株、III 型分泌装置不活化株)、BteA 欠損株 (Δ BteA 株)、BspR 欠損株 (Δ BspR 株、III 型分泌装置活性化株) を SS_1/20AsA_1/2CaA 培地中で MOI 125 あるいは 250 で 3 時間感染させ、培地中に遊離した LDH の量を測定した。

その結果、 Δ BscN 株を感染させた L2 細胞の培地中からは LDH が検出されなかった (図 9A、B)。 Δ BteA 株を感染させた L2 細胞の培地中から検出された LDH の量は、Tohama NaI^r 株を感染させた L2 細胞の培地中から検出された LDH の量と比較し、有意に減少した (図 9A、B)。 Δ BspR 株を感染させた L2 細胞の培地中から検出された LDH の量は、Tohama NaI^r 株を感染させた L2 細胞の培地中から検出された LDH の量と比較し、MOI 125 では有意に増加したが (図 9A)、MOI 250 では有意な差が認められなかった (図 9B)。

また、Tohama NaI^r 株、 Δ BscN 株、 Δ BteA 株、 Δ BspR 株を SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した後、各培養液から全菌体画分と上清画分を調製した。全菌体画分と上清画分を SDS-PAGE で展開後、BteA に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった (図 10)。

その結果、全菌体画分の BteA のシグナルは、Tohama NaI^r 株、 Δ BscN 株、 Δ BspR 株では検出されたが、 Δ BteA 株では検出されなかった (図 10)。上清画分の BteA のシグナルは、Tohama NaI^r 株および Δ BspR 株では検出されたが、 Δ BscN 株および Δ BteA 株では検出されなかった (図 10)。

以上の結果より、百日咳菌野生株が引き起こす細胞傷害 (図 7) は III 型分泌装置に依存的であることが示唆された。また、 Δ BteA 株を感染させた L2 細胞の培地中から LDH が野生株の 1/2 程度検出されたことから (図 9)、細胞傷害性に関する BteA 以外の未知の III 型分泌タンパク質の存在が示唆された。

BteA と BopB の産生および分泌に対する還元剤の影響

これまでの実験結果より、SS 培地からアスコルビン酸を除去すると III 型分泌タンパク質の産生および分泌が上昇することが示唆された。アスコルビン酸は還元剤として知られているため、還元的条件下で III 型分泌タンパク質の分泌が抑制されるかを調べた。

Tohama I 株を SS_AsA-培地 (図 11、none) あるいは還元剤であるアスコルビン酸 (AsA)、2-メルカプトエタノール (2-ME)、ジチオエリスリトール (DTE) を添加した培地で培養した後、各培養液から全菌体画分と上清画分を調製した。全菌体画分と上清画分を SDS-PAGE で展開後、BteA、BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった (図 11)。

その結果、全菌体画分および上清画分の BteA と BopB のシグナルは、SS_AsA-培地と比較して、それぞれの還元剤を含有する培地において減少した (図 11)。一方、

全菌体画分と上清画分の FHA のシグナル強度は SS_AsA-培地とそれぞれの還元剤を含有する培地で有意な差は認められなかった。また、菌の増殖は、SS_AsA-培地と比較し、それぞれの還元剤を含有する培地で有意な差は認められなかった（データ未掲載）。

以上の結果より、百日咳菌を、還元剤を含有する培地で培養すると III 型分泌タンパク質の産生および分泌量が減少することが示唆された。

3-4. 考察

本研究では百日咳菌を SS 培地からアスコルビン酸を除いた培地 (SS_AsA⁻培地) で培養した場合に、III 型分泌タンパク質である BteA と BopB の産生および分泌量が増加することを見出した。百日咳菌をアスコルビン酸とカザミノ酸の量を減少させた SS 培地 (SS 1/20AsA_1/2CaA 培地) で培養した後に、L2 細胞に感染させた場合、培地中に LDH の放出が認められ、百日咳菌野生株が哺乳類細胞に対して細胞傷害性を発揮する条件を確立した。また、BteA 欠損株を L2 細胞に感染させた場合でも細胞傷害性が検出され、BteA 以外に細胞傷害性を有する未知の III 型エフェクターが存在することが示唆された。百日咳菌を還元剤である 2-ME あるいは DTE を添加した培地で培養した場合、アスコルビン酸を添加した場合と同様に III 型分泌タンパク質の産生および分泌量が減少したことから、百日咳菌は環境中の酸化還元状態を感知し III 型分泌タンパク質の産生および分泌を制御することが示唆された。

① *bteA* と *bopB* 遺伝子の mRNA 量について

百日咳菌を SS 培地と比較して SS_AsA⁻培地で培養した場合に BopB の産生量および mRNA 量は有意に増加したが、BteA の産生量および mRNA 量に有意差は認められなかった (図 4、6)。 *Bordetella* 属細菌の BteA と BopB の転写は共にシグマ因子 BtrS によって正に制御され、BspR によって負に制御される (21, 32)。これまで百日咳菌の BspR 欠損株において *bteA* の mRNA 量は野生株と比較して約 2 倍上昇し、一方、*bopB* の mRNA は野生株と比較して 18 倍上昇することが RNA シークエンシング解析によって明らかとなっている (32)。BteA は BopB がコードされる *bsc* 遺伝子座から 2.5 Mb 離れた場所にコードされる (17)。したがって、本研究において Tohama I 株を SS_AsA⁻培地で培養した場合、SS 培地と比較して BteA の産生量および mRNA 量に有意差が認められないのは、BtrS が *bteA* よりも *bopB* の転写に優先的に関与している可能性が考えられる。

② 百日咳菌が引き起こす細胞傷害について

SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した百日咳菌を L2 細胞に感染させると、細胞傷害性が検出された (図 7)。感染前に L2 細胞外の培地を SS_1/20AsA_1/2CaA 培地に交換すると上清中に LDH の遊離が認められたが、L2 細胞用培地である

Ham's F-12K Medium のまま感染させた場合、LDH の遊離は検出されなかった (データ未掲載)。したがって、Ham's F-12K Medium 中には III 型分泌タンパク質の分泌を阻害する物質が含まれている、あるいは III 型分泌タンパク質の分泌に必要な物質が含まれていないことが考えられる。また、SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した百日咳菌を SS_1/20AsA_1/2CaA 培地でヒト肺胞上皮細胞株 A549 に感染させた場合、細胞傷害性が検出されなかった (データ未掲載)。したがって、A549 細胞において細胞傷害性を検出するには、さらに百日咳菌が効率良く III 型分泌タンパク質を産生および分泌する条件の検討を行う必要がある。

③新規 III 型エフェクターについて

これまでマクロファージ J774A. 1 に百日咳菌 18323 野生株を MOI 100 で 8 時間感染させた場合、細胞傷害性が検出されるが、CyaA 欠損株を感染させた場合、細胞傷害性が検出されないことが報告されており、CyaA が細胞傷害性に関与することが示唆されている (33)。本研究において Tohama I 野生株と BteA 欠損株では CyaA の産生および分泌量に有意な差がないことをウエスタンブロットティングによって確認した (データ未掲載)。この結果より、本研究で認められた百日咳菌野生株および BteA 欠損株が L2 細胞に対して引き起こす細胞傷害に CyaA は関与していないことが考えられる。また、BscN 欠損株を感染させた場合、LDH の遊離は認められなかったが、BteA 欠損株を感染させた場合、LDH の遊離が野生株の 2 分の 1 程度認められた (図 9)。したがって、百日咳菌において BteA 以外に III 型分泌装置から分泌される細胞傷害性を持つ未知の III 型分泌タンパク質が存在することが示唆された。

④他の病原因子に対する還元剤の影響について

本研究では百日咳菌を SS 培地で培養した場合と SS_AsA 培地で培養した場合では、菌の増殖に有意な差は認められなかったが (データ未掲載)、SS 培地と比較して SS_AsA 培地で培養した場合に III 型分泌タンパク質の産生および分泌量が増加した (図 3)。これまで III 型分泌装置をもつグラム陰性細菌を、還元剤を添加した培地、あるいは添加していない培地で培養し、III 型分泌タンパク質の発現を分子レベルで解析した例は存在しない。したがって、他の菌においても、酸化還元状態によって III 型分泌タンパク質の発現を制御する機構が存在する可能性が考えられる。本研究では百日咳菌を SS 培地で培養した場合と SS_AsA 培地で培養した場合では、CyaA、FHA の産生および分泌量に有意な差は認められなかった。これまで百日咳菌を、

GSH とシスチンをシステインに置換した SS 培地に還元剤の DTT を加えて培養した場合と、DTT を加えないで培養した場合は、毒素である Prn の産生量に有意な差は認められないことが明らかとなっている (34)。したがって、III 型分泌タンパク質以外の BvgAS によって制御される病原因子は還元剤による影響を受けないことが示唆された。

⑤生体内の酸化環境における III 型分泌装置の発現について

ヒトの気道粘液 (epithelial lining fluid: ELF) には還元剤として主に、アスコルビン酸、尿酸、GSH が存在する。これまでヒトの鼻腔と肺胞の ELF に存在するアスコルビン酸と尿酸の濃度は、おおそ同じであることが明らかとなっている。しかし、鼻腔の ELF における GSH 濃度は肺胞の ELF における GSH 濃度の 100 分の 1 であることが明らかとなっており、その理由の一つとして、鼻腔の ELF では GSH がおそらく GS-SG (GSH の酸化状態) として存在することが考えられている (35)。したがって、鼻腔の方が肺胞より酸化環境であることが考えられる。マウスに 3 日間感染させた百日咳菌のうち、鼻腔洗浄液に含まれる百日咳菌は肺胞洗浄液に含まれる百日咳菌と比較して、III 型分泌タンパク質遺伝子の転写量が増加することが明らかとなっている (36)。したがって、百日咳菌は肺胞よりも酸化環境である鼻腔において III 型分泌装置をより多く発現し、宿主に定着していることが示唆された。

⑥酸化還元状態を感知する調節因子について

本研究では、百日咳菌を SS 培地と比較して SS_AsA 培地で培養した場合に、III 型分泌タンパク質の産生および分泌量が増加した (図 3)。細菌は酸化ストレスに抵抗するために、レドックスセンシング調節因子を利用することが明らかとなっている (37)。例えば、大腸菌において LysR Family に属する OxyR は過酸化水素によって SH 基が酸化され、活性化状態になることで、抗酸化物質の発現を増加させる (38)。また、*Pseudomonas* 属細菌では GSH によって FNR/CRP Family に属する Vfr の SH 基が還元状態に保たれることで、III 型分泌タンパク質の発現を増加させることが明らかとなっている (39)。百日咳菌において *vfr* と相同性のある遺伝子として *btr* が存在する (40)。Btr は N 末端側にシステインクラスターを持ち、C 末端側にヘリックス-ターン-ヘリックス DNA 結合ドメインを持つ。したがって、百日咳菌において培地に還元剤が含まれていない酸化状態の時に、SH 基が酸化され Btr がコンフォメーションの変化を起こし、III 型分泌タンパク質の発現量が増加したことが考えられる。百日咳菌

において還元剤が含まれていない培地で III 型分泌タンパク質の産生量を増加させるシグナル経路は不明であるが、Btr が関与する可能性が考えられる。今後、百日咳菌が酸化還元状態を感知し III 型分泌タンパク質の産生および分泌を制御する分子メカニズムを解明するために、Btr をはじめとした酸化還元状態を感知する様々な調節因子を欠損させた変異株を作製し、それらの変異株における III 型分泌タンパク質の産生および分泌量を解析する必要がある。

4. 第二章 気管支敗血症菌が産生する Bcr4 による III 型分泌装置制御機構の解析

4-1. 緒言

多くの III 型分泌タンパク質にはそれぞれ固有のシャペロンが存在し、基質の菌体内における安定化、III 型分泌装置への効率な輸送 (分泌) に関与することが明らかとなっている (41-44)。例えば、*Pseudomonas* 属細菌においてニードル構造 (図 1) を形成する PscF のシャペロンである PscE と PscG は、菌体内における PscF の重合の阻止、PscF の安定化、III 型分泌装置を介した PscF の分泌などに関与する (45)。*Yersinia* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌などの菌においてインナーロッド (図 1) は菌体外に分泌され、また、重合する性質を有するため (46, 47)、インナーロッドにもシャペロンが存在すると考えられるが、これまでインナーロッドに対するシャペロンは報告されていない。

これまで気管支敗血症菌において Bcr4 と呼ばれるシャペロン様の性質を持つタンパク質が同定されている (48)。Bcr4 欠損株では III 型分泌タンパク質の分泌が認められなくなることから、Bcr4 は III 型分泌装置の機能に必要であることが示唆されている。しかし、Bcr4 による III 型分泌装置制御機構は明らかとなっていない。本章では気管支敗血症菌において Bcr4 がどのように III 型分泌装置の制御に関与するのかを調べるために、Bcr4 と相互作用する因子の同定を試みた。

4-2. 材料と方法

細胞と培養条件、PCR などの DNA 操作、全菌体画分および上清画分の調製、統計処理は 2-2「材料と方法」と同様の方法で行った。

菌株と培養条件

本章で使用した菌株を表 1 に示した。気管支敗血症菌 S798 (13) を野生株として使用した。*Bordetella* 増殖用の培地は Bordet-Gengou 寒天培地 (以下、BG 培地と記述)、と Stainer-Scholte 液体培地 (以下、SS 培地と記述) を使用した。各液体培地の成分を表 3 に示した。BG 培地上で、気管支敗血症菌を 37°C で 5 日間培養後、シングルコロニーをループで回収した。これを SS 液体培地に懸濁し、600 nm の吸光度が 0.23 になるよう調整後、37°C で 18 時間、振盪培養を行なった。大腸菌 BL21 (49) は組換えタンパク質発現用の菌株として用いた。

プラスミドおよびプライマー

本研究で使用したプラスミドを表 4、プライマーを表 5 に示した。

pull-down assay

C 末端に V5 タグを付与した *bscI*、*bscK* あるいは *bcr4* (*bscI*-V5、*bscK*-V5 あるいは *bcr4*-V5) を発現させるために、p99ccdB-*bscI*-V5、p99ccdB-*bscK*-V5、p99ccdB-*bcr4*-V5 を作製した。気管支敗血症菌 S798 より調製したゲノム DNA を鋳型として、プライマーセット B1-*bscI*-V5 および B2-*bscI*-V5、B1-*bscK*-V5 および B2-*bscK*-V5、B1-*bcr4*-comp および B2-*bcr4*-V5 を用いて PCR を行い、*bscI*、*bscK*、*bcr4* 遺伝子をコードする DNA 断片を PCR 産物として得た。これらの PCR 産物と pDONR201 の BP 反応を行い、pDONR201-*bscI*、pDONR201-*bscK*、pDONR201-*bcr4* を得た。これらのプラスミドと p99ccdB-V5 (50) 発現ベクターの LR 反応を行い、p99ccdB-*bscI*-V5、p99ccdB-*bscI*-V5、p99ccdB-*bcr4*-V5 を作製した。

p99ccdB-*bscI*-V5、p99ccdB-*bscI*-V5、p99ccdB-*bcr4*-V5 を導入した BL21 を 37°C で一晩振盪培養した後、50 μ L/mL アンピシリンを含有する LB 液体培地で 1:40 に希釈して 37°C で 2 時間振盪培養した。さらに、終濃度 1 mM で isopropyl-beta-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、各培養液を 30°C で 5 時

間培養した。各菌体を $2,600 \times g$ 、15 分間の遠心分離により回収し、プロテアーゼ阻害剤カクテル cOmplete (Roche) を含有する氷冷した TBS に懸濁した。各菌懸濁液を超音波処理し、各上清を pull-down assay に使用した。

次に、それぞれの N 末端に 6 つのヒスチジン残基 (6xHis)、C 末端に Strep タグを付与した Bcr4 または BscI を精製するために、pCold-*bcr4*-Strep、pCold-*bscI*-Strep を作製した。気管支敗血症菌 S798 より調製したゲノム DNA を鋳型として、プライマーセット 5-pColdII-HindIII-*bcr4* および 3-*bcr4*-Strep-HindIII、5-pColdII-HindIII-*bscI* および 3-*bscI*-Strep-HindIII を用いて PCR を行い、*bcr4* あるいは *bscI* をコードする DNA 断片を PCR 産物として得た。これらの PCR 産物を pColdII の HindIII 認識部位に In-Fusion Cloning System (Clontech) で挿入し、pCold-*bcr4*-Strep、pCold-*bscI*-Strep を作製した。

N 末端に 6xHis、C 末端に Strep を付与した 58-109、110-173 アミノ酸領域を欠失した Bcr4 を精製するために、pColdII-*bcr4* Δ 58-109-Strep、pColdII-*bcr4* Δ 110-173-Strep を作製した。pColdII-*bcr4*-Strep を鋳型として、プライマーセット 5-*bcr4*-58-109-Strep-IF および 3-IF-*bcr4*-58-109-Strep、5-*bcr4*-110-173-Strep-IF および 3-IF-*bcr4*-110-173-Strep を用いて PCR を行い、58-109、110-173 アミノ酸領域を欠失した *bcr4* をコードする DNA 断片を PCR 産物として得た。これらの PCR 産物を In-Fusion Cloning System でセルフライゲーションし、pColdII-*bcr4* Δ 58-109-Strep、pColdII-*bcr4* Δ 110-173-Strep を作製した。

pCold-*bcr4*-Strep、pCold-*bscI*-Strep、pColdII-*bteA*-N-Strep (23)、pColdII-*bcr4* Δ 58-109-Strep、pColdII-*bcr4* Δ 110-173-Strep を有する BL21 を 37°C で振盪培養し、次に $50 \mu\text{L}/\text{mL}$ アンピシリン含有 LB 液体培地で 1:100 希釈して 37°C で 2 時間振盪培養を行った。さらに、各菌培養液に終濃度 0.05 mM で IPTG を添加し、 15°C で一晩培養した。各菌体を $2,600 \times g$ で 20 分間遠心分離を行い回収し、cOmplete を含有する氷冷した TBS に懸濁した。各菌懸濁液を超音波処理し、pCold-*bscI*-Strep を有する BL21 以外の各上清を、Ni-NTA アガロース (QIAGEN) を用いてメーカーのプロトコールに従い精製した。精製したタンパク質は、TBS で透析した。pCold-*bscI*-Strep については、菌懸濁液を超音波処理し、メーカーのプロトコールに従って封入体可溶化試薬 (Thermo) に懸濁した。可溶化溶液と 5 倍量のリフォールディングバッファー (20 mM Tris-HCl, pH-8, 150 mM NaCl, 10% glycerol) を、ローテーターを用いて 4°C で一晩混合し、次に、 $20,000 \times g$ で 15 分間遠心分離を行った。上清を透析バッファー (20 mM Tris-HCl, pH-8, 150 mM NaCl, 10% glycerol)

で透析し、20,000 × *g*、15 分間遠心分離した。上清を精製タンパク質として pull-down assay に使用した。

エッペンドルフチューブに、6×His および Strep を付与したタンパク質と 30 μL の Strep-Tactin ビーズ (IBA) を添加し、4°C で 1 時間混合した後、ビーズを TBS で 3 回洗浄し、精製ビーズとした。次に、V5 タグを付与したタンパク質を含む大腸菌の溶解液を精製ビーズに添加し、4°C で 3 時間混合した。30 μL の上清を新しいチューブに移し、30 μL の 2×SDS-PAGE sample buffer を加えて上清画分 (Sup) を調製した。次に、ビーズを TBS (図 12A) あるいは 0.1% Triton X-100 を含有する TBS (図 12B) で 3 回洗浄し、30 μL の 2×SDS-PAGE sample buffer を加えて、ペレット画分 (Pellet) を調製した。

Bcr4 変異体を産生するためのプラスミドの作製

C 末端に FLAG タグを付与した Bcr4 を発現させるために、pRK-*bcr4*-FLAG を作製した。pDONR-*bcr4* (48) を鋳型として、5-*bcr4*-FLAG-IF と 3-IF-*bcr4*-FLAG のプライマーを用いて inverse PCR を行った。得られた PCR 産物を、In-Fusion Cloning System によりセルフライゲーションし、pDONR-*bcr4*-FLAG を作製した。このプラスミドと *fha* プロモーター配列が挿入された pDONR-*fhaP*、*rnnB* ターミネーター配列が挿入された pDONR-*rnnB*、pRK-R4-R3-F (16) で LR 反応を行い、pRK-*bcr4*-FLAG を作製した。

次に、アミノ酸領域 159-173、164-173、169-173 を欠失し、C 末端に FLAG タグが付与された *bcr4* を発現させるために、pRK-*bcr4*Δ159-173-FLAG、pRK-*bcr4*Δ163-173-FLAG、pRK-*bcr4*Δ169-173-FLAG を作製した。pDONR-*bcr4*-FLAG を鋳型として、プライマーセット 5-*bcr4*-FLAG-IF および 3-IF-*bcr4*Δ169-173-FLAG、5-*bcr4*-FLAG-IF および 3-IF-*bcr4*Δ164-173-FLAG、5-*bcr4*-FLAG-IF および 3-IF-*bcr4*Δ159-173-FLAG を用いて inverse PCR を行った。得られた PCR 産物を In-Fusion Cloning System を用いてセルフライゲーションし、pDONR-*bcr4*Δ159-173-FLAG、pDONR-*bcr4*Δ164-173-FLAG、pDONR-*bcr4*Δ169-173-FLAG を作製した。これらのプラスミドを pRK-R4-R3-F、pDONR-*fhaP*、pDONR-*rnnB* と LR 反応を行い pRK-*bcr4*Δ159-173-FLAG、pRK-*bcr4*Δ163-173-FLAG、pRK-*bcr4*Δ169-173-FLAG を作製した。

pABB-CRS2-Δ*bscI* プラスミドの作製

Bscl 欠損株を作製するために pABB-CRS2- Δ *bscl* を作製した。S798 株より調製したゲノム DNA を鋳型としてプライマー B1-*bscl*、B2-*bscl*、続いてプライマー attB1、attB2 を用いて PCR を行い、*bspR* の上流および下流にそれぞれ約 1 kbp の隣接領域を有する DNA 断片を PCR 産物として得た。この PCR 産物と pDONR201 の BP 反応を行い pDONR201-*bscl* を作製した。pDONR201-*bscl* を鋳型として *bspR* 遺伝子の内部配列に相補するプライマー R1-*bspR*、R2-*bspR* による inverse PCR を行なった。得られた PCR 産物を In-Fusion Cloning System によってセルフライゲーションを行い、pDONR201- Δ *bscl* を作製した。pDONR201- Δ *bspR* とスーサイドベクター pABB-CRS2 (29) の LR 反応を行い、pABB-CRS2- Δ *bscl* を作製した。

Bscl 欠損株の作製

pABB-CRS2- Δ *bscl* を大腸菌 SM10 λ *pir* に導入し、この菌株と Tohama NaI^r 株を BG 培地上で混合後、ナリジクス酸及びアンピシリンを含有するプレート上で選択を行なった。生育してきたコロニーをさらにナリジクス酸とアンピシリンで 2 回選択し、スクロース含有プレート上に生育してきたコロニーから *bscl* 欠損株の候補となる株を取得した。Bscl 欠損株候補の染色体 DNA を鋳型としてプライマー 5-*os-bscl*、3-*os-Bscl* を用いて PCR を行った。増幅断片の大きさが野生株では 2595 bp になるところ Bscl 欠損株では 2226 bp になることを確認した株を、Bscl の 11 番目から 133 番目のアミノ酸を欠損させた Bscl 欠損株 (Δ Bscl 株) とした。

pRK-*bscl* の作製

Bscl を気管支敗血症菌内で高発現させるために、pRK-*bscl* を作製した。S798 株より調製したゲノム DNA を鋳型としてプライマー B1-*bscl*-V5、B2-*bscl*-comp、続いてアダプタープライマー attB1、attB2 を用いて PCR を行い、*bscl* 遺伝子とその上流領域を含む 499 bp の DNA 断片を PCR 産物として得た。この PCR 産物と pDONR201 の BP 反応を行い pDONR201-*bscl*-comp を作製した。このプラスミドを pRK-R4-R3-F、pDONR-*fhaP*、pDONR-*rrnB* と LR 反応を行い pRK-*bscl* を作製した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング

2-2「材料と方法」と同様の方法で行った。マウス抗 V5 モノクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。マウス抗繊維状赤血球凝集素 (FHA) 抗

体は蒲池一成先生（国立感染症研究所）から頂いたものを使用した。ウサギ抗 BscI抗体およびウサギ抗BscJ抗体は、BscIのC末端ペプチド（CKAIGRATQNVDTLARMS）、BscJのC末端ペプチド（CRGEGRGGAGATEGAGHD）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（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。

免疫蛍光染色

L2細胞を 5×10^4 cells/mLの濃度になるようにF-12K/FCSによって調整後、カバーグラスを入れた6 well plateに2 mLずつ添加し、一晚培養した。その後、BG培地上で培養した菌株を、Bsp22の緑色の蛍光シグナルを検出するために、鉄不含SS培地で培養した後、F-12K/FCSで希釈した菌液を各wellに multiplicity of infection (MOI) が2000となるように0.5 mL添加した。細胞を過剰に死滅させることを回避するために、遠心は行わず、37°C、5% CO₂の条件下で1時間インキュベートした。その後は、2-2「材料と方法」と同様の方法で免疫蛍光染色を行った。

哺乳類細胞への感染と乳酸脱水素酵素の測定

L2細胞の密度が 5×10^4 cells/mLになるようにF-12K/FCSで懸濁した溶液を24 well plateの各wellに0.5 mLずつ添加し、37°C、5% CO₂の条件で一晩培養した。その後、BG培地上で培養した菌株を各SS培地に植菌して18時間培養した後、MOIが200となるようにF-12K培地で希釈した菌液を各wellに0.5 mL添加した。1700 rpmで5分間遠心後、37°C、5% CO₂の条件下で3時間インキュベートした。その後は2-2「材料と方法」と同様の方法で乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定を行った。

4-3. 結果

1. Bcr4 と *Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置のインナーロッドタンパク質である BscI の相互作用解析

先行研究により、Bcr4 は III 型分泌タンパク質に対するシャペロンであると予測されている (48)。これまで III 型分泌タンパク質のシャペロンは、基質の安定性や基質の III 型分泌装置への効率的な輸送に関与することが知られている (41-43)。また、一般的に、III 型分泌タンパク質のシャペロンをコードする遺伝子の近傍に、基質となるタンパク質をコードする遺伝子が存在することが知られている (51)。気管支敗血症菌 S798 の染色体上において *bcr4* 遺伝子上流には BcrH2、下流には BscI、BscJ、BscK をコードする遺伝子が存在し (図 12A)、それぞれトランスロケーターのシャペロン、III 型分泌装置のインナーロッド、内膜リング、ATPase 補酵素として機能すると予測されている (52)。以上のことから Bcr4 は BscI、BscJ、BscK のいずれかのシャペロンであることを予測した。

Bcr4 が BscI、BscK に結合するかを調べるために、Strep タグを付与した Bcr4 (Bcr4-Strep) を結合させた Strep-Tactin ビーズに、V5 タグを付与した標的タンパク質 (BscI-V5、BscK-V5) を含む大腸菌の溶解液を添加し、pull-down assay を行った。上清画分 (Sup) とペレット画分 (Pellet) を調製し、これらの画分を SDS-PAGE で展開後、V5 タグに対する抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った (図 12B)。

その結果、V5 タグのシグナルは BscI-V5 のペレット画分には検出されが、BscK-V5 のペレット画分にはほとんど検出されなかった (図 12B)。また、CBB 染色の結果、ビーズに結合している Bcr4-Strep の量に有意な差は見られなかった (図 12B)。以上の結果より、Bcr4 は *Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置のインナーロッドである BscI に結合することが示唆された。

次に、Bcr4 が BscI と結合することを再確認するために、Strep タグを付与した BscI (BscI-Strep) あるいは BteA の N 末端 1-312 番目のアミノ酸領域 (BteA-N-Strep) を結合させた Strep-Tactin ビーズに、V5 タグを付与した Bcr4 (Bcr4-V5) を含む大腸菌の溶解液を添加し、pull-down assay を行った。上清画分 (Sup) とペレット画分 (Pellet) を調製し、これらの画分を SDS-PAGE で展開後、V5 タグに対する抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った (図 12C)

その結果、V5 タグのシグナルは BscI-Strep のペレット画分に検出されたが、

BteA-N-Strep のペレット画分にはほとんど検出されなかった (図 12C)。以上の結果より、Bcr4 は *Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置のインナーロッドタンパク質の BscI と結合することが強く示唆された。

2. BscI の結合および III 型分泌装置の機能に必要な Bcr4 のアミノ酸領域の解析

次に、Bcr4 と BscI が結合する領域を調べるために、図 13A に示した Strep タグを付与した Bcr4 全長 (Bcr4-FL-Strep)、58-109 番目のアミノ酸領域欠損 Bcr4 (Bcr4 Δ 1-57-Strep)、109-173 番目のアミノ酸領域欠損 Bcr4 (Bcr4 Δ 58-109-Strep)(図 13B) を大腸菌内で産生させた。Bcr4-FL-Step、Bcr4 Δ 1-57-Strep、Bcr4 Δ 58-109-Strep を結合させた Strep-Tactin ビーズに V5 タグを付与した BscI (BscI-V5) を含む大腸菌の溶解液を添加し、プルダウンアッセイを行った。その後、上清画分 (Sup) とペレット画分 (Pellet) を調製し、これらの画分を SDS-PAGE で展開後、V5 に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 13B)。

その結果、V5 タグのシグナルは Bcr4-FL-Strep のペレット画分に検出されたが、Bcr4 Δ 58-109-Strep および Bcr4 Δ 110-173-Strep のペレット画分には検出されなかった (図 13B)。以上の結果より、BscI との結合領域 (BscI 結合領域) は Bcr4 の 58-173 番目のアミノ酸領域に存在することが示唆された。

次に、III 型分泌装置の機能に必要な Bcr4 の領域を調べるために、C 末端に FLAG タグを付与した Bcr4 全長 (Bcr4-FL-FLAG)、C 末端 5 塩基欠損 Bcr4-FLAG (Bcr4 Δ 169-173-FLAG)、C 末端 10 塩基欠損 Bcr4-FLAG (Bcr4 Δ 164-173-FLAG)、C 末端 15 塩基欠損 Bcr4-FLAG (Bcr4 Δ 159-173-FLAG) (図 13A) をそれぞれ Bcr4 欠損株 (Δ Bcr4 株) 内で産生させた (Δ Bcr4/pRK-Bcr4-FL-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 169-173-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 164-173-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 159-173-FLAG 株)。これらの菌株と気管支敗血症菌 S798 野生株、 Δ Bcr4 株を SS 培地で培養し、全菌体画分と上清画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、Bcr4、BteA (III 型分泌タンパク質)、BopD (III 型分泌タンパク質) に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 13C)。Bcr4 に対する抗体は Bcr4 の C 末端 18 アミノ酸を抗原として作製したため、本実験で用いた Bcr4 部分欠失変異体を認識しないことが考えられた。そこで、FLAG に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングも行った (図 13C)。

その結果、全菌体画分に対して抗 Bcr4 抗体を用いた場合は、野生株、

Δ Bcr4/pRK-Bcr4-FL-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 169-173-FLAG 株においてシグナルが検出されたが、 Δ Bcr4 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 164-173-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 159-173-FLAG 株においてはシグナルがほとんど検出されなかった (図 13C)。一方で、抗 FLAG 抗体を用いた場合、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 164-173-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 159-173-FLAG 株においてもシグナルが検出された (図 13C)。

以上の結果より、Bcr4 部分欠失変異体が産生されていることを確認した。上清画分に対して抗 BteA 抗体あるいは抗 BopD 抗体を用いた場合、野生株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4-FL-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 164-173-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 159-173-FLAG 株において BteA と BopD のシグナルが検出されたが、 Δ Bcr4 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 159-173-FLAG 株においてはシグナルが検出されなかった (図 13C)。これらの結果より、III 型分泌装置の機能に必要な領域 (T3SS 機能領域) は Bcr4 の 159-163 番目のアミノ酸領域に存在することが示唆された。

3. 気管支敗血症菌における BscI の機能解析

BscI は *Yersinia* 属細菌の III 型分泌装置のインナーロッドである YscI のホモログであり、YscI は III 型分泌装置の機能に必須であることが明らかとなっている (47)。気管支敗血症菌において BscI が III 型分泌装置の機能に必要であることを確認するために、気管支敗血症菌 S798 野生株、BscI 欠損株 (Δ BscI 株)、BscI 相補株 (Δ BscI/pRK-BscI)、III 型分泌装置不活化株 (Δ BscN 株) を SS 培地で培養し、全菌体画分および上清画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、BscI、BteA、BopD、繊維状赤血球凝集素 (FHA) に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 14)。

その結果、全菌体画分の BscI のシグナルは全ての菌株において検出されなかった。上清画分の BscI のシグナルは Δ BscI/pRK-BscI 株において検出され、野生株においては微弱なシグナルが検出された (図 14)。また、上清画分の BscI のシグナルは Δ BscI 株と Δ BscN 株においては検出されなかった (図 14)。上清画分において、III 型分泌タンパク質である BteA、BopD のシグナルは野生株と Δ BscI/pRK-BscI 株において検出されたが、 Δ BscI 株と Δ BscN 株においては検出されなかった (図 14)。また、全菌体画分と上清画分の FHA のシグナルは全ての菌株において検出された (図 14)。以上の結果より、気管支敗血症菌において BscI は III 型分泌装置の機能に必要であり、菌体外へ分泌されることが示唆された。

4. 哺乳類細胞への感染における BscI の機能解析

次に、気管支敗血症菌を哺乳類細胞に感染させた場合、BscI が III 型分泌装置の構築に必要であるかを調べた。野生株、 Δ BscI 株、 Δ BscI/pRK-BscI 株、 Δ BscN 株を L2 細胞 (ラット肺上皮細胞株) に感染させ、III 型分泌装置の鞘状構造を形成する Bsp22 (図 1) に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行なった。Bsp22 の蛍光シグナルをより多く観察するために、気管支敗血症菌が III 型分泌タンパク質をより多く分泌する培地である鉄不含 SS 培地で菌を培養し (53)、L2 細胞に MOI 2000 で 1 時間感染させた (図 15A)。

その結果、L2 細胞に対する菌の付着量はいずれの菌株において有意差が認められない一方で、L2 細胞上に認められた Bsp22 の蛍光シグナル (図 15A、緑色) は、野生株あるいは Δ BscI/pRK-BscI 株を感染させた場合に検出されたが、 Δ BscI 株あるいは Δ BscN 株を感染させた場合には検出されなかった (図 15A、B)。

また、野生株、 Δ BscI 株、 Δ BscI/pRK-BscI 株、 Δ BscN 株を L2 細胞に MOI 200 で 1 時間感染させ、細胞外の培地に遊離する LDH (乳酸脱水素酵素) の量を測定した。

その結果、野生株あるいは Δ BscI/pRK-BscI 株を感染させた L2 細胞の培地中に LDH が検出されたが、 Δ BscI 株あるいは Δ BscN 株を感染させた L2 細胞の培地中には検出されなかった (図 15C)。以上の結果より、気管支敗血症菌において BscI は III 型分泌装置の構築および哺乳類細胞に対する細胞死の誘導に必要であることが示唆された。

5. Bcr4 が BscI の安定性に与える影響の解析

上述したように、Bcr4 と BscI の相互作用が III 型分泌装置の機能に必要なことが示唆された。Bcr4 はシャペロン様の性質をもつタンパク質であるため、Bcr4 が BscI の安定性に関与するかを調べた。気管支敗血症菌 S798 野生株、Bcr4 欠損株 (Δ Bcr4 株、III 型分泌装置不活化株 (48)) を SS 培地で培養し、全菌体画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、BscI (インナーロッド、III 型分泌装置の構成因子)、BscJ (内膜リング、III 型分泌装置の構成因子)、Bcr4 に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 16)。しかし、野生株の全菌体画分において BscI のシグナルを検出することができなかった (図 16)。そこで、全菌体画分において BscI のシグナルを検出するために、III 型分泌装置を過剰に構築し、III 型分泌タンパク質を過剰に分泌する株である BspR 欠損株 (Δ BspR 株、図 17 左下、(21)) を用

いた。 Δ BspR 株、III 型分泌装置を過剰に構築するが、III 型分泌タンパク質を分泌しない株である BspR・Bcr4 二重欠損株 (Δ BspR Δ Bcr4 株、図 17 右下 (48)) を SS 培地で培養し、全菌体画分を調製した。これらの画分を SDS-PAGE で展開後、BscI、BscJ、Bcr4 に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 16)。

その結果、 Δ Bcr4 株をはじめとした III 型分泌タンパク質の分泌能を喪失した菌株では、*bsc* 遺伝子座上の遺伝子の転写を抑制する BspR の機能が增强するため、ため (図 16、17 右上 (48))、全菌体画分の BscJ のシグナルは、 Δ Bcr4 株において野生株と比較し、より弱く検出された (図 16)。 Δ BspR 株、 Δ BspR Δ Bcr4 株では BspR による *bsc* 遺伝子座上の遺伝子の転写の抑制が解除されるため、全菌体画分の BscJ のシグナルは、 Δ BspR 株と Δ BspR Δ Bcr4 株において野生株より強く検出された (図 16)。一方で、全菌体画分の BscI のシグナルは Δ BspR 株において検出されたが Δ BspR Δ Bcr4 株においては検出されなかった (図 16)。以上の結果より、気管支敗血症菌において Bcr4 は BscI が菌体内に安定に存在するために必要な因子であることが示唆された。

4-4. 考察

本研究では、気管支敗血症菌が *BscI* の欠損により、III 型分泌タンパク質を菌体外へ分泌する能力を喪失することを見出した (図 14、15)。また、気管支敗血症菌 *BspR* 欠損株において *Bcr4* を欠損させると、III 型分泌装置の構成因子であるインナーロッドの *BscI* が菌体内で検出されなくなった (図 16)。以上の結果より、*Bcr4* は *BscI* を菌体内で安定化させるシャペロンであることが示唆された (図 18)。*Bcr4* が欠損すると、III 型分泌装置のインナーロッドが形成されず、基部のみが構築された状態で停止するため、III 型分泌タンパク質の分泌能を喪失することが考えられる (図 19、20)。

① *Bcr4* と *BscI* の相互作用について

本研究において、*Bcr4* の 58-173 番目のアミノ酸領域は *Bcr4* と *BscI* の結合に必要であることが示唆された (図 13B)。*Bcr4* の 1-57 番目のアミノ酸領域が *Bcr4* と *BscI* の結合に必要であるか調べるために、N 末端 1-57 番目のアミノ酸領域を欠損させた *Bcr4* (*Bcr4*Δ1-57-Strep) の精製を試みたが、大腸菌内における産生量が極端に少なかったため (データ未掲載)、pull-down assay に用いることができなかった。図 13C より、*Bcr4* の 159-163 番目のアミノ酸領域は III 型分泌装置の機能に必要であることが示唆された。これらの結果より、*Bcr4* の III 型分泌装置の機能に必要な領域 (159-163 番目のアミノ酸領域) は *Bcr4* が *BscI* と結合する領域 (58-173 番目のアミノ酸領域) に含まれていることが明らかとなったため、*Bcr4* と *BscI* の結合が III 型分泌装置の機能に必要であることが示唆された (図 13)。

② 野生株における *BscI* の菌体内量について

気管支敗血症菌において *bscI* 遺伝子と *bopD* 遺伝子は *bsc* 遺伝子座に存在し (図 12)、共通のプロモーターから転写されるため、気管支敗血症菌における *bscI* 遺伝子と *bopD* 遺伝子の mRNA 量は同じになることが考えられる。本研究では気管支敗血症菌野生株の全菌体画分において、*BopD* のシグナルは検出されたが、*BscI* のシグナルは検出されなかった (図 14)。精製した組換え型 *BscI* と気管支敗血症菌野生株の上清中の *BopD* がほぼ同じ重量になるようにサンプルを調製後、SDS-PAGE で展開し、*BscI* あるいは *BopD* に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、*BscI* および *BopD* のシグナルが同程度の強さで検出されたことから (データ未掲載)、本研究で作製した抗 *BscI* 抗体は必要十分な抗原検出感度を保持し

ていた。したがって、気管支敗血症菌の菌体内に存在する BscI の分子数は抗体の検出限界以下であることが強く示唆され、*bscI* 遺伝子の翻訳効率が低いことなどがその理由として考えられた。

③Bcr4 および BscI のホモログについて

先行研究より、気管支敗血症菌において Bcr4 を過剰に発現させると III 型分泌タンパク質の産生および分泌が促進されることが明らかとなっている (48)。また、Bcr4 は気管支敗血症菌野生株では菌体外に分泌されないことが明らかとなっている (48)。Bcr4 のホモログとして *Pseudomonas aeruginosa* の Pcr4 が挙げられるが (同一性は 26.6%)、これまで *Pseudomonas* 属細菌において Pcr4 を過剰に発現させた報告はなく、Pcr4 が III 型分泌タンパク質の産生および分泌の増加に関与するかは不明である。また、*Pseudomonas* 属細菌において Pcr4 は菌体外に分泌されるタンパク質であることが報告されているため (54)、Bcr4 は Pcr4 とは異なる働きをすることが考えられる。*Bordetella* 属細菌と同じアルカリゲネス科に属する *Achromobacter xylosoxidans* の hypothetical protein (NH44784_014631) は Bcr4 との同一性が 49.1%あり、Pcr4 と Bcr4 の同一性よりも高い。そのため、NH44784_014631 と Bcr4 は同じ機能をもつ可能性があるが、NH44784_014631 が *Achromobacter* 属細菌においてどのように機能するかは不明である。他の菌における Bcr4 のホモログの機能解析が進めば、Bcr4 の機能もより詳しく明らかになる可能性がある。

これまでに III 型分泌タンパク質の中で、ニードル、トランスロケーター、エフェクターに対するシャペロンが、*Yersinia* 属細菌などの III 型分泌装置を保持する菌において報告されている (55-58)。しかし、インナーロッドに対するシャペロンは報告されておらず、インナーロッドの菌体内における安定性や III 型分泌装置への輸送に関して、不明な点が多かった。BscI のホモログとして *Yersinia pseudotuberculosis* の YscI などが挙げられるが、BscI と YscI の同一性は 18.3%と低い。また、Bcr4 とアミノ酸配列において相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子は *Yersinia* 属細菌のゲノム上に存在しない。したがって、*Yersinia* 属細菌をはじめとする III 型分泌装置を保有する菌において、インナーロッドは *Bordetella* 属細菌とは異なるシステムで安定化されていることが考えられる。

④Bcr4 を過剰に発現させた場合に III 型分泌装置が活性化されることについて

これまで、気管支敗血症菌において Bcr4 を過剰に発現させると III 型分泌タンパク

質の産生および分泌が促進されることが明らかとなっている (48)。しかし、Bcr4 を過剰に発現させた場合、*bsc* 遺伝子座に存在する遺伝子の転写を抑制する調節因子である BspR の産生量は変化しない。したがって、菌体内における BspR の局在が変化することによって、III 型分泌装置の発現が制御されている可能性が考えられる。今後、Bcr4 が III 型分泌装置の構築に貢献する詳細な分子メカニズムを明らかにするために、Bcr4 を過剰に発現させた場合に、BspR が菌体の中心から膜側へと移行することを蛍光顕微鏡で観察し、また、膜貫通領域を付与することで BspR を膜へ結合させた場合に、III 型分泌タンパク質の産生および分泌量が増加するかを調べる必要がある。

5. 総括

第一章において、百日咳菌は環境中の酸化還元状態を感知し、III 型分泌タンパク質の産生および分泌を制御することを明らかとした。さらに、百日咳菌の III 型分泌タンパク質である BteA が細胞傷害性に重要な役割を果たすことを明らかとした。これによって、百日咳菌は酸化的な環境において BteA を細胞内に注入することで病原性を発揮することが考えられ、百日咳菌が感染する宿主内環境と III 型分泌装置の利用との関係性に知見を与えることができた。また、百日咳菌の感染部位を還元的にする薬剤が、百日咳の予防や治療薬になる可能性を見出した。

第二章において、気管支敗血症菌の Bcr4 は、III 型分泌装置のインナーロッドを構成すると考えられる BscI を菌体内で安定化させることで、III 型分泌装置の構築に貢献していることを明らかとした。Bcr4 と相同性を有するタンパク質は *Bordetella* 属細菌以外の細菌には認められないことから、本研究の結果により、*Bordetella* 属細菌固有の III 型分泌装置制御機構について知見を与えることができた。また、Bcr4 は百日咳菌にも高度に保存されており、Bcr4 の機能を阻害する低分子化合物が、百日咳の治療薬になることが期待できる。

以上のように本研究を通して、百日咳菌における III 型分泌装置の研究の進展および百日咳に対する新規薬剤開発の分子基盤の構築に貢献することができた。

6. 図表

表 1. 使用した菌株

菌名	菌株名	用途・性質	文献
百日咳菌	Tohama I 株	野生株	[27]
	BP344株	臨床分離株	本研究
	BP348株		
	BP350株		
	BP351株		
	Tohama NaI 株	ナリジクス酸耐性株	本研究
	ΔBscN株	III型分泌装置不活化株	本研究
	ΔBteA株	BteA欠損株	本研究
	ΔBspR株	BspR欠損株	本研究
気管支敗血症菌	S798株	野生株	[13]
	ΔBscI株	BscI欠損株	本研究
	ΔBscN株	III型分泌装置不活化株	[13]
	ΔBcr4株	Bcr4欠損株	[48]
	ΔBspR株	BspR欠損株	[21]
	ΔBcr4ΔBspR株	BspR・Bcr4二重欠損株	[48]
大腸菌	DH10B	DNAクローニング	invitrogen
	SM10λ <i>pir</i>	スーサイドベクターの宿主 接合ドナー菌株	[13]
	BL21	組換えタンパク質発現	[49]

表 2. 使用した臨床分離株

NIID No.	患者(年齢・性別)	分離年月	分離場所	Prnの産生	FHAの産生
344株	5歳男児	2008/9/10	愛知県	+	+
348株	41歳女性	2009/6/1	三重県	+	+
350株	13歳女児	2009/6/1	三重県	+	+
351株	4ヶ月女児	2009/7/1	高知県	<i>prn1::IS481</i>	+

表 3. 使用した培地

	SS	LCA	SS_AsA-	SS_CaA-	SS_AsA-CaA-	SS_1/20AsA	SS 1/20AsA_1/2CaA
Basal medium (g/L)	Sodium Gultamate			10.7			
	L-Proline			0.24			
	NaCl			2.5			
	KCl			0.2			
	KH ₂ PO ₄			0.5			
	MgCl ₂ 6H ₂ O			0.1			
	CaCl ₂			0.02			
	Tris			6.1			
	Casamino acid	10	0.5	10	0	0	10
	NH ₄ Cl				0		
	L-lactate				0		
Supplement (g/L)	NaOH			0			
	Dimethyl-β-cyclodextrin			1			
	L-cysteine HCl			4			
	FeSO ₄ 7H ₂ O			1			
	Ascorbic acid	40	2	0	40	0	2
	Niacin				0.4		
	Reduced glutathione				15		
	L-cystine				0		
	CaCl ₂ 2H ₂ O				0		
	HCl				0		

表 4. 使用したプラスミド

プラスミド	選択マーカー*	用途・性質	文献
pDONR201	Km	クローニングベクター	invitrogen
pABB-CRS2	Amp	スーサイドベクター	[28]
pABB-CRS2- Δ bscN	Amp	Δ BscN株の作製	[12]
pABB-CRS2- Δ bteA	Amp	Δ BteA株の作製	[15]
pABB-CRS2- Δ bspR	Amp	Δ BspR株の作製	本研究
p99ccdB-V5	Amp	V5タグを付与したタンパク質の発現	[49]
p99ccdB- <i>bscI</i> -V5	Amp	V5タグを付与したBscIの発現	本研究
p99ccdB- <i>bscK</i> -V5	Amp	V5タグを付与したBscKの発現	本研究
p99ccdB- <i>bcr4</i> -V5	Amp	V5タグを付与したBcr4の発現	本研究
pColdII	Amp	Hisタグを付与したタンパク質の発現	TAKARA
pColdII- <i>bcr4</i> -Strep	Amp	HisタグおよびStrepタグを付与したBcr4の発現	本研究
pColdII- <i>bscI</i> -Strep	Amp	HisタグおよびStrepタグを付与したBscIの発現	本研究
pColdII- <i>bcr4</i> Δ 58-109-Strep	Amp	HisタグおよびStrepタグを付与したBscI Δ 58-109の発現	本研究
pColdII- <i>bcr4</i> Δ 110-173-Strep	Amp	HisタグおよびStrepタグを付与したBscI Δ 110-173の発現	本研究
pColdII- <i>bteA</i> -N-Strep	Amp	HisタグとStrepタグを付与したBteAのN末端312アミノ酸の発現	[22]
pABB-CRS2- Δ bscI	Amp	Δ BscI株の作製	本研究
pRK415-R4-R3-F	Tc	ボルデテラ用の発現ベクター	[15]
pDONR- <i>fhaP</i>	Km	ボルデテラ用のプロモーター	[15]
pDONR- <i>rrnB</i>	Km	ボルデテラ用のターミネーター	[15]
pRK415- <i>fhaP</i> - <i>bcr4</i> -FLAG- <i>rrnB</i>	Tc	Δ Bcr4/pRK-Bcr4-FLAG株の作製	本研究
pRK415- <i>fhaP</i> - <i>bcr4</i> Δ 169-173-FLAG- <i>rrnB</i>	Tc	Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 169-173-FLAG株の作製	本研究
pRK415- <i>fhaP</i> - <i>bcr4</i> Δ 164-173-FLAG- <i>rrnB</i>	Tc	Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 164-173-FLAG株の作製	本研究
pRK415- <i>fhaP</i> - <i>bcr4</i> Δ 159-173-FLAG- <i>rrnB</i>	Tc	Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 159-173-FLAG株の作製	本研究
pRK415- <i>fhaP</i> - <i>bscI</i> -FLAG- <i>rrnB</i>	Tc	Δ BscI/pRK-BscI株の作製	本研究

* Km: Kanamycin

Amp: Ampicillin

Tc: Tetracycline

表 5. 使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'→3')
B1-bspR	AAAAAGCAGGCTCGCCGTTTCCACCACGTAA
B2-bspR	AGAAAGCTGGGTGGCCAATATCCTGTCTCAGC
R1-bspR	CGCGGATCCCATACGGCGCAAGAATGGCT
R2-bspR	CGCGGATCCAAAGACATCAAGCTCCAAAG
5-os-bspR	GTACGAAGCGGAGCACTGAC
3-os-bspR	TACCGATCTGGTCAACGAGC
5-os-bscN	GCCATTGGTCGCGCTGGATCTTGTG
3-os-bscN	TCGCGCGCCATGGCATGCAATCCTC
5-os-bteA	CGGCGGGTGGACGTGATCCGGGAGG
3-os-bteA	AAGGCTCGAACGACCCGGACACCTC
5-recA	ATGAAGATCGGCGTGATGT
3-recA	TAGAAGTTGAGCGCGTTGC
5-bteA	AATGGCCTTGGTGGGAAC
3-bteA	ATTCAGCGCCGTGATCTT
5-bopB	GTCTGCTGACAGCGTTGG
3-bopB	GGGGTTCGATCAGCAAGAC
B1-bscl-V5	AAAAAGCAGGCTTGTGGACAGCGGACCCGCC
B2-bscl-V5	AGAAAGCTGGGTTTGACATTCTCGCCAGCGTGTC
B1-bscK-V5	AAAAAGCAGGCTTGGCGCACGCGCTGGTCCCG
B2-bscK-V5	AGAAAGCTGGGTTGGCTTGGGCGGGGAACGAGG
B1-bcr4-comp	AAAAAGCAGGCTGCCAGGTCCGGTCTCGCACCG
B2-bcr4-V5	AGAAAGCTGGGTTTCCAGGAGCTCCAGGTAATG
5-HindIII-bcr4	ATCCGAATTCAAGCTTCATTAGACTCAGGTTAGATTC
3-bcr4-Strep	CGGGTGGCTCCATCCAGGAGCTCCAGGTAATG
5-HindIII-bscl	ATCCGAATTCAAGCTTAATTTGGATCTGACGGCGATC
3-bscl-Strep	CGGGTGGCTCCATGACATTCTCGCCAGCGTGTC
3-Strep-HindIII	GCAGGTCGACAAGCTTTCATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA
5-bcr4-58-109-Strep-IF	GCCGTCAGCGATCTGTCGGACTGGACGCCTGGTG
3-IF-bcr4-58-109-Strep	CAGATCGCTGACGGCCGCCG
5-bcr4-110-173-Strep-IF	TGGAGCCACCCGAGTTTGA
3-IF-bcr4-110-173-Strep	CTGCGGGTGGCTCCAGCGGTCTCCGCTGTGCCG
B1-bscl	AAAAAGCAGGCTTCATGACTGTTACGACGAC
B2-bscl	AGAAAGCTGGGTGCACAAGATCCAGCGCGACC
R1-bscl	CGACGTTGGCGTTGATCGCCGTCAGATC
R2-bscl	TCAACGCCAACGTCGACACGCTGGCGAG
5-os-bscl	ACATGATCGCGAAGATGATC
3-os-bscl	AAGGCGTCCGTGGACAATAG
5-bcr4-FLAG-IF	CCACCCGAGTTTCGAAAAATGAATTTGGATCTACCCAGCTTTCTTG
3-IF-bcr4-FLAG	TCGAACTGCGGGTGGCTCCATCCAGGACCTCCAGGTAATGGCTCG
3-IF-bcr4Δ169-173-FLAG	GTCATCCTTGTAGTCTAATGGCTCGGACTGCAACG
3-IF-bcr4Δ164-173-FLAG	GTCATCCTTGTAGTCCAACGGCGGGGCCGATCATG
3-IF-bcr4Δ159-173-FLAG	GTCATCCTTGTAGTCCATCATGGCGGGTCCGCTGTC
3-B2-bscl-comp	AGAAAGCTGGGTTTGACATTCTCGCCAGCGTGTC

表 6. 使用実験機器

名称	メーカー	用途
恒温培養器	ADVANTEC	寒天培地における菌の培養
Ultrospec 2100 pro	Amersham	菌懸濁液の吸光度の測定
中型恒温振とう培養機 バイオシェーカー	TAITEC	菌の液体培養
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad	PCR
NanoDrop spectrometer	Thermo	DNA濃度の測定
サブマリン型電気泳動装置 Mupid-2	Mupid	DNAの電気泳動
Light Cycler 96	Roche	RT-PCR
Centrifuge 5424R	eppendorf	遠心分離
ブロックインキュベーター	ASTEC	試料の煮沸
ミニリアルスラブ電気泳動装置	Biocraft	タンパク質の電気泳動
セミドライドランスファー装置	Biocraft	PVDF膜へのタンパク質の転写
multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー	Thermo	wellの吸光度の測定
正立型蛍光顕微鏡 Axioplan2 imaging	zeiss	蛍光観察

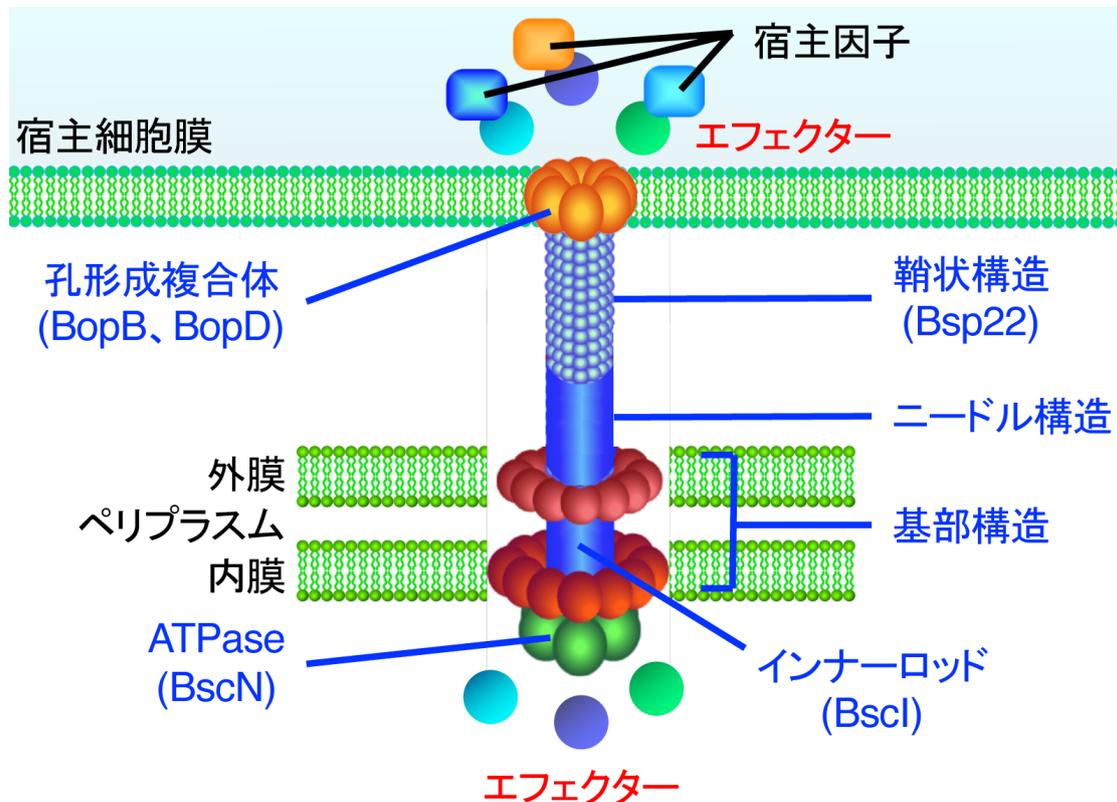


図 1. *Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置を介したエフェクターの宿主内移行

III型分泌装置は内膜、外膜を貫通する基部構造と菌体外に突出したニードル構造から構成される。ニードル構造はインナーロッド (BscI) を介して基部構造に結合する。*Bordetella* 属細菌のニードル構造の先端には Bsp22 と呼ばれるIII型分泌タンパク質によって構成される鞞状構造が存在する。ニードル構造の先端と宿主細胞膜との接触部では、孔形成複合体 (BopB、BopD) と鞞状構造 (Bsp22) が小孔を形成する。ニードル構造から孔形成複合体を通して宿主細胞内へ注入される機能性タンパク質 (エフェクター) は、宿主側因子と相互作用することで宿主細胞内のシグナル伝達を攪乱する。

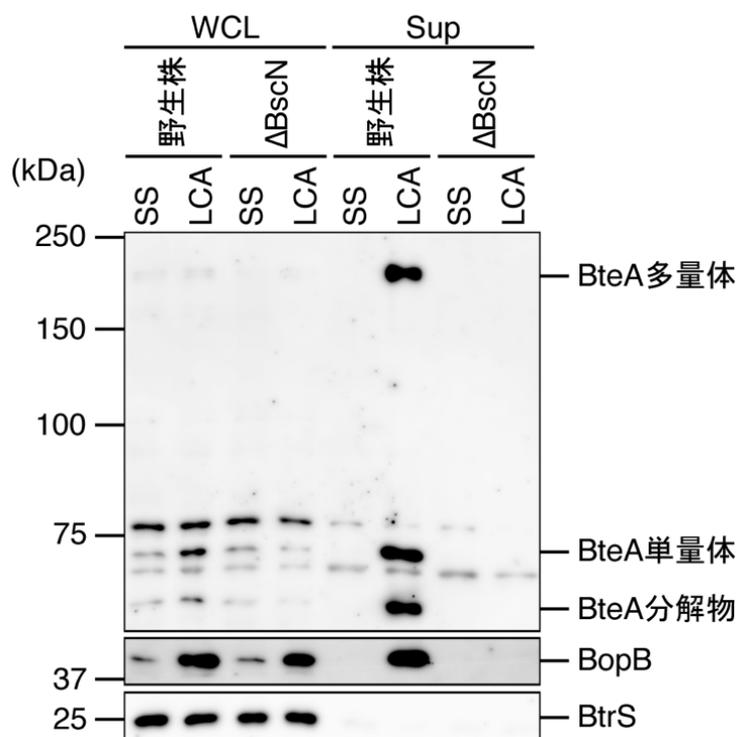


図 2. LCA 培地を用いた培養におけるIII型分泌タンパク質の産生と分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BteA、BopB、BtrS に対する抗体を用いてウエスタンブロットティングを行なった結果を示した。菌体内タンパク質が漏出していないことを確認するために、RNAポリメラーゼのシグマファクターであるBtrSに対する抗体を用いた。SSはSS培地、LCAはLCA培地を示す。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液のOD値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。

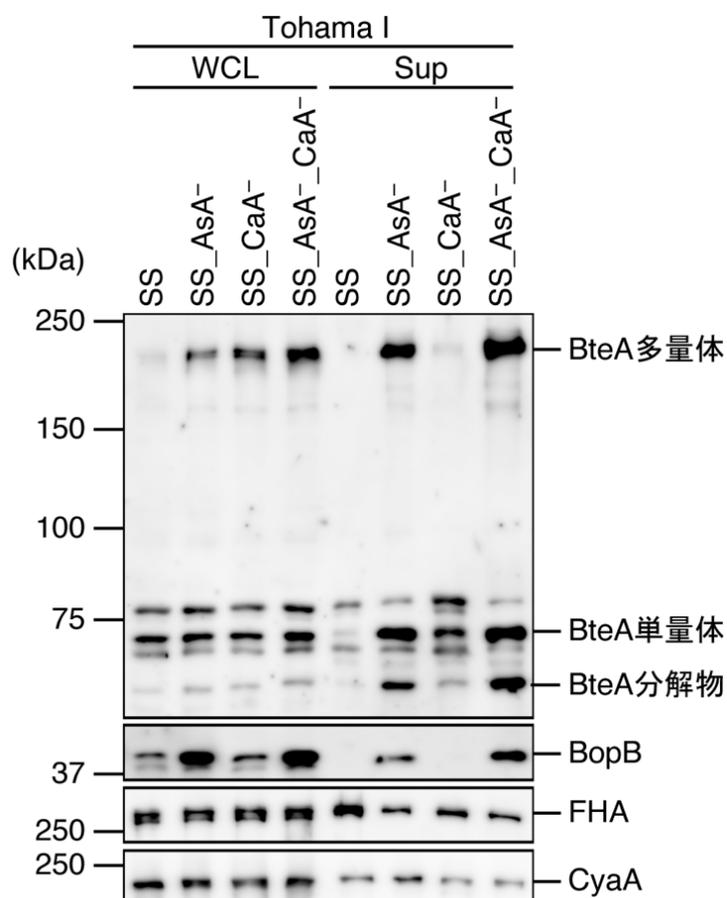


図 3. アスコルビン酸やカザミノ酸を除去した SS 培地を用いた培養における III 型分泌タンパク質、付着因子、毒素の産生および分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BteA (III 型分泌タンパク質)、BopB (III 型分泌タンパク質)、FHA (付着因子)、CyaA (毒素) に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示した。SS は SS 培地、SS_A_{sA}⁻ はアスコルビン酸を除去した SS 培地、SS_CaA⁻ はカザミノ酸を除去した SS 培地、SS_A_{sA}⁻_CaA⁻ はアスコルビン酸とカザミノ酸の両方を除去した SS 培地を示す。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。

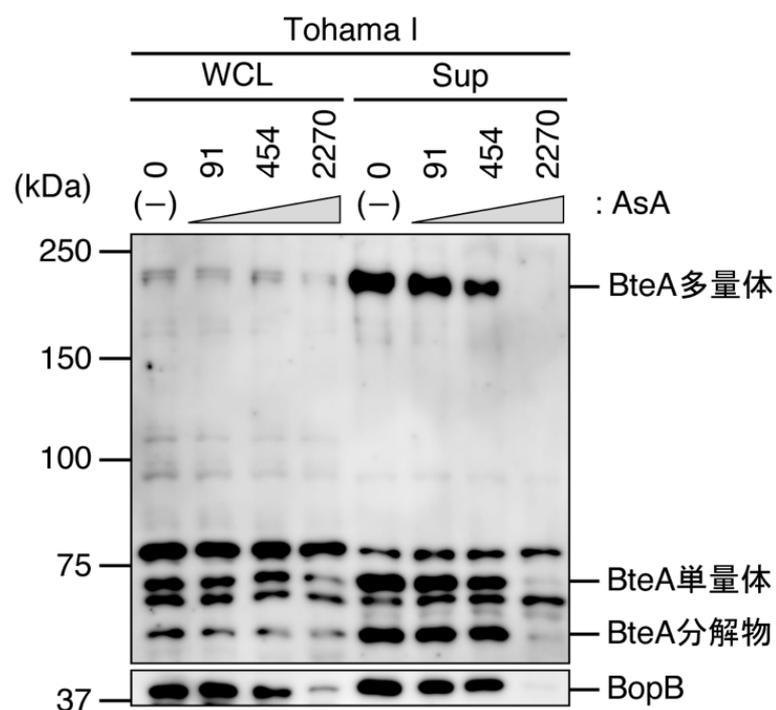


図 4. アスコルビン酸の濃度が異なる SS 培地を用いた培養における III 型分泌タンパク質の産生および分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BteA、BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった結果を示した。0、91、454、2,270 はアスコルビン酸の濃度が 0、91、454、2,270 μM であることを示す。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。

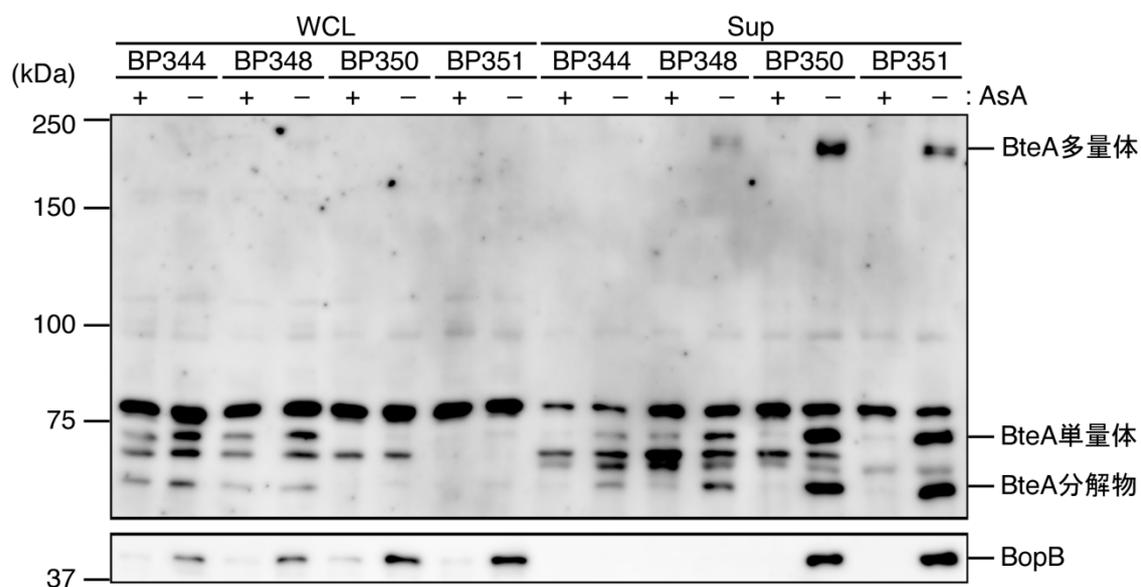


図 5. SS_AsA-培地で培養した百日咳菌臨床分離株における BteA と BopB の産生および分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BteA、BopB に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった結果を示した。+、- は、それぞれ SS 培地、SS_AsA-培地を示す。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。

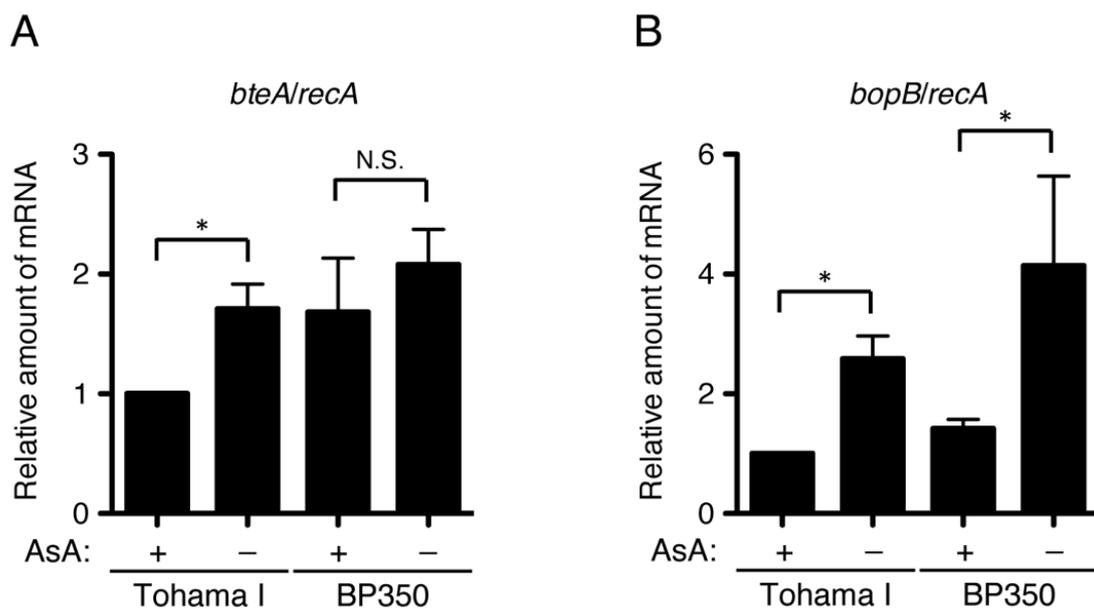


図 6. SS_AsA-培地を用いた培養におけるIII型分泌タンパク質の mRNA 量

各菌株より全 mRNA を調製し、逆転写反応後、*bteA* (A)、*bopB* (B) の mRNA の量を qRT-PCR によって測定した結果をヒストグラムで示した。百日咳菌 Tohama I 株、BP350 株の培養にはアスコルビン酸 (AsA) を含有する SS 培地 (+) あるいは含有しない SS_AsA-培地 (-) を用いた。縦軸は SS 培地で培養した Tohama I 株を基準とした *bteA* (A)、*bopB* (B) の mRNA の相対量を示す。各 mRNA 量はハウスキーピング遺伝子である *recA* で標準化した。データは 3 回の実験結果の平均値を示す。* は $P < 0.05$ 、N.S. は有意差が認められないことを示す。

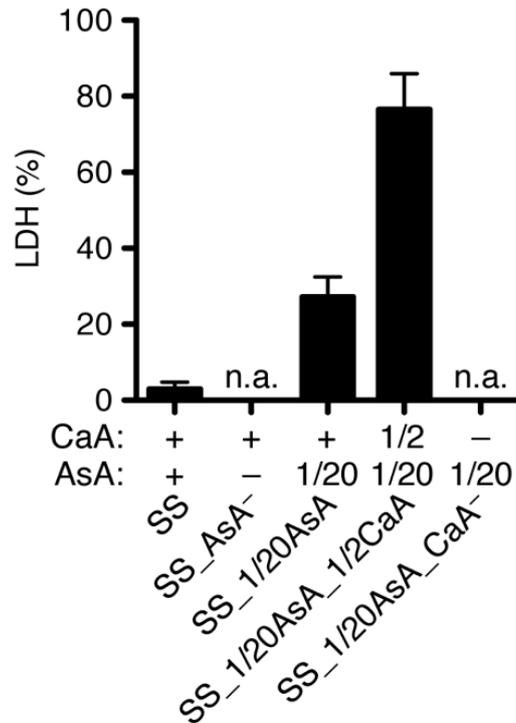


図 7. 百日咳を L2 細胞に感染させた場合に培地中に遊離する LDH 量の測定

感染時の培地に SS 培地、アスコルビン酸を含有しない SS 培地 (SS_{AsA-}培地)、SS 培地の 1/20 の量のアスコルビン酸を含有する SS 培地 (SS_{1/20AsA})、SS 培地の 1/20 の量のアスコルビン酸を含有し 1/2 の量のカザミノ酸を含有する培地 (SS_{1/20AsA_1/2CaA})、SS 培地の 1/20 の量のアスコルビン酸を含有し、カザミノ酸を含有しない SS 培地 (SS_{1/20AsA_CaA-}) を用いた。Tohama I 株を L2 細胞に MOI 500 で 3 時間感染させた後、培地中の 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。*は P < 0.05、n.a.は培地自体によって細胞が傷害され、データを取得できなかったことを示す。

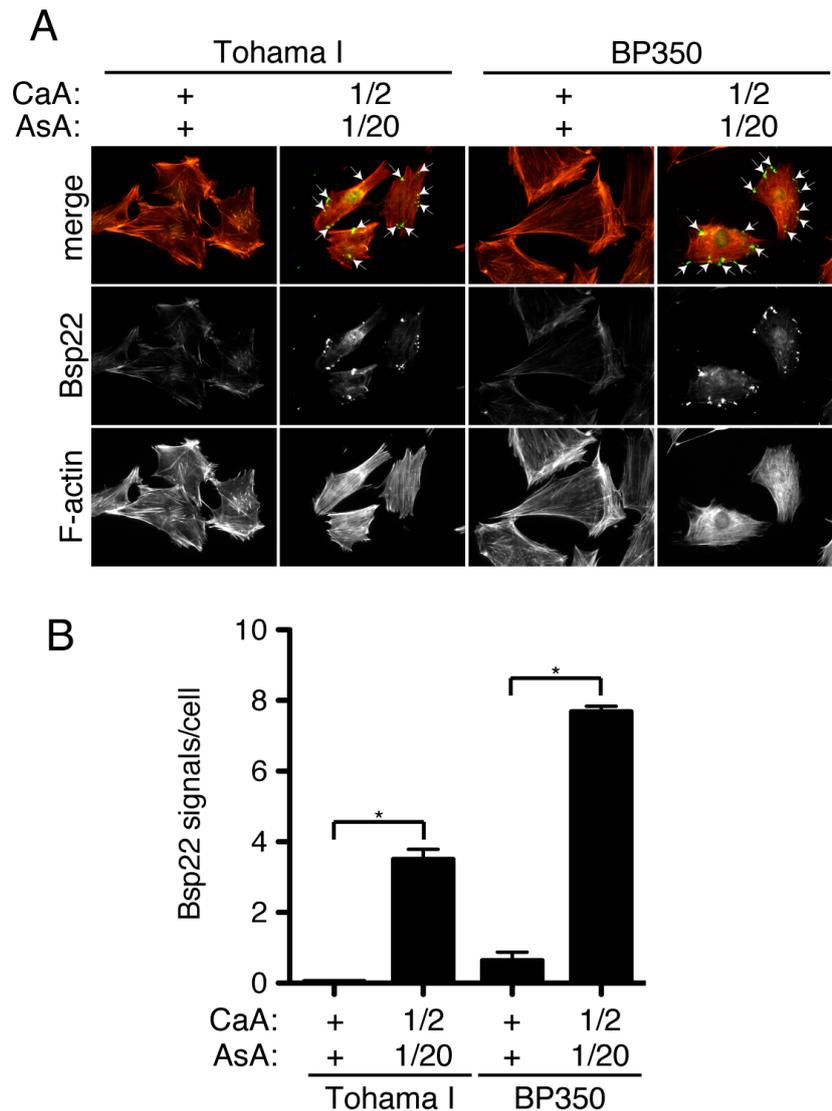


図 8. 百日咳菌を感染させた L2 細胞に対する抗 Bsp22 抗体を用いた免疫蛍光染色
 (A) Tohama I 株を SS 培地あるいは SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養し、MOI 125 で 3 時間感染させた L2 細胞を、抗 Bsp22 抗体、Rhodamine Phalloidin を用いて染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した結果を示した。+、1/2、1/20 は、培地中のカザミノ酸 (CaA) あるいは AsA (アスコルビン酸) の量が SS 培地と同一、1/2、1/20 であることを示す。緑色のシグナルは Bsp22 を示し (矢印)、赤色のシグナルは F-actin を示す。(B) 1 細胞あたりの Bsp22 のシグナル数を計測した結果をヒストグラムで示す。1 回の実験で最低でも 120 個の細胞におけるシグナル数を計測した。ヒストグラムは 3 回の実験結果の平均値を示す。*は $P < 0.05$ 、N.S.は有意差が認められないことを示す。

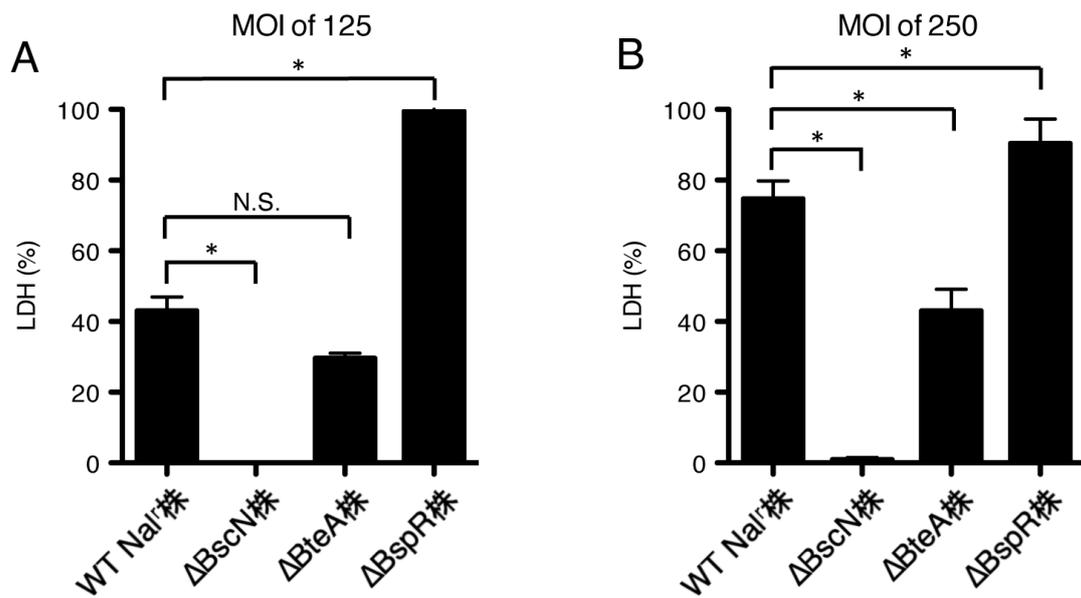


図 9. 百日咳菌感染による BteA 依存的な細胞傷害性

SS_1/20AsA_1/2CaA 培地で培養した Tohama Nal^r 株、ΔBscN 株 (III 型分泌装置不活化株)、ΔBteA 株、ΔBspR 株を SS_1/20AsA_1/2CaA 培地中で L2 細胞に MOI 125 (A) あるいは 250 (B) で 3 時間感染させた。その後、培地中の 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。*は $P < 0.05$ 、N.S.は有意差が認められないことを示す。

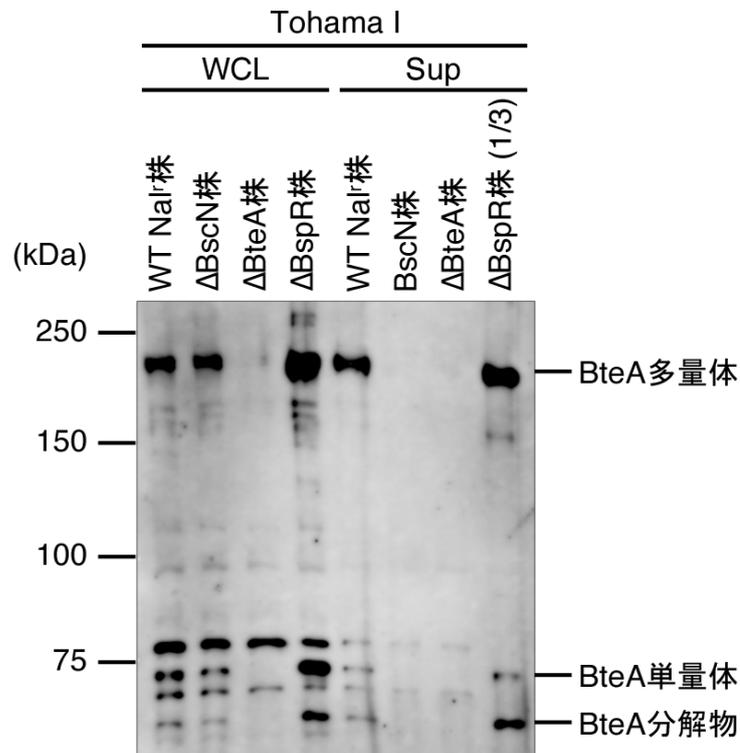


図 10. 百日咳菌変異株における BteA の産生および分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BteA に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった結果を示した。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にサンプル量を調整した。シグナル強度が過剰になることを回避するために、 Δ BspR 株の上清画分は他のサンプルの 1/3 に相当する量を流した。

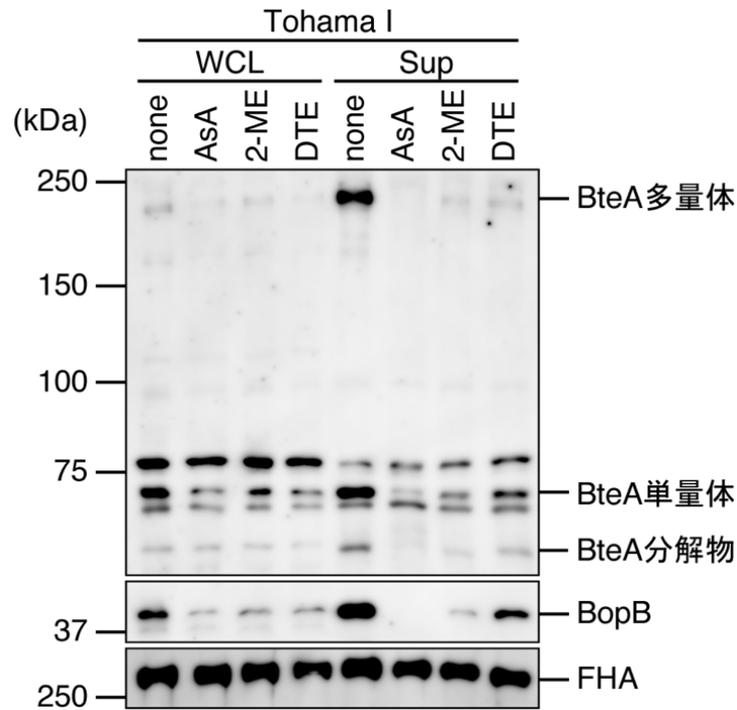


図 11. 還元剤を含有する培地を用いた場合におけるIII型分泌タンパク質の産生および分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BteA、BopB、FHA に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった結果を示した。AsA、2-ME、DTE はそれぞれ SS_AsA-培地中にアスコルビン酸、2-メルカプトエタノール (2-ME)、ジチオエリスリトール (DTE) を終濃度 2.3、2.1、3.0 mM 含有していることを示す。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。

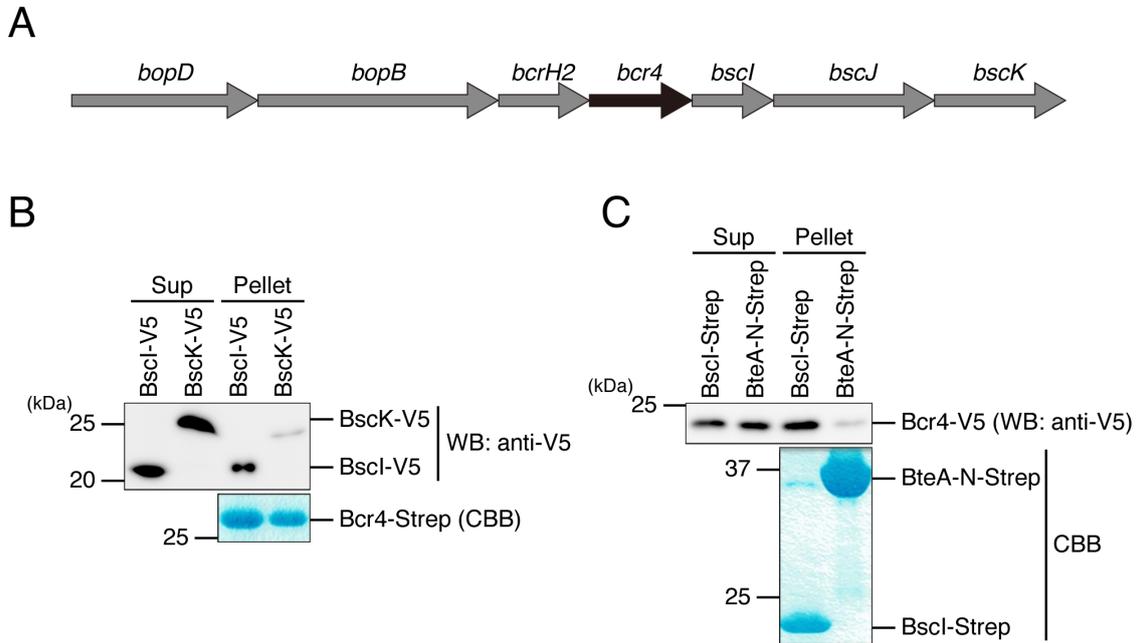


図 12. Bcr4 とインナーロッド BscI の相互作用

(A) 気管支敗血症菌 S798 染色体の *bsc* 遺伝子座上に存在する *bcr4* 遺伝子とその周辺に存在する遺伝子を示した。(B) 精製した Bcr4 (Bcr4-Strep) を結合させた Strep-Tactin ビーズと、V5 タグを付与した BscI あるいは BscK (BscI-V5 あるいは BscK-V5) を含有する大腸菌の溶解液を混合した。上清画分 (Sup) およびペレット画分 (Pellet) を調製し、これらの画分を SDS-PAGE で展開後、抗 V5 抗体を用いてウエスタンブロッティング (WB、上) およびペレット画分を Coomassie Brilliant Blue (CBB、下) 染色した結果を示した。(C) 精製した BscI (BscI-Strep) あるいは BteA の N 末端部分 (アミノ酸領域 1-312、BteA-N-Strep) を結合させた Strep-Tactin ビーズと、V5 タグを付与した Bcr4 (Bcr4-V5) を含有する大腸菌の溶解液を混合した。その後、上清画分 (Sup) およびペレット画分 (Pellet) を調製し、これらの画分を SDS-PAGE で展開後、抗 V5 抗体を用いてウエスタンブロッティング (WB、上) およびペレット画分を Coomassie Brilliant Blue (CBB、下) 染色した結果を示した。

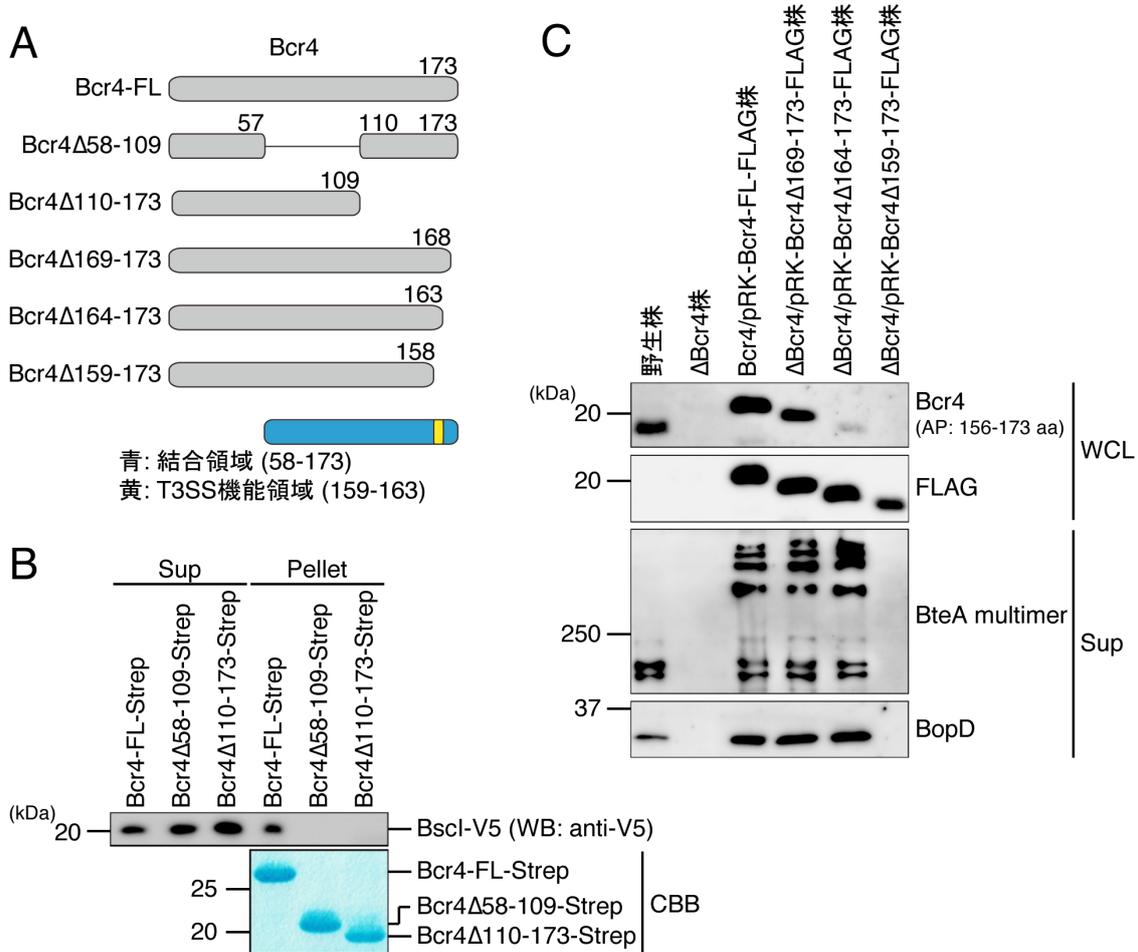


図 13. BscI との相互作用と III 型分泌装置の機能に必要な Bcr4 ドメイン

(A) pull-down assay (パネル B)、III 型分泌装置の機能解析 (パネル C) に用いた Bcr4 変異体を示す。(B) 精製した Bcr4-FL、Bcr4Δ58-109、Bcr4Δ110-173 (Bcr4-FL-Strep、Bcr4Δ58-109-Strep、Bcr4Δ110-173-Strep) を結合させた Strep-Tactin ビーズと、BscI-V5 を含有する大腸菌の溶解液を混合した。上清画分 (Sup) およびペレット画分 (Pellet) を調製し、これらの画分を SDS-PAGE で展開後、抗 V5 抗体を用いたウエスタンブロッティング (WB、上) およびペレット画分を Coomassie Brilliant Blue (CBB、下) 染色した結果を示した。(C) 各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) と上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、Bcr4、FLAG、BteA あるいは BopD に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示した。AP は抗 Bcr4 抗体作製に使用した抗原ペプチド (Antigen Peptide) のアミノ酸領域を示す。同じ量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調

整した。抗 BteA 抗体または抗 BopD 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行う場合、シグナル強度が過剰になることを回避するために、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4-FL-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 169-173-FLAG 株、 Δ Bcr4/pRK-Bcr4 Δ 164-173-FLAG 株の上清画分は、他のサンプルの 1/100、1/50 に相当する量を流した。

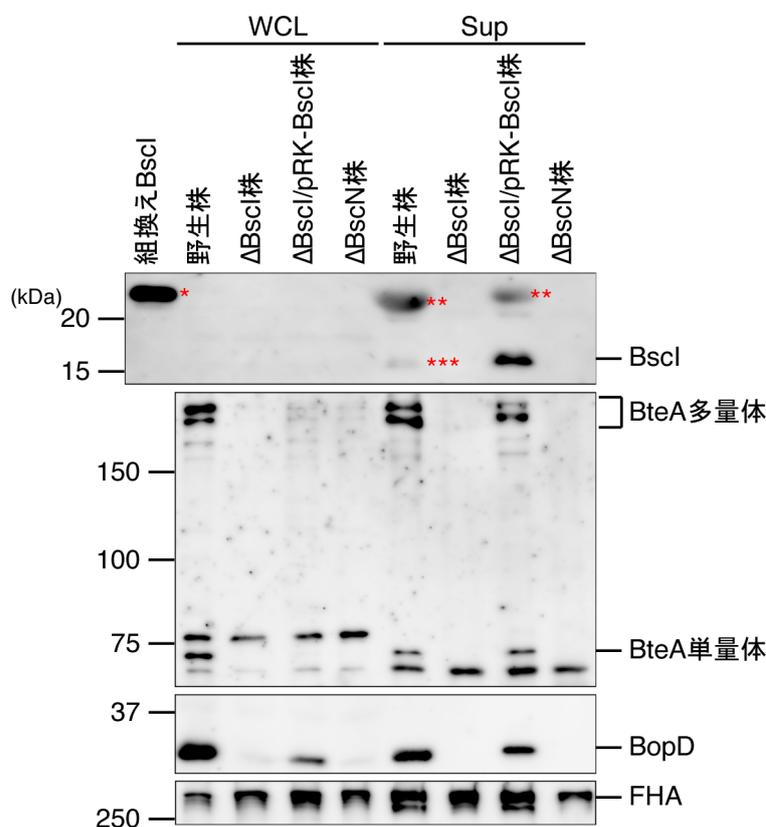


図 14. BscI 欠損株における III 型分泌タンパク質の分泌量の解析

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) あるいは上清画分 (Sup) を SDS-PAGE で展開後、BscI、BteA、BopD、FHA に対する抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った結果を示した。コントロールとして Strep タグを付与した BscI (組換え BscI) を流した。*、**、***はそれぞれ BscI-Strep のシグナル、非特異的シグナル、BscI の微弱なシグナルを示す。同量の菌体から調製した全菌体画分あるいは上清画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。

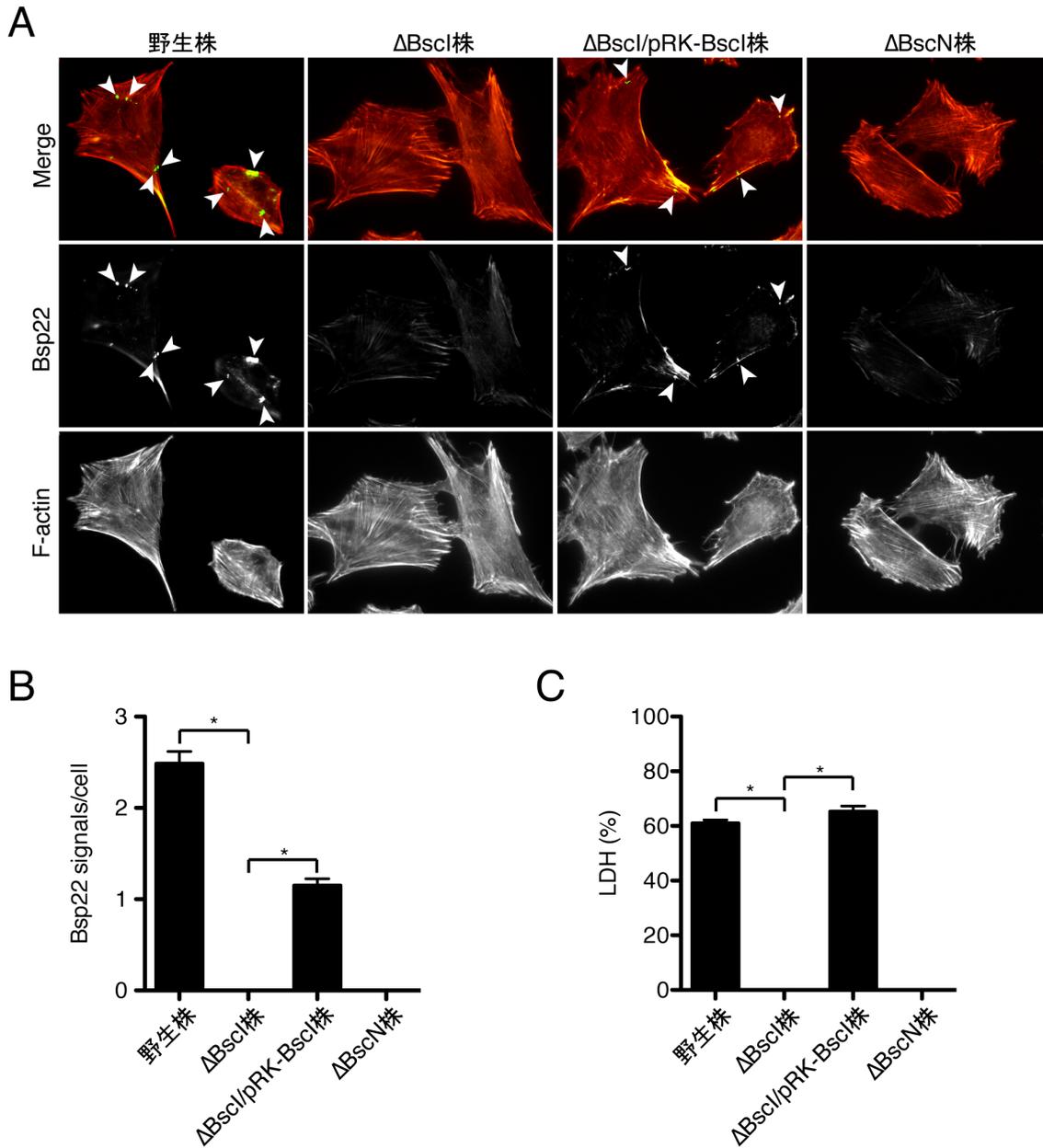


図 15. 気管支敗血症菌を感染させた L2 細胞に対する抗 Bsp22 抗体を用いた免疫蛍光染色と培地中に遊離する LDH 量の測定

(A) 野生株、 Δ BscI 株 (BscI 欠損株)、 Δ BscI/pRK-BscI 株 (BscI 相補株)、 Δ BscN 株 (III 型分泌装置不活化株) を SS 培地で培養し、MOI 125 で 3 時間感染させた L2 細胞を、抗 Bsp22 抗体、Rhodamine Phalloidin を用いて染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した結果を示した。緑色のシグナルは Bsp22 を示し (矢印)、赤色のシグナルは F-actin を示す。(B) 1 細胞あたりの Bsp22 のシグナル数を計測した結

果を示す。1 回の実験で最低でも 120 個の細胞におけるシグナル数を計測した。ヒストグラムは 3 回の実験結果の平均値を示す。*は $P < 0.05$ 、N.S.は有意差が認められないことを示す。(C) SS 培地で培養した野生株、 $\Delta BscI$ 株 (BscI 欠損株)、 $\Delta BscI/pRK-BscI$ 株 (BscI 相補株)、 $\Delta BscN$ 株 (III 型分泌装置不活化株) を L2 細胞に MOI 200 で 1 時間感染させた。その後、培地中の 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。*は $P < 0.05$ 、N.S.は有意差が認められないことを示す。

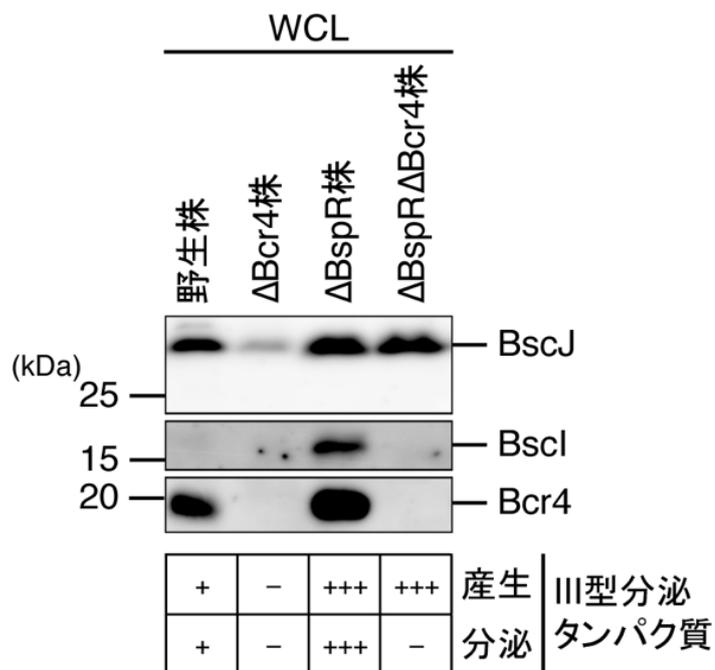


図 16. BscI の安定性に対する Bcr4 の影響

各培養液より調製した全菌体画分 (WCL) を SDS-PAGE で展開後、BscI (インナーロッド)、BscJ (内膜リング)、Bcr4 に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。同じ量の菌体から調製した全菌体画分が泳動されるように培養液の OD 値を基にゲルにアプライするサンプル量を調整した。抗 BscJ または Bcr4 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行う場合、シグナル強度が過剰になることを回避するために、ΔBspR 株および ΔBspRΔBcr4 株の全菌体画分は他のサンプルの 1/10 に相当する量を流した。各菌株の III 型分泌タンパク質の産生量および分泌量を野生株レベル (+)、高レベル (+++) あるいは低レベル (-) で示した。

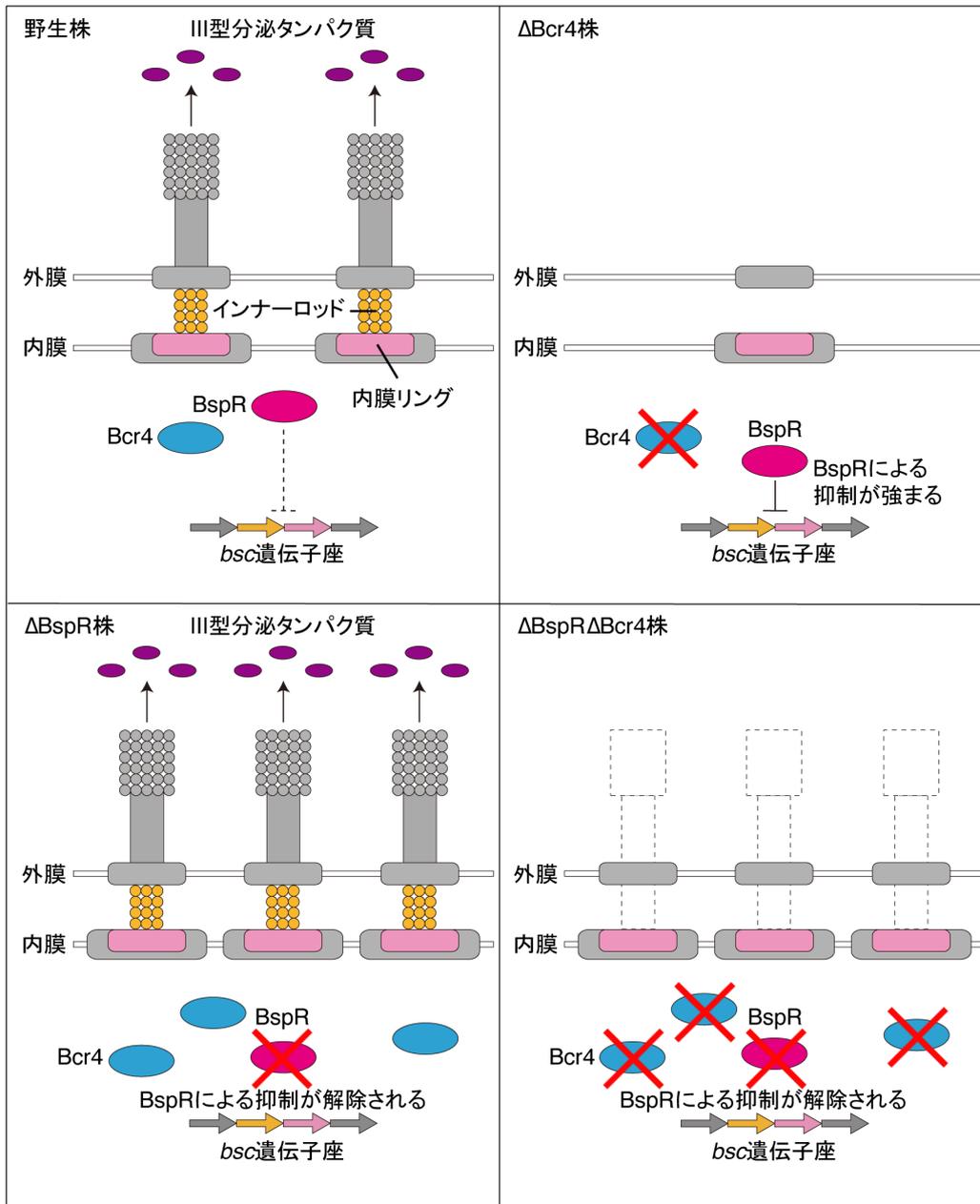


図 17. Bcr4 や BspR を欠損させた菌株における III 型分泌装置の構築

野生株 (左上) では BspR によって *bsc* 遺伝子座上の遺伝子の転写が負に制御されるものの、完全には抑制されず、III 型分泌装置は構築される。Bcr4 欠損株 (右上) では BspR による *bsc* 遺伝子座上の遺伝子の転写の抑制効果が強まるため、III 型分泌装置の構築が抑制される。BspR 欠損株 (左下) では BspR による抑制効果が解除されるため、III 型分泌装置の構築が促進される。BspR・Bcr4 二重欠損株 (右下) でも BspR による抑制効果が解除されるため、III 型分泌装置の構築は促進されるが、Bcr4 が欠損しているため III 型分泌タンパク質は分泌されない。

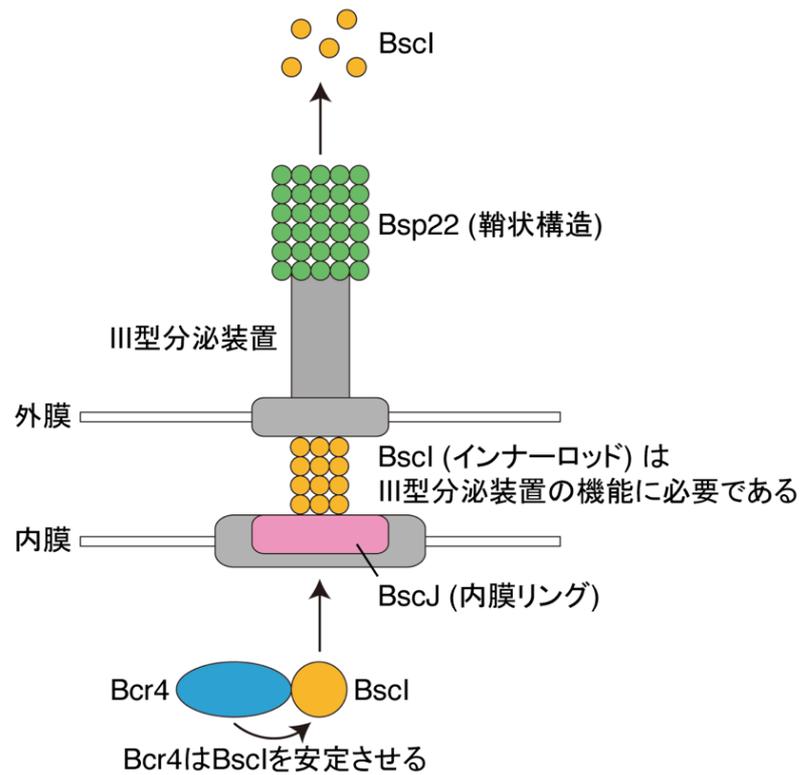
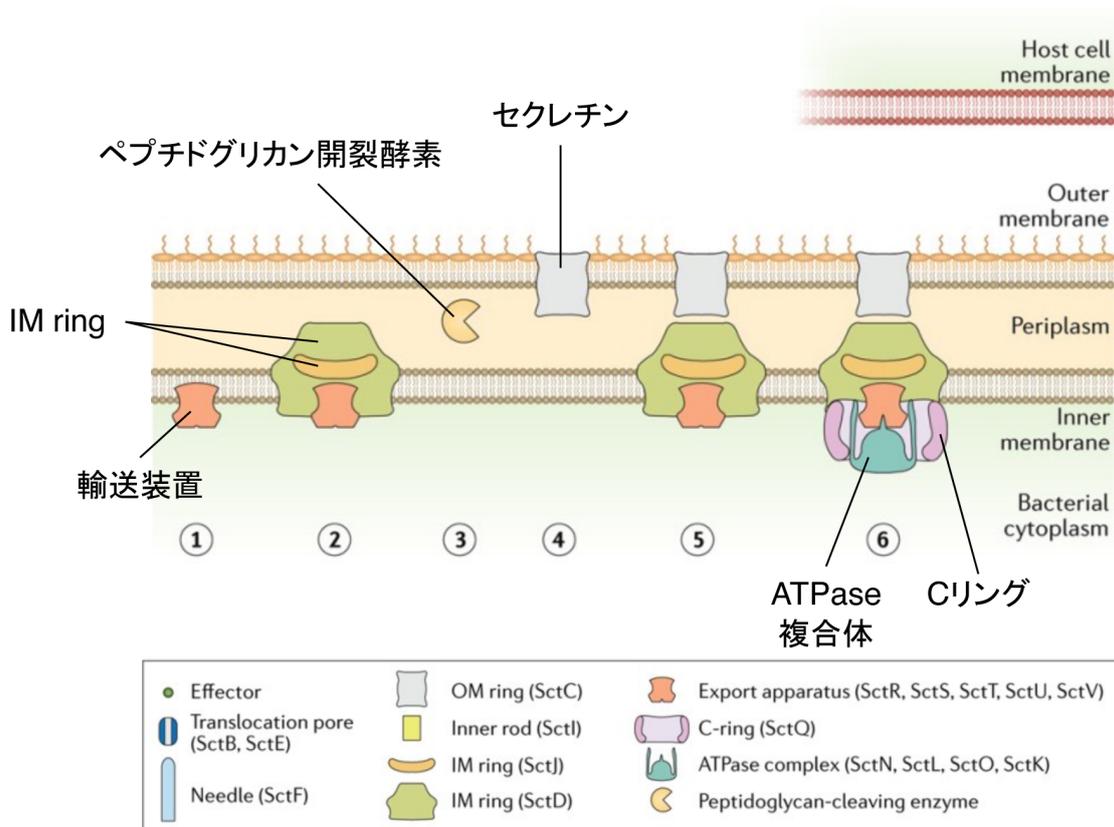


図 18. Bcr4 と BscI の機能に関する模式図

気管支敗血症菌の細胞質内において、Bcr4（青）は BscI（オレンジ）を安定化させる。その後、BscI は III 型分泌装置（灰色）に局在し、インナーロッドを形成すると考えられる。BscI は III 型分泌装置の機能に必要であり、菌体外に分泌される。BscJ（ピンク）は、内膜リングとして機能することが予想される。Bsp22（緑）は鞘状構造を形成している。

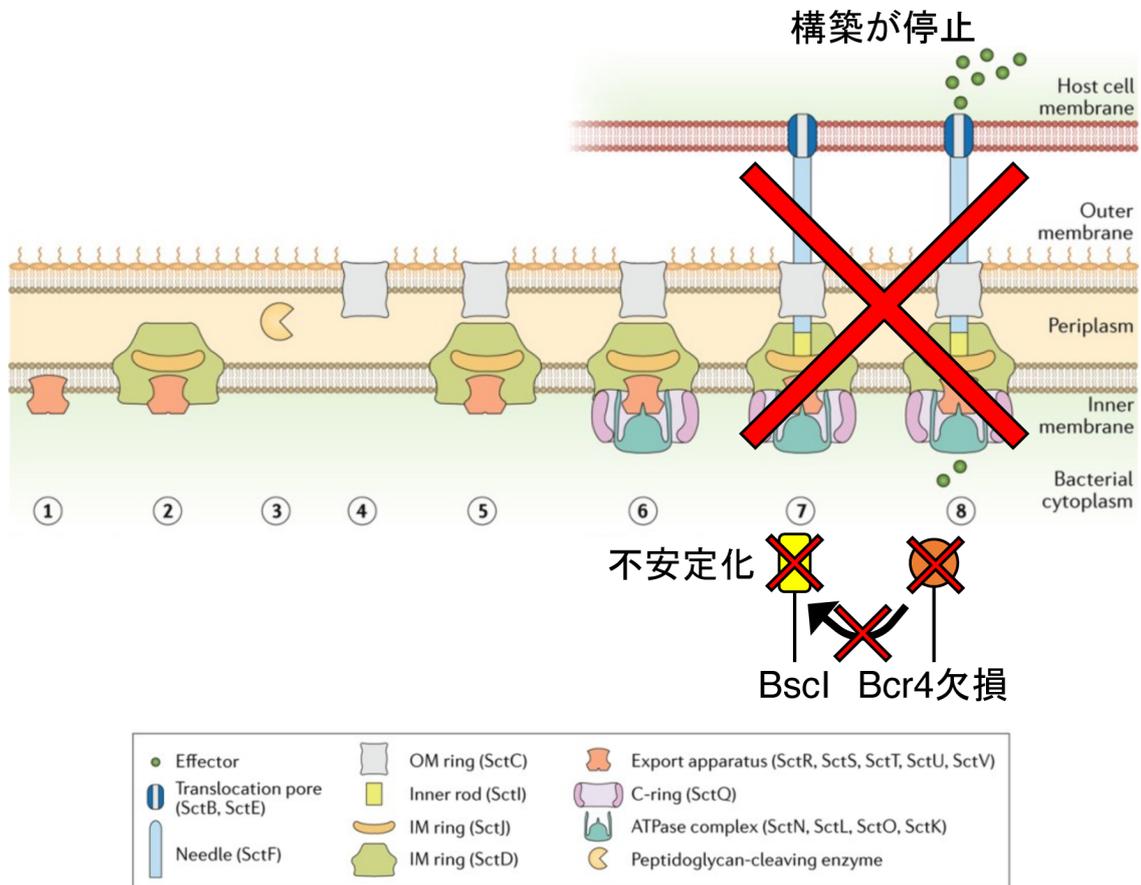


下記文献内の図を一部改変：

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 19. III 型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 ring）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構築するために、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。



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 20. Bcr4 が欠損している場合の III 型分泌装置構築モデル

Bscl のシャペロンである Bcr4 が欠損している場合、Bscl の安定性が低下し、分泌装置内に Bscl 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。

7. 参考文献

1. Goodnow RA. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev 44:722-738.
2. Melton AR, Weiss AA. 1989. Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol 171:6206-6212.
3. Connor KM, Porter JF, Quirie MM, Donachie W. 1996. Moredun *Bordetella* Medium, an improved selective medium for isolation of *Bordetella parapertussis*. J Clin Microbiol 34:638-640.
4. Pittman M. 1979. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. Reviews of infectious diseases 1:401-412.
5. Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, Sutherland WM, Gray MC. 1989. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. J Biol Chem 264:19379-19384.
6. Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S. 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. Proc Natl Acad Sci U S A 86:2637-2641.
7. Roberts M, Fairweather NF, Leininger E, Pickard D, Hewlett EL, Robinson A, Hayward C, Dougan G, Charles IG. 1991. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. Mol Microbiol 5:1393-1404.
8. Smith AM, Guzman CA, Walker MJ. 2001. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. FEMS Microbiol Rev 25:309-333.
9. Yuk MH, Harvill ET, Miller JF. 1998. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. Mol Microbiol 28:945-959.
10. Cornelis GR, Van Gijsegem F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. Annu Rev Microbiol 54:735-774.
11. Büttner D. 2012. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 76:262-310.
12. Deng W, Marshall NC, Rowland JL, McCoy JM, Worrall LJ, Santos AS,

- Strynadka NCJ, Finlay BB. 2017. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 15:323-337.
13. 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* 5:973-983.
 14. 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* 186:3806-3813.
 15. Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF. 2000. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* 35:991-1004.
 16. 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* 281:6589-6600.
 17. Panina EM, Mattoo S, Griffith N, Kozak NA, Yuk MH, Miller JF. 2005. A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. *Mol Microbiol* 58:267-279.
 18. Abe A, Nishimura R, Kuwae A. 2017. *Bordetella* effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues. *Microbiol Immunol* 61:206-214.
 19. 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* 206:3073-3088.
 20. Ahuja U, Liu M, Tomida S, Park J, Souda P, Whitelegge J, Li H, Harvill ET, Parkhill J, Miller JF. 2012. Phenotypic and genomic analysis of hypervirulent human-associated *Bordetella bronchiseptica*. *BMC Microbiol* 12:167.
 21. Kurushima J, Kuwae A, Abe A. 2012. The type III secreted protein BspR regulates the virulence genes in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One* 7:e38925.

22. Medhekar B, Shrivastava R, Mattoo S, Gingery M, Miller JF. 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.
23. 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.
24. Fennelly NK, Sisti F, Higgins SC, Ross PJ, van der Heide H, Mooi FR, Boyd A, Mills KHG. 2008. *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infection and Immunity* 76:1257-1266.
25. Stainer DW, Scholte MJ. 1970. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 63:211-220.
26. Han HJ, Kuwae A, Abe A, Arakawa Y, Kamachi K. 2011. Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 insertion in *Bordetella pertussis*. *PLoS One* 6:e17797.
27. Kasuga T, Nakase Y, Ukishima K, Takatsu K. 1954. Studies on *Haemophilus pertussis*. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. *Kitasato Arch Exp Med* 27:57-62.
28. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y. 1983. Effect of heptakis (2,6-O-dimethyl) beta-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 41:1138-1143.
29. 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* 98:11638-11643.
30. 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* 331:144-151.
31. Watanabe M, Nagai M, Funaishi K, Endoh M. 2000. Efficacy of chemically cross-linked antigens for acellular pertussis vaccine. *Vaccine*

- 19:1199-1203.
32. Ahuja U, Shokeen B, Cheng N, Cho Y, Blum C, Coppola G, Miller JF. 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* 113:2341-2348.
 33. Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61:4064-4071.
 34. Stenson TH, Patton AK, Weiss AA. 2003. Reduced glutathione is required for pertussis toxin secretion by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 71:1316-1320.
 35. van der Vliet A, O'Neill CA, Cross CE, Koostra JM, Volz WG, Halliwell B, Louie S. 1999. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am J Physiol* 276:L289-296.
 36. van Beek LF, de Gouw D, Eleveld MJ, Bootsma HJ, de Jonge MI, Mooi FR, Zomer A, Diavatopoulos DA. 2018. Adaptation of *Bordetella pertussis* to the Respiratory Tract. *J Infect Dis* 217:1987-1996.
 37. Lee SJ, Kim DG, Lee KY, Koo JS, Lee BJ. 2018. Regulatory mechanisms of thiol-based redox sensors: lessons learned from structural studies on prokaryotic redox sensors. *Arch Pharm Res* 41:583-593.
 38. Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6161-6165.
 39. Zhang Y, Zhang C, Du X, Zhou Y, Kong W, Lau GW, Chen G, Kohli GS, Yang L, Wang T, Liang H. 2019. Glutathione Activates Type III Secretion System Through Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol* 9:164.
 40. Bannan JD, Moran MJ, MacInnes JI, Soltes GA, Friedman RL. 1993. Cloning and characterization of btr, a *Bordetella pertussis* gene encoding an FNR-like transcriptional regulator. *J Bacteriol* 175:7228-7235.
 41. Feldman MF, Cornelis GR. 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* 219:151-158.

42. Lee SH, Galán JE. 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* 51:483-495.
43. Lloyd SA, Norman M, Rosqvist R, Wolf-Watz H. 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* 39:520-531.
44. Stebbins CE, Galán JE. 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* 414:77-81.
45. Quinaud M, Chabert J, Faudry E, Neumann E, Lemaire D, Pastor A, Elsen S, Dessen A, Attree I. 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280:36293-36300.
46. Monlezun L, Liebl D, Fenel D, Grandjean T, Berry A, Schoehn G, Dessein R, Faudry E, Attree I. 2015. PscI is a type III secretion needle anchoring protein with in vitro polymerization capacities. *Mol Microbiol* 96:419-436.
47. Wood SE, Jin J, Lloyd SA. 2008. YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. *J Bacteriol* 190:4252-4262.
48. Nishimura R, Abe A, Sakuma Y, Kuwae A. 2018. *Bordetella bronchiseptica* Bcr4 antagonizes the negative regulatory function of BspR via its role in type III secretion. *Microbiol Immunol* 62:743-754.
49. Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130.
50. 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* 188:2801-2811.
51. Wattiau P, Bernier B, Deslée P, Michiels T, Cornelis GR. 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10493-10497.
52. Kamanova J. 2020. *Bordetella* Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins. *Front Cell Infect Microbiol* 10:466.
53. Kurushima J, Kuwae A, Abe A. 2012. Iron starvation regulates the type III

- secretion system in *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Immunol 56:356-362.
54. 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 189:2599-2609.
 55. Day JB, Guller I, Plano GV. 2000. *Yersinia pestis* YscG protein is a Syc-like chaperone that directly binds yscE. Infect Immun 68:6466-6471.
 56. Francis MS, Aili M, Wiklund ML, Wolf-Watz H. 2000. A study of the YopD-IcrH interaction from *Yersinia pseudotuberculosis* reveals a role for hydrophobic residues within the amphipathic domain of YopD. Mol Microbiol 38:85-102.
 57. Sun P, Tropea JE, Austin BP, Cherry S, Waugh DS. 2008. Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. J Mol Biol 377:819-830.
 58. Woestyn S, Sory MP, Boland A, Lequenne O, Cornelis GR. 1996. The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. Mol Microbiol 20:1261-1271.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり終始ご指導いただきました、北里大学大学院感染制御科学府細菌感染制御学研究室の阿部章夫先生、桑江朝臣先生、貴重なご助言をしていただきました杏林大学医学部感染症学研究室の花輪智子先生、百日咳菌臨床分離株を分与していただきました国立感染症研究所 蒲池一成先生に心からお礼申し上げます。

そして、日頃から研究において数々のご配慮やご協力をしていただきました研究室の皆様にも深く感謝いたします。