

# 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

## 【背景】

*Bordetella* 属細菌はグラム陰性菌の多くが保有する III 型分泌装置と呼ばれる針状の病原因子分泌装置を菌体膜上に保持している (図 1)。菌は III 型分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を宿主内に注入し、宿主の生理機能を攪乱させる (図 1)。本研究では (1) 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および (2) 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を行った。

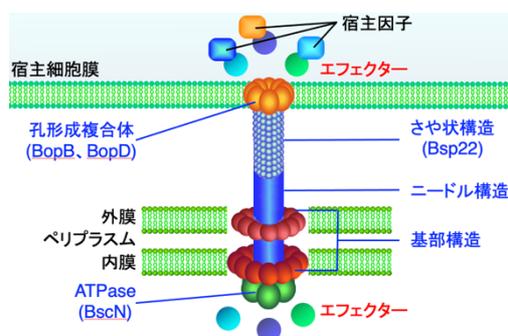


図 1. *Bordetella* 属細菌の III 型分泌装置を介したエフェクターの宿主内移行

## 1. 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

### 【目的】

百日咳菌において III 型分泌装置より分泌される III 型分泌タンパク質群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 III 型分泌タンパク質が効率的に分泌される条件は見出されていない。本研究では百日咳菌感染における III 型分泌タンパク質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。

### 【方法】

百日咳菌のワクチン標準株である Tohama I 株を Bordet-Genogu 寒天培地上で、37°C で 5 日間培養した。その後、Stainer-Scholte 液体培地 (SS 培地)、SS 培地からアスコルビン酸を除いた培地 (SS\_AsA-培地) にそれぞれ懸濁し、600 nm の吸光度を 0.23 に調整後、37°C で 22 時間静置培養を行なった。

## 【結果】

百日咳菌 Tohama I 株を SS 培地あるいは SS<sub>AsA</sub>-培地で培養後、各培養液から全菌体画分 (WCL) および上清画分 (Sup) を調製した。これらのサンプルを SDS-PAGE で展開後、III 型分泌タンパク質である 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った。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 培地と比較し、SS<sub>AsA</sub>-培地においてより強く検出された (図 2)。

次に、Tohama I 株を SS 培地あるいは SS 培地より低濃度のアスコルビン酸を含有する培地 (SS<sub>1/20AsA</sub> 培地、SS<sub>1/20AsA</sub><sub>1/2CaA</sub> 培地) を用いて、ラット肺上皮細胞株 (L2 細胞) に感染させ、細胞傷害性の指標として培地中に遊離した乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase、LDH) の量を測定した。その結果、Tohama I 株を SS 培地中で感染させた場合、培地中に LDH は観察されなかったが、SS<sub>1/20AsA</sub> 培地あるいは SS<sub>1/20AsA</sub><sub>1/2CaA</sub> 培地中で感染させた場合、培地中に LDH が観察された。

また、*bteA* 遺伝子を欠損させた株を L2 細胞に感染させると、野生株を感染させた場合と比較し、培地中の LDH の量は有意に減少した (図 3)。

Tohama I 株を SS<sub>AsA</sub>-培地に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) をそれぞれ添加した培地で培養後、各培養液から全菌体画分および上清画分を調製した。これらのサンプルを 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った。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<sub>AsA</sub>-培地と比較し、それぞれの還元剤を含有する培地において、より弱く

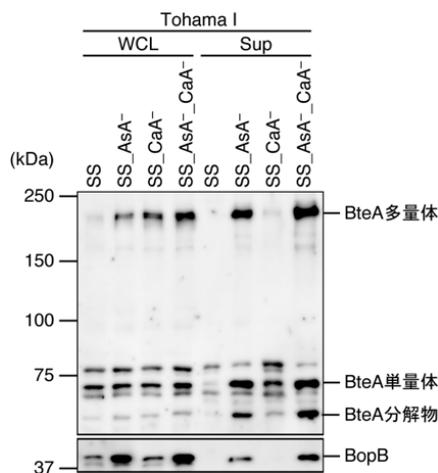


図 2. III 型分泌タンパク質の産生および分泌に対するアスコルビン酸あるいはカザミノ酸の影響

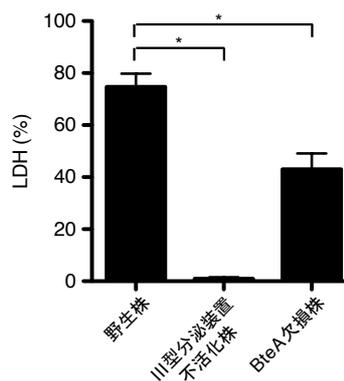


図 3. 百日咳菌変異株の細胞傷害性

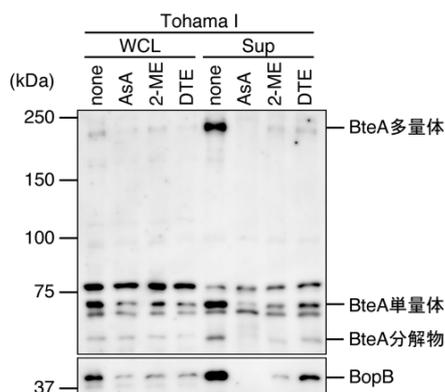


図 4. III 型分泌タンパク質の産生および分泌に対する還元剤の影響

#### 【考察】

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。百日咳菌野生株による細胞傷害性を初めて観察することに成功した。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。

## 2. 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

### 【目的】

これまで百日咳菌の類縁菌である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 型分泌装置の制御にどのように関与するかは明らかとなっていない。本研究では、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。

### 【方法】

気管支敗血症菌はブタより分離された S798 株を用いた。組換えタンパク質の精製には Ni-NTA アガロース (Qiagen) を用いた。欠損株の作製にはスーサイドベクター pABB-CRS2 を用いた。

### 【結果】

精製した Bcr4 (Bcr4-Strep) と III 型分泌装置の構成因子である BscI、BscK (BscI-V5、BscK-V5) を用いて Pull-down Assay を行った。Pellet 画分 (Pellet) を SDS-PAGE で展開後、V5-tag 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、V5-tag のシグナルは BscI-V5 を用いた Pellet 画分において検出された (図 5)。

気管支敗血症菌野生株あるいは BscI 欠損株の培養液から上清画分を調製し、サンプルを SDS-PAGE で展開後、III 型分泌タンパク質である BteA と 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、上清画分の BteA と BopD のシグナルは野生株において検出されたが、BscI 欠損株においては検出されなかった (図 6)。

III 型分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写を抑制する BspR を欠損させた株あるいは BspR・Bcr4 二重欠損株の培養液から全菌体画分を調製し、サンプルを SDS-PAGE で展開後、BscI 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、全菌体画分の BscI の

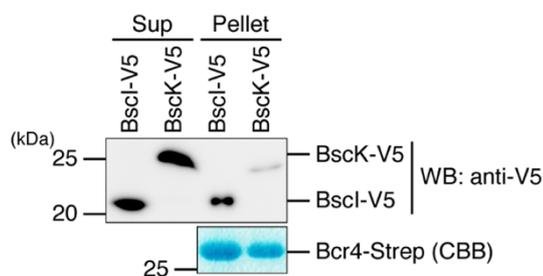


図 5. Bcr4 とインナーロッド BscI の相互作用

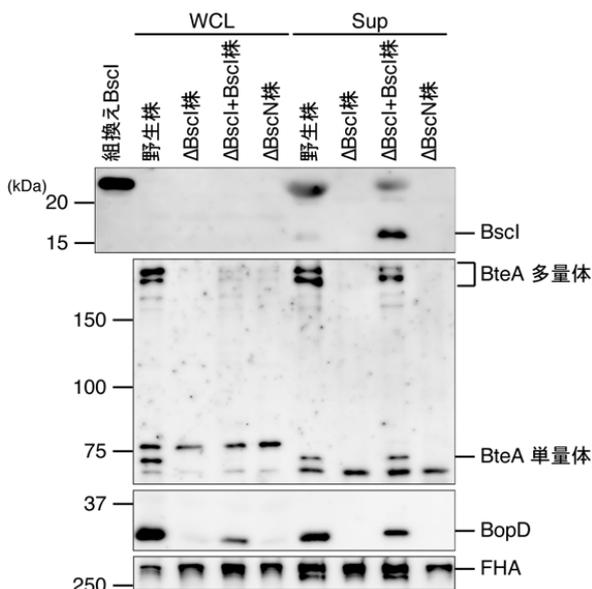


図 6. BscI 欠損株における III 型分泌タンパク質の分泌

グナルは BspR 欠損株において検出されたが、BspR・Bcr4 二重欠損株においては検出されなかった (図 7)。

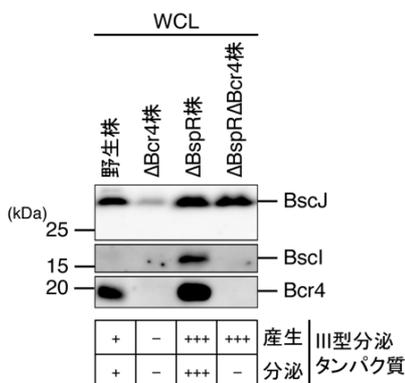


図 7. BscI の安定性に対する Bcr4 の影響

【考察】

インナーロッドとして機能すると予測されている BscI は、III 型分泌装置の機能に必須であることが示唆された。これまで III 型分泌装置のインナーロッドに対するシャペロンの報告は存在しないが、本研究によって Bcr4 は 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が初めて示唆された (図 8)。

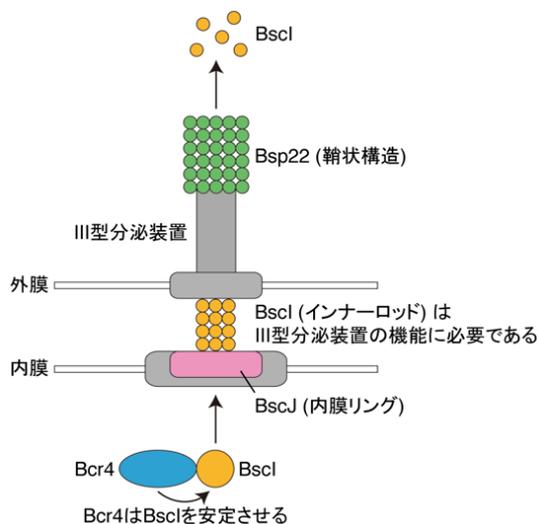


図 8. Bcr4 と BscI の機能に関する模式図