

## *Histophilus somni* 由来の免疫グロブリン結合タンパク質によるマクロファージ細胞骨格形成障害作用の遺伝学的解析

星野尾歌織, 上野勇一, 田川裕一

Genetic analysis of inhibitory activity induced by *Histophilus somni* immunoglobulin binding protein A on cytoskeleton formation in macrophages

Kaori HOSHINO, Yuichi UENO & Yuichi TAGAWA

### 背景と目的

*Histophilus somni* は牛の様々な疾病を引き起こす病原細菌である。中でも発生が多く問題となるのは髄膜脳脊髄炎や肺炎であるが、これらの疾病は宿主の免疫・生理状態の変化や飼養環境等の影響による易感染化、またウイルスや他の細菌感染が病気の成立要因として重要と考えられ、いわゆる日和見感染症や複合感染症と見なされている。しかし、視点を変えれば、*H. somni* については感染症の成立の重要な役割を果たす病原因子の解析が進展しておらず、理解の不十分さ故に病原体以外の要因で説明してきたとも言えよう。

我々は *H. somni* が宿主体内でどのように生き残り、疾病を引き起こすのか、その過程においては菌体表面タンパク質が宿主細胞に対して及ぼす何らかの作用が重要と考え、これまでにいくつかの菌体表面タンパク質の解析を進めてきた。その中で、*H. somni* が産生する特徴的な菌体表面タンパク質である高分子量免疫グロブリン結合タンパク質 IbpA (immunoglobulin binding protein A) の遺伝子領域 *ibpA* の同定に成功した<sup>1)</sup>。さらに、*ibpA* 遺伝子破壊株の解析によって、IbpA がマクロファージ・単球系細胞の細胞骨格形成障害により貪食機能を阻害することを見出した<sup>2)</sup>。また、IbpA は呼吸器上皮細胞に対しても同様に作用することが確認されている<sup>3)</sup>。宿主の感染防御機能に重要な役割を果たすマクロファージや呼吸器上皮細胞の機能が IbpA によって抑制されることから、IbpA は *H. somni* 感染症の成立に必須の病原因子と考えられ、日和見・複合感染症の成立に重要な役割を果たして

いると思われる。

本研究では、*H. somni* の *ibpA* 遺伝子改変株を作出して IbpA の細胞骨格形成障害機構の遺伝学的解析によって、本菌感染症の発病機構の解明ならびにそれに基づく疾病防除法の開発につなげることを目的とする。

### 研究の概要

#### 1. マクロファージ系細胞の細胞骨格形成障害作用を担う IbpA の責任領域の同定

約 12kb の遺伝子 *ibpA* によりコードされる IbpA 推定アミノ酸配列にはいくつかの特徴的な配列や病原性関連遺伝子との相同領域が存在する (図 1)。これらの中で、具体的にどの部分がマクロファージの細胞骨格形成障害作用を担っているのかを特定するため、*ibpA* 遺伝子の一部を欠失させた種々の改変株と組換えタンパク質を作出し、それらによるマクロファージ細胞骨格形成障害作用

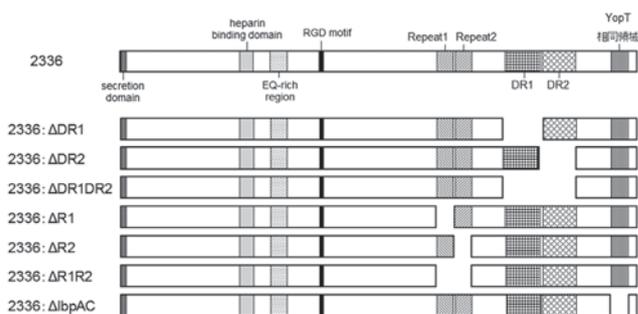


図 1. IbpA の推定機能ドメイン領域とその欠失株の作出

の解析を行った。

### 1) IbpA の推定機能ドメイン領域欠失株の作出と細胞骨格形成障害作用の解析

*ibpA* 遺伝子フレーム内配列欠失変異を導入した DNA 断片を PCR 法により作製, 温度感受性ベクター pLSGA-K-SK にクローニングして遺伝子改変用プラスミドを作製した。これにより, 肺炎由来の *H. somni* 2336 株より IbpA の推定機能ドメイン領域のフレーム内配列欠失変異株 (2336: ΔDR1, 2336: ΔDR2, 2336: ΔDR1DR2, 2336: ΔR1, 2336: ΔR2, 2336: ΔR1R2, 2336: ΔibpAC, 図 1 参照) を作出した。ibpAC (YopT 相同領域) は IbpA の C 末端に存在する *Yersinia* 属のエフェクター分子 YopT (システインプロテアーゼ活性により細胞骨格形成障害を引き起こす) と高い相同性をもつ領域を指す。DR1, DR2 は ibpAC 領域の上流にある 2 つのダイレクトリピート, R1, R2 は中ほどの領域にある 2 つのリピート配列である。これらの遺伝子変異株を細胞:菌 = 1:100 の割合でウシ胎子胸腺由来のマクロファージ系細胞株 FBM-17 に接種し, 細胞の形態を経時的に観察した。

その結果, 接種後 6 時間の時点において, 2336: ΔDR2 株を接種した場合は, 2336 株接種の場合と比べると円形化した細胞の数が有意に減少しており, 2336: ΔDR1DR2 株接種ではさらに減少して *ibpA* 遺伝子のほぼ全領域を欠失させた変異株 2336.A1 の場合と同程度に至ることが分かった。2336: ΔDR1, 2336: ΔR1, 2336: ΔR2, 2336: ΔibpAC 株についても円形化細胞はやや減少する傾向にあった。また, 長時間 (接種後 24 時間以上) 培養を続けると, 2336 株接種細胞では円形化が持続したが, 2336: ΔibpAC 株接種細胞では円形化細胞が減少し, 細胞変形持続時間は短縮する傾向にあった。

### 2) 推定機能ドメイン領域の組換えタンパク質の作出と細胞骨格形成障害作用の解析

肺炎由来株 2336 より, IbpA の推定機能ドメインである DR1, DR2, IbpAC 領域について, 大腸菌組換えタンパク質を作製, 精製した。得られた組換えタンパク質を FBM-17 細胞に 100 ~ 0.78 μg/ml 添加し, 24 時間後の細胞円形化について比較した。陰性対照として, 組換えタンパク質の溶媒として使用したバッファーを同程度に培地に希釈したものを利用した。

その結果, 組換え IbpAC を添加した FBM-17 細胞には非添加対象との違いが認められなかった。一方, 組換え DR1, DR2, および DR1 と DR2 を混合して添加した細胞

では, 24 時間後に明瞭な円形化が認められた。この効果は添加したタンパク質の濃度に依存しており, タンパク質濃度 100 ~ 12.5 μg/ml では陰性対照との間に明瞭な差が認められ, 0.78 μg/ml では差が確認できなかった。これらのことから, 組換え DR1, DR2 タンパク質単独でもマクロファージを円形化させる活性があることが明らかとなった。

これら 2 つの実験により, IbpA のマクロファージ細胞骨格形成障害作用には DR1 および DR2 領域が関与することが明らかとなった。

### 2. *H. somni* 感染培養マクロファージ系細胞における IbpA の作用の解析

最近, IbpA の DR2 領域配列上に確認される Fic domain (HPFxxGNR) は, 細胞内のアクチン重合形成を制御する低分子量 GTP 結合タンパク質のひとつである Rho GTPase に AMP を付加させることによって, Rho GTPase 活性を不活化させる機能があることが報告された<sup>4)</sup>。また, Fic domain 配列への変異導入により, HeLa 細胞内で DR2 を強制発現させても, 細胞は円形化しないことが確認されている。なお, Fic domain 配列は IbpA の DR1 と DR2 領域のいずれにも存在し, これらがマクロファージ円形化作用を示した事実は Fic domain の Rho GTPase 不活化作用がマクロファージの細胞骨格形成傷害作用にも関与していることを示唆している。一方, Rho GTPase は細胞質内に局在していることから, *H. somni* が産生した IbpA がどのようにして細胞質内の Rho GTPase に作用するのか, さらに Fic domain の Rho GTPase への作用以外に IbpA がマクロファージ系細胞に及ぼす影響はないのかなど, IbpA による細胞骨格形成障害の作用機序には不明な点がなお多く残されている。そこで, IbpA の作用機序について検討を加えるために, 以下の予備的な解析を試みた。

#### 1) *H. somni* 感染培養マクロファージ系細胞チロシンリン酸化タンパク質プロファイルの解析

*H. somni* を感染させた培養マクロファージ系細胞において, シグナル伝達系の応答に違いが生じているかどうかを推測するために, 感染細胞のチロシンリン酸化タンパク質プロファイルの解析を行った。*H. somni* の 2336 株と *ibpA* 遺伝子変異株を FBM-17 細胞に接種し, 経時的に細胞を回収して溶解, 可溶化上清を回収した。これらのサンプルについて, 抗リン酸化チロシン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い, チロシンリン酸化タンパ

ク質のプロファイル比較を行った。

その結果、*H. somni* 非接種FBM-17細胞では120 kDaおよび70 kDa近傍のチロシンリン酸化タンパク質が検出された。2336株接種細胞においては、細胞の変形に伴い120 kDa・70 kDa近傍のいずれのチロシンリン酸化タンパク質も明らかに減少した。IbpA非産生株である2336.A1株を接種した場合には、これらのチロシンリン酸化タンパク質の減少は見られず、非接種対照と同じプロファイルを示した。また、細胞骨格形成障害作用が著しく低下した2336: ΔDR2株および2336: ΔDR1DR2株の接種細胞では2336.A1株の場合と同様にプロファイルの変化が認められなかったが、細胞骨格形成障害作用の低下が中程度の2336: ΔDR1株の接種細胞では、70 kDa近傍のチロシンリン酸化タンパク質は減少するが、120 kDa近傍のチロシンリン酸化タンパク質の減少は認められなかった。さらに、2336: ΔibpAC株接種細胞では2336株と同様のプロファイルの変化を示した後、接種24時間後に円形化細胞が減少するに伴って、120 kDa・70 kDa近傍のいずれのチロシンリン酸化タンパク質も増加して、非接種細胞と同様のプロファイルを示すようになった。したがって、IbpAのDR2領域が直接あるいは間接的に70 kDa近傍のタンパク質のチロシンリン酸化、ひいては細胞内のシグナル伝達に影響を与えることで細胞骨格形成障害作用の発現に寄与している、またDR1とDR2の両領域が共同して作用することで120 kDa近傍のタンパク質のチロシンリン酸化に影響を与えている可能性が考えられる。さらに、YopT相同領域を欠失した2336: ibpAC株接種細胞では、細胞骨格形成障害作用の発現やチロシンリン酸化プロファイルの挙動に特徴的な違いが認められたことから、IbpAによる細胞骨格形成障害作用にはDR2領域のFic domainによるRho GTPase不活化作用に加えて、YopT相同領域に基づく特定の作用が細胞骨格形成障害作用の持続的な発現に関与している可能性を示唆している。

#### 残された課題

本研究の遺伝学的解析に基づいて、DR1およびDR2領域が*H. somni* IbpAのマクロファージ系細胞への細胞骨格形成障害作用の主な責任領域であることが明らかとなった。両領域に共通して認められるFic domainはRho GTPaseの不活化作用をもつことが既に報告されており、細胞骨格形成障害作用はFic domainの作用に基づくものと考えられるが、DR1領域欠失変異株とDR2領域欠失変異株では細胞骨格形成障害作用の低下に明瞭な違いが認められる。組換えタンパク質の細胞骨格形成障害作用に

ついてはDR1とDR2で違いが認められないことから、配列欠失がIbpAの構造と機能にもたらす影響を考慮する必要がある。DR1とDR2の両領域欠失株のみがIbpA非産生変異株と同様にFBM-17細胞に円形化作用を示さなかったことを考え合わせると、IbpA分子上の2つのFic domainは細胞骨格形成障害作用の発現への寄与に程度の違いはあるものの、それぞれが活性を発揮していると考えられる。

IbpAの細胞骨格形成障害作用は直接的にはFic domainのRho GTPase不活化作用に基づくとして、どのようにして細胞質内に局在するRho GTPaseとIbpAが会合するのか、またRho GTPaseの不活化作用のみでIbpAの細胞骨格形成障害作用を説明できるのかについては明らかにされていない。*H. somni*感染FBM-17細胞のチロシンリン酸化タンパク質プロファイルの解析はこの疑問に直接解答を与えるものではない。しかし、IbpAの作用によりFBM-17細胞の120 kDa・70 kDa近傍のチロシンリン酸化タンパク質が減少し、DR2領域は70 kDa近傍のチロシンリン酸化タンパク質の減少に影響を与えている。これらの結果から、これらの変動するタンパク質を同定できれば、解答を得るための糸口が掴めるものと期待できる。IbpAのYopT相同配列欠失株ではDR1およびDR2領域を保持するために、野生株の場合と同様に細胞の円形化と120 kDa・70 kDa近傍のチロシンリン酸化タンパク質の減少が観察されるが、培養時間を延長すると円形化細胞の減少とともに、一旦減少したチロシンリン酸化タンパク質が増加する。エルシニア菌のYopTはそのシステインプロテアーゼ活性によってRho GTPaseの細胞質膜へのアンカリングを切断し、細胞骨格形成障害作用をもたらす<sup>5)</sup>。IbpAのYopT相同配列には直接的な細胞骨格形成障害作用はないとしても、IbpAの作用発現にYopT相同配列が関与している事実は、Fic domainのRho GTPase不活化作用のみで単純にIbpAの細胞骨格形成障害作用を説明できるものではないことを示している。なお、*H. somni*が産生したIbpAがその直接的な作用点である細胞質内のRho GTPaseに到達する経路や機序を知るためには、IbpA特異モノクローナル抗体の活用や遺伝子改変操作によるIbpAへの蛍光タグの付加によって感染培養細胞でIbpAの挙動を形態的に観察することが有用であると考えており、今後の重要な検討課題のひとつである。

IbpAの*H. somni*感染症成立における病原因子として

の重要度を明らかにするためには, 変異株を用いた牛への感染実験において評価する必要がある。今後, 2336株と2336: ΔDR1DR2株の病原性の比較によってIbpAの細胞骨格形成障害作用の病原因子としての役割の解明を目指したい。牛への感染実験において2336: ΔDR1DR2株の弱毒化が観察された場合, IbpAにはDR2領域以外にも防御免疫誘導能を有する領域が同定されていることから<sup>1), 6)</sup>, 2336: ΔDR1DR2株の投与による防御免疫の付与が期待できる。さらに, DR1やDR2領域についてもFic domain配列と防御免疫誘導能を有する配列が区別できれば, 我々の開発した遺伝子改変手法の応用によって, 防御免疫誘導能を保持したまま弱毒化した変異株を作出することも可能である。弱毒ワクチンやワクチンベクターとしてのより高い適性を有する遺伝子改変株の作出を進めていく予定である。

#### 謝 辞

本研究の一部は平成20～21年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施し, また科研費(22580359)の助成を受けて実施したものである。

#### 引用文献

1) Tagawa, Y., Sanders, J.D., Uchida, I., et al.: Genetic

and functional analysis of *Haemophilus somnus* high molecular weight-immunoglobulin binding proteins. *Microb. Pathog.* 39, 159-170 (2005).

- 2) Hoshino, K., Sasaki, K., Tanaka, A., et al.: Virulence attributes of *Histophilus somni* with a deletion mutation in the *ibpA* gene. *Microb. Pathog.* 46(5), 273-282 (2009).
- 3) Zekarias, B., Mattoo, S., Worby, C., Lehmann, J., et al.: *Histophilus somni* IbpA DR2/Fic in virulence and immunoprotection at the natural host alveolar epithelial barrier. *Infect. Immun.* 78(5), 1850-1858 (2010).
- 4) Worby, C.A., Mattoo, S., Kruger, R.P., et al.: The fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation. *Mol. Cell.* 10;34(1), 93-103 (2009).
- 5) Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., et al.: A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell.* 31;109(5), 575-588 (2002).
- 6) Geertsema, R.S., Zekarias, B., Scheuch, L.L., et al.: IbpA DR2 subunit immunization protects calves against *Histophilus somni* pneumonia. *Vaccine.* 29(29-30), 4805-4812 (2011).