



<解説>百日咳菌の病原因子の発現制御と感染における役割(2)2成分シグナル伝達系による病原因子の発現制御とphenotypic modulation(自然科学系)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 今川, 忠 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00010814

解説

百日咳菌の病原因子の発現制御と感染における役割
(2) 2成分シグナル伝達系による病原因子の発現制御と phenotypic modulation

今川 忠

(大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床検査学科)

The Expression of *bvg*-Regulated Genes and Possible Roles of
Virulence Factors in *Bordetella pertussis* Infection
Part 2 The Relation of Regulatory Expression of Virulence Genes to Phenotypic Modulation

Tadashi Imagawa

(Department of Clinical Laboratory Sciences, Osaka Prefecture College of Health Sciences)

Key words: *Bordetella pertussis*; *bvg*-regulated genes; phenotypic modulation

はじめに

本解説 Part 1 では「百日咳菌の病原性と菌体表面抗原の性状」というサブテーマで、総論として百日咳の臨床経過、疫学的事項ならびに百日咳菌の性状などについて概説し、次いで菌体表面上に発現する病原因子の性状や特性について各論的に解説した。

Part 2 では、まず百日咳菌の病原遺伝子の発現を统一的に制御している BvgAS 系の機能について述べる。微細環境中のシグナルを菌体内部に伝える装置としては、2成分シグナル伝達系の存在が本菌を含む多くの細菌種で確認されている。すなわち、図 1 に示すように、百日咳菌の内膜(細胞膜)に局在している BvgS 蛋白¹⁾分子中のセンサードメインが菌体外の微細環境からのシグナルを感知して自己リン酸化されると、細胞膜を貫通するリンカー領域から細胞質側の複数のドメインを通して最終的に細胞質側に配置している BvgA がリン酸化される。このように細胞内外に局在する Sensor (BvgS) と Activator (BvgA) という 2つの蛋白質分子間のリン酸化転移反応によって細胞外の情報が細胞内に伝達される系を 2成分シグナル伝達系という。そして、この 2成分シグナル伝達系によって、時間的にまた量的に微妙に制御されている各病原因子の発現が phenotypic modulation の現象や宿主

の気道粘膜の上皮細胞への侵入、あるいは他の感受性宿主への伝播にどのように関わっているのかを、最近の幾つかのグループの報告や仮説を紹介しながら考察する。

また、従来 *Bordetella* 属菌の病原性は微細環境中の特定のシグナルに対応したモジュレーションによって Bvg⁻ phase (I 相: 病原相) と Bvg⁺ phase (III 相: 非病原相) という 2つの異なる形質相の間でオン・オフのスイッチが制御されていると解釈されてきた¹⁾。しかし、最近新たに Bvg-intermediate (Bvgⁱ) phase と名づけられた中間的なクラスの形質相の存在が明らかになり、*bvgAS* 遺伝子系¹⁾は単なる点滅のスイッチではなく可変抵抗器のように作動し、さらに多様な機能をもつ可能性が指摘されている。最後に、これらの新しい知見にもとづいて「Bvg⁻ phase から Bvg⁺ phase へのモジュレーションという現象は、宿主の生体防御機構の攻撃から逃避するために進化の過程で保存されてきた、百日咳菌にとって特別な意味のあるメカニズムなのではないか」という発想から導かれた百日咳菌研究における最近の興味ある話題について紹介する。

¹⁾ 細菌遺伝学では遺伝子は小文字で始まる 3 文字のイタリック体で表し、発現産物(蛋白質)は大文字で始まる 3 文字の標準体で表すことになっている(本解説 Part 1 参照)。ここでは分かり易いように、BvgS 蛋白あるいは *bvgS* 遺伝子などと表示したが、以後は上記の記載方法に従って、一般的には発現産物は BvgS、遺伝子は *bvgS* と記載する。

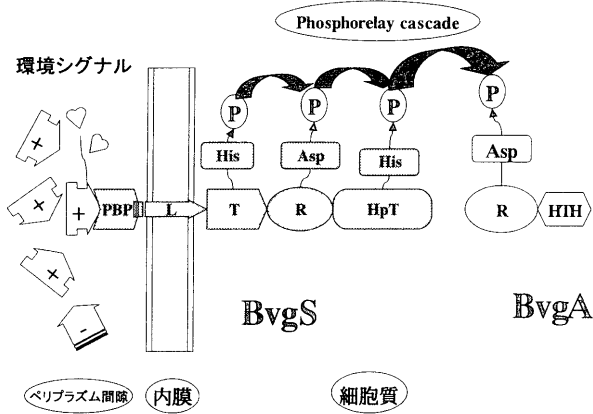


図1 百日咳菌の病原遺伝子の発現を統括的に制御する2成分シグナル伝達系

PBP: N-terminal periplasmic domain containing two periplasmic binding proteins, L: linker, T: cytoplasmically located transmitter, R: cytoplasmically located receiver, HpT: C-terminal histidine phosphotransfer domain, R: N-terminal receiver, HTH: C-terminal helix-turn-helix motif

- (1) Bock, A. and Gross, R. (2001) The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291:119-130.
 - (2) Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F. and Cotter, P.A. (2001) Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol. Microbiol.*, 40:669-683.
- (1) および (2) より改変して転載。

II 病原遺伝子の発現制御機構

II-1 グラム陰性菌の細胞壁と細胞膜の微細構造

グラム染色法によって細菌は青(紫)色に染まるグラム陽性菌と赤色に染まるグラム陰性菌に大別され、両者の細胞壁の構造は大きく異なっている。ちなみに、百日咳菌はグラム陰性の小桿菌である。図2に一般的なグラム陰性菌の細胞壁と細胞膜の構造を示す。リポ多糖体 (lipopolysaccharide: LPS) はグラム陰性菌の細胞壁表層にある脂質と多糖からなる複合体である。その構造は複雑で、外膜の一部をなすリポ A (内毒素としての毒性を示す構造) に主要共通糖鎖 (コア) が連結して基礎構造を形成し、このコア部分から菌体の外側に向かって多糖側鎖^(1,2)が伸びている。ポーリン蛋白質は水や親水性の低分子を透過させる孔をもった蛋白質複合体で外膜の主要蛋白質である。リポ蛋白質は外膜とペプチドグリカンの網目構造を結合させる働きをしている。ペプチドグリカンの基本構造は *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸が

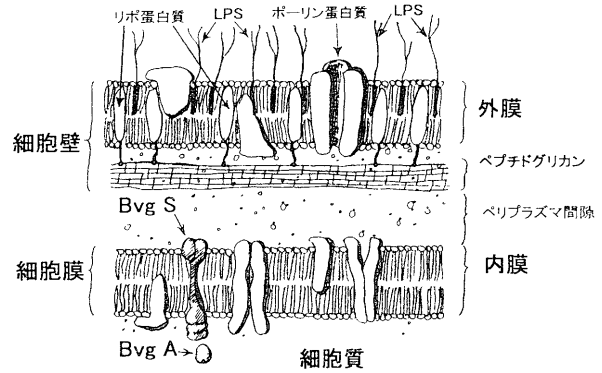


図2 グラム陰性菌の細胞壁と細胞膜の構造模式図

β 1→4 結合で交互に結合して長い糖鎖をつくり、*N*-アセチルムラミン酸に結合した数個の L 型または D 型のアミノ酸やジアミノピメリン酸からなるオリゴペプチドの間でこれらの糖鎖同士が架橋された3次元の網目構造をしている。ペプチドグリカンには剛性があり細菌の球状や桿状などの形を規定しているが、この堅固な網目構造と脂質2重層である外膜が一体となって細胞壁を形成している。一方、細胞膜(内膜ともいう)は半透膜としての機能を有し、物質の能動輸送系や呼吸系の酵素などが存在する機能膜である。この外膜と内膜に挟まれたスペースをペリプラズマ間隙といい、多くの分泌蛋白や加水分解酵素類が局在している。そして、多様な基質が濃度勾配に従って細胞壁を自由に透過してくるが、そのままではサイズが大きくて取り込めない基質はここでさらにプロテアーゼ、ヌクレオチダーゼあるいはアルカリフォスターゼなどの酵素作用により、細胞膜を通して輸送可能な低分子の基質にまで分解されたり修飾されたりして吸収される。

II-2 BvgAS の性状とシグナル伝達機構

bvg 遺伝子領域は少なくとも2つのリンクした遺伝子、*bvgS* と *bvgA* からなっている。図1に示すように、制御遺伝子 *bvgS* にコードされる蛋白質 BvgS は 135 kDa の分子量をもつ百日咳菌の内膜(図2)に局在するセンサー蛋白で、膜貫通領域とリンカー領域(L)によって細胞質側ドメインとつながっている。つまり、このセンサーは N 末端側に2つのペリプラズマ性結合ドメイン(PBP)を含む複雑な内膜センサー・キナーゼと細胞質内に突き出た3つのシグナル・ドメイン(T, R, HpT)からなっている。BvgS は *Bordetella* 属菌が通常の培地(Bordet-Gengou 血液寒天培地や Stainer-Scholte 液体培地³⁾)中で36℃で生育すると活性化される。これらの活性化条件下で、BvgS のトランスミッター・ドメイン(T)のヒスチジンが自動

^{1,2)} 3~5種類の糖質からなるオリゴ糖で構成された菌種固有の基本構造が何回(25回以下)も反復していて、菌体表面の親水性を規定している。この構造は菌体抗原(O抗原)と呼ばれ、数百から数千種類もの抗原決定基を形成している。

リン酸化を起こした後、BvgS レシーバー・ドメイン (R) のアスパラギン酸、ヒスチジン・リン酸転位ドメイン (HpT) のヒスチジン、そして最後に BvgA レシーバー・ドメイン (R) のアスパラギン酸へと次々にリン酸が受け渡されていく。つまり、百日咳菌の病原因子の発現調節には内膜に局在している BvgS が菌体外の微細環境からのシグナルを感知して自動リン酸化されると、最終的に細胞質側に配置している分子量23 kDa の典型的な DNA 結合反応制御蛋白質である BvgA がリン酸化されることにより、細胞外の情報が細胞内へ伝達されるという 2 成分シグナル伝達系が機能している。

II-3 *bvgAS* 系遺伝子による *vags*^(a3) および *vrgs*^(a4) 遺伝子群の発現調節

百日咳菌のほぼ全ての病原遺伝子の発現は phenotypic

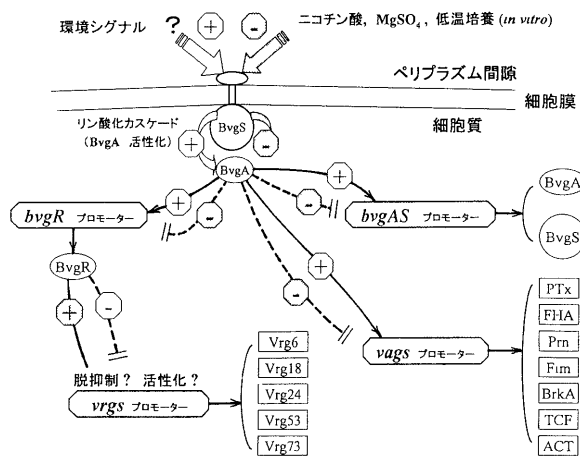


図 3 環境中のネガティブ・シグナルによる BvgA の不活性化ならびに未知のポジティブ・シグナルによる活性化に続く *vags* および *vrgs* 遺伝子の活性化または脱抑制の概念図

BvgA は *in vitro* (通常培地) ならびに *in vivo* (呼吸器系粘膜組織) における未知のポジティブ・シグナルによるリン酸化で活性化される。一方、BvgA は *in vitro* (培地) におけるネガティブ・シグナル (通常培地に 2 mM のニコチン酸や 20 mM の $MgSO_4$ を添加して 36°C で培養したり、通常培地で 25°C で培養すること) により不活性化される。

^(a3) virulence-activated genes の略。病原株を通常条件 (Bvg phase) で培養すると *ptx*, *fha*, *fim*, *prn*, *cyaA*, *tcf*, *brkA*, *bvgAS*, *bvgR* などの病原遺伝子や制御遺伝子が発現して、それぞれ PTx, FHA, Fim, Prn, CyaA, TCF, BrkA, BvgAS, BvgR などの病原因子や調節因子が産生されるが、培地に 2 mM 程度のニコチン酸や 20 mM 程度の Mg^{2+} などが存在する条件 (Bvg phase) では発現が抑制されるという特性をもつ上記の遺伝子群をいう。

^(a4) virulence-repressed genes の略。*vrg6*, *vrg18*, *vrg24*, *vrg53*, *vrg73*, *flaA*, *vraA* など、Bvg phase で産生される調節蛋白質 BvgR によってその発現が抑制されているが、Bvg phase で *bvgR* の発現が抑制されると、脱抑制 (発現の抑制が解かれること) が起きて機能する遺伝子群をいう。これら遺伝子群の機能は未だほとんど解析されていない。

modulation に関係する遺伝子領域である *bvgAS* 系によって制御されている。Bvg phase では微細環境中に存在する未知のポジティブ・シグナルを感知してリン酸化した BvgS との相互作用によって BvgA が活性化すると、図 3 に示すようにその支配下にある *vags* と呼ばれる病原遺伝子群のプロモーターに種々の程度に結合して転写開始の制御を行う。同時に *bvgA* や *bvgS* のすぐ下流にある中間の抑制系の発現調節遺伝子、*bvgR*^(9,10) をも活性化させ、その発現産物である BvgR を介して支配下にある *vrgs* 遺伝子群の発現を抑制する。*in vitro* 系におけるネガティブ・シグナルとして知られている低温での培養 (25°C) や高濃度の Mg^{2+} (20 mM) またはニコチン酸 (2 mM) を含む培地での 36°C 培養など非病原相へのダウン・モジュレーション条件下では、*bvgAS* 系は不活性化され *vags* や *bvgR* は発現しない。このため *vrgs* は BvgR による抑制が解かれて発現する。百日咳菌における *vrgs* の機能は未だほとんど解明されていないが、これらの遺伝子産物の菌体表面での発現により、少なくとも動物実験モデルでは気管における定着が阻害されることが報告されている⁽¹¹⁾。自然環境中 (*in vivo*) では BvgAS 系がどんなシグナルをポジティブと、あるいはネガティブと認識するのか現在のところ全く分かっていない。このことが肝心な *in vivo* におけるこの領域の研究の進展を阻んでいる 1 つの大きな要因となっている。

III 生体内における phenotypic modulation の役割

III-1 百日咳菌はヒト気道粘膜上皮の繊毛細胞に取り込まれて持続感染する?

従来、百日咳菌は気道粘膜の上皮細胞の繊毛に定着して増殖するが、決して上皮細胞内や上皮下には侵入しないというのが定説であった。しかし、近年貪食細胞を用いた *in vitro* 系での実験ではあるが、*Bordetella* 属菌は貪食に抵抗性を示したり、また細胞内に取り込まれてもしばらくは生きていることを強く示唆する報告が相次いでいる。例えば、病原相や非病原相の菌株あるいは特定の病原遺伝子の欠失変異株などを用いて、菌体を抗体でオプソニン化したり、インターフェロン- γ や LPS で刺激した活性化マクロファージや培養した気管上皮の繊毛細胞による貪食や殺菌作用に対する抵抗性を解析した結果⁽¹²⁾ によると、*Bordetella* 属菌のうち *B.pertussis* では貪食されると 24 時間までしか生存できなかった。一方、*B.bronchiseptica* の野生株はマクロファージに貪食されるとすぐにファゴゾーム⁽¹³⁾ に取り込まれるが、感染後 96 時間まで細胞内から生菌が回収できた。しかも、*bvgS* の欠失変異

株, つまり, *vags* がほとんど活性化されない変異株の方がファゴゾーム中で野生株よりはるかに長く生残した。またある報告では, 老人が2年半にわたりペットの感染ウサギから繰り返し感染を受けて持続的に肺炎を発症していた。この老患者および感染ウサギから分離され保存されていたすべての *B. bronchiseptica* の性状を解析して, 感染の成立にはアデニレート・サイクレス毒素 (ACT) の発現が必要であるが, 持続感染に必要なのはアドヘジンの発現であることが示唆された¹³⁾。百日咳菌では上皮細胞内へ取り込まれると2成分シグナル伝達系によるダウン・モジュレーションによってACTの発現が抑制される。あるいは, 何らかの微細環境シグナルによって, たまたまACTの発現が抑制された菌が上皮細胞に取り込まれるのかもしれないが, いずれにしても, これは細胞内で生残するための菌側の適応反応と考えられた¹⁴⁾。百日咳菌は *in vitro* 系でマクロファージや好中球以外にも, ヒトの気管上皮細胞樹立株 (HTE, HAE0 cells), ヒトの子宮ガン由来上皮様細胞株 (HeLa 229 cell), ヒトの喉頭上皮細胞樹立株 (Hep-2 cell), チャイニーズハムスターの卵巣細胞由来株 (CHO cell: Chinese hamster ovary cell) などに取り込まれて生残できる¹⁵⁻²¹⁾。しかし, どの病原因子が細胞側の貪食や殺菌反応に抵抗性を示すのか, あるいは細胞内における菌側の生残に関与するのかなどについては, ACT, FHA, Prn, PTx および LPS などが候補として挙げられるが, 報告者により結果が互いに異なっているので, はっきりとした結論は出ていない。ACTは0.1 mM オーダー以上の Ca^{2+} が結合すると立体構造を大きく変化させる。図4に示すように, ACTを標的細胞に作用させると, ACT分子はまず, C末端側の Ca^{2+} 結合部位を細胞外に残したまま, 分子の中央部からC末端側に分布する複数の膜貫通ドメインを細胞膜に挿入し, ちょうど針で布に糸を縫い込んだ様な状態になる。そして高 Ca^{2+} 存在下に立体構造を大きく変化させ, この縫込みによってできた細胞膜の間隙からN末端側にある酵素活性ドメインが細胞質内に挿入されるといふモデルが提出されている。そして, 細胞質内に挿入されたACTの酵素

活性を担うドメインは細胞内にあるカルモジュリンと結合して活性化され, ATPを基質にして細胞内セカンドメッセンジャーとしてのcAMP量を非生理的なレベルにまで上げることにより, 細胞の機能を麻痺させると考えられている。これに関連して, 百日咳菌の野生株 (I相, III相) およびACT欠損変異株をマクロファージに感染させ

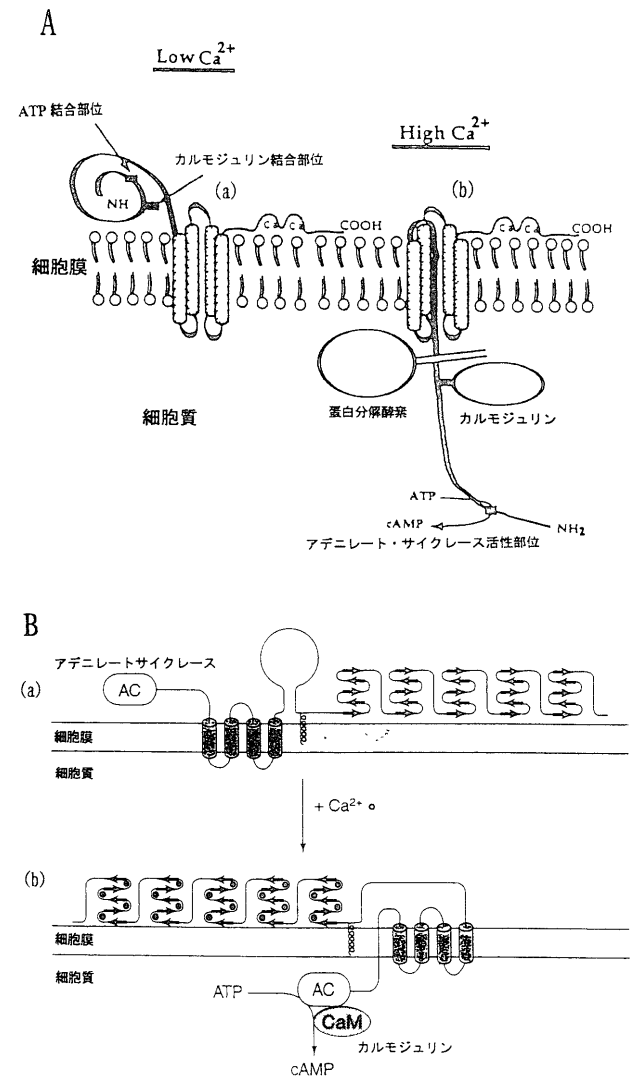


図4 ACTが Ca^{2+} 存在下に標的細胞内へ透過 (侵入) する過程を示すモデル

- (a) 低 Ca^{2+} 濃度で, まず円筒形の膜貫通ドメインが細胞膜内に挿入される。
 (b) 次に, 高 Ca^{2+} 濃度下にC末端側の繰り返し構造ドメインが Ca^{2+} を結合すると, 立体構造が大きく変化して酵素活性ドメイン (AC) が細胞質内に侵入 (透過) する。ACは細胞質内でカルモジュリン (CaM) と結合して活性化し, 細胞内の蛋白分解酵素によって分解されるまでATPをcAMPに変換し続ける。

- A. Rogel, A. and Hanski, E. (1992) Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 267: 22599-22605. より一部改変
 B. Ladant, D. and Ullmann, A. (1999) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.*, 7:172-176. より一部改変

¹⁵⁾ 好中球やマクロファージが微生物と遭遇すると, 線毛などを介して吸着する微生物や対応する抗体が結合 (オプソニン化) した微生物をレセプターで捕捉し, 細胞膜で包み込んで細胞質内に取り込む。この裏返しになった細胞膜で微生物が包まれた細胞質内小粒子をファゴゾームという。食細胞は細胞質の中に消化や殺菌を行う酵素や抗菌物質を高濃度に含んだ細胞膜に包まれたリソゾームという顆粒をもっており, これがやがてファゴゾームと膜融合してファゴリソゾームになり, リソゾームの内容物がファゴゾーム内の微生物に作用して殺菌が開始される。

る実験によって、これらのすべての百日咳菌株がマクロファージに吸着すると貪食されるが、細胞内で ACT を発現する菌では殺菌が抑制されることが示された²³⁾。細胞内 cAMP レベルを上げるフォルスコリンで貪食細胞を処理することによっても同様の殺菌抑制効果が見られるので、マクロファージ内への菌の取り込みに伴って ACT によって誘導される細胞内の cAMP レベルの異常な上昇の結果、殺菌抑制効果が生じたと考えられている。貪食細胞内で ACT が発現すると、最終的には細胞はアポトーシスを起こして死滅する^{24,25)}。また、病原株のマクロファージ内への取り込みは菌数依存的で、かつ血清や特異抗体がなくとも起こり、細胞内に取り込まれてから 3 日間以上生残して持続感染した²⁶⁾。非病原株でもわずかにマクロファージに侵入するが、細胞内では生き残れなかった。

これらの事実により、実際の感染局所 (*in vivo*) においても、繊毛上皮細胞に定着している百日咳菌は何らかの微細環境シグナルの変化に対応して病原相の形質のダウン・モジュレーションにより、粘膜上皮の繊毛細胞に侵入して生残するのも知れないと考えられるようになってきた。つまり、百日咳菌の *in vivo* における phenotypic modulation の役割の 1 つは生体側の感染防御反応に対する菌側の生残のための適応反応ととらえることができる。

一方、好中球を用いた *in vitro* の解析では、ヒト好中球に対する百日咳菌の吸着には FHA が関与し、ACT はむしろ貪食を阻害する²⁷⁾。同様に ACT は抗体でオプソニン化した百日咳菌と Fc レセプターを介した結合ならびに FHA を介した吸着に続く貪食の両方を阻害する²⁸⁾ という報告がある。

ここで、従来の phenotypic modulation の現象 (Part 1 参照) を、近年の遺伝子解析による知見に従って解説する。気管内外の微細環境中の未知のネガティブ・シグナルによって *bvgAS* の発現が停止すると、活性化 BvgA の制御下にある全ての *bags* の発現が順次抑制される。同時に、調節遺伝子 *bvgR* の発現も停止することで機能未知の抑制系遺伝子群は脱抑制されて発現し、弱毒株または非病原株へと形質相が転換する。逆に微細環境中のポジティブ・シグナルを感知すると、病原遺伝子が活性化されて病原相に転換することになる。Parton は彼のレビュー²⁹⁾の中で、気道粘膜上皮におけるネガティブな微細環境シグナルによる非病原株へのモジュレーションという現象は、菌が繊毛上皮細胞内へ侵入する際に必要なのかも知れないし、あるいは気管上皮細胞から放出されて飛沫伝播により他の動物組織などへ感染するような生育環

境サイクルを変化させる際に必要不可欠なのかもしれないと考えた。このような発想から phenotypic modulation はヒトの百日咳の発症病理の初期過程における菌の側から見た合目的な応答ではないかと論じている。

III-2 Bvg⁻ phase の *in vivo* における役割

ヒトの百日咳の起因菌である *B.pertussis* や多くの偶蹄類に慢性あるいは無症候性の気道感染症を引き起こす *B.bronchiseptica* など、哺乳動物の気管に感染する *Bordetella* 属菌のほとんど全ての病原遺伝子 (*fhaB*, *fim2/3*, *prn*, *ptx*, *cyaA*, *brkA*, *tcf* など) の発現は BvgAS 系によって制御されていることは前にも述べた。微細環境中のポジティブ・シグナルによってリン酸化した BvgA は見かけ上、異なる遺伝子群に対しアクティベーターとして、あるいは逆にリプレッサーとして機能している。従って、BvgAS 系の活性化によって *bags* は転写されるが、*brgs* は転写されないという特徴をもった Bvg⁻ phase への転換が起こる。逆に、ネガティブ・モジュレーションシグナルが存在したり、*bvgAS* 遺伝子を完全に欠失した突然変異株などで BvgAS が不活性化状態になると、Bvg⁻ phase に転換する。この phase ではアドヘジンや毒素の発現が起こらず、また調節蛋白質 BvgR が枯渇してくるので *vrgs* が脱抑制を受けて発現する。もう少し具体的にいうと、*bvgAS* は毒素やアドヘジンの遺伝子をポジティブ (Bvg⁺ phase 条件) に制御する以外に、病原性には直接関係ないように見える *B.brochiseptica* の motility regulon⁽⁴⁶⁾、尿素分解酵素の遺伝子あるいは siderophore⁽⁴⁷⁾ 産生に必要な遺伝子ならびに *B.pertussis* の機能不明の外膜蛋白をコードする *vrgs* など複数の遺伝子をネガティブに制御している。

vrgs 遺伝子の 1 つ、*vrg6* は現在のところ機能は未知だ

⁽⁴⁶⁾ *Bordetella bronchiseptica* の鞭毛形成に関わる遺伝子制御系。

⁽⁴⁷⁾ 生物にとって、鉄は必須の微量元素の 1 つで、呼吸系における電子伝達、硝酸と亜硝酸の還元、活性酸素種の分解などに深く関与している。しかし、環境中で微生物が利用できる鉄の濃度は生育に必要な要求量よりもはるかに少なく、水溶液中ではほとんどがそのままでは利用できない粒子として存在している。そこで、生体側は主に肝臓で合成され血清中で鉄と結合して、生体内の種々の組織へ鉄を輸送する役割をもつ血漿蛋白質であるトランスフェリンや哺乳動物の乳汁やヒトの唾液、涙、血液などに含まれる多機能蛋白質で、母乳中の蛋白質の約 10% から 30% を占め、特に初乳中に多く含まれているラクトフェリンを分泌し、遊離鉄と複合体を形成して効率よく利用する。これに対して細菌など寄生体側では微細環境中に鉄が枯渇してくると、菌種に特異的なシデロフォア (siderophore) を分泌する。この鉄キレーター蛋白質は遊離鉄と特異的な複合体を形成し、菌体表面のレセプターを介して菌体内に効率的に取り込まれる。このような仕組みで多くの微生物は宿主や他の微生物と互いに必要な鉄イオンの取り合いをしているのである。

が *B. pertussis* の Bvg⁻ phase におけるある役割を担う遺伝子と考えられている。一方で *bvgR* 遺伝子に欠失のある変異株を作って Bvg⁻ phase の形質を菌体表面に発現させても *in vivo* ではその発現は弱く、定着の効率が減少することが示されている³⁰⁾。また、マウスの噴霧感染系を用いた実験によると、*B. pertussis* の *bvgR* 遺伝子欠損株、すなわち *vrgs* が機能しているはずの株でも野生株よりは弱い、百日咳毒素 (PTx) により発症するリンパ球増多症 (lymphocytosis) が確かに誘導³¹⁾された。これらのデータは Bvg⁻ phase、すなわち調節蛋白質の BvgR が産生されない形質相の *in vivo* における役割を疑問視するものと考えられている。

III-3 *in vivo* におけるモジュレーションシグナルは？

Bvg 活性化キネティックスの解析から、活性化した BvgA が結合して活性化される *vags* 遺伝子群のプロモーター³²⁾ (*vags* プロモーター) には early class と late class³³⁾ の存在が知られていたが、最近、パートアクチン (*prn*) 遺伝子で代表されるような intermediate class の *vags* プロモーターが同定された³⁴⁾。一方、Kinnear ら³⁵⁾ は最近、感染の経過中に遭遇する菌体周囲の微細環境の変化がモジュレーションシグナルになって、病原遺伝子が菌の生存、感染の持続 (持続感染)、免疫監視機構からの逃避および他の宿主への伝播などを制御するのではないかという仮説を提出した。彼らは転写活性化キネティックスの解析により、幾つかの病原因子は、少なくとも3つの *vags* プロモータークラスに分けられて時間差的に制御されていることを示した³⁶⁾。例えば、繊維状赤血球凝集素 (*fha*) 遺伝子は *bvgAS* 系誘導シグナルの10分後に転写が開始される (early class プロモーター) が、*prn* 遺伝子は誘導1時間後 (intermediate class プロモーター)、また百日咳毒素 (*ptx*) 遺伝子は2~4時間後 (late class プロモーター) になってようやく転写が開始される。さらに、遺伝子操作によって早期に *ptx* を発現し、後期に *fha* を発現するようなプロモーター変異をもつ百日咳菌株を作製し、マウス噴霧感染系 (*in vivo*) を用いた実験³⁷⁾ から、この変異株では百日咳菌の気道への定着能が明らかに減少する

ことが観察された。以上より、BvgAS 制御系ならびに *vags* の時間差的制御が百日咳菌の病原性に何らかの役割を果たすのではないかということが示唆された。さらに彼らは *vags* プロモーターの時間差的制御が病原性に果たす役割について解析し、*in vitro* における発現のキネティック・パターンにもとづいて、アドヘジンは宿主の気道に定着するために早期に発現され、毒素は生体防御機構の攻撃から逃れる必要がある時に発現されるという作業仮説を立てた。このような *in vitro* で見られる病原因子発現の時間差的制御が *in vivo* における百日咳菌の病原性 (毒力) に一定の役割をもつだろうという仮定の下に、次の2つの仮説を導いている。

III-3-1 時間的シグナル説

この考え方は「菌の定着には時間差的制御による *vags* 遺伝子群の発現が大切であり、これにより初めて感染を成立させ得る」というものである。*vags* の発現制御は次のように説明される。発症初期の百日咳患者が咳をして飛沫小滴 (エロゾル) を排出する。その中に存在する百日咳菌は外環境の低温 (ネガティブ・モジュレーションシグナル) にさらされて *bvgAS* 系が弱いダウン・モジュレーションを受ける。このわずかにモジュレーションが起きた状態でエロゾル中の菌がたまたま別の感受性宿主の鼻腔に侵入したとする。このような活性化 BvgA が少量しか存在しない状態ではすべての *vags* は活性化されない。つまり、最も感受性の低い *fha* プロモーターは低温というネガティブ・シグナルを感知しても、わずかに活性化 BvgA が残存すれば未だ [on] のままか、あるいは新しい宿主に進入し体温というポジティブ・シグナルを少しでも感知すれば即座に活性化すると考える。もし、百日咳菌が激しい咳によってエロゾルと一緒に体外に喀出されて別の宿主に侵入するまでに、例えば低温への暴露などで *bvgAS* 系が中程度にモジュレーションを起こすならば、*prn* の発現は最高レベルに達するだろう。一方、モジュレーションに最も敏感な *ptx* プロモーターは活性化 BvgA 量が少しでも減るともはや発現されなくなり、気道侵入直後の粘膜上皮細胞への吸着の際には毒素作用を発揮することはないと思われる。このような状況で、まず Prn が上皮細胞の表面に吸着し、これがベースになって FHA が Prn と複合体を形成してしっかりと上皮細胞に吸着することで気道上での菌体の定着が完了するの

³²⁾ 真核生物と原核生物である微生物では遺伝子の構造が大きく異なるが、高等動物と同様に微生物でも発育 (増殖) する間に多くの遺伝子が、必要な時期に必要なだけ働いていると考えられる。各構造遺伝子の上流領域にはプロモーターと呼ばれる一連の特別な DNA 配列がある。複雑な構成要素からなる転写調節因子が DNA に結合することによってプロモーター付近の DNA 構造や安定性が変化して RNA ポリメラーゼがプロモーターに結合したり2本鎖の開裂が促進されて転写が進行する。

³³⁾ スクレオチドやアミノ酸配列のデータベースなどから、局所的に高い類似性を有するものを検索する相同性検索プログラムのこと。これに対して長い配列の類似性を保っているものに対する相同性検索プログラムを FASTA という。

ではないかと説明している。

III-3-2 空間的シグナル説

これは「*vags* 遺伝子群の発現制御は、時間的な要因というよりむしろ、空間的な要因に反応して起こる」という発想から導かれたものである。この場合、鼻咽腔から下部気道における粘膜上皮の微細環境は、*in vitro* のようなモジュレーションを惹起する均質なシグナルの存在する環境とは全く異なっていることを前提としている。気道粘膜上皮のある部位における微細環境は、中等度のモジュレーションと認識されるようなシグナルとして存在するだろう。このような微細環境にいる菌は FHA や Prn のようなアドヘジンの発現が誘導されるが、毒素の発現は抑制される。そして別の部位における微細環境はモジュレーションが起こらない状態かもしれない。この場合はアドヘジンと毒素が共に発現することになる。この仮説では *vags* 遺伝子群は百日咳菌が宿主の気道のどの部位にいるかによって時間差的に制御されるだろうと説明する。*bvgA* に支配されているレギュロン（遺伝子制御系）上の *vags* は、そのプロモーターを中心とする転写制御領域の塩基配列の違いによって、環境中の特定のシグナルのわずかな変化に対してそれぞれ異なる様式で敏感に反応する。つまり、百日咳菌は制御系が1つという効率の良さによってその生活環 (life cycle) の複雑さに対応できるようになっていると考えられる。

以上の2つの仮説は互いに必ずしも相容れないものではなく、両立し得るものである。つまり、宿主気道内における菌の定着する位置は、最初に気道に侵入した部位から時間の経過によって移動し得るし、ある程度時間的な要因にも依存するだろうからである。

IV 微細環境シグナルによるモジュレーションに伴う形質相の多様な変化

百日咳菌の *bvgAS* 制御遺伝子にコードされた2成分シグナル伝達系は Bvg^+ phase (病原相) と Bvg^- phase (非病原相) の間の発現形質のモジュレーションを行っているが、従来、 Bvg^+ phase だけで病原性を保ち、気道上で感染を成立させるのに必要かつ十分³⁶⁾であり、 Bvg^- phase は菌にとって有害であるだけで何の役にも立たないという報告が多かった。しかし、最近 *B. bronchiseptica* は、 Bvg^- phase 遺伝子の発現によって宿主外での栄養が乏しい環境下で生残能力を獲得することが報告された³⁷⁾。従って、この点で様相を全く異にする *B. pertussis* の場合、 Bvg^- phase の存在は進化の名残りではないかという可能性も論じられている。また、栄養飢餓状態で生残できる

能力が増大し下部気道に定着・感染できない *Bordetella bronchiseptica* の変異株が分離され、これを用いた解析から Bvg -intermediate (Bvg') phase が遺伝学的に定義された³⁸⁾。*Bordetella* 属菌では環境条件の差に应答して、少なくとも3つの異なる形質相 (phenotypic phase) の発現が制御されていることが明らかにされた。すなわち、 Bvg' phase はアドヘジンや毒素が発現されることが特徴の相であり、 Bvg^- phase の特徴は *Bordetella bronchiseptica* の場合には運動器官である鞭毛が形成され、*Bordetella pertussis* では *vrgs* が発現することにある。 Bvg' phase の特徴は (1) *vrgs* の発現形質が存在しない。(2) ごく一部の *vags* の発現形質が存在する。(3) この phase 特有の BipA 蛋白質 (後述) が存在することである。

V Bvg' phase で活性化する遺伝子 *bipA* (*Bordetella* intermediate phase gene A) の転写制御と発現産物 BipA の性状

V-1 *bipA* の転写制御機構

Deora ら³⁹⁾は *bipA* の上流にある転写制御領域付近の塩基配列を決定して、BLAST⁽⁴⁰⁾で解析した結果、この領域には親和性の異なる $BvgA$ 結合部位が多数分布していることを見出した。彼らはこれらの分布や相対的な位置ならびに親和性の違いに着目して、高親和性ならびに低親和性の活性化 $BvgA$ ($BvgA\sim P$) 結合サイトの組合せによって Bvg' phase においては最大の転写が起こるが、 Bvg^- phase では抑制が起こり、 Bvg^- phase においては活性化が起こらないというモデルを提出した (図5)。 Bvg' phase は *Bordetella* 属菌の感染サイクルにおいてユニークな役割をする明確な形質相であり、この phase で最大に発現するクラス of 遺伝子の存在が明らかにされたことで、*Bordetella* 属菌の病原遺伝子制御系の発現様式が多様であることが示された。このモデルからまずいえることは、*Bordetella* 属菌は気道に感染する過程で、現在置かれている微細環境に最も適切な時間的、空間的な遺伝子発現パターンを簡単に構築できるように高度に適応しているということである。そして *vags* 遺伝子の活性化や抑制に関わる DNA 配列に対する $BvgA\sim P$ の相対的な親和性を微調整することによって、それぞれの病原遺伝子の発現レベルを連続的に強めたり弱めたりすることができることである。しかし、このような *bvg* 遺伝子制御系の複雑さは決して *Bordetella* 属菌にユニークなものではなく、他の病原細菌に存在する病原遺伝子制御系も同様に複雑な遺伝子発現パターンを示すことが分かっている⁴⁰⁾。

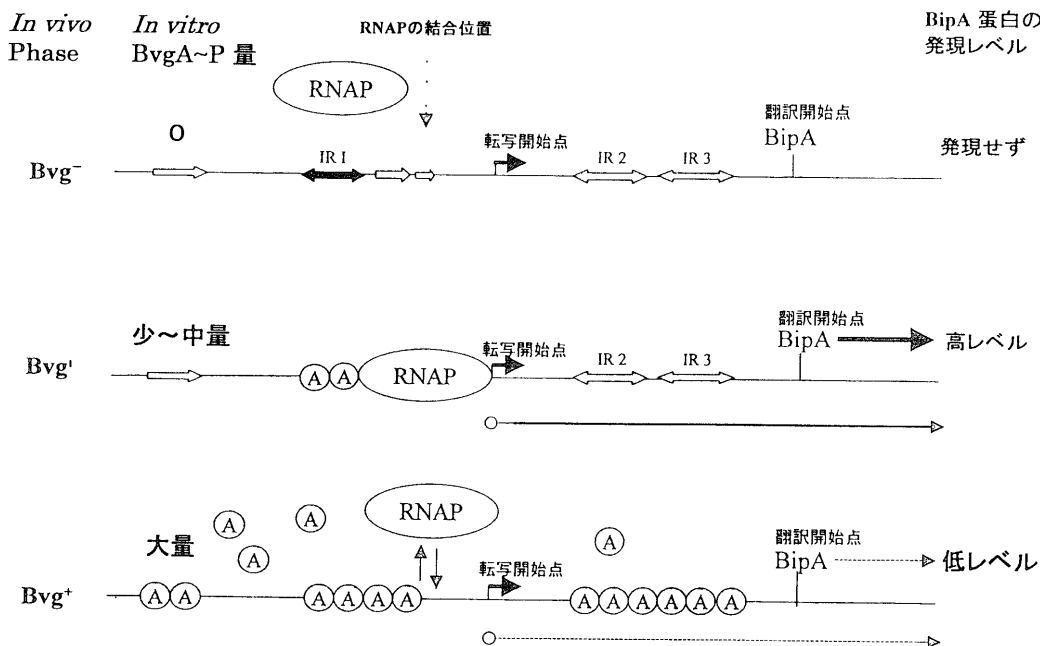


図5 BvgAS系による *bipA* 遺伝子の発現制御モデル

bipA 遺伝子のプロモーター付近 (RNA polymeraseの結合位置) から BipA 蛋白質の翻訳開始点にかけて、結合力の異なる複数の活性化 BvgA 結合サイト (IR1, 2, 3等の矢印) が散在することが明らかになっている。*bipA* が最大レベルに発現するには Bvg⁻ phase における適量の活性化 BvgA 蛋白質の存在が必要であり、Bvg⁻ phase における活性化 BvgA 蛋白質が大量に供給されると、逆に転写 (mRNA 合成) が抑制されることを示すモデル。

Deora, R., Bootsma, H.J. Miller, J.F. and Cotter, P.A. (2001) Diversity in the *B. pertussis* virulence regulation. *Mol. Microbiol.*, 40:669-683. より改変して転載。

V-2 Bvg⁻ phase で最大に発現する BipA の性状

Stockbauer ら⁴¹⁾は、*B. bronchiseptica* の Bvg⁻ phase の性状を解析して、この phase で最大に発現する抗原の存在を示し、*bvg* 遺伝子系の制御下にある新しいクラスの遺伝子の存在を明らかにした。Bvg⁻ phase に特異的な蛋白質抗原の幾つかは回復期の百日咳患者の血清抗体でとらえられている³⁰⁾。つまり、Bvg⁻ phase 特有の遺伝子群は百日咳患者の体内 (*in vivo*) で確かに発現していることを意味している。この蛋白質は BipA と名づけられ、Bvg⁻ phase で最大に発現し、その発現は転写レベルで制御されていることが明らかにされた。BipA は *B. pertussis* や *B. parapertussis* の Bvg⁻ phase でも同様に発現している⁴¹⁾。また、*bipA* 遺伝子も環境因子の微細な変化に反応して、BvgAS 系によって時間差的に活性化または抑制される。

BipA は 1578 個のアミノ酸残基からなり、N 末端付近の一次構造ならびに分子中央の繰り返しドメインの存在は、*Yersinia* 属の Invasin⁴¹⁰⁾ ならびに EHEC⁴¹¹⁾ や EPEC⁴¹²⁾ で発現される Intimin⁴¹³⁾ に非常に高い相同性をもっていることから、BipA は複雑な phenotypic modulation に一定の役割を担うアドヘジンとして機能することが想定されている。さらに *in vitro* 系でも BipA が繊毛のない L2 細胞には結合しないことや、電子顕微鏡で

Bordetella 属菌は呼吸上皮細胞の繊毛の生えている側のみ吸着することが観察されることから、BipA は *in vivo* 系ではアドヘジンとして機能していると考えられている⁴¹⁾。BipA の C 末端部位を認識する抗体を用いた細胞学的な解析および電子顕微鏡による解析から、BipA は菌体外膜に局在し、その C 末端は細胞表面に露出している

⁴¹⁰⁾ 小腸バイエル板への効率的な侵入に必要な *Yersinia enterocolitica* (腸炎エルシニア) の外膜蛋白質。

⁴¹¹⁾ Enterohemorrhagic *E. coli* の略で、O157 で代表される腸管出血性大腸菌。

⁴¹²⁾ Enteropathogenic *E. coli* (腸管病原性大腸菌) の略。

⁴¹³⁾ 腸管病原菌にとって人や動物に感染するには、まず腸管上皮に吸着しなければならない。この過程に関与する蛋白質の1つが intimin である。intimin は病原性大腸菌の外膜上に存在し、種々の真核細胞表面リセプターと特異的に相互作用をするアドヘジン (吸着分子) の仲間である。EPEC (O127) や EHEC (O157) はそれぞれ抗原性の異なる intimin- α , - β を産生する。もう1つは EPEC 自身が産生する intimin receptor (Tir) である。細菌の分泌蛋白質はその分泌様式によって type I~IV に分類されるが、細菌が宿主細胞などに吸着 (密着) すると鞭毛の基部に似た中空の射出装置を宿主細胞の細胞質内に挿入して直接エフェクター蛋白質 (毒素など) を注入するタイプのものを type III secretion system⁴¹⁴⁾ という。このシステムによって菌はまず Tir を宿主の上皮細胞表面に打ち込んだ後、外膜上に発現している intimin を腸管上皮細胞上に組み込んだ Tir に結合させて宿主の腸管上皮に持続的に定着する。

ことも明らかになっている⁴¹⁾。

V-3 BipA の飛沫感染過程における役割

Stockbauer ら⁴¹⁾は感染過程で遭遇する自然宿主の気管上皮細胞のある部位の微細環境において、BipA、線毛(Fim)、FHA および他の *Bordetella* 属の病原因子の吸着特性を調べるための assay 系を用いて、*B. bronchiseptica* の野生型株 *bipA* 遺伝子欠損変異株 についてウサギの気管への定着能を比較した。その結果、Bvg⁺ phase の条件で培養した菌を経鼻投与して5週目という時点では、鼻中隔、鼻腔、喉頭、気管への定着に BipA 蛋白質は必要ないことが示された。また、BipA が病状の重症化(あるいは緩解)、炎症、病理あるいは高力価の抗 *Bordetella* 抗体の産生などに必要だという証拠も見出されなかったにもかかわらず、彼らは BipA (および Bvg⁺ phase) は気管内定着以外の感染サイクルのパラメーターとして重要な役割を果たすかもしれないという考えに固執している。なぜなら、飛沫感染は概念的には (1) 感染宿主からの放出、(2) 環境中での生残り、あるいは自然環境中で次の宿主に感染するまでの一時的な生残り、(3) 自然宿主との最初の接触と相互作用という3つのステップに分けられる。そしてまず初めに BvgAS 系は *Bordetella* 属菌の菌体が気管の中にいるのか外に出ているのか、を感知すると考えられる。さらに、百日咳菌は人体外では長い期間、生残できないのに感受性のある生体には強い伝染性があるという事実や、Bvg⁺ phase は飛沫感染にある役割をもっているという間接的証拠からも、伝播のための何らかのメカニズムに関与している可能性が強く示唆されるというのである。この仮説を確実に論証するには、さらに多くの *in vivo* での実験を中心とした証拠の積み重ねが必要であるが、百日咳菌の感染と発症のメカニズムの解明とともに、他の感受性宿主への伝播のメカニズムの解明は新しいタイプのワクチン開発につながる可能性を秘めた独創的な研究であるという点からも興味あるテーマである。

VI 終わりに

本稿では前半部で百日咳菌の病原因子の発現制御機構について概説し、後半部では *in vitro* で観察される phenotypic modulation の *in vivo* における意義について動物実験や臨床実験で得られた直接的証拠にもとづいて考察された2, 3の仮説や考え方を紹介した。

Bordetella 属菌の飛沫感染の分子機序については未だほとんど何も分かっていないといった方が正しいのだが、*Bordetella* 属菌の感染サイクルのうち Bvg⁺ phase はエロ

ゾル伝播のステップに何らかの重要な役割を演じているのではないかという発想から導かれた仮説の正当性について活発な議論が行なわれている。

文 献

- 1) Lacey, B.W. (1960) Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. J. Hyg., 58:57-93.
- 2) Weiss, A.A. and Falkow, S. (1984) Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. Infect. Immun., 43:263-269.
- 3) Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D. and Falkow, S. (1988) The *vir* locus and phase-variation in *Bordetella pertussis*. Tokai J. Exp. Clin. Med., 13 (Suppl.):S223-226.
- 4) Knapp, S. and Mekalanos, J.J. (1988) Two-transacting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol., 170:5059-5066.
- 5) Melton, A.R. and Weiss, A.A. (1989) Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol., 171:6206-6212.
- 6) Roy, C.R., Miller, J.F. and Falkow, S. (1989) The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. J. Bacteriol., 171:6338-6344.
- 7) Uhl, M.A. and Miller, J.F. (1995) *Bordetella pertussis* BvgAS virulence control system, "Two-Component Signal Transduction" (ed. by Hoch, J. and Shilhavy, T.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.333-349.
- 8) Stainer, D.W. and Scholte, M.J. (1970) A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. J. Gen. Microbiol., 63:211-220.
- 9) Merkel, T.J. and Stibitz, S. (1995) Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol., 177:2727-2736.
- 10) Merkel, T.J., Barros, C. and Stibitz, S. (1998) Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol., 180:1682-1690.
- 11) Beattie, D.T., Shahin, R. and Mekalanos, J.J. (1992) A *vir*-repressed gene of *Bordetella pertussis*

- is required for virulence. *Infect. Immun.*, 60: 571-577.
- 12) Banemann, A. and Gross, R. (1997) Phase variation affects long-term survival of *B. bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect. Immun.*, 65:3469-3473.
 - 13) Gueirard, P., Weber, C., Coustumier, A.L. and Guiso, N. (1995) Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J. Clin. Microbiol.*, 33:2002-2006.
 - 14) Masure, H.R. (1992) Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:6521-6525.
 - 15) Bassinet, L., Gueirard, P., Maitre, B., Housset, B., Gounon, P. and Guiso, N. (2000) Role of adhesions and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 68:1934-1941.
 - 16) Ewanowich, C.A., Melton, A.R., Weiss, A.A., Sherburne, R.K. and Peppler, M.S. (1989) Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 57:2698-2704.
 - 17) Ewanowich, C.A., Sherburne, R.K., Man, S.P.F. and Peppler, M.S. (1989) *Bordetella paraptussis* invasion of HeLa 229 cells and human respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.*, 57:1240-1247.
 - 18) Lee, C.K., Roberts, A.L., Finn, A.M., Knapp, S. and Mekalanos, J.J. (1990) A new assay for invasion of HeLa cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect. Immun.*, 58:2516-2522.
 - 19) Lee, C.K., Roberts, A.L., Finn, T.M. and Mekalanos, J.J. (1990) Invasion of HeLa 229, Chinese hamster ovary, and U937 cells by *Bordetella pertussis*, p.115-123. *In* Manclark, C.R., DHHS publication no. (FDA) 90-1164 (ed.), *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis*. Department of Health and Sciences, U.S. Public Health Service, Bethesda.
 - 20) Schipper, H., Krohne, G.F. and Grose, R. (1994) Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.*, 62:3008-3011.
 - 21) Moullem, M., Farfel, Z. and Hanski, E. (1990) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. *Infect. Immun.*, 58:3759-3764.
 - 22) Masure, H.R. (1993) The adenylate cyclase toxin contributes to the survival of *Bordetella pertussis* within human macrophages. *Microbial Pathogen.*, 14:253-260.
 - 23) Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. and Guiso, N. (1998) Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect. Immun.*, 66:1718-1725.
 - 24) Khelef, N. and Guiso, N. (1995) Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134:27-31.
 - 25) Khelef, N., Zychlinsky, A. and Guiso, N. (1993) *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.*, 61:4064-4071.
 - 26) Friedman, R.L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T. and Yocum, D.E. (1993) Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.*, 60:4578-4585.
 - 27) Weingart, C.L. and Weiss, A.A. (2000) *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect. Immun.*, 68:1735-1739.
 - 28) Weingart, C.L., Mobberley-Schuman, P.S., Hewlett, E.L., Gray, M.C. and Weiss, A.A. (2000) Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect. Immun.*, 68:7152-7155.
 - 29) Parton, R. (1999) Review of the biology of *Bordetella pertussis*. *Biologicals*, 27:71-76.
 - 30) Martinez de Tejada, G., Cotter, P.A., Heininger, U., Camilli, A., Akerley, B., Mekalanos, J.J. and Miller, J.F. (1998) Neither the *bvg*⁻ phase nor the *virg6* locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect. Immun.*, 66:2762-2768.
 - 31) Merkel, T.J., Stibitz, S., Keith, J.M., Leef, M. and

- Shahin, R. (1998) Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 66:4367-4373.
- 32) Scarlato, V., Prugnola, A., Arico, B. and Rappuoli, R. (1990) Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:6753-6757.
- 33) Harvill, E.T., Preston, A., Cotter, P.A., Allen, A.G., Maskell, D.J. and Miller, J.F. (2000) Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect. Immun.*, 68:6720-6728.
- 34) Kinnear, S.M., Marques, R.R. and Carbonetti, N.H. (2001) Differential regulation of *bvg*-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect. Immun.*, 69:1983-1993.
- 35) Kinnear, S.M., Boucher, P.E., Stibitz, S. and Carbonetti, N.H. (1999) Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.*, 181:5234-5241.
- 36) Akerley, B.J., Cotter, P.A. and Miller, J.F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell*, 80:611-620.
- 37) Cotter, P.A. and Miller, J.F. (1994) BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect. Immun.*, 62:3381-3390.
- 38) Cotter, P.A. and 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.*, 24:671-685.
- 39) Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F. and Cotter, P.A. (2001) Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol. Microbiol.*, 40:669-683.
- 40) Miller, J.F., Mekalanos, J.J. and Falkow, S. (1989) Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science*, 243:916-922.
- 41) Stockbauer, K.E., Fuchslocher, J.F. and Cotter, P.A. (2001) Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol. Microbiol.*, 39:65-78.
- 42) Kerr, J.R. (1999) Type III (contact-dependent) secretion in gram-negative bacteria. *Rev. Med. Microbiol.*, 10:155-164.
- 43) Yuk, M.H., Harvill, E.T. and Miller, J.F. (1998) The BvgAS virulence control system regulated type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol. Microbiol.*, 28:945-959.