

令和元年6月12日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18797

研究課題名(和文)牛サルモネラ症原因菌の新規ADP-リボシル化毒素産生機構の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism for expression of ADP-ribosyltransferase toxin ArtA/ArtB in Salmonella

研究代表者

玉村 雪乃(Tamura, Yukino)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・研究員

研究者番号：90584384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラの一部の菌は百日咳毒素(PTX)と相同であるADP-リボシル化毒素 ArtABを産生する。本研究により、artAB遺伝子がサルモネラのプロファージ(Artプロファージ)上に存在することが明らかとなった。多様なArtファージが認められたが、全てのArtファージが、ファージ様の構造をとり、artAB遺伝子は、大腸菌の志賀毒素遺伝子と同様に、後期アンチターミネーターQ遺伝子の下流存在していた。サルモネラがマウスマクロファージ内でartABを発現していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにArtABの毒性については明らかにされてきたが、その発現機構は未解明であった。本成果により毒素発現機構および発現条件が明らかとなり、ArtABがSalmonella属菌の病原性と関連する可能性が示された。近年増加した成牛のサルモネラ症の主な原因菌であるファージ型DT104が共通にArtABを保有していることから、本成果が成牛のサルモネラ症増加の原因究明の一助となると考える。百日咳毒素は百日咳ワクチンの構成成分であるが、本研究においてArtABがサルモネラ感染動物体内において産生される可能性が示され、ArtABも百日咳毒素と同様にワクチンの候補抗原となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Salmonella produces a pertussis-like toxin (ArtAB), which catalyzes ADP-ribosylation of Gi proteins. We detected artAB gene on phage fraction induced by mitomycin C. Sequencing analysis revealed variety of Art phages, whereas Art phages retained features of lambdoid phages. artAB gene were present downstream region of antiterminator Q in all Art phages. artAB gene were expressed in murine macrophages during Salmonella infection.

研究分野：獣医学

キーワード：サルモネラ症 ADP-リボシル化毒素 毒素転換ファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛のサルモネラ症は種々の血清型の *Salmonella* 属菌に起因する伝染性疾病であり、感染牛に下痢や敗血症を引き起こす。*S. Typhimurium* (ST)は牛サルモネラ症の主な原因血清型として最も重要であり、北海道内においては乳用牛のサルモネラ症原因菌の約8割を占める。牛サルモネラ症は従来子牛の疾病として重要であったが、1990年代以降、成牛における発生が増加し、これと同時期にSTファージ型DT104(DT104)の分離数が増加した。このことから申請者らは、DT104が成牛のサルモネラ症増加と関連している可能性を指摘した。DT104は世界各国で人や家畜から分離されており、重症例からの分離例が多いこと等の疫学的な観点から、病原性が強く、新たな病原性因子を獲得した菌であることが推測される。

近年、百日咳毒素様ADP-リボシル化毒素ArtABがDT104ゲノムにおけるプロファージ(Artファージ)上の遺伝子 $artAB$ にコードされていることが報告された。 $artAB$ はDT104が共通に保持し、溶原性ファージの誘導物質であるマイトマイシンC(MMC)あるいは H_2O_2 処理によりArtABが誘導的に発現することが明らかとなっている。申請者らはArtABを精製し、本毒素が百日咳毒素感受性G蛋白質をADP-リボシル化すること、さらにマウスへの腹腔内投与により致死活性を示すことを明らかにした。 $artAB$ 遺伝子はDT104以外のSTの一部にも認められ、さらに他血清型であるWorthington(SW)、Agoueve(SA)、他菌種である*S. bongori*(Sb)においてもArtAB類似蛋白質の産生が認められる。他血清型由来のArtABはDT104由来ArtABと類似した生物活性を示すことから、本毒素がDT104のみならず他血清型の*Salmonella*属菌に伝達し、強毒化に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、本毒素の発現機構および発現条件は未解明であり、*Salmonella*属菌の病原性における本毒素の役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究ではArtABと牛サルモネラ症の原因菌であるDT104の病原性との関連について明らかにすることを目的とし、ArtABの発現機構および発現条件を解明する。

3. 研究の方法

(1) $artAB$ 遺伝子の局在の解析

DT104以外の $artAB$ 保有株においては当該遺伝子の局在は解析されていないが、その発現がMMCにより誘導されることから、DT104と同様にプロファージ上に存在することが予想される。 $artAB$ 保有株をMMCで刺激し、培養上清から分離したファージ分画よりDNAを抽出し、S1ヌクレアーゼ処理後に電気泳動および $artA$ プローブを用いたサザンブロッティングを実施した。

(2) Art ファージゲノムの解析と $artA$ 転写開始点の同定

次世代シーケンサーにより、ファージの全塩基配列を決定し、DFAST(<https://dfast.nig.ac.jp/dfc/>)によりアノテーションを実施した。Easyfig 2.2.3(<http://mjsull.github.io/Easyfig/>)を用いてファージ間の塩基配列を比較した。 $artA$ の転写開始点は、MMCで刺激したDT104 U1株のRNAを用いて、5'RACE法により同定した。

(3) Art ファージ伝達性の解析

DT104をMMCで刺激し、Artファージを含む培養上清を回収した。一夜培養したST LT2株を受容菌として用いて、ブランクアッセイを実施した。ブランクからPCRで $artA$ を検出することで、Artファージを検出した。また、ブランク内に発育したコロニーから得た溶原菌をMMCで刺激し、培養上清からウエスタンブロッティングでArtAを検出した。Artファージ伝達の特異性を明らかにするために、DT104の $artAB$ 遺伝子をハイグロマイシン耐性遺伝子に置換した株を作成した。本株をMMCで刺激し、ファージを含む培養上清を、一夜培養した受容菌液と混合して室温で1時間静置後、ハイグロマイシンを含む寒天培地に塗抹してArtファージ伝達株を選択した。受容菌には、異なる遺伝子型のSTを複数株選択して用いた。

(4) $artA$ 発現条件の解析

DT104感染動物体内における $artA$ 発現状況を検討するために、マウスマクロファージ系細胞であるRAW264.7細胞内における当該遺伝子の発現状況を調べた。RAW264.7細胞にDT104を感染させ、1時間後および3時間後に細胞内の菌からRNAを抽出し、定量RT-PCR法により $artA$ の発現量を測定した。また、DT104感染動物に対する抗菌剤投与によるArtA発現誘導の可能性を検討するために、DT104を抗菌剤で刺激し、16時間後に培養上清からウエスタンブロッティングでArtAを検出した。

4. 研究成果

(1) $artAB$ 遺伝子の局在の解析

DT104以外の $artAB$ 保有STおよび他血清型の $artAB$ 保有菌である*S. Worthington*および*S. Agoueve*において、DT104と同様に約48kbのファージ上に $artA$ が検出され、DT104以外の $artAB$ 保有株においてもArtファージが存在することが明らかとなった。*S. bongori*においては $artA$ を保有するファージが検出されなかったことから、ファージサイクルに依存しない $artAB$ 発現機構が存在することが示唆された。

(2) Art ファージゲノムの解析と転写開始点の同定

Art ファージの全塩基配列解析の結果、Art ファージには複数の種類が存在することが明らかとなった。DT104 の Art ファージは、ST の病原性に関与すると考えられているプロファージ Gifsy-1 に類似していた。DT104 の Art ファージにおいては、Gifsy-1 に存在するファージの複製遺伝子周辺の領域が欠損しており、*artAB* を含む外来の遺伝子領域に置き換わっていた。非 DT104 の ST である NCTC73 株の Art ファージは、DT104 の Art ファージと高い相同性を示したことから、同一血清型内で Art ファージが伝達される可能性が示された。*S. Worthington* の Art ファージは DT104 や ST NCTC73 株の Art ファージと高い類似性を示したが、異なるインテグラーゼを保有していた。*S. Agoueve* においては、*artAB* 周辺の領域以外は DT104 や ST NCTC73 株の Art ファージと類似性が認められなかった。全ての Art ファージが ファージ様の構造をとり、*artAB* は後期アンチターミネーターQ 遺伝子の下流に存在していた。DT104 の *artA* の転写開始点を 5' RACE 法により解析した結果、アンチターミネーターQ 遺伝子の下流に転写開始点が同定された。さらに転写開始点の下流、*artA* の上流にターミネーターと考えられる配列が認められた。これらの構造は志賀毒素転換ファージ上の志賀毒素遺伝子周辺の構造と類似しており、志賀毒素遺伝子発現機構と同様に、後期アンチターミネーターQ 発現後、後期プロモーターからの転写がターミネーターをリードスルーし、*artA* が発現する可能性が示唆された。*S. bongori* においても *artAB* 周辺にファージ様の構造は認められたが、他の Art ファージと塩基配列の類似性は認められず、ゲノムサイズも小さかった。

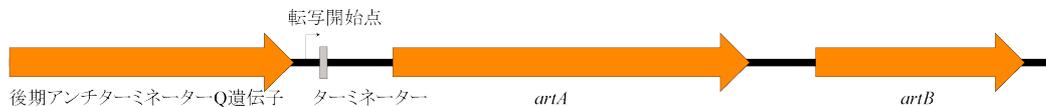


図 1 *artAB* 周辺の構造

(3) Art ファージ伝達性の解析

DT104 由来 Art ファージは ST LT2 株に伝達し、溶原化した。溶原菌を MMC で刺激した結果、ArtA の産生が認められた。また、複数の遺伝子型の ST において、DT104 由来 Art ファージの伝達および溶原化が認められた。以上のことから *artA* が同一血清型内で伝達可能であり、ST の強毒化に関与する可能性が示唆された。

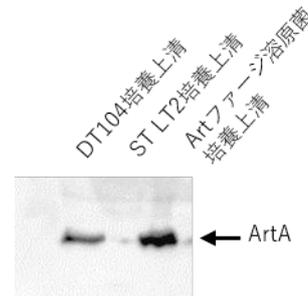


図 2 溶原菌培養上清からの ArtA 検出

(4) *artA* 発現条件の解析

RAW264.7 細胞内における DT104 の *artA* 発現量は、培養液中の DT104 より有意に高かった。また、感染 1 時間後より 3 時間後で発現量が増加した。このことから動物細胞内で *artA* の発現が誘導されていることが明らかとなり、動物体内においても細胞内で本遺伝子が発現している可能性が示唆された。また、抗生物質刺激による ArtA 産生について解析した結果、ナリジクス酸およびニューキノロン系抗菌剤刺激により Art ファージが誘導され、ArtA が産生されていることが明らかとなった。これにより、DT104 感染動物に対する抗菌剤投与により ArtA 産生が誘導される可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Tamamura Y. and Uchida I., Molecular epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Hokkaido, Japan. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 査読有. 2018. 52(4), 293-299. Doi: 10.6090/jarq.52.293

Tamamura Y., Tanaka K., Uchida I., Characterization of pertussis-like toxin from *Salmonella* spp. that catalyzes ADP-ribosylation of G proteins. Scientific Reports. 査読有. 2017. 1;7(1):2653. doi: 10.1038/s41598-017-02517-2.

[学会発表](計 4 件)

内田 郁夫, 佐々木 美羽, 西村 奈都子, 玉村 雪乃, 三浦 祥, 村田 亮. サルモネラ属菌における百日咳毒素様毒素遺伝子の発現機構. 2019. 第 92 回日本細菌学会

玉村雪乃, 高安真理子, 内田郁夫, 楠本正博, 岩田剛敏, 渡部綾子, 新井暢夫, 秋庭正人.

Salmonella Typhimurium DT104の動物細胞内におけるArtAB発現解析および抗生物質による発現誘導. 2018. 第161回日本獣医学会学術集会

Tamamura Y., Tanaka K., Uchida I. Characterization of pertussis-like toxin from *Salmonella* spp. that catalyzes ADP-ribosylation of G proteins. 2017. ETOX18

玉村 雪乃, 田中 聖, 秋庭 正人, 内田 郁夫. *Salmonella* 属菌が産生する ArtAB は RAW264.7 細胞の Gi 蛋白質を ADP-リボシル化する. 2017. 第 1 回獣医微生物学フォーラム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。