

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790313
 研究課題名 (和文) サルモネラのマクロファージアポトーシス誘導と宿主免疫応答
 研究課題名 (英文) The relationship between *Salmonella*-induced macrophage cell death and innate immune response
 研究代表者
 高屋 明子 (TAKAYA AKIKO)
 千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
 研究者番号：80334217

研究成果の概要 (和文) : サルモネラによるマクロファージアポトーシス誘導と宿主免疫応答誘導を制御する因子として GogA、GtgA の 2 つの新規エフェクターを同定した。サルモネラは SPI1 依存的に発現した GogA、GtgA によりカスパーゼ-8 活性化を誘導する。低レベルの GogA、GtgA によるカスパーゼ-8 活性化はサイトカイン産生を促進する一方、高発現の GogA、GtgA はアポトーシスを誘導に関与する。カスパーゼ-8 はアポトーシス誘導と宿主免疫応答誘導を制御する重要な因子である。以上の結果よりサルモネラは SPI1 量制御を介してカスパーゼ-8 活性化を適切に制御することが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Caspase-8 is one of the key factors for controlling both cell death and innate immune response in macrophage. In this study, we suggest that *Salmonella* can induce caspase-8 activation dependently on translocation of novel effectors, GogA and GtgA by SPI1 in macrophage cell. Whereas caspase-8 activation induced by the normal level of GogA and GtgA is involved in the induction of cytokine production, that induced by higher level of those is involved in the induction of apoptosis. Taking these findings together, it is suggested that *Salmonella* controls the induction of caspase-8 activity through regulation of GogA and GtgA expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：サルモネラ、マクロファージ、エフェクター、SPI1、カスパーゼ-8、NF- κ B、病原性

1. 研究開始当初の背景

チフス症は世界で年間1600万人が発症し、

60万人が死亡する最も警戒される細菌感染症の一つである。サルモネラ属細菌の病原性発

症機構の特徴の一つは、宿主がもつ異物抵抗に重要であるマクロファージなどの貪食細胞内で生存し、増殖することである。菌が貪食細胞に作用した結果、宿主の免疫応答に影響を与え、このことがサルモネラの病原性発現に重要であることが示唆されているが、その詳細については不明な点が多い。我々はこれまでにサルモネラの染色体上のAAA⁺プロテアーゼ欠損株を構築し、マウスに対する病原性を検討した結果、Lon欠損株およびClpXP欠損株が著しく弱毒化することを見出した。しかしながら、これら欠損株はマウス体内で6ヶ月もの間持続感染し、ワクチン効果があることから、これら弱毒株は宿主の免疫系を適度に活性化していると考えられる。2種の弱毒株はいずれもマクロファージ内での増殖能が低下することから、これら弱毒株のマクロファージに与える影響を検討することにより、サルモネラによる宿主免疫系かく乱機構の一端を明らかにできると考えられる。

サルモネラを含め多くの細胞内寄生細菌は宿主細胞に感染した際、宿主の細胞死を誘発し、このことが細菌の病原性発現に重要である。菌による細胞死が明らかにされて以来、この細胞死がアポトーシスであるのか、又、ネクローシスであるのかについて議論が交わされてきたが、近年、菌による細胞死は従来研究されてきたアポトーシス、ネクローシスとは異なることから、‘ピロトーシス’という新たな細胞死機構として位置付けることが提唱された。しかしながら、ピロトーシスの誘導機構やピロトーシスがどのように病原性発現調節に関与するかについては不明である。サルモネラの病原性発現と宿主細胞の細胞死誘導に関する研究から、サルモネラの病原因子の一つである*Salmonella pathogenicity island* (SPI) 1によるカスパーゼ-1を介したマクロファージや樹状細胞の細胞死は全身感染に関与し、宿主の炎症反応誘導に影響を与えることが報告されている。このことから、サルモネラ感染における宿主免疫応答機構を解明するためには、サルモネラによる細胞死誘導機構を明らかにすることが重要である。我々はサルモネラのAAA⁺プロテアーゼの一つであるLonがSPI1の発現調節因子であるHilC、HilDの分解に関与することを見出した。このため、樹立したLon欠損株ではSPI1が過剰産生されており、Lon欠損株をマクロファージに感染させるとSPI1依存的に細胞死が過剰に誘導されることも見出した。Lon欠損株による細胞死誘導は、カスパーゼ-1依存的な細胞死誘導に加え、野生株による細胞死では活性化されないカスパーゼ-3依存的なアポトーシス誘導経路が関与していた。以上の結果から、サルモネラは病原因子の発現制御を介して細胞死を適度に誘発し、このことにより宿主免疫反応を調節していると考えられる。そこで本研究で

は、まずLon欠損株におけるカスパーゼ-3活性化機構を明らかにすることにより、サルモネラが細胞死誘導を適切に調節する機構を有することを検討する。続いて、Lon欠損株で過剰発現しているSPI1が持続感染成立に与える影響について調べることにより、サルモネラの病原因子発現制御と宿主免疫応答の関係について検討する。

2. 研究の目的

宿主細胞におけるカスパーゼ-3の活性化経路は複数存在することが示されている。我々はサルモネラLon欠損株をマクロファージ様細胞RAW264.7に感染させると、SPI1依存的にカスパーゼ-3が活性化され、RAW264.7のアポトーシスが引き起こされることを明らかにしている。しかしながら、Lon欠損株がどの経路をターゲットにしてカスパーゼ-3を活性化しているのかは明らかにしていない。そこで本研究ではまずLon欠損株によるカスパーゼ-3の活性化経路を同定し、続いてLon欠損株の宿主細胞のターゲット因子を同定する。宿主因子のターゲット因子を同定後、Lon欠損株側の病原因子の同定を試みる。サルモネラ野生株感染ではカスパーゼ-3が活性化されないことから、野生株ではこの病原因子の量は厳密に制御されていると考えられるので、病原性発現における病原因子の作用機序について明らかにすることを目的とする。又、サルモネラが宿主の細胞死を適切にコントロールするために細胞死誘導を制御していると考えられることから、Lon欠損株にSPI1欠損を導入した株をマウスに感染させた後、持続感染が変化するか、又はLon欠損株の病原性低下と異なるのかを検討し、サルモネラ持続感染と宿主細胞死の関係について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) サルモネラ感染細胞におけるカスパーゼ-8、9活性化の測定:種々のサルモネラ変異株をMOI10でマクロファージ用細胞、RAW264.7に感染させた。感染後、4時間でのカスパーゼ-8、9活性をCaspase-Glo8/9を用いて測定した。
- (2) サルモネラ感染細胞におけるサイトカイン産生量及び転写量の測定:サルモネラ感染細胞から産生されるサイトカインIL-1 β 量はELISAにより定量した。また、転写はリアルタイムRT-PCRによりmRNA量を定量することにより比較した。
- (3) Lon・SPI1二重欠損株の病原性解析: Lon・SPI1二重欠損株をマウスに経口及び腹腔から感染させ、LD₅₀を求めた。

- (4) **GogA、GtgAの細胞内移行性の検討**：宿主細胞内でのみ活性を有するCyaとGogAまたはGtgAの融合タンパクを発現するプラスミドを作製した。各プラスミドを導入したサルモネラを細胞に感染させ、cAMP量を定量することにより細胞内移行性を評価した。

4. 研究成果

- (1) **SPI1 過剰発現株におけるカスパーゼ-3 活性化経路**：Lon 欠損株感染で誘導されるカスパーゼ-3 活性化経路を明らかにするため、上流のカスパーゼ-8、9 の活性を調べた。その結果、SPI1 過剰産生によりカスパーゼ-8、9 ともに活性化されることが明らかとなった。カスパーゼ-8 阻害剤により処理した細胞では、SPI1 過剰産生株でもカスパーゼ-3、9 両方の活性化が消失した。このことから、SPI1 過剰産生ではカスパーゼ-8 活性化を介してカスパーゼ-3 活性化が誘導されることが明らかとなった。
- (2) **SPI1 過剰産生は病原性を低下させる**：SPI1 過剰産生によるサルモネラ病原性発現への影響を調べるため、Lon・SPI1 二重欠損株のマウスに対する病原性をLon 欠損株と比較した。その結果、二重欠損株ではLon 欠損株と比較して、LD₅₀ が 10 倍上昇した。このことから、Lon 欠損による病原性低下の一因は SPI1 過剰発現が起因することが示唆された。
- (3) **SPI1 産生量はカスパーゼ-8 活性量を制御する**：野生株を RAW264.7 細胞に感染させた際のカスパーゼ-8 活性を測定すると、活性化が認められた。SPI1 欠損によりカスパーゼ-8 活性化は認められず、また、プラスミドで SPI1 レギュレーター-HilD を導入し、転写活性を増加させると HilD 増加に伴いカスパーゼ-8 活性が増加した。野生株感染ではカスパーゼ-8 活性化はカスパーゼ-3 活性を誘導しないが、HilD 増加に伴いカスパーゼ-3 活性化が誘導された。このことから、SPI1 産生量がカスパーゼ-8 活性量を制御し、これによりカスパーゼ-3 活性量が制御されることが示唆された。
- (4) **SPI1 によるカスパーゼ-8 活性化はサイトカイン産生を誘導する**：低レベルのカスパーゼ-8 活性はサイトカインの転写活性化因子 NF- κ B の活性化を誘導する。そこで、SPI1 によるカスパーゼ-8 活性化がサイトカイン IL-1 β 産生に関与するか検討した。カスパーゼ-8 阻害および SPI1 欠損株により IL-1 β 量が低下した。

また、IL-1 β 転写量を比較したところ、カスパーゼ-8 阻害および SPI1 欠損株により低下した。このことは、SPI1 によるカスパーゼ-8 活性化は NF- κ B の活性化を誘導することにより、サイトカイン産生制御に関与することを示唆している。

- (5) **カスパーゼ-8 活性化因子の同定**：SPI1 はエフェクターを宿主細胞に輸送する。カスパーゼ-8 活性化が特異的なエフェクターによる誘導されると考え、エフェクターを同定した。SPI1 レギュレーターによって転写活性化される遺伝子を研究室にある DNA アレイの結果をもとに抽出した。また、Effective T3 により抽出した遺伝子がエフェクターであるか検討した。その結果、エフェクター候補として、gogA、gtgA を得た。これらがカスパーゼ-8 活性化に関与する可能性を検討するため、各遺伝子欠損株を構築し RAW264.7 細胞に感染させた。その結果、GogA、GtgA がカスパーゼ-8 活性化に関与することが明らかとなった。
- (6) **サルモネラは GogA、GtgA を宿主細胞に輸送する**：GogA、GtgA が宿主細胞に輸送されるか GogA-Cya、GtgA-Cya 融合タンパク質による cAMP 量産生により評価した。その結果、GogA、GtgA は宿主細胞内に輸送されることが明らかとなった。以上の結果より、GogA、GtgA はカスパーゼ-8 活性化を引き起こすサルモネラの新規エフェクターであることが示唆された。

以上の結果から次のようなモデルが提唱される(図 1)。

サルモネラは SPI1 レギュレーター依存的に GogA、GtgA の転写を促進する。産生された GogA、GtgA はタイプ III タンパク質分泌機構依存的にマクロファージ細胞質に輸送される。輸送された GogA、GtgA はカスパーゼ-8 を活性化することにより、転写活性化因子 NF- κ B を活性化しサイトカインの転写を促進する。このことはサイトカイン産生を促進し、ピロトーシス誘導に寄与する。一方、SPI1 が脱抑制され GogA、GtgA が過剰に産生されると、カスパーゼ-8 が過剰に活性化され、カスパーゼ-3 を活性化しアポトーシスが誘導される。SPI1 過剰産生は病原性低下の要因となることから、カスパーゼ-8 活性化を制御することは病原性発現に重要であると考えられる。

近年サルモネラ及び他の菌において、NF- κ B 制御に関するエフェクターの存在が明らかにされている。しかしながら、多くは NF- κ B を抑制するもので、GogA、GtgA のよう

に活性化に関するエフェクターの報告はいまだなく、本研究が初めてである。今後はGogA、GtgAのターゲット同定し、カスパーゼ-8活性化機構を明らかにすることを目的に研究を進める予定である。

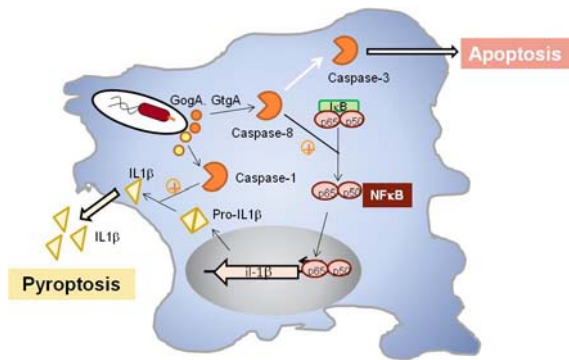


図1 SPI1 依存的な細胞死誘導機構

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① 山本友子, 高屋明子 : サルモネラによる宿主免疫細胞のハイジャック. 実験医学. 査読無 Vol. 27, 2009, 1535-1541.
- ② Matsui, M., Takaya, A., Yamamoto, T: The σ^{32} -mediated negative regulation of Salmonella Pathogenicity Island 1 expression. *J.Bacteriol.* 査読有, Vol. 190, 2008, 6636-6645.
- ③ Mizusaki, H., Takaya, A., Yamamoto, T., Aizawa, S. Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 査読有, Vol.190, 2008, 4624-4631.
- ④ Kage, H., Takaya, A., Ohya, M., Yamamoto, T. Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. *J. Bacteriol.* 査読有, Vol. 190, 2008, 2470-2478.
- ⑤ 高屋明子, 山本友子 : サルモネラマクロファージ内生存戦略の分子機構. 感染・炎症・免疫, 査読無 Vol. 38, 2008, 282-289.
- ⑥ Eguchi, M., Sekiya, Y., Kikuchi, Y., Takaya, A., Yamamoto, T., and Matsui, H. Expressed *Salmonella* antigens within macrophages enhance the proliferation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes by means of bystander dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 査読有, Vol. 50, 2007,

411-420.

[学会発表] (計8件)

- ① 高屋明子: サルモネラ病原分子の分泌制御と機能. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27日. パシフィコ横浜
- ② 都竹奈巳, 高屋明子, 原貴史, 山本友子: サルモネラ新規エフェクターによるマクロファージ Caspase-8 活性化機構. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月28日. パシフィコ横浜
- ③ 都竹奈巳, 高屋明子, 山本友子: サルモネラが有するマクロファージ Caspase-8 活性化エフェクターの探索. 第92回日本細菌学会関東支部総会. 2009年11月5日. 東京歯科大学
- ④ Takaya, A., Kobayashi, S., Tsuzuku, N., Yamamoto, T.: A novel effector, which is involved in the caspase-8 activation within *Salmonella*-infected macrophage cells. 3rd ASM Conference on *Salmonella*. 2009年10月8日. Centre de Congres, Aix-en-Provence, France
- ⑤ 小林里美, 高屋明子, 原貴史, 山本友子: SPI1 によるマクロファージアポトーシスと炎症性サイトカイン産生制御. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月13日. 名古屋国際会議場
- ⑥ 都竹奈巳, 高屋明子, 谷川育己, 山本友子: 転写因子 HilA により活性化される新規遺伝子の網羅的解析. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月13日. 名古屋国際会議場
- ⑦ 高屋明子, 小林里美, 山本友子: *Salmonella* Pathogenicity Island 1 タイプIII 蛋白分泌システムによるマクロファージカスパーゼ-8 活性化制御. 第2回細菌学・若手コロッセウム. 2008年8月4日. 湘南国際村センター.
- ⑧ Ohya, M., Takaya, A., Yamamoto, T. The regulation of PagC, a macrophage-induced *Salmonella* protein, by ClpXP protease. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2007年9月3日. 淡路島国際フォーラム

[その他]

ホームページ

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高屋 明子 (TAKAYA AKIKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 80334217