

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590490

研究課題名（和文）サルモネラⅢ型分泌装置タンパク質 STM1410 の機能解析

研究課題名（英文）Functional characterization of type III secretion apparatus STM1410 encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2

研究代表者

岡田 信彦（OKADA NOBUHIKO）

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：80194364

研究成果の概要（和文）：サルモネラ SPI-2 遺伝子領域にコードされている STM1410 の機能解析を行った。ネズミチフス菌 STM1410 変異株は、マウスに対する病原性が著しく低下すること、SPI-2 エフェクター（SseJ）の宿主細胞への分泌が観察されないことなどから、STM1410 はⅢ型分泌装置タンパク質として機能することが示唆された。また、STM1410 は細胞分画により菌体の内膜成分であることおよび SPI-2 エフェクターである PipB の安定性に対して間接的に関与することを明らかにした。これらのことから、STM1410 は機能タンパク質として SsaW と命名することを提唱した。

研究成果の概要（英文）：The virulence of many Gram-negative pathogens is associated with type III secretion systems (T3SSs), which deliver virulence effector proteins into the cytoplasm of host cells. Components of *Salmonella* T3SS are encoded within *Salmonella* pathogenicity island I and II (SPI-1 and SPI-2). While most SPI-2 T3SS proteins in *Salmonella* have assigned names and functions, a few of them remain poorly characterized. Here, we studied a SPI-2-encoded protein, STM1410, that shows no homology to other T3SS/flagellar proteins and is only present in pathogenic *Salmonella*. Our findings demonstrated that it is essential for type III secretion and that it is localized to the inner membrane. Interestingly, we found STM1410 is critical for the stability for the SPI-2 effector protein PipB. Overall, our findings suggest that STM1410 is a structural protein that contributes to the function of the T3SS complex, and therefore we propose to rename it SsaW.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,500,000	4,550,000

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：病原性・サルモネラ感染症・Ⅲ型分泌機構

1. 研究開始当初の背景

サルモネラは感染後、マクロファージなど宿主細胞内で、サルモネラ小胞と呼ばれるサルモネラ特異的な細胞内オルガネラを形成し、

その中でのみ増殖する。さらにサルモネラ小胞の形成には、サルモネラ特異的病原遺伝子領域、SPI-2 にコードされるⅢ型分泌機構から分泌される種々のエフェクターが関与することが明らかにされている。一般に、Ⅲ型分

泌機構は、エフェクターとよばれるタンパク質を真核細胞の細胞質へ直接、分泌・注入する役割を担っており、多くの病原性グラム陰性菌の病原性発現に關与する重要なビルレンス因子の一つである。III 型分泌装置は複数のタンパク質からなる巨大な分子装置で、20 種類以上の構造タンパク質の多くは、細菌間において高度に保存されている。本研究で着目する機能未知タンパク質 STM1410 は、相同性を有するタンパク質が他の細菌の III 型分泌機構にはみられないことから、サルモネラ特異的な機能を有する新規 III 型分泌装置タンパク質であることが予想された。

2. 研究の目的

サルモネラが宿主細胞内で増殖するためには、SPI-2 にコードされる III 型分泌機構が重要な因子として關与する。サルモネラ SPI-2 遺伝子領域には、32 個のタンパク質がコードされている。これらのタンパク質の多くは、既知タンパク質との相同性から機能が推定されている。しかしながら、現在までに、相同性タンパク質がなく、サルモネラ特異的な機能未知タンパク質についての解析は全く進んでいない。本研究では、サルモネラ SPI-2 における III 型分泌装置の構造およびエフェクター分泌機構解析の一環として、機能未知タンパク質 STM1410 の機能解析を行い、本タンパク質の III 型分泌機構における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス感染実験

ネズミチフス菌野生株および変異株によるマウス混合感染には、BALB/c マウス(♀、5~6 週齢) をを用い、腹腔内接種 48 時間後に脾臓内生菌数を測定し Competitive Index 値の算出を行った。

(2) 全菌体タンパク質試料および培養上清タンパク質試料の調製

Salmonella を LB 培地にて 37°C で一晚振盪培養後、50 倍希釈となるように LPM 培地 (pH 5.8) に植菌し、37°C で 8~9 時間振盪培養した。遠心後、沈殿物を sample buffer で溶解し、全菌体タンパク質試料とした。また、培養上清は 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過し、trichloroacetic acid にて沈殿したものを、培養上清タンパク質試料とした。

(3) 菌体構成タンパク質の分画

① 可溶化タンパク質試料および不溶化タン

パク質試料の調製

LPM (pH 5.8) 培地で培養した *Salmonella* 菌体を超音波破碎した。低速遠心にて未破碎菌体を除いた上清をさらに遠心後、上清を可溶性タンパク質試料とした。沈殿物を 2% Triton X-100 溶液に懸濁した。遠心後、上清を Triton X-100 可溶化タンパク質試料とし、沈殿物を Triton X-100 不溶化タンパク質試料とした。

② *Salmonella* 菌体膜成分の分離と内膜および外膜タンパク質試料の調製

LPM (pH 5.8) 培地で培養した *Salmonella* 菌体をフレンチプレスで破碎後、上清を 60 Ti ローターを用いて 150,000 g、2 時間遠心して得られた沈殿物を菌体膜成分とした。この懸濁液をさらにショ糖密度勾配遠心法により分画し、内膜および外膜タンパク質画分を得た。また、各画分に対して、タンパク質濃度の測定および NADH オキシダーゼの活性測定を行った。

(4) タンパク質の検出

① 抗体

一次抗体としてマウス抗 HA 抗体 (1:2,000)、マウス抗 SseB 抗体 (1:2,000)、マウス抗 FLAG 抗体 (1:20,000)、ウサギ抗 PagC 抗体 (1:1,000)、マウス抗 DnaK 抗体(1:2,000)を用い、二次抗体には alkaline phosphatase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体(1:10,000)および alkaline phosphatase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:20,000)を使用した。

② SDS-PAGE および Western blot 法

調製したタンパク質試料を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開・分離した。分離後、セミドライ型トランスファー装置を用いてアクリルアミドゲルからタンパク質を PVDF 膜に転写した。タンパク質が転写された PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 PBS にてブロッキングした後、PBS で洗浄し、一次抗体および二次抗体で反応した。抗原抗体反応は、nitro blue tetrazolium および 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate を用いた発色反応にて検出した。

(4) その他

染色体 DNA およびプラスミド DNA の調製および精製、PCR、DNA クローニングなどの分子遺伝学的手法は、Molecular Cloning (Sambrook and Russel, 2001) に従った。

4. 研究成果

(1) *stm1410* 変異による SPI-2 III 型分泌装

置機能への影響を明らかにする目的で、SPI-2 T3SS の分泌タンパク質である SseB の培養上清への分泌を観察した。その結果、*stm1410* 変異株において SseB の分泌はみられなかった。一方、*stm1410* 変異株の感染細胞内における SPI-2 エフェクターの分泌を調べるために、HeLa 細胞へ *Salmonella* を感染させ、SPI-2 エフェクタータンパク質 SseJ の細胞への分泌・輸送を免疫蛍光抗体法により観察した結果、*stm1410* 変異株では SseJ の分泌が全くみられなかった。したがって、STM1410 は SPI-2 III 型分泌装置の機能発現に必須のビルレンス因子であることが強く示唆された。

(2) STM1410 は、SPI-2 III 型分泌装置を形成するタンパク質の一部であることが予想されたため、次に菌体内における局在を検討した。サルモネラ菌体を破碎し、タンパク質の可溶性の差により分画した。その結果、STM1410 は膜成分に存在するタンパク質であることが示された。さらに、膜成分をショ糖密度勾配遠心法により分画すると、STM1410 は内膜に存在することが示唆された。

(3) STM1410 タンパク質の精製と機能領域の同定および SPI-2 III 型装置タンパク質との相互作用の検討を行った。しかしながら、STM1410 融合タンパク質において、可溶化率は著しく低く、可溶化タンパク質としての精製はできなかった。同様に、SPI-2III 型分泌装置のうち内膜リングを構成するタンパク質も、融合タンパク質として発現させることが困難であった。今後は、STM1410 を含め、内膜タンパク質の可溶化条件の検討および機能を保持した部分タンパク質として発現・精製することも試み、他の III 型分泌装置タンパク質との相互作用を決定する必要がある。

(4) STM1410 変異株に SPI-2 エフェクターである PipB を発現するプラスミドを形質転換すると、野生株に比べ PipB タンパク質の発現量は著しく減少することから、STM1410 は、PipB の菌体内発現に関与することが強く示唆された。そこで、STM1410 の PipB の発現に対する影響を検討した。野生株および STM1410 変異株における *pipB* 遺伝子の転写活性に違いは見られないことから、発現した PipB タンパク質の STM1410 変異株内での安定性を調べた。PipB-Myc/His 融合遺伝子をアラビノースで誘導可能なプロモーター下流に挿入したプラスミドを作成し、野生株と STM1410 変異

株に形質転換し、それぞれの株についてアラビノース添加後、タンパク質合成阻害剤としてクロラムフェニコールまたはゲンタミシンを加え、経時的に菌体内の PipB-Myc/His 融合タンパク質発現量を Western blot 法で検出し、PipB の細胞内安定性について野生株と STM1410 変異株とで比較した。アラビノース添加による PipB-Myc/His 融合タンパク質の強制発現後、0.5、1、2、4、6、8 および 12 時間後では、野生株と STM1410 変異株で違いは見られなかったが 18 時間以降、野生株に比べ STM1410 変異株では、intact な PipB-Myc/His 融合タンパク質が減少した。

(5) 大腸菌 K-12 株で *stm1410* と *pipB* 遺伝子の形質転換株と *pipB* 遺伝子のみの形質転換株を用いて同様の実験をした結果、PipB の発現量に違いは見られなかった。したがって、STM1410 による PipB タンパク質の安定性には STM1410 以外のサルモネラ特異的なタンパク質が関与していることが示唆された。

(6) STM1410 は、III 型分泌装置を構成する内膜タンパク質として機能するだけでなく、直接的ではないがエフェクターの細胞内安定性にも関わることが示唆され、このような多機能性タンパク質の存在は III 型分泌機構を解析する上で重要な発見である。

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 9 件)

1. Haneda T, Y. Ishii, H. Shimizu, K. Ohshima, N. Iida, H. Danbara, and N. Okada. 2012. *Salmonella* type III effectoer SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cell. Microbiol.* **14**: 485-499. (査読有)
2. Haneda T, N. Okada, Y. Kikuchi, M. Takagi, T. Kurotaki, T. Miki, S. Arai and H. Danbara. 2011. Construction and evaluation of *Salmonella enterica slyA* mutant strain for use in live attenuated oral vaccines. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 399-409. (査読有)
3. Miki, T., K. Akiba, M. Iguchi, H. Danbara and N. Okada. 2011. The *Chromobacterium* type

- III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 And Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **80**: 1186-1203. (査読有)
4. Haneda, H., M. Sugimoto, Y. Yoshida-Ohta, Y. Kodera, M. Oh-Ishi, T. Maeda, S. Shimizu-Izumi, T. Miki, Y. Kumagai, H. Danbara, and N. Okada. 2010. Comparative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ppGpp-deficient mutant to identify a novel virulence protein required for intracellular survival in macrophages. *BMC Microbiol.* **10**:324 doi:10.1186/1471-2180-10-324. (査読有)
 5. Miki, T., M. Iguchi, K. Akiba, M. Hosono, T. Sobue, H. Danbara and N. Okada. 2010. *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. *Mol. Microbiol.* **77**: 855-872. (査読有)
 6. Ishikawa, H., E. Kutsukake, T. Fukui, I. Sato, T. Shirai, T. Kurihara, N. Okada, H. Danbara, M. Toba, N. Kohda, Y. Maeda, and T. Matsumoto. 2010. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain b240 protects mice from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 1338-1342. (査読有)
 7. Ito, M., Y-G, Kim, H. Tsuji, M. Kiwaki, K. Nomoto, R. Tanaka, N. Okada, and H. Danbara. 2010. A practical random mutagenesis system for probiotic *Lactobacillus casei* using Tn5 transposition complexes. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 657-666. (査読有)
 8. Miki, T., Y. Shibagaki, H. Danbara and N. Okada. 2009. Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **191**: 6843-6854. (査読有)
 9. Haneda, T., Y. Ishii, H. Danbara and N. Okada. 2009. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**: 241-249. (査読有)
- [学会発表] (計 19 件)
1. Haneda T, Okada N *Salmonella* type 3 effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. 第 94 回日本細菌学会関東支部総会 (東京) 2011.10.6-7
 2. Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Danbara H, Okada N SpvC, a *Salmonella* effector, reduces intestinal inflammation during early stage of infection FEMS 2011 (Geneva) 2011.6.26-30
 3. Ito M, Kim YG, Tsuji H, Kiwaki M, Nomoto K, Tanaka R, Danbara H, Okada N. A Practical Random Mutagenesis System for Probiotic *Lactobacillus casei* Using Tn5 Transposition Complexes FEMS 2011 (Geneva) 2011.6.26-30
 4. 木田優美、倉川 尚、高橋琢也、野本康二、岡田信彦、檀原宏文 定量的RT-PCR 法による高感度 *Chlamydia* 定量系の構築 第 23 回 北里大学バイオサイエンスフォーラム (青森) 2010.8.5
 5. 村井 牧、伊藤雅洋、木脇真祐美、辻浩和、野本康二、岡田信彦、檀原宏文 フィズス菌—大腸菌シャトルベクターを用いたヒト腸管由来ビフィズス菌の形質転換 第23回 北里大学バイオサイエンスフォーラム (青森) 2010.8.5
 6. 伊藤雅洋、辻 浩和、野本康二、岡田信彦、檀原宏文 *Lactobacillus* におけるランダム変異株作製法の確立 第14回 腸内細菌学会 (京都) 2010.6.18
 7. 村井 牧、伊藤雅洋、木脇真祐美、辻浩和、野本康二、岡田信彦、檀原宏文 ビフィズス菌—大腸菌シャトルベクターを用いたヒト腸管由来ビフィズス菌の形質転換 第14回 腸内細菌学会 (京都) 2010.6.18
 8. 木田優美、倉川 尚、高橋琢也、野本康二、岡田信彦、檀原宏文 定量的 RT-PCR 法による高感度 *Chlamydia* 定量系の構築 第 84 回 日本感染症学会 (京都) 2010.4.5
 9. 伊藤雅洋、辻浩和、野本康二、岡田信彦、檀原宏文 *Lactobacillus* におけるランダム変異株作製法の確立 第 83 回日本細菌学会総会 (横浜) 2010.3.27-29
 10. 岡田由美子、鈴木穂高、角田修子、五十君静宏、山本茂貴、岡田信彦 シグマ因子 RpoN のリステリア病原性への関与とその機構 第 83 回日本細菌学会総会 (横浜) 2010.3.27-29

11. 羽田健、石井雄太、岡田信彦、檀原宏文
SpvC によるサルモネラ腸炎抑制機構の解析
第 84 回日本細菌学会総会（横浜）
2010.3.27-29

12. 三木剛志、岡田信彦、檀原宏文
Chromobacterium violaceum の病原性発現にお
ける III 型分泌機構の役割 第 83 回日本細菌
学会総会（横浜）2010.3.27-29

13. 岡田信彦 サルモネラの緊縮応答と病原
性 2009 日本乳酸菌学会秋期シンポジウム
（東京）2009.11.27

14. 小野紗矢佳、三木剛志、岡田信彦、檀原
宏文 *Salmonella* pathogenicity island 2 上にコ
ードされる SsaN の機能解析 第 92 回日本細
菌学会関東支部総会（東京）2009.11.5

15. 石井雄太、羽田健、岡田信彦、檀原宏文
サルモネラ腸炎モデルを用いた *Salmonella*
plasmid virulence C の機能解析 第 92 回日本
細菌学会関東支部総会（東京）2009.11.5

16. 石井真利衣、三木剛志、秋庭きなり、岡
田信彦、檀原宏文 *Chromobacterium violaceum*
エフェクター候補因子 CV2266 の機能解析
第 92 回日本細菌学会関東支部総会（東京）
2009.11.5

17. 羽田健 サルモネラ感染と免疫応答 第
92 回日本細菌学会関東支部総会（東京）
2009.11.5-6

18. 伊藤雅洋、岡田信彦、檀原宏文
Lactobacillus における実用的なランダム変異
株作製法の確立 第 22 回バイオサイエンス
フォーラム（東京）2009.8.3

19. 岡田信彦 プロテオーム解析によるサル
モネラ緊縮応答タンパク質の同定 第 82 回
日本細菌学会総会（名古屋）2009.3.13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 信彦 (OKADA NOBUHIKO)
北里大学・薬学部・教授
研究者番号：80194364

(2) 研究分担者

三木 剛志 (MIKI TSUYOSHI)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：40358582