

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24590534

研究課題名(和文)サルモネラの自然免疫回避エフェクターの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Salmonella type III effectors, which are involved in evading the host innate immune response.

研究代表者

羽田 健 (Haneda, Takeshi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：00348591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では炎症制御エフェクターSpvCが感染後期においてリン酸化スレオニンリアーゼ活性によりSalmonella enterica serovar Typhimurium (S. Typhimurium) のマウス脾臓内増殖性に与与することが明らかとなった。また、III型エフェクターSseK1、SseK2およびSseK3がNF- κ B活性化を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that Salmonella anti-inflammatory type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to bacterial proliferation in the spleen in the mouse model of systemic infection. We also revealed that other Salmonella type III effectors, SseK1, SseK2 and SseK3, regulate NF- κ B activation in the host cell.

研究分野：医歯薬学

キーワード：サルモネラ III型エフェクター 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

サルモネラには 2500 を越える血清型が知られているが、ヒトに対し全身感染し、重篤なチフス・パラチフスを起こすチフス性サルモネラ血清型 (Typhi および Paratyphi A、typhoidal *S. enterica*) と局所感染により胃腸炎を引き起こす非チフス性サルモネラ血清型 (non-typhoidal *S. enterica*: NTS) に大別される。NTS はわが国の食中毒の発生件数、患者数ともに上位を占めるサルモネラ腸炎の原因菌である。また、免疫不全患者や小児、高齢者では NTS の全身感染による死亡例も少ないながら報告されている。このことは、NTS が赤痢菌やコレラ菌、腸管出血性大腸菌と同様に腸管病原細菌でありながら、全身感染を引き起こすという本菌の病原性の特徴を示している。このようなサルモネラ感染症の治療には基本的にニューキノロン剤が用いられているが、ニューキノロン剤耐性を含む多剤耐性サルモネラの出現が臨床的に問題となっている。このため、サルモネラ感染症に対する新たな感染予防・治療法の開発が望まれる。我々はサルモネラ感染症における宿主と細菌の相互作用を明らかにし、感染症の分子基盤を理解することで、新たな感染予防薬または治療薬を開発することを目指している。

2. 研究の目的

我々は本研究を開始するまでに、サルモネラ腸炎モデルマウスを用いて、(1) サルモネラ腸炎発症時に発現する宿主側因子の網羅的解析および (2) 血清型 Typhi の腸炎回避の分子メカニズムの解析を行い、サルモネラが感染局所において自然免疫を回避することで全身感染を可能にしていることを明らかにした。また、(3) サルモネラ III 型エフェクター SpvC がリン酸化スレオニンリアーゼ活性により宿主の mitogen-activated

protein kinases (MAPKs) からリン酸基を除去 (不活化) することで感染初期の炎症反応を制御し、その結果、全身への菌の拡散を可能にすることを示した。

これまでにいくつかの病原細菌において、自然免疫を回避する機能をもつ III 型エフェクター (自然免疫回避エフェクター) が同定され、そのエフェクターの機能によって細菌は宿主細胞の細胞機能を錯乱し、感染を確立することが報告されている。興味深いことに、サルモネラは III 型エフェクターの作用により、上皮細胞に対しアポトーシスやパイロプトーシスを誘導することで、細胞侵入を可能にする一方で、自然免疫による宿主の感染防御機構を回避することが明らかとなってきた。このように、サルモネラにおいて、自然免疫回避の重要性が示唆されているにも関わらず、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究ではサルモネラの自然免疫回避の分子メカニズムを解明するために、自然免疫回避エフェクターの機能を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

本研究では既に自然免疫回避エフェクターとして知られている SpvC と、腸管出血性大腸菌において自然免疫回避エフェクターとして同定されている NleB とアミノ酸相同性を示す SseK1、SseK2 および SseK3 について機能解析を行った。

(1) SpvC の機能解析

我々はこれまでにサルモネラ腸炎モデルマウスを用いて、SpvC が感染初期に mitogen-activated protein kinases (MAPKs) からリン酸基を脱離させ、不活化することにより感染局所 (腸管) における炎症 (自然免疫) を回避する機能をもつことを明らかにした。SpvC は SPI-1 および

SPI-2 の 2 つの III 型分泌装置 (T3SS) から分泌されるエフェクターであることから、SPI-2 T3SS が発現する感染後期にも感染に重要な病原因子として機能することが予想される。そこで、サルモネラ感染の後期に注目して SpvC の機構解析を行った。

SpvC による MAPKs の不活化が MAPKs の表現系 (炎症誘導、細胞増殖およびアポトーシス) に関与するか否かを明らかにした。

SpvC によるサルモネラ感染後期における役割を明らかにするため、SpvC が MAPKs のどの表現系に関わるのかを明らかにすることを試みた。具体的には既に作成済みの哺乳動物発現プラスミドにクローニングした SpvC を lipofectamine LTX と Plus reagent を用いてマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 にトランスフェクションし、炎症性サイトカイン・ケモカイン発現 (p38)、細胞増殖性 (ERK1/2) および細胞死 (JNK) について、ELISA (Tnf-、IFN-、Mip-2[p38]) もしくはルシフェラーゼアッセイ (CellTiter-Glo assay [ERK1/2] および Caspase-Glo assay [JNK]) により明らかにした。

SpvC によるマウス臓器内増殖性にリン酸化スレオニンリアーゼ活性が関与するか否かを明らかにした。

我々はこれまでに SpvC 欠失株を DBA2 マウスに腹腔内投与すると、マウス臓器内増殖性が野生株の 1/2 程度に低下することを明らかにした (データ未発表)。そこで、SpvC によるマウス臓器内増殖性にリン酸化スレオニンリアーゼ活性が関与するか否かを明らかにするため、リン酸化スレオニンリアーゼ活性を持たない SpvC の点変異株を用いてマウス感染実験を行った。

(2) SseK1、SseK2 および SseK3 の機能解析

SseK1、2 および 3 はそれぞれがアミノ酸相同性を示すタンパク質であり、SPI-1 T3SS および SPI-2 T3SS から分泌される III 型エフェクターである。またこれらのエフェクターは腸管病原性大腸菌 (EPEC) の NieB とアミノ酸相同性をもつ。NieB は NF- κ B 活性化を制御する機能をもつことが報告されていることから、サルモネラにおいて SseK1、SseK2 および SseK3 が NF- κ B 経路を抑制することで自然免疫を回避するという仮説のもと、以下の実験を行った。

SseK1-3 が NF- κ B 経路を抑制するか否かを調べた。

SseK1、2 および 3 各タンパク質を哺乳動物は発現ベクター-pCMV-2B にクローニングした。得られたプラスミドを NF- κ B レスポンスエレメントをもつホタルルシフェラーゼレポータープラスミドと共にヒト子宮頸癌由来上皮細胞 HeLa にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにより SseK1、SseK2 または SseK3 が NF- κ B の活性化を抑制するか否かを調べた。

SseK1-3 が NF- κ B 経路のどの宿主因子と結合するかを調べた。

EPEC において NieB は NF- κ B 活性化経路のうち、TNF- κ B 経路のみを選択的に阻害することが報告されている。しかし、研究開始時点では NieB と結合する宿主因子は見つかっていなかった。そこで、SseK1、SseK2 および SseK3 に結合する宿主因子を同定するため、これらエフェクターを GST 融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、グルタチオンセファロース 4B を用いて精製し、HeLa 細胞の細胞抽出液と混合した後、プルダウンアッセイにより SseK1、SseK2 または SseK3 と相互作用する宿主タンパク質を精製し、質量分析により同定することを試みた。

4. 研究成果

(1) SpvC の機能解析

SpvC がもつ PTL 活性がマウス臓器内増殖性に関与するか否かを明らかにするため、*S. Typhimurium* 野生株、SpvC 欠失株および PTL 活性を持たない SpvC の点変異株を DBA2 マウスに腹腔内接種したところ、SpvC 欠失株ではマウス脾臓内生菌数が野生株の 1/2 に減少した。一方、点変異株の脾臓内生菌数は野生株と同程度であった。このことから、SpvC によるマウス脾臓内増殖性(全身感染性)には PTL 活性すなわち MAPKs の不活化が関与することが示唆された。

サルモネラが全身感染性を示すにはマクロファージ内で増殖することが重要であることから、我々は次にサルモネラ野生株または SpvC 変異株をマクロファージ様培養細胞 RAW264.7 に感染し、細胞内で増殖を比較した。その結果、SpvC 変異株の細胞内増殖性は野生株と同程度であった。また、DBA2 マウス大腿骨由来の骨髄マクロファージ (BMM) を用いて同様の実験を行ったが、サルモネラ野生株と SpvC 欠失株に細胞内増殖性の違いは見られなかった。次にマクロファージ内で SpvC が PTL 活性を示すか否かを調べるために、SpvC を発現させた RAW264.7 細胞または BMM を用いて、炎症性サイトカイン Mip-2 の分泌性、細胞増殖性、およびアポトーシス誘導性を調べた。しかしながら、これら MAPKs が示す表現系は SpvC を発現していない細胞と同程度であった。以上のことから SpvC によるマウス臓器内増殖性にはマクロファージ内での増殖性および PTL 活性は関与しないことが示唆された。

(2) SseK1、SseK2 および SseK3 の機能解析

SseK1、SseK2 または SseK3 が NF- κ B 活性化を抑制するか否かを明らかにするため、

NF- κ B レポーターアッセイを行った。その結果、NleB と同様に HeLa 細胞に TNF- α を添加した場合は SseK1、SseK2 または SseK3 のどの遺伝子を発現している細胞でも、ベクターのみをトランスフェクションした細胞に比べ、NF- κ B 転写活性が 1/2~1/3 に低下した。一方、HeLa 細胞に IL-1 を添加し NF- κ B 活性化経路を活性化した場合は転写活性の低下は見られなかった。また、SseK1、SseK2 または SseK3 をトランスフェクションした HeLa 細胞に TNF- α を添加した後、細胞を溶解し、抗 NF- κ B p65 抗体を用いてイムノブロッティングを行った結果、ベクターをトランスフェクションした細胞に比べ、SseK1、SseK2 または SseK3 をトランスフェクションした細胞で p65 の発現が減少した。以上のことから、SseK1、SseK2 および SseK3 は TNF- α により活性化された NF- κ B 活性化経路を制御することが示唆された。

これらのタンパク質は感染局所での炎症を制御し、菌の全身拡散を誘導する自然免疫回避エフェクターとして機能することが予想される。そこでこれらタンパク質がどのように NF- κ B 活性化を制御するかを明らかにするために、SseK1、SseK2 および SseK3 と相互作用する宿主タンパク質を同定することを試みた。

SseK1、SseK2 または SseK3 を GST 融合タンパク質として精製し、HeLa 細胞の細胞溶解液を混合し、プルダウンアッセイを行った。SseK1、SseK2 および SseK3 を結合した宿主タンパク質を質量分析計で同定することを試みたが、再現よくプルダウンした宿主タンパク質を見つけることができなかった。

本研究の開始 1 年後および 2 年後に他の研究グループより NleB の酵素活性および NleB と結合する宿主タンパク質が同定された。NleB は N-acetylglucosamine transferase (N-AGT) 活性をもち、GAPDH や Death Domain ファミリーである FADD および TRADD と結合

する。そこで、SseK1、SseK2 および SseK3 が N-AGT 酵素活性をもつか否か、また GAPDH や FADD と結合するか否かを調べた。しかしながら、NieB、SseK1、SseK2 および SseK3 共に N-AGT 酵素活性が見られず、また GAPDH または DD ファミリータンパク質との結合性を明らかにすることができなかった。

次に SseK1、SseK2 または SseK3 が in vivo で自然免疫回避エフェクターとして機能するか否かを明らかにするため、これらタンパク質をコードする遺伝子の欠失株、または全て欠失した三重変異株を腸炎モデルマウスに感染させ、盲腸の炎症の程度を野生株感染マウスと比較した。その結果、野生株、単独欠失変異株、三重欠失変異株感染マウス共に、盲腸の炎症は同程度であった。

以上、サルモネラ III 型エフェクター SseK1、SseK2 および SseK3 は NF- κ B 活性化を制御する機能をもつことが明らかになったが、その詳細なメカニズムを明らかにすることはできなかった。また in vivo におけるこれらエフェクターの役割も不明のままである。SseK1、SseK2 および SseK3 三重変異株感染マウスにおいても盲腸の炎症に違いが見られなかったことから、未知 NF- κ B 制御タンパク質の存在が予想された。よって SseK1、SseK2 および SseK3 の in vivo における機能を明らかにするには、全ての NF- κ B 制御タンパク質を同定したうえで、それらを包括的に機能解析することが必要である。

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 1 件)

Yukie Yoshida, Tsuyoshi Miki, Sayaka Ono, Takeshi Haneda, Masahiro Ito, Nobuhiko Okada Functional Characterization of the Type III Secretion ATPase SsaN Encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2

PLOS ONE 査読有 9巻 2014年

e94347

DOI: 10.1371/journal.pone.0094347

〔学会発表〕(計 3 件)

羽田健、岡田信彦 サルモネラ III 型エフェクターによる炎症制御機構の解析、第 15 回北里微生物アカデミー 2013 年 8 月 8 日 北里大学相模原キャンパス (相模原市)

Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada The functional analysis of *Salmonella* type III effector, SpvC 4th ASM Conference on *Salmonella* 2013/10/05-2013/10/09 Seaport Hotel and World Trade Center (Boston, MA, USA)

羽田健、岡田信彦 サルモネラの自然免疫回避エフェクターの機能解析 第 31 回白金シンポジウム 2013 年 12 月 17 日 北里大学白金キャンパス(東京都港区)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 健 (HANEDA TAKESHI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：00348591