

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293106

研究課題名(和文) マウス腸炎モデルを用いたサルモネラ炎症制御機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the Salmonella type III effectors that regulate the host's immune response using the streptomycin mouse model

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラ感染機構における病原性発現の分子基盤は、Ⅲ型分泌機構により分泌されるエフェクターと宿主細胞の標的分子との相互作用にある。本研究では、サルモネラⅢ型エフェクターのうち、NF- κ B経路を標的としたエフェクターを同定し、サルモネラ腸炎における炎症制御機構の解明に取り組んだ。その結果、6つの炎症制御エフェクターを同定し、それぞれの機能解析を行った。3つのSseKファミリーは、TRADD及びFADDを標的タンパク質とし、シグナル伝達を阻害することが示唆された。SreA/SreBは、NF- κ BのサブユニットであるRelAを切断するメタロプロテアーゼであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Microbial infections usually lead to host innate immune responses and inflammation. The enteropathogenic bacteria *Salmonella Typhimurium* utilizes a type III secretion system to induce intestinal inflammation by delivering specific effector proteins that stimulate signal transduction pathways resulting in the production of pro-inflammatory cytokines. In this study, we have identified *Salmonella* effector proteins that inhibit the NF- κ B signaling pathway. A family of SseK proteins is bound to TRADD and FADD. Also, we show that these effector proteins SreA and SreB are metalloproteases that cleave the RelA transcription factor. These results indicate that *Salmonella* can evolve determinants to regulate host inflammatory response and that those determinants can contribute to the development of *Salmonella* infection.

研究分野：医歯薬学

キーワード：サルモネラ サルモネラ腸炎 Ⅲ型エフェクター NF- κ B Ⅲ型分泌機構

1. 研究開始当初の背景

サルモネラ感染機構における病原性発現の分子基盤は、Ⅱ型分泌機構により分泌されるエフェクターと宿主細胞の標的分子との相互作用にある。サルモネラⅡ型エフェクターについては、これまでにおよそ 40 以上のタンパク質が同定されているが、その機能あるいは標的分子について明らかになっているものは 20 にも満たない。これらのエフェクターを機能別に分類すると、1) 細胞侵入性に関わるエフェクター、2) 宿主細胞内において形成されるサルモネラ小胞の形成・維持に関わるエフェクター、3) 宿主免疫応答の攪乱、すなわち、炎症応答の誘導および抑制に関わるエフェクター、及び 4) 宿主細胞に対する細胞死誘導(ピロトーシスやアポトーシスなど)に関わるエフェクターなどである。サルモネラの腸管への感染過程においては、炎症が誘導されるが、炎症制御に関わるエフェクターは、これまでほとんど報告がない。

2. 研究の目的

これまでに、マウス腸炎モデルによる感染実験が確立されたことによって、サルモネラによる腸管粘膜での病原性発現機構が解析可能となり、サルモネラは感染初期には腸管上皮細胞においてSPI-1 エフェクターに依存した炎症誘導を、また、感染後期では、粘膜固有層においてToll 様受容体を介してSPI-2 エフェクターが誘導する強い炎症応答を惹起することが明らかにされている。本研究は、サルモネラの腸管粘膜感染において、サルモネラⅡ型エフェクターを介した炎症誘導と炎症抑制の分子機構とその後の全身拡散との関連性を明らかにし、サルモネラの感染初期にお

いて未だに解明されていない粘膜感染機構を分子レベルで明確にすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)サルモネラⅡ型エフェクター遺伝子のクローニング

サルモネラⅡ型エフェクター遺伝子は、サルモネラ染色体DNAを鋳型として、PCRで増幅後、哺乳動物細胞発現ベクター-pEGFP-C1にクローニングした。

(2)培養細胞は、ヒト上皮細胞由来のHeLa細胞及びマウスマクロファージ用細胞であるRAW264.7細胞を用いた。

(3)NF-κBの活性は、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)を用いて測定した。

(4)マウス腸炎モデルによるサルモネラ感染実験は、streptomycin を経口投与したマウスに、サルモネラ被験菌 10^8 cfuを胃内投与後、適当な時間で盲腸を摘出し、解析材料とした。

(5)その他

染色体DNAおよびプラスミドDNAの調製及び精製、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。また、トランスフェクション、融合タンパク質の発現・精製、SDS-PAGE、ウエスタンブロット法は既知の方法を用いた。

4. 研究成果

(1)転写因子 NFκB 活性を抑制するサルモネラⅡ型エフェクターの同定

NF-κB-ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドとⅡ型エフェクター遺伝子を挿入したプラスミドを培養細胞に形質

転換し、TNF- α 刺激後のNF- κ B転写活性を測定することにより、NF- κ Bの活性化を抑制するサルモネラ型エフェクターを選択し、6つの炎症抑制エフェクターを同定した。すなわち、既知エフェクターのSseK1、SseK2及びSseK3と新規シグナル制御エフェクター（signal regulated effector; Sre）SreA、SreB 及び SreCで、いずれもサルモネラ特異的な型エフェクターである。

(2) 炎症抑制エフェクターSseK1、SseK2及びSseK3の機能解析

SseK1、SseK2及びSseK3は、既知のエフェクターである。アミノ酸配列の相同性から腸管出血性大腸菌型エフェクターNleBファミリーに属すると考えられている。SseK1、SseK2 及び SseK3は、TNF- α 、IL-1およびPMA刺激に対してTNFレセプターを介したNF- κ Bの転写活性のみを抑制すること(図1)、免疫沈降反応よりFADD (FAS-associated death domain) と直接相互作用することを明らかにした。

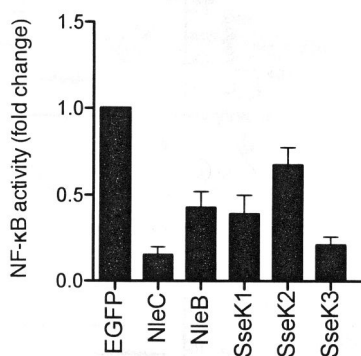


図1 TNF- α 刺激後の SseK による NF- κ B 活性抑制

一方、サルモネラ腸炎モデルによるマウス感染実験では、SseK1、SseK2、SseK3各欠失変異株およびSseK1/2/3欠失変異株による腸管感染は、細菌学的、病理組織学的、免疫学的

解析により野生株との明らかな違いを見出すことはできなかった。

(3) SreA 及び SreB による NF κ B 活性化抑制機構

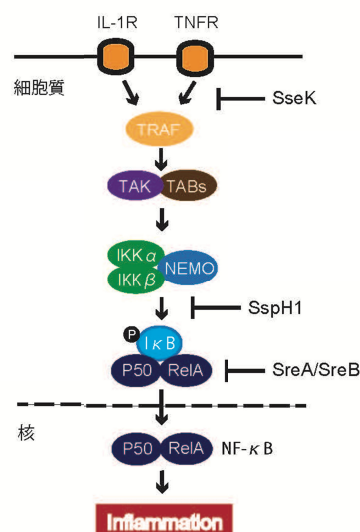


図2 炎症制御エフェクターによる NF- κ B 抑制機構

SreA 及び SreB は、NF- κ B のサブユニットの 1 つである RelA (p65) を特異的に切断するメタロプロテアーゼであることを明らかにした。SreA/SreB は、TNF- α 及び IL-1 刺激に対する NF- κ B の転写活性を抑制した。また、酵素活性ドメインのアミノ酸の 1 つを異なるアミノ酸に置換すると NF- κ B 経路の活性化を阻害できず、さらに、RelA に対するプロテアーゼ活性が消失したことから、SreA/SreB はともに RelA を酵素的に分解することにより、NF- κ B 活性化経路を抑制することが示唆された(図2)。

これまでに、NF- κ B を標的分子とする型エフェクターには、腸管出血性大腸菌の NleC が報告されている。SreA/SreB と NleC は、ともに RelA に対するプロテアーゼ活性

を有するが、互いのアミノ酸配列における相同性はほとんどない。また、NleC の標的分子は、RelA 以外にも NF- κ B のもう 1 つのサブユニットである p50 およびコアチベーターの p300 が報告されている。したがって、SreA/SreB においても、RelA 以外の標的分子が存在する可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. 岡田信彦 羽田 健 . サルモネラ φ 型エフェクターによる炎症抑制機構 . アレルギーの臨床 . 36 : 160-165 . 2016 . (査読無)
2. Takenaka R, Nureki S, Ueno T, Shigemitsu O, Miyazaki E, Kadota J, Mik T, Okada N. *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia possibly due to the aspiration of runoff water. *J. J. Infect. Dis.* 68: 526-529. 2015. (査読有)
3. Kurakawa T, Ogata K, Tsuji H, Kado Y, Takahashi T, Kida Y, to M, Okada N, and Nomoto K. Establishment of a sensitive system for analysis of human vaginal microbiota on the basis of rRNA-targeted reverse transcription - quantitative PCR. *J. Microbiol. Method.* 111: 93-104. 2015. (査読有)
4. 岡田信彦 三木剛志 . φ 型分泌機構を介したクロモバクテリウム・ビオラセウムの病原性発現機構の解析 . 化学療法の領域 . 30: 122-130. 2014 (査読無)
5. Yoshida Y, Miki T, Ono S, Haneda T, Ito M, and Okada N. Functional characterization of the type III secretion ATPase SsaN encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *PLoS One.* Apr 10;9(4):e94347. 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0094347. eCollection)

(査読有)

6. Miki T, and Okada N. Draft Genome Sequence of *Chromobacterium haemolyticum* causing human bacteremia infection in Japan. *Genome Announcement* 2 : e01047 10.1128/genomeA.01047-14. 2014. (査読有)
7. Ito M, Kim Y-G, Tsuji H, Takahashi T, Mayumi K, Koji N, H. Danbara H, and Okada N. Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* identifies *asnH*, an asparagine synthetase gene involved in its immune-activating capacity. *PLoS One.* 2014 Jan 8;9 (1):e83876. 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0083876. eCollection) (査読有)
8. Yamazaki H, Oda M, Takahashi Y, Iguchi H, Yoshimura K, Okada N, and Yokomori H. Relation between ultrastructural localization, changes in caveolin-1, and capillarization of liver sinusoidal endothelial cells in human hepatitis C-related cirrhotic liver. *J Histochem Cytochem.* 61:169-76. 2013. (doi:10.1369/0022155412468590) (査読有)

[学会発表] (計16件)

1. 西山啓太、岡田信彦 乳酸菌における分泌シグナル非依存的なタンパク質の分泌機構に関する研究 第33回白金シンポジウム 北里大学白金キャンパス (東京都港区) 2015.12.22
2. 西山啓太、瀬戸泰幸、岡田信彦、山本裕司、向井孝夫 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 による *Campylobacter jejuni* の感染予防とその作用機序を考える 第18回北里微生物アカデミー研究集会 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原

- 市) 2015.8.6
3. 羽田 健、岡田信彦 サルモネラ炎症制御エフェクターの解析 第 18 回北里微生物アカデミー研究集会 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市) 2015.8.6
 4. 田中尚道、桑江朝臣、羽田 健、岡田信彦、阿部章夫 *Bordetella* 属細菌が産生するタンパク質 BspR の機能解析 第 28 回北里大学バイオサイエンスフォーラム (相模原) 2015.8.6
 5. 竹村桃、羽田 健、岡田信彦 サルモネラ NFκB 制御エフェクターの解析 第 28 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市) 2015.8.6
 6. 後藤亮介、三木剛志、岡田信彦 サルモネラ腸炎における新規定着因子の同定 第 28 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市) 2015.8.6
 7. 緒方清仁、倉川 尚、辻 浩和、高橋琢也、伊藤雅洋、岡田信彦、野本康二 ヒト腔細菌叢解析のための高感度な定量的 RT-PCR 法の開発 第 88 回日本細菌学会 (岐阜) 2015.3.27
 8. 守屋智草、岡田信彦 鼻腔常在細菌叢が経鼻ワクチンの効果に与える影響 第 32 回白金シンポジウム 北里大学白金キャンパス (東京都港区) 2014.12.16
 9. 伊藤雅洋、金 倫基、辻 浩和、高橋琢也、木脇真祐美、野本康二、檀原宏文、岡田信彦 Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* identifies *asnH*, an asparagine synthetase gene involved in its immune-activating capacity. 第 32 回白金シンポジウム 北里大学白金キャンパス (東京都港区) 2014.12.16
 10. Ito M, Kim YG, Tsuji H, Takahashi T, Kiwaki M, Nomoto K, Danbara H, and Okada N Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* identifies *asnH*, an asparagine synthetase gene involved in its immune-activating capacity. 5th ASM Conference on Beneficial Microbes Omni Shpreham Hotel, Washington D.C., USA 2014.9.30
 11. 守屋智草、岡田信彦 サルモネラ弱毒株 SH110 の経口投与により誘導される分泌型 IgA の解析 第 17 回北里微生物アカデミー研究集会 (北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市) 2014.8.21
 12. 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 北里大学白金キャンパス (東京都港区) 2013.12.17
 13. Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Danbara H, Okada N The functional analysis of *Salmonella* type III effector, SpvC. 4th ASM Conference on *Salmonella* Seaport Boston Hotel, Boston, USA 2013.10.6
 14. 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 回微生物アカデミー 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市) 2013.8.8
 15. Ito M, Kim YG, Tsuji H, Kiwaki M, Takahashi T, Nomoto K, Danbara H, Okada N Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* *asnH*, an asparagine synthetase gene that contributes to activation

of host innate immunity. 2nd Exploring
Human Host-Microbiome interactions in
Health and Disease 2013 Fitzwilliam
College, Cambridge, UK 2013.7.10

16. 伊藤雅洋、金 倫基、辻 浩和、高橋琢
也、木脇真祐美、野本康二、檀原宏文、
岡田信彦 乳酸桿菌による自然免疫賦活
化作用に関する遺伝子の同定 第17回
腸内細菌学会 北里大学白金キャンパス
(東京都港区) 2013. 6.13

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

□羽田 健 (HANEDA TAKESHI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 00348591

守屋 智草 (MORIYA CHIKAYA)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号: 90518101