

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06001

研究課題名(和文)サルモネラ属菌が産生する百日咳毒素様毒素の病原因子としての機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of pertussis-like toxin from Salmonella spp.

研究代表者

内田 郁夫(Uchida, Ikuo)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：70355204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかのサルモネラ属菌は百日咳毒素様のADP-リボシル化毒素ArtABを産生し、当該毒素遺伝子(artAB)は菌のプロファージ(Artファージ)にコードされている。artABはSOS応答誘発物質によりArtファージの誘導に伴って発現する。artABはマクロファージ内の活性酸素種(ROS)の刺激により発現するが、酸化ストレス応答に関与するoxyR発現の強い菌では、ファージのリプレッサー遺伝子clの発現が増強し、その結果、artAB発現の細胞内発現が弱くなるものと推測された。一方、ArtABはマクロファージのROS産生を抑制し、これにより、細胞の殺菌作用を低下させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルモネラ属菌におけるartAB 遺伝子はマクロファージ内において発現し、その発現はSOS 反応誘発物質であるH2O2などの細胞が産生するROSにより誘導されることが明らかとなった。また、ArtABは、マクロファージのROS産生を抑制し、細胞内における菌の殺菌能を抑制することが示唆された。本研究で得られた研究成果は、ArtAB 毒素のSalmonella における病原性因子としての役割を解明するための基礎知見となり、Salmonella 症の診断、予防、治療法の開発改良にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Salmonella Typhimurium (S. Typhimurium) definitive phage type 104 (DT104) and S. Worthington produce ArtAB toxin, which catalyzes ADP-ribosylation of pertussis toxin-sensitive G protein. ArtAB gene (artAB) is encoded on a prophage in Salmonella, and prophage induction by SOS-inducing agents is associated with increases in ArtAB production in vitro. Here, we showed a significant increase in artAB transcription of DT104 within macrophage-like RAW264.7 cells. However, such induction was not observed in S. Worthington. High expression levels of oxyR and cl in S. Worthington is suggested to be responsible for the low efficacy of artAB expression. Furthermore, in this study we have shown that ArtAB-treated macrophages increase Salmonella viability in the macrophage cells, and ArtAB inhibited ROS production of macrophage, suggesting that ArtAB has the ability to reduce the bactericidal effect of the cells.

研究分野：獣医細菌学

キーワード：Salmonella ADP-リボシル化毒素 マクロファージ SOS 応答 ROS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サルモネラは、食中毒や家畜のサルモネラ症の原因となる。サルモネラの病原性因子として、腸管上皮細胞への侵入やマクロファージ内での増殖や殺菌機構からエスケープするための因子等が知られている。これに加えて、近年、サルモネラの産生する百日咳毒素 (Ptx) 様毒素の存在が報告され、これらの蛋白と病原性との関連が注目されている。

我々は成牛のサルモネラ症から高頻度に分離される *Salmonella* Typhimurium (ST) が Ptx と相同性を示す ArtAB を産生していることを見出した。ArtAB はコレラ毒素や Ptx 等と同様に A ユニット 1 個と 5 個の B ユニットから成り、A1B5 型の集合体構造を成している。ArtAB はマウスへの腹腔内接種により致死活性を示し、インスリンの分泌亢進活性など Ptx と同様の活性を示すが、白血球増多活性が見られない等異なる点も明らかにされている。ArtAB は cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ (AC) の活性を調節する G 蛋白質のうち、AC 抑制性 G 蛋白質 (Gi) を ADP-リボシル化し、マウスのマクロファージ由来細胞である RAW264.7 の cAMP を上昇させる活性を持つ。ST 以外の血清型である *S. Worthington* (SW)、*S. Agouve* (SA) や菌種の異なる *S. bongori* においても ArtAB ホモログの産生が認められるが、病原性との関連性は不明である。一方、*S. Typhi* (チフス菌) において、ArtAB と同様に Ptx と相同性を示す PltAB が報告され、さらにチフス菌以外にも種々の血清型菌が PltAB 遺伝子を保有している。

ArtAB 遺伝子 (*artAB*) は菌のプロファージ (Art ファージ) にコードされている。*Salmonella* 属菌における *artAB* はマイトマイシン C、キノロン系抗生物質、 $H_2O_2$  などの SOS 誘発物質処理により、Art ファージの誘導に伴って発現する。特に  $H_2O_2$  による *artAB* 発現誘導のレベルは菌種や血清型により異なることが示唆されている。

以上のように、百日咳毒素様毒素を産生する菌が広くサルモネラ属菌に分布していることが知られているが、それらの *in vivo* における発現や機能および病原性因子としての役割については不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、サルモネラ属菌における百日咳毒素様毒素の一つとして知られる ArtAB の発現機構や生物学的機能を明らかにし、それらの病原性因子としての役割を解明することにより、人や家畜のサルモネラ症における予防法や診断法の開発のための基盤となる知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1) サルモネラの細胞へ感染実験および細胞内における各遺伝子の発現量の解析

DMEM 培地でマクロファージ様細胞 RAW264.7 を培養後、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA;  $0.2 \mu M$ ) を添加し、マクロファージ由来における  $H_2O_2$  を含む活性酸素種 (ROS) 産生を誘導し、正常マウス血清によりオプソニン化したサルモネラを MOI 50:1 となるように加え、細胞にサルモネラを貪食させた。その後、ゲンタマイシン処理により細胞外の菌を除去し、3 時間培養後、0.1 % の Triton X-100 で細胞を溶解して得られた細胞内の菌から total RNA を抽出した。この RNA を用いて、リアルタイム PCR 法による各遺伝子の発現量を定量した。

#### (2) ゲンタマイシンプロテクションアッセイによる ArtAB の殺菌能の解析

RAW264.7 細胞に  $200 U/mL$  の IFN- $\gamma$  および  $1 \mu g/mL$  の LPS を添加し、その後、ArtAB を  $100 ng/mL$  に加えて 18 時間培養した。培養後、オプソニン化済 *S. Typhimurium* KST10 (*artAB* 非保有) を感染多重度 (MOI) 10 となるように加え  $37^\circ C$ 、5%  $CO_2$  下 30 分インキュ

ベートした。インキュベート後の時点を感染後 0 時間とした。その後 PBS で 3 回洗浄し、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ゲンタマイシン添加 DMEM で 30 分間培養した。その後、PBS で 3 回洗浄し、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ゲンタマイシン添加 DMEM で培養した。感染後一定時間 (0, 2, 5, 24 時間) 培養した細胞を PBS で 3 回洗浄し 0.1 % TritonX 加 PBS を加え細胞を溶解し、混釈培養により菌数を測定した。

#### (3) RAW264.7 細胞における ROS 産生量の定量

マクロファージにおける ROS 産生量の測定には、蛍光プローブとしてジヒドロロダミン 123 (DHR123) (コスモバイオ) を使用し、マイクロプレートリーダーで測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *artAB* 遺伝子の *in vivo* における発現誘導

DT104 の ArtA 産生を蛍光免疫染色法によりレーザー顕微鏡下で観察した結果、RAW264.7 細胞に感染 3 時間後以降に、菌体が局在する場所に ArtA の産生が確認された。細胞内における *S. Typhimurium* DT104 の *artA* 発現は、*in vitro* での発現に比較して上昇したが、*S. Worthington* および *S. bongori* では上昇は認められなかった (図 1 A)。菌の SOS 応答に關与する *recA* の細胞内での発現上昇は *S. Typhimurium* DT104 においてみられ、*S. Worthington* および *S. bongori* では認められなかった (図 1 B)。しかし、PMA 刺激細胞内では 3 株全てにおいて *artA* および *recA* の転写量が増加し、*S. Typhimurium* DT104、および *S. bongori* ではいずれの遺伝子も転写量の上昇が認められた。*S. Worthington* においては *recA* 発現の上昇が認められたものの、*artA* の転写量の有意な増加は認められなかった (図 1 A,B)。一方、細胞内における酸化ストレス応答制御因子である *oxyR* の転写量は *S. Worthington* および *S. bongori* において増加が認められたが、*S. Typhimurium* DT104 の場合 PMA で刺激した場合においても発現の上昇は認められなかった。さらに、OxyR の作用により誘導的に発現し、ファージの溶原化を維持する *cI* リプレッサー遺伝子の発現は *S. Worthington* において上昇し、*S. Typhimurium* DT104 ではそれが認められなかった。以上のことから、マクロファージ内における DT104 の *artAB* は ROS により誘導的に発現するが、*S. Worthington* のように *oxyR* の発現応答の強い菌では *cI* リプレッサーにより Art ファージの誘導と *artAB* の転写が抑制されるためにその細胞内発現が弱くなるものと推察された。すなわち、細菌の酸化ストレス応答の強弱が細胞内における毒素産生能に反映している可能性が示唆された。

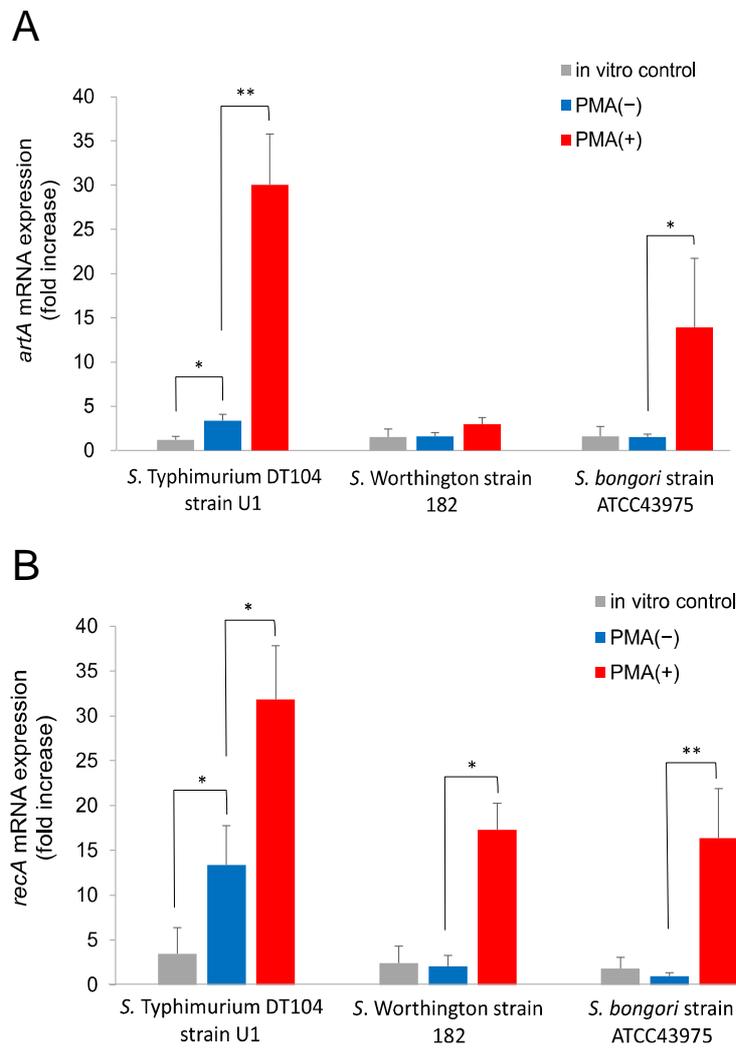


図1 細胞内における *artA* および *recA* の発現

(A) *artA* の発現量。(B) *recA* の発現量。縦軸は 16S rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして測定した細胞内での発現量と *in vitro* の発現量との比を示す。DMEM 培地における *in vitro* での各遺伝子の発現量を灰色示す。RAW264.7 細胞内における各遺伝子の無刺激の場合の発現量を青、PMA で刺激した場合の発現量を赤で示した。(n=24、mean ±SE、\*: P<0.05、\*\*: P<0.01)

(2) ArtAB のマクロファージに対する殺菌能におよぼす影響

INF- および LPS で活性化した RAW264.7 細胞を ArtAB で処理し、ArtAB 非産生の KST10 株を当該細胞に感染させ、ゲンタマイシンプロテクションアッセイにより、ArtAB が *Salmonella* のマクロファージ内生存性・増殖性に与える影響について調べた。この結果、ArtAB で細胞を処理することにより感染後 5 時間以降において、*Salmonella* のマクロファージ内増殖性を低下させることが明らかとなった ( 図 2 )。また、この現象は、ArtAB の用量に依存していた。

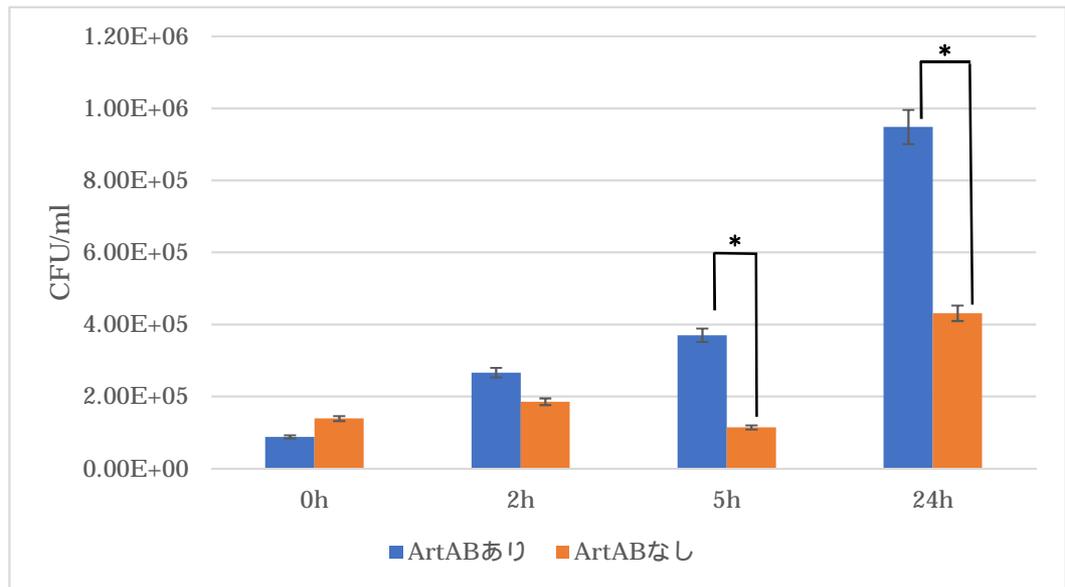


図 2 ArtAB 感作および非感作細胞における感染 *S.Typhimurium* KST10 の細胞内生存菌数の経時変化  
 $2 \times 10^5$  の RAW264.7 細胞を DMEM 培地 ( 抗生物質を含まない ) 200  $\mu$ l で 37  $^{\circ}$ C、18 時間培養後、ArtAB (500 ng/ml)、INF- $\gamma$  (200 U/ml)、LPS (1  $\mu$ g/ml) を培地に添加し、さらに 18 時間培養した。その後、*S.Typhimurium* KST10 (ArtAB 非産生株) を 10MOI で感染させ、ゲンタマイシンプロテクションアッセイにより経時的に菌数を測定した。

\*:  $p < 0.05$

### ( 3 ) ArtAB のマクロファージの ROS 産生能におよぼす影響

LPS、INF-、PMA を用いて RAW264.7 細胞を刺激し ArtAB を添加した場合、ROS 産生量が有意に減少した。この反応は ArtAB 濃度が 100 ng/mL までは濃度依存的であることが示された。未刺激の場合、ArtAB による ROS 産生量には変化が見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Miura Shou, Tamamura Yukino, Takayasu Mariko, Sasaki Miwa, Nishimura Natsuko, Tokugawa Kanetaka, Suwa Izumi, Murata Ryo, Akiba Masato, Kusumoto Masahiro, Uchida Ikuo | 4. 巻<br>166             |
| 2. 論文標題<br>Influence of SOS-inducing agents on the expression of ArtAB toxin gene in Salmonella enterica and Salmonella bongori   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Microbiology  | 6. 最初と最後の頁<br>785 ~ 793 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1099/mic.0.000939  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Miura Shou, Satoh Rin, Tamamura-Ando Yukino, Tokugawa Kanetaka, Beppu Miho, Nozaki Chiaru, Murata Ryo, Kusumoto Masahiro, Uchida Ikuo | 4. 巻<br>168        |
| 2. 論文標題<br>Intra-macrophage expression of ArtAB toxin gene in Salmonella  | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Microbiology  | 6. 最初と最後の頁<br>1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1099/mic.0.001152  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡久川兼誉, 諏訪いづみ, 三浦祥, 村田亮, 玉村雪乃, 楠本正博, 内田郁夫                      |
| 2. 発表標題<br>Salmonella Typhimurium DT104 のArtAB 遺伝子の マウスマクロファージ様細胞内における発現 |
| 3. 学会等名<br>第85回日本細菌学会北海道支部学術総会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>玉村雪乃, 楠本正博, 岩田剛敏, 渡部綾子, 新井暢夫, 秋庭正人, 三浦祥, 村田亮, 内田郁夫 |
| 2. 発表標題<br>Salmonella 属菌における Art フェージの構造と 伝達性の解析              |
| 3. 学会等名<br>第85回日本細菌学会北海道支部学術総会                                |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>玉村 雪乃, 高安 真理子, 新井 暢夫, 岩田 剛敏, 渡部 綾子, 楠本 正博, 内田 郁夫, 秋庭 正人       |
| 2. 発表標題<br>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 |
| 3. 学会等名<br>第161回日本獣医学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>内田 郁夫, 佐々木 美羽, 西村 奈都子, 玉村 雪乃, 三浦 祥, 村田 亮 |
| 2. 発表標題<br>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              |
| 3. 学会等名<br>第92回日本細菌学会総会                             |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三浦 祥, 佐藤 凜, 玉村 雪乃, 別府 美保, 渡久川 兼誉, 村田 亮, 楠本 正博, 内田 郁夫 |
| 2. 発表標題<br>Salmonella 属菌のマクロファージ内における百日咳毒素様毒素の発現                |
| 3. 学会等名<br>第64回日本獣医学会学術集会                                       |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐藤 凜, 内田 郁夫, 三浦 祥, 村田 亮, 玉村 雪乃, 渡久川 兼誉, 別府 美保, 野崎 千遥, 楠本 正博 |
| 2. 発表標題<br>Salmonella 属菌における百日咳毒素様毒素(ArtAB)遺伝子の細胞内発現                   |
| 3. 学会等名<br>第95回日本細菌学会総会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)   | 備考 |
|---------------|--|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 玉村 雪乃<br><br>(Tamamura Yukino)<br><br>(90584384) | 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・主任研究員<br><br><br><br>(82111) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|