

平成21年 4月 20日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2005-2008

課題番号：17390125

研究課題名（和文） オートファジーと病原細菌の細胞内寄生戦略

研究課題名（英文） Autophagy and strategy for intracellular multiplication of pathogenic bacteria

研究代表者

氏名（ローマ字）：山本 友子 (YAMAMOTO TOMOKO)

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60110342

研究成果の概要：

サルモネラは感染の初期にはマクロファージに細胞死を誘導して殺菌機構をエスケープし、中盤以降はファゴソームを SCV と呼ばれる細胞内オルガネラに成熟させ、増殖する。本研究において、サルモネラの SCV 内増殖にはオートファジーに抵抗することが必須であることを明らかにした。さらに SPI-1 高発現サルモネラはマクロファージに大量の Caspase-3 活性化を導き、アポトーシスを誘導することを見出した。マクロファージ内での SPI-1 発現制御は、サルモネラの Lon protease が、SPI-1 転写制御因子 HilC, HilD を特異的に認識し分解することに基づくことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,000,000	0	6,000,000
2006年度	4,200,000	0	4,200,000
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,400,000	1,260,000	15,660,000

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・オートファジー・アポトーシス・宿主応答・マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

サルモネラ感染症は重篤なチフス症から軽微な腸炎まで多岐にわたっている。チフス症は 21 世紀の今日においても、世界中で年間 1600 万人が発症し、60 万人の死亡が報告されていることから、感染・発症のメカニズム解明とそれに基づく予防法の確立は喫緊の重要な研究課題である。サルモネラの有する最も重要な病原戦略は、マクロファージの

食菌機構をエスケープし、食細胞内で増殖する細胞内寄生性である。サルモネラは感染の初期にはマクロファージに細胞死を誘導して殺菌機構をエスケープし、中盤以降はマクロファージ内メンブランチラフィックを変化させてファゴソームを SCV (*Salmonella* containing vacuole) と呼ばれる独自の細胞内オルガネラに成熟させ、終始その中で増殖する。SCV メンブランチラフィックの機構はこ

こ数年でかなり明らかにされてきているが、「サルモネラが SCV を成熟させたとしても、膜閉鎖系の SCV 内で栄養をいかにして獲得するのか？」という命題は現在のところ未解決のまま残されている。さらに細胞内増殖を確保するための感染時期に依存した細胞死のコントロールについても多くの疑問が残されたままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、「サルモネラが膜閉鎖系の SCV 内で栄養をいかにして獲得するのか？」の命題に対し、「サルモネラはオートファジーによりオートファゴソーム内に生成された再利用可能な栄養素を SCV 内に取り込み増殖する。すなわちサルモネラはオートファジーをマクロファージ内寄生戦略に取り入れている」という仮説を提唱し、その実証を第一の目的とした。さらに感染の各段階において誘発されるマクロファージ細胞死のコントロール機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1)マクロファージ：RAW264.7 マクロファージ様細胞を用いた。  
サルモネラ：病原株 $\chi$ 3306 とそれに由来する各種弱毒株を用いた。
- (2)マクロファージ内の SCV とリソソーム融合は、acid phosphatase 活性の有無を透過型電子顕微鏡観察下で判定した。
- (3)オートファジー阻害剤として 3-メチルアデニン、ワートマニンを用いた。
- (4)サルモネラの細胞内増殖は、温度感受性 pHSG422 保有株の生存率で評価した。
- (5)マクロファージ細胞死の検出は、TUNEL 法ならびに抗ヒストン抗体を用いた immunoblotting 法によった。

## 4. 研究成果

- (1) サルモネラ細胞内寄生とオートファジー  
マクロファージ感染早期に殺菌される DnaK 変異株と野生株の細胞内動態を、電子

顕微鏡下で観察した。感染 2 時間後で野生株はファゴソーム内に観察されたが、DnaK 欠損株の周囲には明確なファゴソーム膜が観察されなかった。acid phosphatase 活性を指標にして、phagosome-lysosome (PL) 融合を検討したところ、感染 2 時間後で野生株を内包する SCV は 13%が融合したのに対し、DnaK 内包ファゴソームとの融合は観察されなかった。従って従来考えられていた「サルモネラの PL 融合阻害による食菌機構からのエスケープ」は再検討の必要があるといえる。

オートファジー阻害剤のワートマニン、3-メチルアデニンで感染マクロファージを処理し、サルモネラの細胞内増殖性を検討した結果、阻害剤存在下で生存率が増加することが明らかとなった。ClpXP 欠損株はマクロファージ内で野生株と同様に増殖可能であるが、殺菌機構に抵抗不能であることが明らかとなった。さらに ClpXP 欠損株感染マクロファージ細胞ではオートファジーが過剰に起こることが明らかとなった。従って「サルモネラがマクロファージ内細胞内寄生戦略にオートファジーを取り入れる」という仮説は否定的であり、むしろサルモネラの細胞内寄生にはオートファジーに抵抗する必要があると考えられた。サルモネラが膜閉鎖系の SCV 内で栄養を獲得する方法についてはいまだ明らかとはなっていない。

## (2) サルモネラ細胞内寄生とマクロファージ細胞死の制御

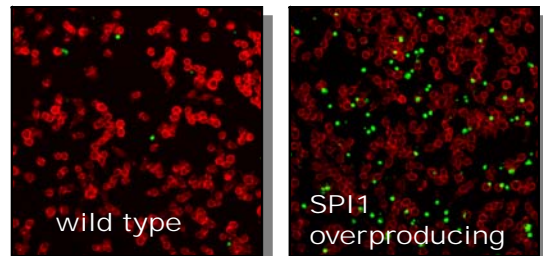
サルモネラは、感染初期では上皮細胞やマクロファージに細胞死を誘導して感染を拡大し、中盤以降ではマクロファージ細胞内オルガネラのメンブランチラフィックスを変化させてその中で増殖し、全身感染を成立させると考えられている。マクロファージはサルモネラの住処であることからこれを確保するために、細胞死の誘導は感染の段階に応じて厳密に制御されなければならない。サルモネラは SPI-1(Salmonella Pathogenicity Island 1)の機能によりマクロファージや樹状細胞に細胞死を誘導するが、この細胞死は Caspase-1 依存的な炎症性サイトカインの誘発を伴うもので、従来のアポトーシスやネクロト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として位置つけることが提唱されている。一方、我々は、SPI-1 を過剰に発現するサルモネラが、マクロファージに Caspase-1 依存的な細胞死に加えて、Caspase-3 依存的な大量のアポトーシスを誘導することを見出した(図 1)。さらに Caspase-3 活性化経路について詳細な検討を行い、SPI-1 過剰産生サルモネラ感染マクロファージでは、Caspase-8 過剰活性化 → Bid → Bax → Cytochrome C 遊離 → Caspase-9 活性化の経路により大量の Caspase-3 が誘導されていることを見出した。さらに、サルモネラ SPI-1 野生株感染マクロファージにおいても Caspase-8 活性化が起こること、しかしこのレベルの Caspase-8 では Caspase-9, Caspase-3 の活性化に至らずアポトーシスは誘導されないことを明らかにした。又、Caspase-8 活性化に関わるサルモネラのエフェクターを同定するために、SPI1 発現を統合的に制御する転写因子 HilA により活性化される遺伝子を DNA array を用いて網羅的に解析した。現在までに 3 つの遺伝子産物が Caspase-8 活性化エフェクター候補となっているが、候補遺伝子のコードするエフェクターの機能ならびに Caspase-8 活性化機構解明が今後の課題となる。

図 1 TUNEL 法によるサルモネラ野生株 (wild type) あるいは SPI1 過剰産生株 (SPI1 overproducing) 感染 6 時間後のマクロファージの細胞死の検出

to down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol. Microbiol.* **55** 839-852 (2005)

③ Tomoyasu, T., Takaya, A., Handa, Y, Karata, K., Yamamoto, T. ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:59-66 (2005)



- ④ Kodama, C., Eguchi, M., Sekiya, Y., Yamamoto, T., Kikuchi, Y., Matsui, H. Evaluation of the Lon-deficient *Salmonella* strains as an oral vaccine candidate. *Microbiol. Immunol.* **49**:1035-1045 (2005)
- ⑤ 山本友子・高屋明子. サルモネラの細胞内侵入と食細胞内寄生の分子機構 *日細菌誌* **60** : 375-387 (2005)
- ⑥ Takaya, A., Matsui, M., Tomoyasu, T., Kaya, M., Yamamoto, T. The DnaK chaperone machinery converts the native FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> hetero-tetramer into a functional transcriptional regulator of flagellar regulon expression in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **59**:1327-1340 (2006)
- ⑦ Takaya, A., Watanabe, M., Yamamoto, T. Organization of Tn2610 containing two transposition modules. *Antimicrobiol. agents Chemother.* **50**:1143-1147 (2006)
- ⑧ Yamamoto, T. Bacterial strategies for escaping the bactericidal mechanisms by macrophage. *YAKUGAKUZASSHI* **16**:1235-1243 (2006)
- ⑨ 山本友子・高屋明子. 細菌がマクロファージ食食と殺菌を回避するしくみ. *蛋核酵* **51** : 118-124 (2006)
- ⑩ Eguchi, M., Sekiya, Y., Suzuki, M., Yamamoto, T., Matsui, H. An oral *Salmonella* vaccine promotes the down-regulation of cell surface Toll-like receptor4 (TLR4) and TLR2 expression in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 300-308 (2007)
- ⑪ Eguchi, M.; Sekiya, Y., Kikuchi, Y., Takaya, A., Yamamoto, T., Matsui, H. Expressed

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Takaya A., Suzuki, A., Kikuchi, Y., Eguchi, M., Isogai, E., Tomoyasu, T., Yamamoto, T. De-repression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 genes within macrophages leads to rapid apoptosis via caspase-1- and caspase-3-dependent pathways. *Cell Microbiol.* **7**: 79-90 (2005)
- ② Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., Yamamoto, T. Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads

*Salmonella* antigens within macrophages enhance the proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes via bystander dendritic cells **FEMS Immunol Med Microbiol** 50: 411-420 (2007)

- ⑫ Yokoyama, E., Maruyama, S., Kabeya, H., Hara, S., Sata, S., Kuroki, T., and Yamamoto, T. Prevalence and Genetic Properties of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Definitive Phage Type 104 Isolated from *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* House Rats in Yokohama City, Japan. **Appl. Environ. Microbiol.** 73:2624-2630 (2007).
- ⑬ Kage, H., Takaya, A., Ohya, M., and Yamamoto, T. Coordinated regulation of expression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. **J. Bacteriol.** 190 : 2470-2478 (2008)
- ⑭ Mizusaki, H. Takaya, A., Yamamoto, T. and Aizawa, S. Signal pathway in the salt-activated expression of the SPI1/type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.** 190: 4624-4631 (2008)
- ⑮ Hang'ombe, B., Isogai, E., Mubita, C., Isogai, N., Silungwe, M., hisenga, C., Moonga, L., Mulenga, E., Yabe, J., Takaya, A., Yamamoto, T., Kurebayashi, Y. and Isogai, H. Detection of *invA*, *spiC*, *sipC*, *invF*, and *hila* in *Salmonella* isolated from beef and poultry by dot blot hybridization in Zambia. **Inter. J. App. Res. Vet. Med.** 6:1-6 (2008)
- ⑯ Takaya, A., Tabuchi, F., Tsuchiya, H., Isogai, E. and Yamamoto, T. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. **J. Bacteriol.** 190:4181-4188 (2008)
- ⑰ Matsui, M., Takaya, A. and Yamamoto, T.  $\sigma^{32}$ -mediated negative regulation of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 expression. **J. Bacteriol.** 190:6636-6645 (2008)
- ⑱ 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 **感染症免疫** 38:282-289 (2008)

[学会発表] (計71件)

- ① 高屋明子、水之江義充、高出明美、磯貝恵

美子、友安俊文、吉田真一、山本友子. サルモネラのOMVを介したマクロファージ内増殖機構. 第78回日本細菌学会総会 (2005)

- ② 松井真理、高屋明子、友安俊文 山本友子. サルモネラのDnaKシャペロンによるSPI1発現制御機構. 第78回日本細菌学会総会 (2005)
- ③ Takaya, A., Kaya, M., Tomoyasu, T. and Yamamoto, T. Activation of FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> transcriptional master regulator of *Salmonella* flagellum biogenesis by DnaK chaperone machinery. 105<sup>th</sup> American Society for Microbiology, General Meeting, Atlanta, USA. (2005)
- ④ Oya, M., Takaya, A., Tomoyasu, T. and Yamamoto, T. Modulation of HilC and HilD, transcriptional regulators for expression of SPI1 genes, in a complex manner. Cold Spring Harbor Meeting on Microbial pathogenesis & Host response, CSH, USA. (2005)
- ⑤ Yamamoto, T., Takaya, A. and Tomoyasu, T. : Lon protease regulates the induction of macrophage apoptosis for establishment of systemic *Salmonella* infection. 6<sup>th</sup> International Conference on AAA Proteins, Schloss Seggau, Austria. (2005)
- ⑥ 高屋明子、島崎稔、山本友子. サルモネラ SPI2 非依存型食細胞内増殖機構. 第79回日本細菌学会総会 (2006)
- ⑦ 松井真理、高屋明子、山本友子. サルモネラのDnaKシャペロンによるHilA活性発現. 第79回日本細菌学会総会 (2006)
- ⑧ Takaya, A., Mizunoe, Y., Takade, A., Sashinami, H., Isogai, E., Nakane, A., Yoshida, S., and Yamamoto, T. Type VI secretion system via outer membrane vesicle releases *Salmonella* PagC protein, leading to attenuation of *Salmonella* virulence. ASM conference; Protein Traffic in Prokaryotes, Iraklio Crete, Greece. (2006)
- ⑨ Takaya, A., Mogk, A., and Yamamoto, T. ClpV, a novel and unique AAA+ member of *Salmonella*. 41<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Gifu (2006)
- ⑩ 高屋明子、松井真理、島崎稔、山本友子 : 分子シャペロンDnaKによるサルモネラタイプIII蛋白質分泌機構制御. 第1回細菌学・若手コロッセウム (2007)

- ⑪山口陽、高屋明子、山本友子. AAA<sup>+</sup>プロテアーゼLonによる腸管出血性大腸菌のタイプIIIエフェクター分泌制御機構. 第5回感染症沖縄フォーラム (2007)
- ⑫石川秀人、高屋明子、水之江義充、高出明美、磯貝恵美子、吉田眞一、山本友子. サルモネラのOMVによる病原性発現調節. 第80回日本細菌学会総会 (2007)
- ⑬ Yamamoto, T., and Takaya, A. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* is regulated by Lon protease. 7<sup>th</sup> International Conference on AAA Proteins, Cirencester, England. (2007)
- ⑭ Takaya, A., Kitagawa, R., Ohya, M., and Yamamoto, T. The role of ClpXP protease in flagellum biogenesis of non-pathogenic and pathogenic *E. coli*. 7<sup>th</sup> International Conference on AAA Proteins, Cirencester, England (2007)
- ⑮高屋明子、大矢麻衣、山本友子. Function of DnaK/DnaJ chaperone machinery on the regulation of *Salmonella* type III secretion systems. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会 (2007)
- ⑯松井真理、高屋明子、山本友子.  $\sigma^{32}$  regulon regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 expression. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会 (2008)
- ⑰大矢麻衣、高屋明子、山本友子. Recognition of HilD, *Salmonella* Pathogenicity Island1(SPI1) protein, by Lon protease. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会 (2008)
- ⑱ Tomoko Yamamoto and Akiko Takaya. Control of host cell death by *Salmonella* pathogenicity island-1 Type III secretion system. The 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. Seoul, Korea (2008)
- ⑲Tomoko Yamamoto. Two functionally distinct Type III secretion systems for *Salmonella* pathogenesis. Japan-Mexico Workshop on “Pharmacobiology” and “Nanobiology” Mexico City, Mexico (2009)
- ⑳山本友子 サルモネラ病原因子の発現と感染機構. ワークショップ: サルモネラ感染とワクチン開発. 第82回日本細菌学会総会(2008)

〔図書〕(計3件)

- ①山本友子: 微生物感染症学 南山堂 312頁 (2005)
- ②山本友子: 薬科微生物学第5版 丸善 318頁 (2007)
- ③山本友子: 医科細菌学第4版 南江堂 430頁 (2008)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 友子 (YAMAMOTO TOMOKO)  
千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 60110342

### (2) 研究分担者

高屋 明子 (TAKAYA AKIKO)  
千葉大学・大学院薬学研究院・講師  
研究者番号: 80334217

大矢麻衣 (OYA MAI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 60456093