

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 12 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2011

課題番号：20590460

研究課題名 (和文) サルモネラ菌の細胞内増殖および全身感染成立に関わる病原因子の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of *Salmonella* virulence factor involved in survival within host cells or systemic disease

研究代表者

打矢 恵一 (UCHIYA KEIICHI)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70168714

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：サルモネラ菌, SPI-2, *spiC* 遺伝子, マクロファージ

1. 研究計画の概要

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) の染色体上, 30.7cs に存在する *Salmonella* Pathogenicity Island 2 は, マクロファージ (Mφ) の殺菌能に対する抵抗性やマウスに対する全身感染の成立に深く関与しており, それに関与する病原因子として, この領域内に新規のタンパクである SpiC を同定した. 本研究の目的は, SpiC を中心にその機能を分子レベルで解明することにより, サルモネラ特有の病原性のメカニズムを明らかにすることである. さらに, これらの知見を基盤として, 多剤耐性化が問題になっているサルモネラ感染症に対して新たな薬物治療法を確立したいと考える. これまで, SpiC の機能を明らかにする目的でサルモネラ感染により Mφ 内で変化する宿主因子の網羅的な解析を cDNA アレイ等の方法により行った結果, SpiC がサイトカイン抑制因子 3 (SOCS-3) などの遺伝子発現の増強に関与し, さらに培養上清を用いたプロテオーム解析の結果, SpiC の鞭毛蛋白発現への関与が明らかとなった. そこで, 以下の課題について詳しく調べる. (1) SpiC の鞭毛への関与 (2) SpiC の線毛への関与 (3) サルモネラの全身感染成立における SpiC の関与 (4) 新規薬物療法への展開

2. 研究の進捗状況

平成 20 年度～平成 22 年度の研究実施計画に基づいて研究を行った結果, 以下の成果を得た. (1) 鞭毛形成における SpiC の関与について, ① SpiC は転写レベルで *fliC*, さらにクラス 3 に属する *fliD* や *motA* の発現に関与していた. しかし, マスター・レギュレーターである *fliH/fliC* の発現には

関与していないことがわかった. ② 抗 FliH ペプチド抗体を用いた実験結果から, SpiC は FliH の発現に翻訳の段階で関与していることがわかった. ③ サルモネラ感染 Mφ において, SpiC 依存的な SOCS-3 の発現に FliC の関与が示された. ④ さらに, その発現には p38 および ERK シグナル伝達経路の活性化が関与していた. (2) 線毛形成における SpiC の関与について, ① *S. Typhimurium* が保有している 12 の線毛遺伝子の欠損変異株を作製し, サルモネラ感染 Mφ からの SOCS-3 発現を調べた結果, タイプ 1 線毛をコードしている *fimA* がその発現に影響していることがわかった. ② サルモネラ感染 Mφ における p38 および ERK シグナル伝達経路の活性化のレベルを調べた結果, 野生株に比べて *fimA* 変異株において低下が見られた. ③ SpiC は *fimA* 発現の転写後段階に関与している可能性が示唆された. (3) Mφ からの SOCS-3 発現の増強における FimA の関与について, ① FimA 蛋白質を遺伝子組み換え技術により大腸菌で多量発現を行いその精製を行った結果, 精製 FimA 蛋白質を得た. ② FimA を Mφ に作用させて SOCS-3 の発現を調べた結果, その発現の増強が見られた. ③ FimA は Mφ の MAP キナーゼ (p38, ERK, JNK) および NF-κB などのシグナル伝達経路を活性化した. ④ TLR2 の中和抗体や TLR2 を発現させた HEK-293 細胞を用いた実験結果から, FimA は TLR2 を介して Mφ からの SOCS-3 発現に関与していることがわかった. これまでの研究結果から, サルモネラの病原性における鞭毛などの個々のファクターの関与については不明瞭な点があったが, SpiC の作用により鞭毛や線毛などの種々の

ファクターが総合的に働き、サルモネラの病原性に寄与しているものと考えられた。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。この理由として、SpiCの線毛への関与について研究を行っている段階で新たな知見が得られ、当初計画していなかったFimAタンパクの精製やその機能の解析を行うなどの研究計画が生じた。

4. 今後の研究の推進方策

SpiCの鞭毛や線毛形成への関与が示されたので、これらの構成遺伝子である*fliC*や*fimA*、あるいは両遺伝子の欠損変異株を用いて、Mφのシグナル伝達経路の活性化および病原性への関与を調べる。また、SpiCがサルモネラ感染Mφ内において、ファゴソームとライゾゾーム(P/L)の融合の阻止に関与していることを報告したが、そのメカニズムは不明である。SpiCによるカルシウム・シグナリングの活性化が引き金となり、アクチンの重合が起これば結果的にP/L融合が阻止されると考えられるので、この仮説を調べる。

5. 代表的な研究成果

(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10件)

(1) Takayuki Inagaki, Tetsuya Yagi, Kazuya Ichikawa, Taku Nakawawa, Makoto Moriyama, Kei-ichi Uchiya, Toshiaki Nikai, and Kenji Ogawa

Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in *Mycobacterium avium* complex isolates
J. Antimicrob. Chemother., 査読有, 66, 2011, 722-729

(2) Kei-ichi Uchiya, Asami Sugita, and Toshiaki Nikai

Involvement of SPI-2-encoded SpiC in flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

BMC Microbiol., 査読有, 9, 2009, 1-10

(3) Kei-ichi Uchiya and Toshiaki Nikai
Salmonella virulence factor SpiC is involved in expression of flagellin protein and mediates activation of the signal transduction pathways in macrophages

Microbiology, 査読有, 154, 2008, 3491-3502

(4) Yoshiyuki Okumura, Takeshi Matsui, Kenji Ogawa, Kei-ichi Uchiya, and Toshiaki Nikai

Biological properties and primary structure of elastase inhibitor AFUEI from *Aspergillus fumigatus*

J. Med. Microbiol., 査読有, 57, 2008, 803-808

[学会発表] (計20件)

(1) 高橋弘泰、打矢恵一、他10名
*Mycobacterium avium*104 (HIV陽性患者由来)のゲノム比較

日本薬学会第131年会 平成23年3月30日 静岡

(2) 高橋弘泰、打矢恵一、他9名
肺MAC症患者とHIV陽性患者由来

*Mycobacterium avium*の遺伝子解析
第64回国立病院総合医学会 平成22年11月26日 福岡

(3) 打矢恵一、杉田亜沙美、二改俊章
サルモネラ感染マクロファージからの

SOCS-3発現におけるFimAの関与
第83回日本細菌学会総会 平成22年3月27日 横浜

(4) 杉田亜沙美、打矢恵一、二改俊章
Salmonella Pathogenicity Island 2のFlhDC発現への関与

第82回日本細菌学会総会 平成21年3月14日 名古屋

(5) 打矢恵一、二改俊章

Salmonella Pathogenicity Island 2のFliA (Sigma-28)発現への関与

第81回日本細菌学会総会 平成20年3月24日 京都

[図書] (計2件)

(1) 打矢恵一 (分担)、南山堂、薬剤耐性のメカニズム、2009、32-38

(2) 打矢恵一 (分担)、廣川書店、新しい微生物学(第4版)、2011、372-384