

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 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 and 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

研究成果の概要（和文）：*Salmonella enterica* serovar Typhimurium が有する *Salmonella* Pathogenicity Island 2 の領域内に存在している新規病原因子である SpiC は、鞭毛繊維の構成タンパクである FliC、さらにタイプ 1 線毛の構成タンパクである FimA の発現に関与していることを明らかにした。サルモネラを感染させたマクロファージにおいて、SpiC は FliC や FimA の発現を介して細胞内カルシウムイオンの増加を促し、カルシウム・シグナル伝達経路の活性化を介して、*Salmonella*-induced filament の形成を誘導することにより、サルモネラのマクロファージ内増殖に関与していることが判った。

研究成果の概要（英文）：SpiC encoded within *Salmonella* pathogenicity island 2 on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is involved in the expressions of FliC and FimA, which are a component of the flagellar filaments and a major subunit of type 1 fimbriae, respectively. Infection of macrophages with *Salmonella* causes the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in a SpiC-dependent manner and the elevation of Ca<sup>2+</sup> activates the calcium signal transduction pathway, leading to the formation of *Salmonella*-induced filament that is involved in the intracellular survival of *Salmonella*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：サルモネラ菌，SPI-2，*spiC* 遺伝子，マクロファージ，細胞内カルシウムイオン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、増加傾向にあるサルモネラ感染症、とくに全身感染を引き起こすチフス症においては予防のためのワクチンがなく、さらに多剤耐性を獲得したサルモネラが出現し、衛生環境の悪い諸国において大きな社会問題となっている。サルモネラの病原性に関する

研究は、チフス症のモデルとしてマウスに対して主に *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) を用いて解析が行なわれているが、サルモネラの病原性において最も重要なマクロファージ内の殺菌抵抗性の機構については不明な点が多く、分子レベルでの解明が必要とされている。

*S. Typhimurium* の染色体上、30.7cs に存在する *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) の領域内に同定した新規の病原遺伝子、*spiC* はマクロファージ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関与しているが、その機能は明らかでない。そこで、SpiC の機能を明らかにする目的でサルモネラ感染によりマクロファージ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 がシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)、IL-10、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、これらのファクターはサルモネラのマクロファージ内増殖に重要な役割をしていることを明らかにしてきた。また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、さらにサルモネラの菌体を透過型電子顕微鏡により観察中、大変興味あることに、鞭毛に加えて SpiC の線毛形成への関与の可能性が示唆された。これまでの研究成果から、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。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

これまでの研究結果から、以下のような仮説が考えられた。SpiC は鞭毛や線毛形成に関与し、TLR5 や TLR2 などを通してサルモネラ感染マクロファージ内のシグナル伝達経路を活性化し、COX-2、IL-10、SOCS-3 などの産生を促す。このようなシグナル伝達経路の活性化や産生された種々のファクターが総合的に作用して、サルモネラの病原性において最も重要なマクロファージ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いる可能性が考えられ、このような仮説を以下に示す研究計画に従って詳しく調べた。

(1) 本研究には、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s 株を野生株として使用した。細胞は J774 マクロファージ、HeLa 細胞、および HEK-293 細胞を使用した。

(2) 鞭毛形成における SpiC の関与について、鞭毛関連遺伝子 (鞭毛繊維の構成蛋白をコードしている *fliC* や *fliB* 遺伝子、鞭毛関連遺伝子発現のマスター・レギュレーターで

ある *fliC/fliD* 遺伝子) の発現を TaqMan プローブ法による定量 RT-PCR、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによるプロモーターアッセイ、さらに特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により調べ検討を行った。

(3) 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 13 の線毛遺伝子の欠損変異株を  $\lambda$  Red 組換えシステムにより作製した。② 線毛遺伝子 (タイプ 1 線毛をコードしている *fimA* 遺伝子など) の発現を (1) の方法に従って調べた。③ FimA 蛋白質を遺伝子組換え技術により、大腸菌での発現系を用いて精製を行った。④ FimA の TRL2 への関与をその中和抗体や TLR2 を発現させた HEK-293 細胞を用いて調べた。

(4) 病原性におけるカルシウム・シグナル伝達経路の関与について、① 細胞内カルシウムイオン濃度は、カルシウム蛍光プローブである Fura-2 を用いて Image Xpress にて測定を行った。② サルモネラ感染細胞内の Sif (*Salmonella*-induced filament) およびアクチン重合の変化は、特異抗体および蛍光標識された二次抗体を用いて二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。③ 感染実験は BALB/c マウスを用いて行い、生存率や臓器内 (肝臓、脾臓) 菌数の変化を調べた。

## 4. 研究成果

平成 20 年度～平成 23 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。

平成 20 年度：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) サルモネラ感染マクロファージにおいて、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。

平成 21 年度：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 13 の線毛遺伝子の欠損変異株を作製し、サルモネラ感染マクロファージからの 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明らかになった。(2) サルモネラ感染マクロファージにおける 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* 変異株において有意な低下が

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強く示唆された。

平成 22 年度：マクロファージからの 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 をマクロファージに作用させて 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 はマクロファージの MAP キナーゼ (p38, ERK, JNK) および NF- $\kappa$ B 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 を介してマクロファージからの SOCS-3 発現に関与していることがわかった。

平成 23 年度：サルモネラのマクロファージ内増殖における細胞内カルシウムイオンの重要性について, (1) サルモネラを感染させたマクロファージおよび HeLa 細胞の細胞内カルシウムイオン濃度を測定した結果, 野生株を感染させた細胞では, *spiC* 欠損変異株を感染させた場合に比べて有意に増加した。

(2) マクロファージ内でのサルモネラの増殖性および COX-2 発現への細胞内カルシウムの関与を調べた結果, カルシウムチャンネルの阻害剤であるベラパミル処理により野生株のマクロファージ内増殖の低下に加えて, サルモネラ感染マクロファージの COX-2 発現が阻害された。(3) サルモネラのマクロファージ内増殖において重要な役割をしている Sif (*Salmonella*-induced filament) の形成能を調べた結果, その低下が見られたことからサルモネラの病原性における細胞内カルシウムイオンの重要性が示された。(4) カルシウム・シグナル伝達経路の関与について調べるために, カルモジュリンや MLCK (myosin light chain kinase) の阻害剤 (W-5, ML-7) を用いて検討を行った結果, これらの阻害剤処理によりサルモネラのマクロファージ内増殖および Sif 形成の低下が見られた。以上の結果から, SpiC は細胞内カルシウムイオンの増加を促し, カルモジュリンを介して MLCK を活性化して, Sif の形成を引き起こすことにより, サルモネラの細胞内増殖に関与していることが示唆された。

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。

## 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 15 件)

- ① Kei-ichi Uchiya and Toshiaki Nikai. *Salmonella*: strategies for survival. Toxin Reviews, 査読有, 2012, *In press*
- ② 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.
- ③ Nobuo Yamashita, Yumiko Komori, Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya, Takeshi Matsui, Akira Nishimura, Kenji Ogawa, and Toshiaki Nikai. High-yields heterologous production of the novel *Aspergillus fumigatus* elastase inhibitor AFUEI in *Aspergillus oryzae*. J. Biosci. Bioeng., 査読有, 112, 2011, 114-117.
- ④ 稲垣孝行, 八木哲也, 市川和哉, 中川拓, 森山誠, 打矢恵一, 二改俊章, 小川賢二: *Mycobacterium avium* における Line probe assay による Rifampicin 耐性遺伝子検査の有用性, 結核, 査読有, 85, 2010, 703-709.
- ⑤ 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.
- ⑥ Kazuya Ichikawa, Tetsuya Yagi, Makoto Moriyama, Takayuki Inagaki, Taku Nakagawa, Kei-ichi Uchiya, Toshiaki Nikai, and Kenji Ogawa. Characterization of *Mycobacterium avium* with clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, IS*Mav6*. J. Med. Microbiol., 査読有, 58, 2009, 945-950.
- ⑦ Takayuki Inagaki, Kei Nishimori, Tetsuya Yagi, Kazuya Ichikawa, Makoto Moriyama, Taku Nakawawa, Takami Shibayama, Kei-ichi Uchiya, Toshiaki Nikai, and Kenji Ogawa. Comparison of a Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-VNTR and IS*1245*

restriction fragment length polymorphism typing. J. Clin. Microbiol., 査読有, 47, 2009, 2156-2164.

- ⑧ Yumiko Komori, Masaya Nagamizu, Kei-ichi Uchiya, Toshiaki Nikai, and Anthony T. Tu. Comparison of Sea Snake (*Hydrophiidae*) Neurotoxin to Cobra (*Naja*) Neurotoxin. Toxins, 査読有, 1, 2009, 151-161.
- ⑨ Masaya Nagamizu, Yumiko Komori, Kei-ichi Uchiya, Toshiaki Nikai, and Anthony T. Tu. Isolation and Chemical Characterization of a Toxin Isolated from the Venom of the Sea Snake, *Hydrophis torquatus aagardi*. Toxins, 査読有, 1, 2009, 162-172.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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 33 件)

- ① 打矢恵一、二改俊章：サルモネラのマクロファージ内増殖における細胞内カルシウムの関与、第 85 回日本細菌学会総会平成 24 年 3 月 27 日、長崎
- ② 奥村欣由、打矢恵一、本間道夫、二改俊章： *Aspergillus nidulans* が産生するエラスターゼインヒビター AFLEI の性質と X 線構造解析、第 85 回日本細菌学会総会平成 24 年 3 月 27 日、長崎
- ③ 新美政樹、打矢恵一、二改俊章：日本と韓国において分離された *Mycobacterium avium* の遺伝学的相違について、48 回日本細菌学会中部支部総会、平成 23 年 10 月 22 日、名古屋
- ④ 打矢恵一、二改俊章：サルモネラの病原性における細胞内カルシウムの関与、第 48 回日本細菌学会中部支部総会、平成 23 年 10 月 22 日、名古屋
- ⑤ 新美正樹、打矢恵一、高橋弘泰、黒河和宏、八木哲也、市川和哉、日比谷健司、中川 拓、山田憲隆、二改俊章、小川賢二：日本人と韓国人肺 MAC 症患者由来株の遺伝子的特徴、第 65 回国立病院総合医学会、平成 23 年 10 月 8 日、岡山
- ⑥ Kei-ichi Uchiya and Toshiaki Nikai: FimA is involved in activation of the signal transduction pathways in *Salmonella* infected-macrophages in a Toll-like receptor 2-dependent manner. International Union of Microbiological Societies 2011 Congres. 平成 23 年 9 月 8 日、札幌
- ⑦ 高橋弘泰、打矢恵一、黒河和宏、新美正樹、八木哲也、市川和哉、稲垣孝行、森山誠、西森敬、日比谷健司、二改俊章、小川賢二：肺 MAC 症患者由来臨床分離株と基準株 *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
- ⑧ 黒河和宏、高橋弘泰、打矢恵一、新美正樹、八木哲也、市川和哉、稲垣孝行、森山誠、西森敬、日比谷健司、二改俊章、小川賢二： *Mycobacterium avium* における経気道感染株と経腸感染株での特徴的新規遺伝子領域の保有状況の比較、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 30 日、静岡
- ⑨ 武田優、江島ちひろ、打矢恵一、平松正行、二改俊章：拘束水ストレス負荷によるサイトカインおよび免疫細胞への影響、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 30 日、静岡
- ⑩ 高橋弘泰、打矢恵一、二改俊章、長谷川万里子、篠田裕美、辻清太、林悠太、垂水修、中川拓、山田憲隆、小川賢二：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
- ⑪ 奥村欣由、鈴川誠、打矢恵一、小川賢二、小森由美子、山下伸雄、二改俊章： *Aspergillus* 属が産生するエラスターゼインヒビターの精製とその性質、第 4 回アスペルギルス研究会、平成 22 年 7 月 24 日、千葉
- ⑫ 鈴川誠、奥村欣由、打矢恵一、小森由美子、小川賢二、二改俊章： *Aspergillus nidulans* が産生するエラスターゼインヒビターの性質およびその部分一次構造について、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月 30 日、岡山
- ⑬ 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
- ⑭ 打矢恵一、杉田亜沙美、二改俊章： *Salmonella* FimA のマクロファージからの SOCS-3 発現への関与、第 46 回日本細菌学会中部支部総会、平成 21 年 10 月 23 日、名古屋

- ⑮ 高橋弘泰、稲垣孝行、市川和哉、日比谷健司、中川拓、打矢恵一、二改俊章、小川賢二：ヒト、ブタ由来 *Mycobacterium avium* の MIRU-VNTR 型別解析による比較  
日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月 27 日、京都
- ⑯ 杉田亜沙美、打矢恵一、二改俊章：  
*Salmonella* Pathogenicity Island 2 の FliHDC 発現への関与とその意義、第 82 回日本細菌学会総会、平成 21 年 3 月 14 日、名古屋
- ⑰ 松井健、奥村欣由、打矢恵一、二改俊章：  
*Aspergillus fumigatus* の産生するエラスターゼインヒビターの精製、性質及び構造決定について、第 45 回日本細菌学会中部支部総会、平成 20 年 10 月 17 日、金沢
- ⑱ Asami Sugita, Toshiaki Nikai, and Kei-ichi Uchiya: *Salmonella* virulence factor SpiC is involved in flagellum synthesis and mediates activation of the signal transduction pathways in macrophages. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders. 平成 20 年 9 月 24 日、名古屋
- ⑲ 奥村欣由、小川賢二、打矢恵一、小森由美子、二改俊章：*Aspergillus* 属が産生する病原因子としてのエラスターゼと新規エラスターゼ阻害因子、第 2 回アスペルギルス研究会、平成 20 年 7 月 19 日、東京
- ⑳ 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 4 件)

- ① 打矢恵一他、廣川書店、新しい微生物学 (第 4 版)、2011、372-384
- ② 打矢恵一他、廣川書店、CBT 対策と演習微生物学・免疫学、2009、185-191
- ③ 打矢恵一他、南山堂、薬剤耐性のメカニズム、2009、32-38
- ④ 打矢恵一他、廣川書店、薬毒物分析学辞典、2009、218

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：糸状菌由来エラスターゼ阻害剤の製造方法  
発明者：二改俊章、打矢恵一、小川賢二、山下信雄、西本遼、松永將義  
権利者：同上  
種類：特許

番号：特許第 2011-50309  
取得年月日：平成 23 年 3 月 17 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：