

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790119
 研究課題名（和文） ペプチドグリカン修飾の解析及び修飾に関わる因子の同定とその解析
 研究課題名（英文） Investigation of peptidoglycan modification and its role in virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
 研究代表者
 河野 美幸 (KAWANO MIYUKI)
 同志社女子大学・薬学部・特別任用助教
 研究者番号：10454498

研究成果の概要（和文）：サルモネラにおけるペプチドグリカン N-脱アセチル化酵素の候補遺伝子を同定し、その遺伝子産物がリゾチーム抵抗性などに関わることを示した。また、ペプチドグリカンと同様に細菌表層を構成するリポ多糖について、その脱アシル化酵素（LpxR）欠損株では宿主細胞内における増殖が有為に低下すること、LpxR 欠損株の感染は宿主細胞の iNOS 誘導を増強することを見出した。LpxR は、宿主の細胞応答を減弱させることにより宿主細胞内におけるサルモネラの生存及び増殖に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：*Salmonella* Typhimurium LpxR potentially detoxifies lipid A by 3'-O-deacylation. The intracellular growth of the *LpxR*-null strain was lower than that of the wild-type strain, and the expression level of iNOS was enhanced in the cells infected with the *LpxR*-null strain. We also identified the candidate genes for peptidoglycan N-deacetylase in *S. Typhimurium*. The deletion of the gene also affected the intracellular growth. These results suggested that the cell wall modifications were important for the intracellular growth of *S. Typhimurium* within host cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学・微生物学・免疫学
 科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学，マクロファージ，エンドトキシン，ペプチドグリカン，グラム陰性菌外膜

1. 研究開始当初の背景
 病原性微生物の最外部を覆う細胞壁は、宿主

への侵入、免疫系の活性化など感染時の様々な過程で重要な役割を果たしている。近年、

自然免疫において、Toll-like receptor (TLR) 等のパターン認識受容体による病原性微生物の細胞壁成分の認識と、それに引き続く宿主免疫系の活性化機序についての研究が急速に進んできた。

本研究で対象としたグラム陰性菌の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) は、マクロファージなどの貪食細胞内で生存・増殖することができる細胞内寄生性細菌である。*S. Typhimurium* などの病原性微生物は、このような環境下で自身のリポ多糖の lipid A 部位を修飾することが知られており、lipid A の構造修飾は抗菌ペプチドに対する抵抗性を増加させるなど *S. Typhimurium* の病原性に深く関わる。また、精製 lipid A 標品を用いたレポーターアッセイにより、lipid A の構造変化が TLR4-MD2 を介した宿主の免疫応答に影響を与えることも報告されている。しかし、lipid A を修飾する修飾酵素群と病原性との関連については不明な点が多く残されていた。また、リポ多糖と同様に細菌表層を構成するペプチドグリカンについても、グラム陽性菌においてはペプチドグリカン修飾と病原性との関係が知られていたが、グラム陰性細菌のペプチドグリカン修飾の有無や、その病原性との関連についてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、*S. Typhimurium* の細胞表層、特にペプチドグリカンとリポ多糖の構造に着目した。ペプチドグリカンに関しては、新規ペプチドグリカン修飾の有無及び修飾に関わる因子の同定、それら因子の病原性への関与の解明、リポ多糖については、リポ多糖修飾や修飾酵素が宿主免疫応答に与える影響など、リポ多糖修飾と病原性との関わりを解明を目的とし、最終的にペプチドグリカン及びリポ多糖の構造変化と宿主応答との関連性を明らかにすることを目指して解析を行った。

(1) 貪食細胞により貪食・殺菌される一般的なグラム陽性菌においては、マクロファージ貪食胞内で分解された細菌のペプチドグリカンが宿主細胞内のセンサータンパク質により認識され、自然免疫系を活性化するシグナ

ルとなる。一方、*S. Typhimurium* はマクロファージなどの貪食細胞内で生存可能な細胞内寄生性細菌である。このことから、*S. Typhimurium* のペプチドグリカン修飾は宿主免疫系の活性化を誘導しにくいということが考えられた。そこで、*S. Typhimurium* に特徴的なペプチドグリカン修飾の同定を行い、ペプチドグリカン修飾と細胞内寄生性との関連を明らかにすることを試みた。同時に、グラム陽性菌における既知のペプチドグリカン修飾酵素のアミノ酸配列をもとに、*S. Typhimurium* において相同的なタンパク質をコードする遺伝子を探索し、それら候補遺伝子産物の病原性への関与を検討した。また現在、ペプチドグリカンの分析法は HPLC と質量分析機を組み合わせたものが主流であるが、HPLC の過程で損失する修飾型ペプチドグリカンも存在すると予想されるため、より効率的かつ網羅的な分析方法の確立を試みた。

(2) グラム陰性菌のリポ多糖層の生合成においては、リポ多糖が内膜から外膜へとペプチドグリカン層を通過して輸送されることが必要である。この過程で、リポ多糖修飾の欠損をペプチドグリカン修飾が補完するなど、ペプチドグリカン修飾とリポ多糖修飾とが互いに影響を与えあっている可能性がある。この観点から、*S. Typhimurium* のリポ多糖、特に lipid A 部位の修飾酵素について解析を行った。特に、近年同定されたが生理的役割の解析が進んでいなかった lipid A の 3'-O-脱アシル化を行う新規酵素 (LpxR) に着目し、LpxR による lipid A 修飾の病原性への関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) ① *Staphylococcus aureus* の野生株から従来の方法により精製したペプチドグリカンについて、HPLC による前処理を省略して直接 MALDI-TOF MS による解析を行うために、試料の前処理方法や解析に用いるマトリックスなどの検討を行った。

② *Listeria monocytogenes* のペプチドグリカン N-脱アセチル化酵素をコードする遺伝子 (*pgdA*) との相同性をもとにデータベース検索を行い、*S. Typhimurium* におけるペプチドグリカン N-脱アセチル化酵素の候補遺伝子をクローニングした。当該遺伝子について

*E. coli*では相同的な遺伝子が無いことを確認し、*E. coli*における過剰発現系を構築した。また相同組み替えにより *S. Typhimurium* の当該遺伝子欠損株を作製した。

③ ②で作製した過剰発現株もしくは遺伝子欠損株を用いて、リゾチーム抵抗性及びマクロファージ様培養細胞への感染性などを検討した。

(2) ① *S. Typhimurium* の lipid A 脱アシル化酵素 LpxR について、*lpxR* のプロモーター下流に *lacZ* を融合させた株を作製し、様々な培養条件においてレポーターアッセイを行い、LpxR の発現条件の探索を行った。

② *S. Typhimurium lpxR* 欠損株を相同組換えにより作製した。

③ ②で作製した遺伝子欠損株について、マクロファージ様培養細胞などへの侵入能及び細胞内増殖能の測定、レポーターアッセイによるサイトカイン放出誘導能の測定などを行い、LpxR の病原性に対する寄与を検討した。

4. 研究成果

(1) ① Zip-tip などを用いて夾雑物の除去や試料の濃縮を試みたが、MALDI-TOF MS 分析の前処理としての HPLC を省略することは困難であると判明したため、従来の分析方法を採用した。

② *L. monocytogenes* PgdA との相同性をもとに、*S. Typhimurium* のペプチドグリカン修飾酵素の候補遺伝子 (STM3132, STM0179) をクローニングした。

③ ②でクローニングした遺伝子を、類似遺伝子を持たない *E. coli* で過剰発現させ、リゾチーム抵抗性に対する影響を調べた。STM3132, STM0179 いずれの遺伝子も、過剰発現により *E. coli* のリゾチーム抵抗性を増強することを見出した。これらの遺伝子産物は *S. typhimurium* のペプチドグリカン N-脱アセチル化酵素である可能性が高いが、精製タンパク質を用いた活性測定などにより、酵素の活性本体であることの確認が必要である。また、*S. Typhimurium* STM0179 遺伝子欠損株においては、マクロファージ様培養細胞内における増殖が亢進した。STM0179 遺伝子産物は、宿主細胞内での *S. Typhimurium* の生存及び増殖に関与する可能性がある。

(2) ① β-ガラクトシダーゼを利用したレポーターアッセイにより、LpxR タンパク質の発現は、培地の Mg^{2+} 濃度や pH に関わらず stationary phase において誘導されることを見出した。さらに LpxR 発現の経時的变化を調べ、stationary phase において誘導された LpxR はその後長時間にわたり膜面分に維持されることを示した (図 1)。また、これまで LpxR による lipid A 脱アシル化活性は過剰発現株や単離した膜面分においてのみ観察されていたが、stationary phase では野生株においても脱アシル化された lipid A が MALDI-TOF MS により検出できることを示した。

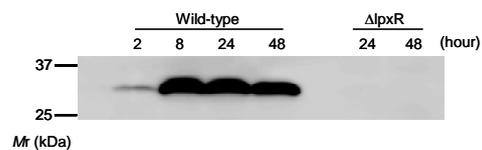


図 1 LpxR 発現量の経時的变化

S. Typhimurium 野生株もしくは *lpxR* 欠損株 ($\Delta lpxR$) を LB 培地で上記時間培養した後、膜面分を調製し、ウエスタンブロッティングにより LpxR 発現量を調べた。

② 相同組換えにより *S. typhimurium lpxR* 欠損株 ($\Delta lpxR$) を作製した。

③ ②で作製した $\Delta lpxR$ 株をマクロファージ様培養細胞 (RAW264.7 細胞) に感染させたところ、感染 24 時間後におけるマクロファージ細胞内での生菌数が野生株と比較して有為に低下した。また、この生菌数の低下は野生型 *lpxR* 遺伝子の導入により回復した (図 2)。この結果は他の培養細胞 (J774.1 細胞, HEK293 細胞) においても同様であり、リポ多糖修飾酵素の欠損が宿主細胞内における生存・増殖に影響を与えた初めての例である。

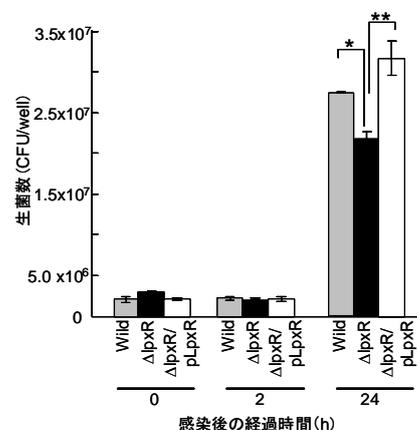


図 2 マクロファージ様培養細胞内における

S. Typhimurium の増殖

RAW264.7 細胞に *S. Typhimurium* の各株を感染させ、上記時間経過後に細胞内で生存している *S. Typhimurium* を回収し、LB 寒天培地上に形成されるコロニーの計数を行った。

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

また、同様に *S. Typhimurium* を感染させた RAW264.7 細胞を回収し、iNOS の発現量を比較したところ、 Δ lpxR 株を感染させた RAW264.7 細胞において iNOS の誘導が増強されることを見出した(図 3)。以上の結果から、LpxR は宿主の細胞応答を減弱させることにより *S. Typhimurium* の宿主細胞内における生存及び増殖に寄与すると考えられた。

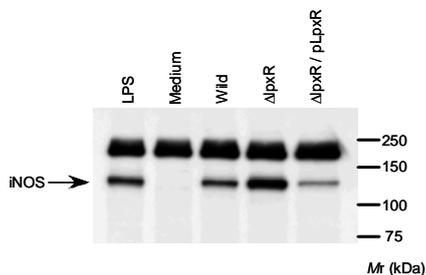


図 3 マクロファージ様培養細胞における iNOS 発現量の比較

S. Typhimurium 各株を感染させた RAW264.7 細胞から感染 24 時間後に細胞抽出液を調製し、ウェスタンブロッティングにより iNOS 発現量を調べた。

(1), (2)より、細菌の表層を覆うリポ多糖やペプチドグリカンの構造変化が、リゾチーム抵抗性や宿主細胞内での生存・増殖など、*S. Typhimurium* の病原性に深く関与していることを示した。特に、リポ多糖修飾酵素の欠損が、*S. Typhimurium* 感染に伴う宿主の細胞応答を *in vivo*において変化させた例ほどの細菌においても初めてであり、感染に伴う宿主細胞応答について、細菌表層構造との相関という観点から解明を進める上での糸口となると考えられる。

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 2 件)

①真鍋貴行, 河野美幸, 川崎清史

Mutations in the lipid A deacylase PagL which release the enzyme from its latency affect the ability of PagL to interact with lipopolysaccharide in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 投稿中 (2010年5月受理)

②河野美幸, 真鍋貴行, 川崎清史

Salmonella enterica serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages.

FEBS Letters, 査読有, vol. 584, 2010, pp. 207-212

[学会発表] (計 3 件)

①河野美幸, 真鍋貴行, 川崎清史

LpxRによるリポドA脱アシル化はサルモネラの効率的な細胞内増殖に必要である。第82回日本生化学会大会, 2009年10月24日, 神戸

②真鍋貴行, 河野美幸, 川崎清史

サルモネラ LPS 脱アシル化酵素 PagL の活性調節に関与するアミノ酸残基は他の外膜タンパク質との相互作用に重要である。第82回日本生化学会大会, 2009年, 10月24日, 神戸

③河野美幸, 川崎清史

Salmonella typhimurium mutant lacking a lipid A modification exhibited reduced intracellular growth in RAW264.7 cells 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年, 12月12日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 美幸 (KAWANO MIYUKI)

同志社女子大学・薬学部・特別任用助教

研究者番号: 10454498