

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07011

研究課題名（和文）サルモネラの病原性発現におけるポリアミンの役割

研究課題名（英文）Role of host polyamines in Salmonella pathogenesis

研究代表者

岡田 信彦（Okada, Nobuhiko）

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：80194364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ポリアミンは、病原細菌の病原性発現に寄与することが知られている。しかし、細菌感染におけるポリアミンの役割については、in vivoに基づいたエビデンスが乏しく、どの程度、感染性に影響を及ぼすかは不明な点が多かった。そこで、本研究ではマウス感染モデルを用いて、腸管系病原細菌サルモネラの病原性発現におけるポリアミンの役割の解明を試みた。その結果、サルモネラにおけるポリアミン恒常性はその病原性発現に必要であることが明らかになった。宿主よりサルモネラに取り込まれたポリアミンは病原因子の機能発現に必要であった。本研究により、細菌感染におけるポリアミンの新たな役割が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原細菌サルモネラの病原性発現に関わるポリアミン恒常性は宿主からの取り込みに依存しており、エフロルニチン（ジフルオロメチルオルニチン）による宿主ポリアミンの阻害はサルモネラの感染性を抑制した。エフロルニチンはアフリカ睡眠病の治療薬として用いられている承認された薬剤であることから、本研究結果はその適応をサルモネラ感染に拡大する可能性を示唆した。さらに、ポリアミンによる病原因子の制御機構が明らかになることは、ポリアミンおよびそれに関連した分子をターゲットとした新たな抗菌薬（抗感染薬）の開発における分子基盤になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Polyamines are aliphatic polycations that are ubiquitous in almost all living organisms, including animals and microbes. Earlier studies have demonstrated that, in addition to pivotal physiological functions, polyamines are also involved in multiple aspects of bacterial pathogenesis. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an entero- and intracellular-pathogenic bacterium causing life-threatening infections ranging from gastroenteritis to systemic infection. Polyamines have been reported to contribute to *S. Typhimurium* pathogenesis, however, the role of polyamines is not fully understood. In this study, we clarify that *S. Typhimurium* utilizes the polyamines of its hosts in order to infect them. Polyamine homeostasis in *S. Typhimurium* is required for functional expression of virulence factors. These results also suggest that controlling the host polyamine levels could be a promising avenue for treatment of *Salmonella* infection.

研究分野：細菌学

キーワード：ポリアミン サルモネラ マウス感染モデル 病原因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) ポリアミンはほぼ全ての生物に存在し、細胞増殖などの健全な細胞活動に関わる生理活性物質である。
- (2) 細菌において、ポリアミンはその生育には必須ではないが、重要な役割を果たすだけでなく、病原細菌の病原性発現にも寄与する。
- (3) その陽電荷の化学的な性質から、細胞内に存在するポリアミンの多くは陰電荷の核酸、特に RNA と結合し、その転写後翻訳活性に影響を及ぼす。
- (4) 腸管系病原細菌サルモネラにおいて、ポリアミンは III 型分泌機構の遺伝子を含む多くの遺伝子の発現制御に関与し、活性酸素種や活性窒素種に対する酸化ストレス応答に寄与することが報告されていたが、*in vivo*におけるエビデンスが乏しい。

2. 研究の目的

- (1) 腸管病原菌サルモネラの病原性発現におけるポリアミンの役割を明らかにする。
- (2) ポリアミンを制御ターゲットとした新たな細菌感染制御法開発における分子基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 菌増殖試験

LB あるいは M9 最小培地にネズミチフス菌を植え替え(希釈)、継時的に 660 nm 波長の吸光度を測定した。

(2) サルモネラ腸炎モデル

6~10 週齢の C57BL/6 マウスに、ストレプトマイシン (25 mg/mouse) を経胃接種し、その 24 時間後に LB 液体培地で培養したネズミチフス菌を経胃接種により感染させた (1×10^8 cfu/mouse)。感染したマウスより糞便を回収し、リン酸緩衝液で懸濁した後、さらに同液で段階希釈したものを LB 寒天培地に塗布した。37 °C にて一夜培養し、生育したコロニー数より糞便(腸管内容物)中におけるネズミチフス菌の生菌数を算出した。また、頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、盲腸と脾臓を摘出し、盲腸内容物中および脾臓中のネズミチフス菌の生菌数を算出した。腸炎の強度を評価するために、糞便中の炎症マーカーであるリポカリン 2 を ELISA 法にて定量測定した。

(3) 培養細胞株を用いた細胞侵入および細胞内増殖試験

上皮細胞様株 HeLa およびマクロファージ様株 RAW264.7 にネズミチフス菌を感染させ、一定時間培養した。ゲンタミシン入りの培地に置換し、細胞外菌を殺菌した後、リン酸緩衝液で洗浄した。1% Triton 処理液から、細胞内生菌数を決定した。細胞侵入試験では、接種菌数に対する細胞内生菌数を決定し、細胞侵入率を算出した。また、細胞内増殖試験では、感染 2 時間後と 20 時間後の細胞内生菌数を比較し、菌増殖率を算出した。

(4) 定量的逆転写 PCR による遺伝子発現解析

マウスの脾臓より全 RNA を抽出し、それぞれの遺伝子の特異的プライマーを用いた定量的逆転写 PCR により遺伝子発現レベルを決定した。

4. 研究成果

ポリアミン恒常性はネズミチフス菌の増殖性に影響を及ぼす

ネズミチフス菌の増殖におけるポリアミンの役割を明らかにするために、ポリアミン生合成に関わると予想される遺伝子が全て欠失した変異株、ポリアミンの取り込みに関わるトランスポ

ーター遺伝子の変異株および、生合成遺伝子およびトランスポーター遺伝子の全てが破壊された変異株（以下、ポリアミン変異株とする）を作製した。まず、LB 培地を用いた増殖試験試験を行なった結果、それぞれの変異株は野生株と同様な増殖性を示した。一方、M9 最小培地では、それぞれの変異株は野生株と比較し、その増殖性が減弱した。これは、培地中にポリアミンのプトレッシンやスペルミジンを加えることにより、回復したことから、取り込みによるポリアミン恒常性はネズミチフス菌の増殖に影響を及ぼすことが明らかになった。このポリアミン添加による増殖性の回復は、ポリアミン変異株でも認められたことから、ネズミチフス菌では未知のトランスポーターによりポリアミンを取り込んでいることが推測された。

ネズミチフス菌のポリアミン変異株は、マウスに対する感染性が減弱する

ネズミチフス菌の病原性発現におけるポリアミン恒常性の役割を明らかにするために、マウス感染モデルを用いた病原性評価を行った。その結果、ポリアミン変異株のマウス定着活性は野生株と比較し、著しく減弱した。また、炎症マーカーである糞便中のリポカリン 2 量を測定することにより、誘導された炎症レベルを比較したところ、ポリアミン変異株の炎症誘導能が減弱していた。定着活性および炎症誘導能のどちらも、1% スペルミジン飲水に置き換えることにより、回復した。これらの結果より、ネズミチフス菌の取り込みによるポリアミン恒常性は本菌のマウスに対する病原性発現に必要であることが明らかになった。

ネズミチフス菌のポリアミン変異株は、細胞内侵入および細胞内増殖活性が減弱する

ネズミチフス菌は細胞内へ侵入・生残し、増殖するが、これは本菌のビルレンス形質である。そこで、ポリアミン変異株におけるこれらのビルレンス形質を野生株と比較した。その結果、ポリアミン変異株の細胞内侵入性および増殖性は共に、野生株と比較して、減弱した。これは、菌培養液あるいは細胞用培地にスペルミジンを添加することにより、回復した。これらの結果は、ネズミチフス菌のポリアミン恒常性は本菌の細胞内侵入性および増殖性に必要であることが明らかになった。

宿主ポリアミン合成阻害剤は、ネズミチフス菌のマウス定着活性を抑制する

エフロルニチン（DFMO）は、宿主オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）の阻害剤であり、ポリアミン合成を阻害する。そこで、1% DFMO 飲水したマウスにネズミチフス菌を感染させ、その定着活性について、DFMO を含まない飲水の対照群のものと比較した。その結果、DFMO 飲水により、ネズミチフス菌の定着活性は有意に減弱した。さらに、DFMO 処理したマクロファージ様細胞 RAW264.7 における増殖能を処理していないものと比較した結果、DFMO 処理群の RAW264.7 における増殖能は減弱した。以上の結果より、宿主の合成阻害によるポリアミンレベルの低下は、ネズミチフス菌の感染性を減弱させることが明らかになった。これは、DFMO 処理によるネズミチフス菌の細胞内増殖能の減弱が一因であると推測された。

ネズミチフス菌の感染は、宿主のアルギナーゼ活性を高めることにより、宿主ポリアミン量を増加させる

宿主細胞はアルギニンを取り込み、それをアルギナーゼによりオルニチンと尿素に代謝する。このオルニチンは ODC によりプトレッシンとなる。プトレッシンはスペルミジン合成酵素（SRM）により、スペルミジンに変換される。そこで、ネズミチフス菌感染によりマウスのポリアミン量およびポリアミン合成に関わるこれらの因子をコードする遺伝子の発現レベルを調べた。まず、

ネズミチフス菌の感染マウスにおける糞便中および脾臓内のポリアミン量について、感染していない対照マウスのもものと比較したところ、感染マウスのポリアミン量は糞便中および脾臓内のどちらにおいても有意に増加した。そこで、アルギニン取り込みに関連する遺伝子 (*Slc7a1* および *Slc7a2*)、アルギニン代謝に関わるアルギナーゼ遺伝子 (*Arg-1* および *Arg-2*) およびポリアミン合成に関わる遺伝子 (*ODC* および *SRM*) の発現レベルを比較した結果、*Arg-1* および *Arg-2* の発現レベルがネズミチフス菌感染群で有意に上昇した。そこで、アルギナーゼ酵素活性を産生される尿素を指標に評価した結果、脾臓内のアルギナーゼ活性は感染マウス群で有意に上昇していた。これらの結果より、ネズミチフス菌の感染はアルギナーゼの発現活性を上昇させ、それによって宿主内のポリアミン量が増加することが示唆された。これは、ネズミチフス菌が戦略的に宿主ポリアミンを上昇させ、それを搾取することにより、自身のビルレンスを高めている可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yusuke Hoshino, Taro Sakamoto, Naoki Sudo, Masahiro Ito, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada, Tsuyoshi Miki	4. 巻 90 (7)
2. 論文標題 Fatty acid homeostasis tunes flagellar motility by activating phase 2 flagellin expression, contributing to Salmonella gut colonization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00184-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00184-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Tsuyoshi, Hoshino Yusuke, Sudo Naoki, Ito Masahiro, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko	4. 巻 90
2. 論文標題 <i>uvrY</i> Deletion and Acetate Reduce Gut Colonization of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli by Decreasing Expression of Type 1 Fimbriae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00662-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00662-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Tsuyoshi, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko, Ito Masahiro	4. 巻 NA
2. 論文標題 Possible link between colonization of the gastrointestinal tract by <i>Citrobacter rodentium</i> in C57BL/6 mice and microbiota composition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Tsuyoshi, Ito Masahiro, Okada Nobuhiko, Haneda Takeshi	4. 巻 NA
2. 論文標題 The CpxRA two-component system of adherent and invasive <i>Escherichia coli</i> contributes to epithelial cell invasion and early-stage intestinal fitness in a dysbiotic mouse model mediated by type 1 fimbriae expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00132-24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Miki, Yusuke Hoshino, Taro Sakamoto, Naoki Sudo, Masahiro Ito, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada
2. 発表標題 Fatty acid homeostasis tubes flagellar motility, contributing to Salmonella gut colonization
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------