

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25年 5月24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390080

研究課題名（和文）サルモネラエフェクターの網羅的解析と宿主応答の分子基盤

研究課題名（英文）Studies on *Salmonella* infection and host response using an accurate prediction system for screening effectors

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

研究成果の概要（和文）：

サルモネラ感染後の宿主高次機能の多岐にわたる変化は、未だ同定されていない多数の病原分子（エフェクター）と標的分子の存在を強く示唆している。本研究は、申請者らが開発したインフォマティクス支援インタラクトーム網羅的解析法によって同定された新規エフェクター候補について、病原性状さらに感染細胞における宿主応答の分子機構解明に取り組んだ。その結果、新規のエフェクターとして同定された GogA、GtgA2 は、感染初期に *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1)-Type 3 secretion system (T3SS)により宿主細胞に輸送され、感染マクロファージ内で Caspase8 活性化を導くことが明らかとなった。GogA、GtgA2 は caspase-8 の 2 面性（サイトカインの誘発とアポトーシスイニシエーター）制御を介した感染細胞の生死を決定するキーエフェクターであると考えられる。さらにエフェクター候補 STM1239 は SPI1-T3SS と SPI2-T3SS により輸送され、マクロファージ内では細胞質に存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

A broad range of pathogenic bacteria translocate a repertoire of effector proteins using the type 3 protein secretion system (T3SS) and enact the virulence program of the bacteria by directly interacting with host cell pathways. In this study, we have constructed an accurate prediction system for screening effectors on a genome-wide scale. Using this system, five candidates of novel effectors of *Salmonella* could be listed. Among them, GogA and GtgA2 were demonstrated to activate caspase-8 which has two opposing functions namely as an initiator of an apoptosis and in a non-apoptotic role including induction of the pro-inflammatory response. Another effector candidate, STM1239 was shown to be injected into macrophage cytoplasm by SPI1- and SPI2-T3SSs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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・エフェクター・宿主応答・バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

サルモネラ属細菌病原戦略の分子基盤は、エフェクターと呼ばれる病原分子と宿主細胞標的分子間の相互作用にある。すなわちエフェクターが T3SS 等の蛋白分泌システムによって宿主細胞に輸送された後、宿主の機能分子に作用して高次機能を攪乱し、侵入・拡散・細胞内寄生・炎症反応の誘発や抑制・ピロトーシスやアポトーシス等の細胞死の誘発等、種々の感染現象が引き起こされる。これまでに遺伝子ランダム破壊法に基づいて多くのエフェクターが同定されてその機能が報告されてきたが、感染後に起こる宿主高次機能の多岐にわたる変化は未同定のエフェクターと未同定の標的分子が多数存在することを強く示唆していた。

2. 研究の目的

申請者らは長年にわたり、サルモネラの病原性制御機構と宿主応答の分子機構に関する研究を展開してきた。本研究では、独自に開発した網羅的解析法を用いて、サルモネラ新規エフェクターを同定し、エフェクターと宿主分子間相互作用に基づいたサ

ルモネラ感染と宿主応答分子機構の解明に取り組む。

3. 研究の方法

- (1) インフォマティクス支援インタラクトーム網羅的解析法の樹立とサルモネラエフェクターのリスト化：Sato et al. *BMC Bioinformatics* 12:442 (2011)に公表した。
- (2) マクロファージ:RAW264.7マクロファージ細胞を使用した。
- (3) caspase-8 活性測定：Caspase®-Glo8 assay kit (Promega) を用いた。
- (4) サイトカイン測定：IL1βの細胞内レベルは、Mouse IL1β ELISA Ready-SET-Go (eBioscience)を用いて測定した。
- (4) エフェクターの宿主細胞内輸送：GogA-3FAGあるいはGtgA2-2HAを発現するサルモネラをマクロファージに感染させ、共焦点顕微鏡下で観察した。又、当研究室で改良した cya-translational fusion assay system を用いて宿主細胞への移行を検討した。

4. 研究成果

(1) GogA, GtgA2 の機能解明

GogA, GtgA2 は SPI1-T3SS により感染細胞に輸送されるエフェクターであることが明らかとなった(図1)。GogA, GtgA2 はマクロファージ細胞内で Caspase-8 を活性化し IL-1 β などの炎症性サイトカインを誘発することを明らかにした(図2)。さらに GogA, GtgA2 発現の脱抑制は、Caspase-8 を過剰に誘発し、Caspase-9, Caspase-3 の誘発を経て細胞をアポトーシスに導くことを明らかにした(図3)。Caspase-8 は炎症の誘発とアポトーシスの誘導という細胞の生死に関し2面性を有している。GogA, GtgA2 は Caspase-8 の活性化を介して、サルモネラ感染細胞の運命を決定するキーエフェクターと位置付けることができる。

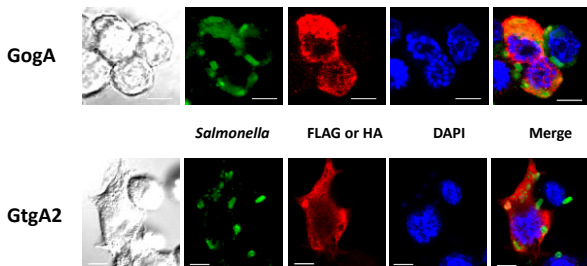


図1 GogA-FLAGあるいはGtgA2-HA発現サルモネラ感染マクロファージ細胞の共焦点顕微鏡観察

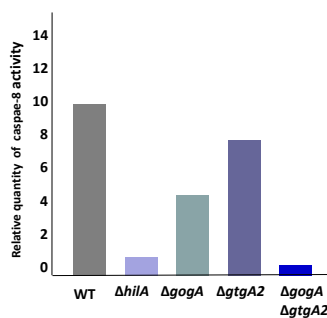


図2 サルモネラ感染によるマクロファージCaspase-8誘導

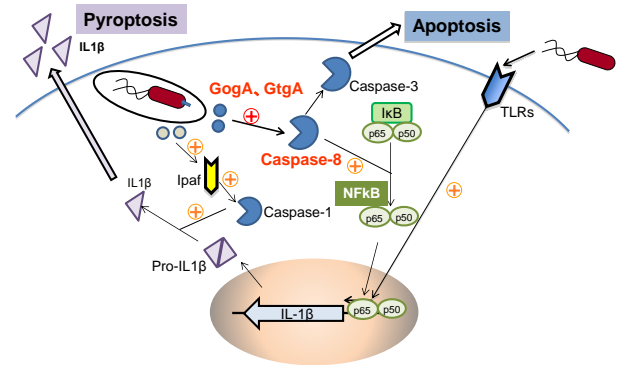


図3 新規エフェクターGogAとGtgA2によるマクロファージ炎症・細胞死誘導機構

(2) 新規エフェクターSTM1239 の輸送

STM1239 の宿主細胞への輸送システムについて検討した。サルモネラの多くのエフェクターは、SPI1-T3SS と SPI2-T3SS により宿主細胞に注入される。SPI1-T3SS は主に感染初期に機能する上皮細胞侵入や炎症応答制御に関連するエフェクターを、SPI2-T3SS は主に感染中盤以降のマクロファージ内増殖に参与するエフェクターを輸送すると報告されてきた。SPI1 と SPI2 をそれぞれ欠損させたサルモネラを用いて STM1239-cya transfusion の宿主細胞への輸送を検討した結果、STM1239 の輸送には両 T3SS が関与することが明らかとなった(図4)。

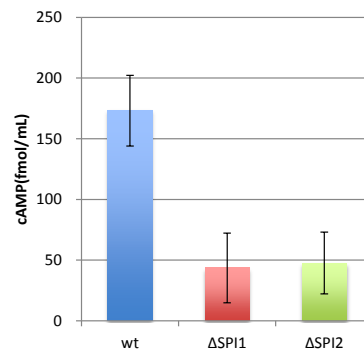


図4 STM1239-cya fusionのマクロファージ細胞質輸送におけるSPI1欠損、SPI2欠損の影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Yamamoto T. Studies on the molecular mechanism of *Salmonella* infection. ***Antibiotics Chemother.***29: 473-483,2013, 査読無
2. Takaya A. Regulation of *Salmonella* pathogenesis by effectors of *Salmonella* pathogenicity island 1 and 2. ***Antibiotics Chemother.***29: 62-71,2013, 査読無
3. Takaya A., Erhardt M, Karata K, Winterberg K,Yamamoto T and Hughes K. YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. ***Mol. Microbiol.*** 83: 1268-1284,2012,査読有
4. 山本友子. 細胞内寄生性細菌のストレス応答と病原性発現制御機構に関する研究 ***日本細菌学雑誌*** 66: 517-529,2011,査読無
5. Sato Y., Takaya A and Yamamoto T. Meta-analytic approach to the accurate prediction of secreted virulence effectors in gram-negative bacteria. ***BMC Bioinformatics*** 12:442,2011,査読有
6. Kitagawa R, Takaya A and Yamamoto T. Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. ***Microbiology*** 157:3094-3103,2011,査読有
7. Takaya A., Kitagawa N, Kuroe Y, Endo K., Okazaki M, Yokoyama E, Wada A and Yamamoto T. Mutational analysis of reduced telithromycin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan. ***FEMS Microbiol. Lett.*** 307: 87-93,2010, 査読有
8. Kitagawa R, Takaya A., Ohya M, Mizunoe M, Takade A, Yoshida S, Isogai E and Yamamoto T. Biogenesis of

Salmonella enterica serovar Typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. ***J. Bacteriol.***192:5645-5656 ,2010,査読有

[学会発表] (計 31 件)

1. Yamamoto T. The SPI1-flagellar regulatory circuit of *Salmonella*: negative regulation by YdiV, a dual-function protein induced under nutrient starvation. 47th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Chiba 2012.12.12-14
2. Takaya A., Sato Y., Shouji T, Yamamoto T. Inactivation of RlmA^{II} confers the telithromycin-resistance to *Streptococcus pneumoniae*. II International Conference on Antimicrobial Research. Lisbon ,Portugal 2012.11.21-23
3. 高屋明子., 佐藤慶治., 山本友子. サルモネラ YdiV の 2 つの機能によるべん毛マスターレギュレーターFlhD₄C₂活性制御 第 95 回日本細菌学会関東支部総会 東京 2012.10.11-12
4. 山本友子. サルモネラによるマクロファージ細胞死誘導とその制御 第 79 回日本細菌学会北海道支部総会 帯広 2012.8.28-29
5. Shibata T , Takaya A., Sato Y., Yamamoto T. Mechanism of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan. 第 85 回日本細菌学会総会 長崎 2012.3.29
6. Sato Y., Takaya A., Yamamoto T. A study on the *Salmonella* secreted protein STM1670 identified by machine learning approach.第 85 回日本細菌学会総会 長崎 2012.3.29
7. Takaya A., Sato Y., Yamamoto T. The antibiotic mechanism of telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*.第 85 回日本細菌学会総会 長崎 2012.3.29
8. Sato Y., Takaya A., Yamamoto T.

- Bioinformatics-assisted identification of effectors based on feature analysis of secreted signal. 第 85 回日本細菌学会総会 長崎 2012.3.28
9. Yamamoto T. Control of *Salmonella* pathogenicity island expression on the stress-induced regulatory loop within macrophages. Rudbeck Life Science Symposium, Uppsala, Sweden 2012.2.16-17
 10. Takaya A. Control of inflammatory response and macrophage cell death by *Salmonella*. Rudbeck Life Science Symposium, Uppsala, Sweden 2012.2.16-17
 11. Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. An integrated bioinformatics approach for the identification of novel effectors in *Salmonella*. 46th Conference of US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kolkata, India 2011.12.7
 12. 山本友子 細菌が病原性をコントロールするしくみ 微生物研究会 松戸 2011.11.12
 13. Takaya A, Sato Y, Yamamoto T. YdiV is a novel adaptor protein for ClpXP protease. 9th International Conference on AAA Proteins, Kumamoto 2011.11.8
 14. Yamamoto T. Bacterial strategies hijacking host cell functions for a successful function. Joint symposium of Seoul National University and Chiba University. Seoul, Korea 2011.10.14
 15. 高屋明子, 曾根佳央里, 佐藤慶治, 山本友子 肺炎球菌のテリスロマイシン高度耐性化機構 第 94 回日本細菌学会関東支部総会 東京 2011.10.6-7
 16. Ito M, Shibata T, Takaya A, Sato Y, Endo K, Yamamoto T. Telithromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinically isolated between 2009 and 2010 in Japan. IUMS Congress, Sapporo 2011.9.9
 17. Sone K, Takaya A, Sato Y, Endo K, Yamamoto T. Combination of *erm* gene and mutation in riboproteins results in high-level telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. IUMS Congress, Sapporo 2011.9.9
 18. 山本友子 細胞内寄生性細菌のストレス応答と病原性発現制御機構に関する研究 第 84 回日本細菌学会総会 札幌 2011.9.8
 19. Yamamoto T. Novel *Salmonella* effectors capable of activating caspase-8 in macrophages, leading to induction of a pro-inflammatory response. IUMS Congress, Sapporo 2011.9.7
 20. Takaya A, Sato Y, Yamamoto T. Novel *Salmonella* effectors, GogA and GtgA2 are involved in induction of pro-inflammatory response within murine bone marrow-derived macrophage cells. IUMS Congress, Sapporo 2011.9.7
 21. Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. Meta-analysis based prediction system of secreted virulence effectors. IUMS Congress, Sapporo 2011.9.7
 22. Samizo C, Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. Identification of novel *Salmonella* effectors by genome-wide *in silico* screening. IUMS Congress, Sapporo 2011.9.7
 23. Kitagawa R, Takaya A, Yamamoto T. Acceleration of membrane vesicle release by PagC in *Salmonella*. 第 33 回日本分子生物学会年会 神戸 2010.12.7-10
 24. Fujinawa M, Takaya A, Yamamoto T. Novel posttranscriptional control mechanism of flagellar regulator, FlhDC in *Salmonella*. 第 33 回日本分子生物学会年会 神戸 2010.12.7-10
 25. Yamamoto T. Novel *Salmonella* effectors capable of activating caspase-8 in macrophages. 45th Conference of US-Japan Cooperative

- Medical Science Program, Kyoto
2010.12.7
26. Takaya A, Yamamoto T. Molecular analysis of reduced telithromycin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* collected clinically between 2005 and 2009 in Japan. I International Conference on Antimicrobial Research. Valladolid, Spain 2010.11.5-6
 27. 原 貴史, 高屋明子, 山本友子 サルモネラ感染におけるマクロファージ Caspase-8 活性化による細胞死制御 第 93 回日本細菌学会関東支部総会 東京 2010.10.21
 28. 谷川育己, 高屋明子, 山本友子 サルモネラ SPI1 転写制御因子 HiiD によるベンモレギュロン制御機構 第 93 回日本細菌学会関東支部総会 東京 2010.10.21
 29. Yamamoto T. Host-*Salmonella* Interaction: Control of inflammatory response and host cell death by *Salmonella* Pathogenicity Island 1. The 5th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases, Taiwan, China 2010.9.24
 30. Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. Bioinformatics-assisted identification of novel virulence effectors in *Salmonella*. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji 2010.9.8-10
 31. Yamamoto T.: Bacterial strategies for hijacking of host cells to cause systemic disease. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji 2010.9.7

[図書] (計 2 件)

1. 薬科微生物学第 6 版 加藤文男 編 pp85-124 丸善 (2013)
2. 微生物学—基礎から臨床へのアプローチ 神谷 茂 編 pp179-211 メディカルサイエンスインターナショナル (2012)

[その他]

ホームページ

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/index.html>

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：600110342

(2) 研究分担者

高屋 明子 (TAKAYA AKIKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：80334217

佐藤 慶治 (SATO YOSHIHARU)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00554586