

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659218
 研究課題名（和文）ターゲット・エッジ指向型スクリーニングに基づくサルモネラ病原性分子機構の解明
 研究課題名（英文）Study on the molecular mechanism of *Salmonella* pathogenicity using a target・edge-oriented screening of 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）：

病原細菌の多くは、進化した病原因子輸送装置 Type III protein secretion system を使って多様に分化した一群の病原因子（エフェクター）を宿主細胞に輸送し、細胞高次機能を攪乱、収奪する。サルモネラではこれまで 38 種のエフェクターが同定されているが、感染細胞の多岐にわたる変化は、いまだ同定されていない多数のエフェクターの存在を強く示唆していた。本研究では、エフェクター機能解析支援の新たな技術として、エフェクターが宿主因子を模倣するという特性に着目して、宿主因子(ターゲット)や相互作用(エッジ)の側からアプローチする全く新しいエフェクター機能解析技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：

A broad range of pathogenic bacteria translocate a repertoire of effector proteins using the type III protein secretion system and enact the virulence program of the bacteria by directly interacting with host cell pathways. The effectors do not have well-conserved sequence and do not have any kind of common identifiable signal sequence to target them for secretion. This makes it very difficult to identify novel effectors. In this study, we have established a novel system to support the functional analysis of virulence effector, in which the function can be analyzed from the side of host factor in target pathway or from the host's protein-protein interaction targeted by virulence effector. In this system, the function of virulence effector can be predicted and assumed function can be assessed based on the mimicry features widely observed in most of virulence effectors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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・病原性・バオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

病原細菌の多くは、進化した病原因子輸送装置 Type III protein secretion system を使って多様に分化した一群の病原因子（エフェクター）を宿主細胞に輸送し、細胞高次機能を攪乱、収奪する。サルモネラではこれまで 38 種のエフェクターが同定されているが、感染細胞の多岐にわたる変化は、いまだ同定されていない多数のエフェクターの存在を強く示唆していた。申請者らは新規エフェクター発見を可能にするインフォマティクス支援インタラクティブ解析法を立ち上げ、昨年までにそのエフェクター指向型スクリーニング法を開発して新規エフェクター候補をリスト化し、その中の 2 種の分子 GogA, GtgA2 についてはその機能を実証した。

2. 研究の目的

本研究は、感染宿主の機能変化から予測された宿主標的分子のプロファイリングに基づくターゲット・エッジ指向型スクリーニング法を構築して、新たな視点からエフェクターを探索・機能解析し、エフェクターと標的分子の相互作用を軸としたサルモネラ病原性分子機構の解明に取り組むものである。

3. 研究の方法

(1) エフェクター-宿主因子間 3 次元構造の類似性検索技術の開発

マウスにおける構造既知の遺伝子セットとして、PDB(Protein Data Bank)に登録されている 2,179 の遺伝子セットを用意した。3 次元構造情報から 2 次元構造アサインメントプ

ログラム DSSP によりヘリックス、 β シート、コイル構造から構成される 2 次元構造配列を割り当てた。エフェクター側の配列は現在報告されている 40 のサルモネラエフェクターの配列セットを用意した。1 次元アミノ酸配列から 2 次元構造予測ツール Prof を用いて 2 次元配列に変換し、PDB 構造の DSSP 出力結果と配列類似性比較を行なった。本類似性検索の有効性は、3 次元構造が明らかとなっており且つ宿主ターゲット因子との構造類似性が報告されている SptP、SifA、SopA の 3 つのサルモネラエフェクターを対象として評価を行なった。

(2) 進化解析に基づく予測機能モチーフの信頼性評価

今回我々は、全てのエフェクターのサルモネラオルソログ遺伝子を NCBI database から収集して PAML 解析パッケージの最尤法解析ツール CODEML により比較進化解析を行ない、サルモネラ属菌の進化の過程でエフェクター配列上に起きた置換イベントを推定した。ここで、サルモネラの病原性を低下させるような置換は集団中から排除される傾向にあると考え、機能モチーフとそれ以外の部位、さらには構造のフォールドに重要なタンパク質内部に埋没したサイトとそうでない外側に露出したサイト上に起きる置換に起こり易さの違いが有るか検証した。

4. 研究成果

(1) 3 次元構造の模倣性探索によるハイジャック部位の推定： 2 次元構造予測ツール Prof を用いてエフェクター配列を 2 次元構造配列へと変換し、PDB database に登録され

ているマウス由来のエントリー2,179 構造に対してDSSPを適用して構築した2次元配列セットとの間の相同性検索を行なった。ここで、H(Helix)、C(コイル)、E(ベータシート)で表現される2次元配列をアミノ酸配列に見立て、アラインメント構築ツール(Needle)を用いてアラインメントを作製し、最終的なアラインメントにおける一致率で評価を行った。ここで、アラインメント構築における各種パラメータが予測精度に関わってくると考え、グリッドパラメータ評価技術により効果的なアラインメント作製パラメータを網羅的に検証したところ、ギャップ構築ペナルティは開始ペナルティ(gap_open)が100、拡張ペナルティ(gap_extention)が2という設定で、アラインメント作製時のギャップ使用を厳しく制限することで、精度の高い相同性の同定が可能であることが判明した。この様に最適化された手法を宿主因子との構造模倣性が報告されているSptP、SifA、SopAの1次元配列に適用し、マウスPDB構造の中から正解を導くことができるかを検証した。SptPとマウス2,179構造との比較で最も類似性が高いと算出された宿主因子はRPTPa(PDB:1P15、2次構造一致率71.2%)であった。この2つのアミノ酸配列のアラインメントからは11.5%の一致率しか得られず、従来の1

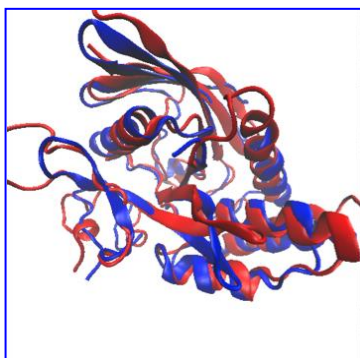


図1: RPTPa(赤)とSptP予測3次元構造(青)の重ね合わせ。SptPの結晶構造(正解構造)とのRMSDは1.3Åであり、精度の高い構造予測に成功した。

次元配列の相同性検索ではこの類似性は検出されない。本手法でSptPの構造を予測したところ、RPTPaの構造とほぼ完全に一致し、SptPの構造

とRMSD 1.3Åの範囲での予測に至り、正解構造を導いた(図1)。このRPTPaは、GTPase Racとの相互作用を介してアクチン細胞骨格のリモデリングに関与しているとの報告があり、本類似性検索の結果はSptPの機能及びターゲットパスウェイの同定に結びつく有益な情報である。また、SifAの検索結果においては、上位2番目に宿主GEF(Guanine nucleotide Exchange Factor)因子FARP2(PDB code 4GYV)との類似性が予測され、SifAのGTPaseサイクルへの関与を同定するのに役立つ。SopAについてはSopAと宿主因子E3リガーゼE6-APとの類似性を見出すことはできなかった。SopAに関しては、主にαヘリックスとコイル構造のみで構成される複雑性に欠く構造であるため、2次元構造の配列のみからでは3次元構造の類似性の検出が難しい。しかし、後述する進化解析による予測3次元構造の評価技術を組み合わせることで、上位に予測されたが間違っている予測の除去と予測された構造類似性の評価が可能であり、さらなる予測精度の向上が見込める。このように一部の立体構造の類似性検索としては課題が残されているが、本手法により、従来の1次元配列ベースでの相同性検索では全く検出することのできないエフェクター⇄宿主因子間構造類似性の予測(ターゲット同定支援)、さらにはエフェクター相互作用部位の高精度予測(エッジ同定支援)が可能であることを証明した。

(2) 機能モチーフの進化パターン解析による機能推定: 公共データベースに全ゲノムが登録されている45のサルモネラ属菌ゲノム配列を用いてサルモネラ全4,510遺伝子におけるオルソログ配列のマルチプルアラインメントを構築し、最尤法による遺伝子進化解析を行なった。全遺伝子について、アミノ酸配列の変化を起こす塩基置換である非同義

表 1: エフェクター機能モチーフの有無における進化速度の偏り

遺伝子	モチーフ有り 機能モチーフ (サイト)	モチーフ有り		モチーフ無し		dN/dS (機能 有り)	dN/dS (機能 無し)	p-value
		開始点	終了点	開始点	終了点			
<i>sptP</i>	Y.Phosphatase	478	534	1	300	0.13	0.42	0.001
<i>sopB</i>	Y.Phosphatase	441	470	1	300	0.10	0.29	0.003
<i>sipB</i>	Effector Binding	321	409	1	300	0.03	0.15	2.66E-05
<i>sopE2</i>	Binding with CDC42	165	198	1	150	0.06	0.21	2.40E-07
<i>sopA</i>	Substrate Binding	563	578	1	162	0.20	0.59	0.428
<i>spvB</i>	ribosyl-transferase	391	554	1	300	0.20	0.34	0.351
<i>sseI</i>	Protease (PDB:4G29)	150	312	1	150	0.08	>10	0.045

置換とアミノ酸置換を起こさない同義置換イベント及びそれらのサイトごとの割合の比(dN/dS)を算出し、特定の領域における進化速度の指標とした。同義置換の多くはアミノ酸配列を変化させないことからタンパク質機能に影響を与えないことが多いが、アミノ酸置換が許容されないサイトにおいては非同義置換がおこりにくいため、機能的に重要なサイトにおいてdN/dSの値は0に近づく。

まずエフェクター群と遺伝子全体とで遺伝子あたりのdN/dSの値に違いが見られるか検討したところ、遺伝子全体と比べて40件の既知エフェクター遺伝子は非同義置換が起こり易く、進化速度が速い傾向にあった(dN/dSの平均値:遺伝子全体=0.2、エフェクター40件=0.42)。次に、機能性部位が判明している7つのエフェクターについて、機能部位とそれ以外との間で進化速度の差があるかどうか検証したところ、機能部位の進化速度はそれ以外の部位と比べ、有意に低かった(表1)。また、3次元構造が判明している6件のエフェクターについて、フォールドに重要な部位(内部に完全に埋没しており、他のサイトと相互作用しているサイトをDSSPプログラムで抽出)と、構造のフォールドに重要でない溶媒に露出したサイトの間で進化速度を比較したところ、フォールドに重要な内部に埋没したサイトにおいては、それ以外のサイトと比べ進化速度が遅い傾向にあった(表2)。*sopE2*と*sipA*に関してはこの偏りに関して統計的に有意な差を得ることは出来なかったが、今後も多くのサルモネラ属菌ゲノムの配列決定が進むと考えられ、より鮮明な差を検出することが可能であろう。これらの解析

結果は、エフェクターは素早く進化するが、宿主細胞機能の攪乱のために必要なフォールド骨格を維持するためのサイトは高度に保存されていることを示している。通常サルモネラ属菌内での比較解析においては機能性部位を浮き彫りにする程の有効な進化イベント数が得られないことが多いが、進化の速いエフェクターに関しては比較的多くのアミノ酸置換のデータを得ることができ、予測された機能モチーフとそれ以外のサイトの間で有意な進化速度の差があるかを検証できる。本手法により、予測された機能モチーフの進化速度が有意に遅いかどうか、もしくは宿主因子との模倣性検索をベースに予測された3次元立体構造についてフォールドに重要なサイトの進化速度が有意に遅いかどうかを検証することで、予測信頼度の評価が可能である。

表 2: エフェクター3次元構造上における進化速度の偏り

遺伝子	PDB-code	置換が起きるサイト		結晶構造中の全サイト		Fisher's Exact Test p-value
		埋没サイト数	全体数	埋没サイト数	全体数	
<i>sopA</i>	3SY2:A	13	127	141	609	0.003
<i>sifA</i>	3HW2:A	19	143	68	308	0.041
<i>sspH2</i>	3G06:A	21	206	140	601	2.02E-04
<i>sptP</i>	1G4U:S	12	81	102	360	0.027
<i>sopE2</i>	1R9K:A	9	70	35	168	0.151
<i>sipA</i>	2FM8:C	9	89	36	220	0.145

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6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. 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
 6. 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
- [学会発表] (計 27 件)
1. Yamamoto T. Host-*Salmonella* interaction: Control of inflammatory response and macrophage cell death by novel effectors. 第 195 回日本獣医学会学術集会 東京 (2013.3.29)
 2. 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)
 3. 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)
 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. 佐藤慶治, 高屋明子, 山本友子 分泌シグナルの特徴解析に基づくサルモネラ新規エフェクターの同定 第 85 回日本細菌学会総会 長崎 (2012.3.28-29)
 6. 佐藤慶治, 高屋明子, 山本友子 機械学習法により同定されたサルモネラ分泌タンパク質 STM1670 に関する研究 第 85 回日本細菌学会総会 長崎 (2012.3.28-29)
 7. 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)
 8. Takaya A. Control of inflammatory response and macrophage cell death by *Salmonella*. Rudbeck Life Science Symposium, Uppsala, Sweden (2012.2.16-17)
 9. 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)
 10. 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)
11. 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)
 12. 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)
 13. Yamamoto T. Novel *Salmonella* effectors capable of activating caspase-8 in macrophages, leading to induction of a pro-inflammatory response. IUMS Congress, Sapporo (2011.9.7-9)
 14. 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 (2011.9.7-9)
 15. Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. Meta-analysis based prediction system of secreted virulence effectors. IUMS Congress, Sapporo (2011.9.7-9)
 16. Samizo C, Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. Identification of novel *Salmonella* effectors by genome-wide *in silico* screening. IUMS Congress, Sapporo (2011.9.7-9)
 17. 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 (2011.9.7-9)
 18. 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 (2011.9.7-9)
 19. 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)
- [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