

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689026

研究課題名(和文)サルモネラエフェクターによるカスパーゼ-8の非アポトーシス活性制御の解明

研究課題名(英文) Salmonella effector GogA induces caspase-8 activation, leading to modulation of proinflammatory response in macrophages

研究代表者

高屋 明子 (Takaya, Akiko)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80334217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円、(間接経費) 5,640,000円

研究成果の概要(和文)：カスパーゼ-8はアポトーシスの実行因子である一方、NF- $\kappa$ B活性化を介した炎症反応惹起に関わる。我々は新規サルモネラエフェクターGogAが感染マクロファージにおいてカスパーゼ-8活性化に関わることを見出した。GogAは感染初期におけるNF- $\kappa$ B活性化、それに続く炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ 発現制御に関与した。GogAによるカスパーゼ-8活性化にはLSm8が必要であった。一方、カスパーゼ-8活性化はGogAの過剰発現だけでは変化しないことから、他の因子の関与が示唆された。サルモネラはGogAの分泌量を制御することによりNF- $\kappa$ Bカスケードを制御し、感染を成立させていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Caspase-8 activation requires tight regulation owing to its two opposing functions, namely as an initiator of apoptosis and in a non-apoptotic role including induction of the pro-inflammatory response. We have demonstrated that a novel Salmonella effector GogA induces caspase-8 activation. The limited caspase-8 activation by GogA is involved in NF $\kappa$ B activation, leading to modulation of proinflammatory cytokines at the early stage of Salmonella infection. However, caspase-8 activation is not involved in induction of pyroptosis. Furthermore, caspase-8 activation by GogA may be required for interaction with LSm8, U6 snRNA-associated Sm-like protein. On the other hand, Salmonella has another effector involving in caspase-8 activation in addition of GogA. These findings together, it is suggested that induction of NF $\kappa$ B activation by the activated-caspase-8 are regulated through translocation of some effectors including GogA, leading to proliferation of Salmonella within host cells.

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 カスパーゼ-8 炎症反応 細胞死 エフェクター

## 1. 研究開始当初の背景

カスパーゼは真核細胞に広く存在するシステインプロテアーゼであり、15種類が同定されている。カスパーゼ-8は細胞のプログラム死“アポトーシス”の実行因子として研究が進んできた(apoptotic function)。一方、カスパーゼ-8が活性化されているにも関わらずアポトーシス誘導とは関係しない細胞機能にも関与することが明らかとなってきた(non-apoptotic functions)。

サルモネラは染色体上にコードされる *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) で構成される3型分泌装置からエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞に送り込むことにより、病原性発揮に必要な小腸上皮細胞からの侵入や宿主自然免疫惹起を誘導する。SPI1は感染段階における宿主環境に依りて厳密に制御されているが、我々はSPI1が脱制御され過剰発現されると、マクロファージのアポトーシスを過剰に誘導することを見出している。マクロファージは宿主内におけるサルモネラが生存・増殖繰り返す寄生先であることから、マクロファージの生死を制御することは、サルモネラの病原性発現に重要な戦略であると考えられるが、宿主体内においてどこで制御されているかについては不明である。

過剰なSPI1によって誘導されるアポトーシスにはカスパーゼ-8活性化が必須であった。又、サルモネラ野生株感染ではアポトーシスは誘導されないものの、カスパーゼ-8が低レベルで活性化されていた。更に我々は、カスパーゼ-8活性化エフェクターとして、GogA、GtgA2を同定していた。しかしながら、GogA、GtgA2によるカスパーゼ-8活性化機構及び野生株におけるカスパーゼ-8活性化の意義については明らかではない。

## 2. 研究の目的

サルモネラがGogA、GtgA2によってカスパーゼ-8活性化を誘導する機構及びその意義について検討した。また、カスパーゼ-8活性化の分子機構を明らかにするため、GogAを用いた酵母2ハイブリッド法によりDdx50、LSm8、Thap7が候補因子として同定していた。これらRNA制御に関するタンパク質である。これまでにウイルス感染においてRNA認識レセプターRIG-Iファミリーを介したカスパーゼ-8活性化について報告されていたが、Ddx50ではRIG-Iとの相同性のある領域が存在していた。そこで候補因子とともに、RIG-Iを介したカスパーゼ-8活性化経路が存在するか検討することで、GogA、GtgA2によるカスパーゼ-8活性化分子機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1)サルモネラ感染におけるカスパーゼ活

性の検討：サルモネラ野生株及び各種欠損株をマウスマクロファージ様細胞RAW264.7細胞、マウス骨髄由来マクロファージに感染させた後、経時的にサンプル調製した。カスパーゼ-8活性は、Caspase-Glo Assay (プロメガ)を用い、ルシフェラーゼ活性を指標とした。ルシフェラーゼはGLOMAX (プロメガ)で測定した。又、カスパーゼ-8、カスパーゼ-3抗体(Cell signaling)を用いて前駆体と活性体を検出した。

(2)サルモネラエフェクターの細胞内移行：Cya融合タンパク質を発現するプラスミドをサルモネラに感染させ、cAMP量を測定することでタンパク質の細胞内移行量を比較した。又、*lac*プロモーター下流にGogAをクローニングしたプラスミドを構築し、サルモネラ野生株及び変異株に導入し、RAW264.7細胞に感染した。細胞を固定化した後、GogA抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。又、細胞を分画し、ウェスタンブロッティングで検出した。

(3)siRNAによる宿主候補因子ノックダウンによるカスパーゼ-8活性化への影響：siRNAはライフテクノロジーズジャパン社から購入した。細胞への導入は、Lipofectamine RNAiMAX (インビトロジェン)を用い、添付資料に基づいて行った。

(4)FRET法による細胞内相互作用の検討：GogAはpTagGFP2-N (evrogen)にクローニングし、GogA-GFPが発現するプラスミドを構築した。Ddx50及びLSm8はpTagRFP- $\alpha$  (evrogen)にクローニング、RFP-Ddx50及びLSm8が発現するプラスミドを構築した。LipofectamineLTXを用いてHeLa細胞にトランスフェクションし、24時間後に共焦点レーザー顕微鏡FV1000(オリンパス)を用いて観察した。

## 4. 研究成果

**(1)サルモネラエフェクターGogAはSPI1レギュロンに属する。**

これまでにマクロファージ様細胞RAW264.7感染でのカスパーゼ-8活性化に関わる因子として、GogA、GtgA2を同定している。2つのタンパク質の相同性は96.9%と非常に高いにも関わらず、カスパーゼ-8活性化に関わる寄与はGogAのほうが強い。また、マウス骨髄由来マクロファージ感染におけるカスパーゼ-8活性化には、GogAのみが関与するとの結果が得られた。GogA、GtgA2は細胞内移行量が異なる可能性を考え、まず野生株におけるGogA、GtgA2の細胞内移行量についてCya融合タンパク質を用いて検討した。その結果、GogAの細胞内移行量が多いことが示された。カスパーゼ-8活性化はSPI1過剰発現株であるLon欠損株で顕著に高くなるこ

とから、Lon 欠損株からの GogA、GtgA2 欠損株の細胞内移行量を野生株と比較したところ、GogA の細胞内移行量は増加するものの、GtgA2 の細胞内分泌量はほとんど変化しなかった。Lon 欠損株では SPI1 発現が大きく上昇していることから、GogA の発現は SPI1 と同調し、SPI1 量に応じて細胞内に移行されることが示唆された。一方、GtgA2 の発現は SPI1 と同調しておらず、GogA に比べて低い。以上の結果より、サルモネラカスパーゼ - 8 活性化は、主に GogA に依存することが明らかとなった。

## (2)GogA は感染初期における NF- $\kappa$ B 活性化に関わる。

野生株感染におけるカスパーゼ - 8 活性化の影響を検討するため、炎症性サイトカイン IL1 産生について検討した。野生株及び GogA 欠損株を RAW264.7 細胞に感染 24 時間後の培養上清中の IL1 量を ELISA により測定したところ、GogA 欠損株感染で優位に低下していた。この減少が発現低下に依存するか検討したところ、GogA 欠損株感染では野生株感染と比較して顕著に低下していた。

IL1 の転写には NF- $\kappa$ B が関わる。そこで、GogA が NF- $\kappa$ B 活性化に関与するか調べるため、感染細胞における NF- $\kappa$ B 阻害タンパク質 i $\kappa$ B 量を比較した (図 1)。その結果、感染 2 時間後では GogA 欠損株感染では野生株感染と比較して増加していた。又、Lon 欠損株感染細胞では、感染 4 時間でも顕著に減少していたが、Lon・GogA 二重欠損株では減少が見られなかった。このことは、GogA が NF- $\kappa$ B 活性化に関与することを示している。

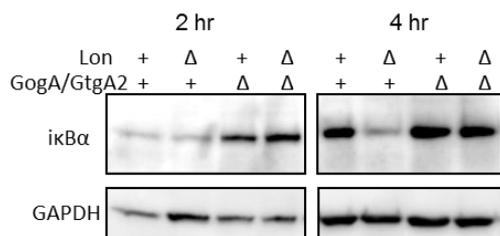


図 1. サルモネラ感染細胞における i $\kappa$ B 量

## (3)カスパーゼ-8 活性はピロトーシス誘導には関与しない。

サルモネラ感染による IL1 産生を伴う炎症反応では、アポトーシスとは異なる細胞死 'ピロトーシス' が誘導される。カスパーゼ - 8 活性化もピロトーシス誘導に関与する可能性を検討した。Lon 欠損株を RAW264.7 感染 4 時間後の細胞死を検討したところ、アポトーシスと共にピロトーシスも活性化されていた。しかしながら、Lon・GogA 二重欠損株ではアポトーシス誘導は顕著に低下するものの、ピロトーシスは Lon 欠損株感染と同レベルであった。このことから、カスパーゼ - 8 活性はピロトーシス誘導に関与しないことが明らかとなった。

## (4)カスパーゼ - 8 活性化には LSm8 が関与する。

GogA のターゲット候補である Ddx50、LSm8、Thap7 及び RIG-I がカスパーゼ - 8 活性化に関与する可能性について検討するため、各遺伝子に対する siRNA を RAW264.7 に導入、16 時間後にサルモネラ Lon 欠損株を感染させ、4 時間後の細胞を回収し、カスパーゼ - 8 活性について調べた。その結果、LSm8 siRNA を導入した細胞で、カスパーゼ - 8 及びカスパーゼ - 3 活性が顕著に低下した (図 2)。このことから、サルモネラ感染におけるカスパーゼ - 8 活性化には、LSm8 が関与することが示唆された。LSm8 は U6 snRNA-associated Sm-like protein であり、RNA と相互作用することで RNA のプロセッシングに関与するが、アポトーシス誘導との関与は不明である。

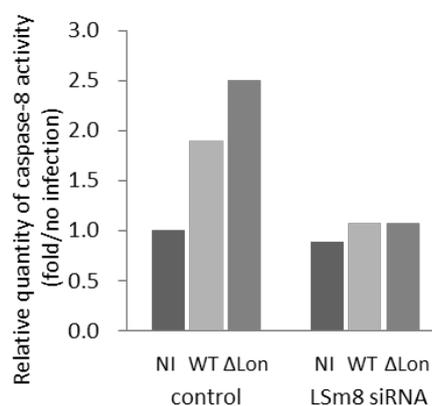


図 2. LSm8 siRNA によるカスパーゼ - 8 活性化

## (5)GogA と LSm8 の相互作用

GogA と LSm8 の相互作用を検討するため、GogA-GFP および RFP-LSm8 を発現するプラスミドを構築、HeLa 細胞に導入し 16 時間後に観察した。GogA-GFP は核近傍に集積しており、RFP-LSm8 は細胞質に発現していた。FRET により観察した RFP-LSm8 は、GogA-GFP のところで検出された (図 3)。このことから、GogA は LSm8 と相互作用されることが強く示唆された。

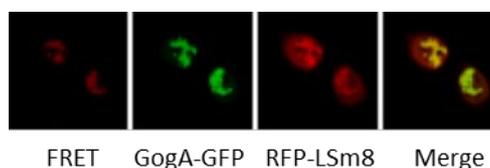


図 3 GogA-GFP と RFP-LSm8 の相互作用

## (6)GogA に加えて他のサルモネラ因子がアポトーシス誘導に関与する。

GogA のみでアポトーシスが誘導されるか検討するため、GogA を発現するプラスミド構築、RAW264.7 への導入を行った。しかしなが

ら、トランスフェクション効率が低く、この方法では確かめることができなかった。そこで、GogA プラスミドを導入したサルモネラ野生株を感染させ、IPTG 添加により GogA を過剰に発現させた。IPTG 添加により GogA の細胞内移行量は顕著に増加していた。しかしながら、カスパーゼ-8 活性化量は IPTG を添加していないときと同程度であった。このことから、GogA 量の増加以外の因子が、カスパーゼ-8 の活性増加に必須であることが示唆された。Lon 欠損株では GogA 以外の SPI1 エフェクターも増加していることから、他の SPI1 エフェクターが GogA と協同して、カスパーゼ-8 活性化に関与すると考えられる。

以上の結果より、サルモネラはマクロファージに感染すると、SPI1 レギュロンに属する GogA を SPI1 依存的に宿主細胞内に移行させる。移行された GogA は LSm8 と相互作用することで、カスパーゼ-8 活性化を誘導する。活性化されたカスパーゼ-8 は NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症性サイトカインの発現を促す。

細菌感染における炎症反応惹起は、多くの病原性細菌で報告されており、この反応では Nod-like レセプターとカスパーゼ-1 によって構成されるインフラマソーム構築が必須である。この炎症反応はピロトーシスを誘導し、細胞内に取り込まれ菌でも外に放出することで殺菌されやすくするため、宿主の防御機構のひとつであるとも考えられる。しかしながら、今回明らかにしたサルモネラエフェクターによるカスパーゼ-8 を介した炎症反応惹起は細胞死を誘導しない。このことから、低レベルでのカスパーゼ-8 活性はサルモネラの増殖の場であるマクロファージを集積させ、自身の生存・増殖の場を確保するという、サルモネラ側の感染戦略の一つと考えることができる。

#### 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7件)

- (1) 高屋明子, 山本友子. サルモネラ感染症のメカニズム. 感染症内科 (査読無) 2 頁未定 (2014)
- (2) Takaya, A. Regulation of *Salmonella* pathogenesis by effectors of *Salmonella* pathogenicity island 1 and 2. *Antibiotics and Chemotherapy* (査読有) **29**: 62-71(2013)
- (3) Yamamoto T. Studies on the molecular mechanism of *Salmonella* infection. *Antibiotics and Chemotherapy* (査読無) **29**: 473-483 (2013)
- (4) Takaya A, Sato Y, Shoji T, Yamamoto T. Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by RImA<sup>II</sup> methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae*

telithromycin susceptible. *Antimicrobial agents Chemother.* (査読有) **57**:3789-3796 (2013)

- (5) Takaya A, Erhardt M, Karata K, Winterberg K, Yamamoto T, Hughes KT: "YdiV : a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex" *Mol Microbiol* (査読有) **83**(6):1268-84 (2012)
- (6) Sato Y, Takaya A, Yamamoto T. Meta-analytic approach to the accurate prediction of secreted virulence effectors in gram-negative bacteria *BMC Bioinformatics* (査読有) **14**. 442 (2011)
- (7) Kitagawa R, Takaya A, Yamamoto T. Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* (査読有) **157** 3094-103 (2011)

[学会発表](計20件)

- (1) 高屋 明子. The function and regulation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 in host cells. 第 87 回日本細菌学会総会(招待講演) 2014 年 3 月 26 日~28 日 東京
- (2) 佐藤 慶治. FliIT enhances the ClpXP-catalyzed degradation of master regulator FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> in *Salmonella*. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26 日~28 日 東京
- (3) 庄司 竜麻. 肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する rRNA 段階的修飾. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26 日~28 日 東京
- (4) 木村 旭. リネゾリド長期投与におけるリネゾリド耐性 Coagulase-negative *Staphylococcus* の出現と耐性化機構. 第 96 回日本細菌学会関東支部総会 2013 年 10 月 31-11 月 1 日、東京
- (5) 小田倉 香織. サルモネラ FliIT による ClpXP プロテアーゼ依存的 FlhC 分解促進機構. 第 96 回日本細菌学会関東支部総会 2013 年 10 月 31-11 月 1 日東京
- (6) 松井 優里. サルモネラ新規エフェクター STM1239 の同定. 第 96 回日本細菌学会関東支部総会 2013 年 10 月 31-11 月 1 日 東京
- (7) Takaya A. FliIT fine-tunes the flagellar biogenesis by enhancing the ClpXP-catalyzed degradation of master regulator FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>. EMBO workshop on AAA+ proteins: from mechanism and disease to targets. 15-19 September, 2013, Neuss, Germany
- (8) 庄司 竜麻. 肺炎球菌リボソームと TEL の

- 相互作用におけるリボソーム内因性修飾酵素の影響. 第7回細菌学若手コロッセウム 2013年8月7-9日 広島
- (9) 前田 侑也. CspC/CspE によるサルモネラの病原性発現制御. 第7回細菌学若手コロッセウム 2013年8月7-9日 広島
- (10) 佐藤 慶治. 協調的認識により調節される AAA+プロテアーゼ ClpXP の基質特異性. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 千葉
- (11) 高屋 明子. ClpXP プロテアーゼによるアダプタータンパク質を介した FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 認識・分解機構. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 千葉
- (12) 佐藤 慶治. 協調的認識により調節される AAA+プロテアーゼ ClpXP の基質特異性. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 千葉
- (13) 高屋 明子. ClpXP プロテアーゼによるアダプタータンパク質を介した FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 認識・分解機構. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 千葉
- (14) 前田 侑也. CspC/CspE によるサルモネラの感染初期マクロファージ殺菌回避機構. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 千葉
- (15) 庄司 竜麻. RImA<sup>II</sup> 不活化に夜肺炎球菌のテリスロマイシン耐性化機構. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 千葉
- (16) 高屋 明子. 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 FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 活性制御. 第95回日本細菌学会関東支部総会 2012年10月10日~12日, 東京
- (17) Takaya A. Identification of *Salmonella* novel effectors by bioinformatic approach. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 2012年9月13日~14日, Korea (招待講演)
- (18) Takaya A. Control of inflammatory response and macrophage cell death by *Salmonella*. Rudbeck Life Science Symposium 2nd Chiba-Uppsala Meeting'. 2012年2月16日 Uppsala University, Sweden(招待講演)
- (19) Takaya A. Control of functions mediated by *Salmonella* Pathogenicity Island 1 by AAA+ proteases. Singapore-Japan Joint Forum 'Emerging Concepts in Microbiology'. 2011年11月15日. National University of Singapore, Singapore(招待講演)
- (20) Takaya A. YdiV is a novel adaptor protein for ClpXP protease. 9th International Conference on AAA proteins. 2011年11月8日. Kumamoto City International Center, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (3) 連携研究者

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

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