

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450434

研究課題名(和文)成牛型サルモネラ症原因菌が産生する新規ADP-リボシル化毒素の構造及び機能解明

研究課題名(英文)Characterization of novel ADP-ribosyltransferase toxin from Salmonella which cause Salmonellosis in adult cattle.

研究代表者

内田 郁夫 (UCHIDA, Ikuo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域・領域長

研究者番号：70355204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Salmonella Typhimurium DT104は百日咳毒素(PTX)と相同性を示す毒素 ArtABを産生する。この研究により、ArtABがPTXと同様にAB5型毒素ファミリーに属することを明らかにした。ArtABはマウス腹腔内接種により致死活性を示し、インスリン分泌亢進活性等PTXと同様の活性を示したが、PTXとは異なり、白血球増多活性は陰性であった。ArtABはマウスマクロファージ由来RAW264.7細胞におけるGi蛋白質をADP-リボシル化し、cAMP上昇活性を示した。以上のことから、ArtABはPTXと類似した活性を有し、DT104の病原因子としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salmonella Typhimurium DT104 produces pertussis-like toxin (ArtAB-DT104), which catalyzes ADP-ribosylation of G proteins. Here, we characterized ArtAB-DT104 and homologs in *S. Worthington* and *S. bongori* (ArtAB-SW and ArtAB-Sb, respectively). ArtABs comprise a A subunit and pentameric B subunits. The A subunits of ArtAB-SW and ArtAB-Sb, which exhibit ADP-ribosyltransferase activity, had high amino acid sequence identity with ArtAB-DT104, whereas the B subunits of ArtAB-Sb showed lower identity. Injection of ArtABs was fatal in mice; LD50 of ArtAB-DT104 and ArtAB-SW were lower than that of ArtAB-Sb, suggesting that the B subunit is important for ArtAB toxicity. ArtABs catalyzed ADP-ribosylation of Gi proteins in RAW264.7 cells and increased intracellular cyclic AMP levels. Unlike Pertussis toxin, ArtABs did not induce lymphocytosis, possibly due to differences in ADP-ribosylation of target G proteins. These results suggest the general importance of ArtABs for Salmonella virulence.

研究分野：獣医学

キーワード：サルモネラ症 ADP-リボシル化毒素 病原性因子 百日咳毒素 G蛋白質 複合体毒素

1. 研究開始当初の背景

牛のサルモネラ症は従来子牛の疾病として重要であったが、1990年代となってから搾乳牛、すなわち成牛のサルモネラ症が顕在化した。現在、わが国においては、牛のサルモネラ症の多くが *Salmonella* Typhimurium (ST) を原因血清型となっている。STには、200種類以上のファージ型が存在する。1990年代になってから、欧米諸国において、多剤耐性の definitive phage type 104 (DT104) と呼ばれるファージ型の ST に起因した家畜のサルモネラ症や食中毒の発生が増加し、大きな問題となった。申請者らは、成牛のサルモネラ症の増加した 1992 年ごろから、我が国の牛由来分離株においても高率に多剤耐性 DT104 が分離されていたことを明らかにし、DT104 と成牛型サルモネラ症との関連性を指摘するとともに、DT104 における病原性因子の探索を試み、菌の溶原ファージ上に百日咳毒素 (PTX) に相同性を示す遺伝子 [*artA/artB* (*artAB*)] が存在することを明らかにした。この遺伝子は DT104 が共通に保持し、それ以外の ST からはほとんど検出されない。さらに申請者らは、*artAB* の遺伝子産物 (ArtAB) が、牛の脳由来の PTX 感受性 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) を ADP-リボシル化することを明らかにした。しかしながら、*artAB* の *Salmonella* 属菌における分布や、ArtAB の構造および生物学的機能については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ArtAB の構造及び機能を明らかにし、DT104 の病原因子としての役割を検証することにより、牛サルモネラ症における新たな予防法開発のための基盤となる研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) *artAB* の *Salmonella* 属菌における分布について調べるため、DT104 以外の牛由来 ST 305 株、ST 以外の *Salmonella enterica* における 84 血清型の各菌株および *S. bongori* の当該遺伝子の保有状況を PCR でスクリーニングした。

(2) ArtAB の精製

申請者らは DT104 をマイトマイシン C (MMC) で処理することにより試験管内で ArtAB が発現することを見出した。そこで、MMC を 0.5 $\mu\text{g/ml}$ に添加した Syncase broth で培養した菌の培養上清から、アフィゲルブルーゲル、ヒドロキシアパタイト、および疎水性クロマトグラフィーを用いて ArtAB を精製した。さらに ArtAB の性状解析に用いるため、ウサギを用いて、精製 ArtAB に対する免疫血清を作成した。

(3) ADP-リボシル化活性の確認

精製 ArtAB について、牛脳由来 PTX 感受性 G 蛋白質およびビオチン化 NAD を用いて ADP-リボシル化活性を確認した。

(4) ArtAB と PTX の生物活性の比較

PTX の生物活性として知られる赤血球凝集反応性と CHO 細胞に対する凝集塊形成活性を調べた。さらに、BALB/c マウスに対する腹腔内接種試験により、インスリン分泌亢進活性、白血球増多活性および ArtAB の LD₅₀ 値を測定した。

(5) マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に対する cAMP 上昇活性の測定

DMEM で培養した RAW264.7 細胞に ArtAB を添加し 16 時間培養した後、1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、10 μM isoproterenol および 50 μM lysophosphatidic acid を含むバッファーを加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 15 分保温した後に細胞内 cAMP を測定した。cAMP の測定は cAMP EIA キットにより実施した。

(6) RAW264.7 細胞の G 蛋白質における ArtAB による ADP-リボシル化実験

細胞膜分画中の G 蛋白質の ADP-リボシル化実験は、種々の濃度の ArtAB で 16 時間処理した RAW264.7 細胞から調整した細胞膜分画とビオチン化 NAD を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) *Salmonella* 属菌における *artAB* の分布
DT104 243 株中 237 株 (97.5%) が *artAB* を保持していた。DT104 以外の ST においては 303 株中 10 株 (3.3%) のみであった。ST 以外の 84 血清型を含む *S. enterica* においては、*S. Worthington* (SW) および *S. Agoueve* (SA) から *artAB* が検出され、さらに、菌種の異なる *S. bongori* においても検出された。ST 由来の *artAB* のシーケンスは完全に一致していた。SW および SA における *artAB* のシーケンスは同じであったが、DT104 の *artA* および *artB* との相同性はそれぞれ、推定アミノ酸配列レベルでそれぞれ 99% および 85% であった。*S. bongori* 由来の *artAB* では DT104 の ArtA とは 91% の相同性を示したが、ArtB では DT104 のものと比較して 25% と低いものであった。

(2) ArtAB の精製

DT104 の 400 ml の培養上清から 182 μg の ArtAB を精製した。精製 ArtAB は牛由来 G 蛋白質を ADP-リボシル化した。ArtAB は ADP-リボシル化活性を示す ArtA (25.5 kDa) と 13.3 kDa の ArtB から構成されていた。イオン交換クロマトグラフィーにより ArtA と ArtB ユニットを分離することが可能であり、この結果と非還元下で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から ArtAB は ArtA1 個と ArtB5 個からなる A1B5 型のサブユニット構造を成していることが示唆された。*S. Worthington* および *S. bongori* の ArtAB も同様にマイトマイシン C を添加して培養することにより発現を誘導することが可能であり、各種カラムクロマトグラフィーを実施することにより ArtAB ホモログが精製された。DT104, *S. Worthington*, *S. bongori* 由来の ArtAB をそれぞれ ArtAB-DT104, ArtAB-SW お

よび ArtAB-Sb と命名した。

ウサギで作出した抗 ArtAB 抗体を用いたウエスタンブロッティングによる解析の結果、ArtAB-DT104, ArtAB-SW, ArtAB-Sb における ArtA ユニットは同一の抗原性を示したが、ArtAB-DT104 に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、ArtAB-SW および ArtAB-Sb の ArtB ユニットに対しては極めて弱い反応しか示さなかった。

(3) 各 ArtAB の PTX 感受性 G 蛋白質に対する ADP-リボシル化

3 種類の ArtAB はいずれも牛の脳由来 PTX 感受性 G 蛋白質を ADP-リボシル化した。その反応は百日咳毒素と同様に還元剤であるジチオスレイトール (DTT) 依存性の酵素反応を示した。

(4) ArtAB と PTX の生物活性の比較

ArtAB-DT104 および ArtAB-SW は PTX と同様に、CHO 細胞に対する赤血球凝集活性、凝集塊形成活性、インスリン分泌亢進活性を示したが、ArtAB-Sb は上記活性を示さなかった。また、いずれの ArtAB も PTX とは異なり、白血球増多活性は認められなかった。

3 種の ArtAB はいずれもマウスに対して致死活性を示し、LD₅₀ 値は、ArtAB-DT104, ArtAB-SW, 及び ArtAB-Sb でそれぞれ、0.21 µg/匹、0.44 µg /匹、および 2.75 µg /匹となり、ArtAB-DT104 が最も毒力が強かった。

(5) RAW264.7 細胞に対する cAMP 上昇活性

受容体作動薬である isoproterenol を加えることにより、ArtAB の濃度依存的に細胞内 cAMP が増加した。濃度依存的 cAMP の増加は、lysophosphatidic acid の存在下でより顕著であった。

(6) RAW264.7 細胞における Gi 蛋白質のリボシル化

ArtAB で処理した細胞から得た細胞膜分画の ADP-リボシル化反応において、培養液に添加した ArtAB の濃度に依存して in vitro で ArtAB によりリボシル化される細胞膜分画中の G 蛋白質量の減少が認められた。リボシル化された G 蛋白質はウエスタンブロッティングによりアデニル酸シクラーゼ抑制性の Gi であることが示唆された。以上のことから、ArtAB は PTX と同様に細胞内の Gi 蛋白質をリボシル化し、これにより Gi 蛋白質を介した cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼの抑制が阻害され、その結果細胞内の cAMP 濃度が上昇することが示された。また、百日咳毒素で処理した細胞から得られた細胞膜分画では、ArtAB による ADP-リボシル化が完全に阻止されないことから、百日咳毒素と ArtAB の標的蛋白が完全に一致しないことが示唆された。

以上の結果から、ArtAB は PTX 様の活性を有しており、DT104 の病原性因子としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Tamamura Y, Uchida I, Tanaka K, Nakano Y, Izumiya, H, Takahashi, T, Kikuchi, N., A case study on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at a dairy farm associated with massive sparrow death. Acta. Veterinaria. Scandinavica. 58:23, 2016. (査読有)

Yukawa S, Tamura Y, Tanaka K, Uchida I., Rapid detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 strains by the polymerase chain reaction. Acta. Veterinaria. Scandinavica. 57:59, 2015. (査読有)

Kobayashi A, Takahashi S, Ono M, Tanaka K, Kishima M., Akiba M., Uchida I., Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from food-producing animals in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis: evidence of clonal dissemination and replacement. Acta Veterinaria. Scandinavia. 56:31, 2014. (査読有)

Tamamura Y, Tanaka K, Akiba M, Kanno T., Hatama S., Ishihara R., Uchida I. Complete nucleotide sequence of virulence-resistance plasmids carried by Emerging multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Hokkaido, Japan. PLOS ONE 8:e77644, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

玉村雪乃, 内田郁夫, 田中聖, Salmonella Typhimurium DT104 が産生する ArtAB のマクロファージ由来細胞 RAW264.7 に対する細胞内 cAMP 濃度上昇活性, 158 回日本獣医学術集会 2015 年 9 月 7 日、北里大学獣医学部 (青森県十和田市)

玉村雪乃, 田中聖, 内田郁夫, Salmonella が産生する ADP-リボシル化毒素 ArtAB の性状, 第 88 回日本細菌学会 2015 年 3 月 26 日、岐阜大学 (岐阜県岐阜市)

玉村雪乃, 内田郁夫, 田中聖, Salmonella における百日咳毒素様蛋白 ArtAB の産生とその性状について, 第 157 回日本獣医学学会学術集会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学 (北海道札幌市)

玉村雪乃, 内田郁夫, 田中聖, 牛由来多剤耐性 Salmonella Typhimurium PFGE 型菌が保有する薬剤耐性病原性プラスミドの解析, 第 80 回日本細菌学会北海道支部総会、2013 年 8 月 30 日、東京農業大学生物産業学部 (北海道網走市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 郁夫 (UCHIDA, Ikuo)
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・細菌・寄生虫研究領域・領域長
研究者番号：70355204

(2)研究分担者

玉村 雪乃 (TAMAMURA, Yukino)
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・細菌・寄生虫研究領域・研究員
研究者番号：90584384