

学位論文内容要旨

微生物学 吉田 雪絵



題目「Ⅲ型分泌機構を介した *Salmonella* 病原性発現機構に関する研究」

Salmonella enterica (*S. enterica*) はヒトや家畜・家禽に対して、胃腸炎などの局所感染および腸チフスに代表される全身感染(敗血症)を引き起こすグラム陰性細菌である。本菌は経口的に感染し、小腸回盲部まで達した後、パイエル板の M 細胞あるいは粘膜上皮細胞より侵入し、腸管粘膜を通過、腸間膜リンパ節に至る。さらにマクロファージ内で増殖した細菌が、脾臓や肝臓など全身臓器に拡散し増殖を繰り返すと、敗血症などの重篤な全身感染症を引き起こす。*Salmonella* が全身感染を発症するための主要な病原形質は、マクロファージに対する殺菌抵抗性であり、これには *Salmonella* 特異的病原遺伝子領域である *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) にコードされるⅢ型分泌機構が関与する。

一般に、Ⅲ型分泌機構は、エフェクターとよばれる機能性タンパク質を真核細胞へ直接、分泌・注入する役割を担っており、多くのグラム陰性菌の病原性発現に必要な病原因子である。Ⅲ型分泌装置の構造は、べん毛構造に類似しており、内膜と外膜を貫通する基部構造と菌体外膜表層に突出したニードル構造からなる。

Salmonella SPI-2 遺伝子領域には、32 個のタンパク質がコードされ、機能的に転写調節因子、分泌装置、シャペロン、トランスロケーターおよびエフェクターに分類される(図 1)。これらタンパク質の多くは、既知タンパク質との相同性から機能が推定されているが、一方で、病原体特異的なタンパク質をコードする遺伝子も存在する。本研究では、*Salmonella* SPI-2 Ⅲ型分泌機構による *Salmonella* の病原性発現機構の解析を目的とし、第 1 章では、SPI-2 にコードされる機能未知タンパク質 SseE の機能について、また、第 2 章では、アミノ酸の相同性から *Salmonella* SPI-2 Ⅲ型分泌機構特異的 ATPase と予測される SsaN の ATPase 活性とその機能について解析を行った。



図 1 *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) 領域の遺伝子組成

Ⅲ型分泌装置(黄)、エフェクター(紫)、トランスロケーター(赤)、シャペロン(橙)、転写調節因子(緑)をコードする遺伝子を示した。

第1章 シャペロンタンパク質 SseE の機能解析

Salmonella SPI-2 遺伝子領域にコードされるタンパク質の中で、他のⅢ型分泌機構には相同性のないタンパク質の1つとして SseE が知られている。これまで、SseE は、SPI-2 Ⅲ型分泌機構により分泌されるエフェクタータンパク質の1つと考えられていた。そこで本研究では、SseE の機能解析を行った。まず、SseE の細胞内局在を調べるために、*S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 株（野生株）のゲノム上の *sseE* 遺伝子を、2HA タグを付加した *sseE*-2HA 遺伝子に置換した変異株を作製した。SPI-2 発現誘導条件下で培養後、遠心分離により菌体と培養液（上清）、さらに菌体を可溶化画分（細胞質画分）と不溶化画分（膜画分）に分画した。SseE（SseE-2HA）は、細胞質画分にはのみ検出され、上清中には検出されなかった。さらに SseE の宿主細胞への分泌について、SseE-CyaA 融合タンパク質を利用した cAMP 生成定量法により確認した。百日咳毒素の1つである CyaA は、宿主細胞内でアデニル酸シクラーゼ活性を発揮し、細胞内 ATP を分解し、cAMP へ変換する。SseE-CyaA、SseG-CyaA（陽性コントロール）および CyaA（陰性コントロール）を発現するプラスミドを導入した *Salmonella* 野生株を HeLa 細胞に感染させ、感染 20 時間後の細胞内 cAMP を定量した結果、SPI-2 エフェクターである SseG のみが感染細胞における cAMP 量の増加が観察された。したがって、SseE は SPI-2 Ⅲ型分泌機構により分泌されるエフェクターでないことが確認された。

SseE は、PSI-BLAST 検索により病原性大腸菌のⅢ型分泌機構におけるシャペロンタンパク質である CesD2 と低い相同性を持つことから、SPI-2 エフェクターに対するシャペロン機能について検討した。一般的に、シャペロンタンパク質の標的となるエフェクターはシャペロン遺伝子の近傍に位置する。SseF に対するシャペロンは SscB であることが報告されていることから、SseE の標的は SseG であると推定された。そこで、野生株、*sseE* 欠失変異株およびその相補株（SseE-FLAG 発現プラスミドを有する *sseE* 欠失変異株）に対して、SseG-2HA を発現するプラスミドを形質転換し、菌体内および培養上清への SseG の分泌を明らかにした。*sseE* 変異株においては菌体内での SseG 量は著しく減少し、また培養上清中では、検出できなかった。一方、SseE の欠失は、SseF の発現には全く影響がなかった。このことから、SseE が、SseG のシャペロンとして機能することが強く示唆された。

一般にシャペロンはエフェクターに結合し、エフェクターの細胞内でのタンパク質安定性に関与する。SseE と SseG との結合は、FLAG pull-down 法により明らかにした。また、SseG が野生株に比べ、*sseE* 欠失変異株内で不安定であること、一方、SseF は *sseE* 欠失変異株内でも野生株同様に安定であることから、SseE は SseG の特異的シャペロンであることが示唆された。

以上のことから、SseE は SPI-2 エフェクター SseG のシャペロンであり、宿主細胞内における

エフェクター分泌およびその機能発現に関与していることが強く示唆された。

第2章 SPI-2 III型分泌機構特異的 ATPase SsaN の機能解析

III型分泌機構特異的 ATPase は、III型分泌機構を介したタンパク質の輸送・分泌に必須であることから、III型分泌機構の機能発現には必要不可欠な酵素である。そこで、本研究では、アミノ酸配列による相同性から SPI-2 III型分泌機構特異的 ATPase と推定されている SsaN の ATPase 活性とその機能について検討した。最初に、*S. Typhimurium* SL1344 株を親株として *ssaN* 欠失変異株を作製し、エフェクターの分泌能について、野生株と *ssaN* 欠失変異株とを比較した。その結果、*ssaN* 欠失変異株において、SPI-2 III型分泌機構依存的に分泌されるトランスロケーター SseB およびエフェクター SseJ の分泌は、培養上清および培養細胞のいずれにおいても、みられなかった。このことから、SsaN は SPI-2 III型分泌機構に必須の因子であることが明らかとなった。

次に、マウスに対する病原性発現への SsaN の関与を明らかにするため、Balb/c マウスを用いた混合感染実験を行った。野生株に比べ *ssaN* 欠失変異株では、脾臓内増殖性の著しい低下がみられたが、相補株では病原性は野生株と同程度まで回復した。

さらに、SsaN の ATPase 活性を調べるために、SsaN-Myc-His₆ 融合タンパク質を精製し、その ATPase 活性を malachite green assay により測定した。SsaN の ATPase 活性は 0.36 ± 0.06 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ で、他のIII型分泌機構特異的 ATPase とほぼ同様の活性を示した。

III型分泌機構特異的 ATPase は、シャペロン-エフェクター複合体に結合後、シャペロン-エフェクター複合体からエフェクターを解離し、エフェクター分子を、III型分泌機構を介して菌体外へ輸送するために必要であるといわれている。SsaN は、他の細菌に見られるIII型分泌装置の構造解析から、SsaKと複合体を形成し、さらにCリングを構成しているSsaQに結合していると予想されている。そこで、SsaN と SsaKQ および SPI-2 特異的なシャペロン分子 (SscA, SscB, SsaE および SseA) との結合性を pull-down 法により確認した。その結果、SsaK および SsaQ とそれぞれ相互作用すること、および SPI-2 に存在する既知のすべてのシャペロンと結合することを明らかにした。また、SsaN によるシャペロン-エフェクター複合体からのエフェクターの解離作用を調べるために、SsaN 存在下で SsaE/SseB 複合体が解離することを確認した。グルタチオンセファロース上に、GST-SsaE/SseB-FLAG 複合体を固相化し、精製した SsaN-Myc-His₆ 融合タンパク質および ATP を加え、SseB-FLAG 融合タンパク質の解離をウエスタンブロット法により検出した。SsaN と ATP の添加により、SsaE (シャペロン分子) からの SseB (エフェクター) の解離がみられたが、SsaN と ATP γ S あるいは SsaN_{R192G} と ATP の添加では、解離はみられなかった。したがって、シャペロン-エフェクター複合体において、SsaN は ATP 依存的にシャペロンとエフェクターの解離を促進することが明らかとなった。

本研究では、*Salmonella* SPI-2 にコードされるタンパク質のうち、これまで機能未知とされてきた SseE が SseG に対する特異的シャペロンであることを明らかにした。また、SsaN が ATPase 活性を有することを明らかにし、SsaN と相互作用する他の III 型分泌装置タンパク質の同定を行った。さらに、SsaN が ATPase 活性によりシャペロンとエフェクターの解離に関与することを明らかにした。今後、SPI-2 タンパク質の機能解析が進むことにより、多くの病原細菌が保持する III 型分泌機構を標的とした治療法の確立がなされることを期待する。