

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドーシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発

所属 国立感染症研究所 細菌部
研究者 渡辺治雄

分担研究者

(1) ヤクルト(株) 中央研究所 田中隆一郎

要旨:

Salmonella と *Shigella* の細胞侵入に関わる遺伝子産物や、その発現制御様式には共通点が多い。*Shigella* においてこれら遺伝子群の Master regulator である *virF* 自体の発現を調節する *cpxR-cpxA* 遺伝子が *Salmonella* においても同様の機能を持つ可能性を検討し、実際に *cpxA* が *Salmonella* の Master regulator である *hilA* 遺伝子の発現調節を通して細胞侵入能発現に関与することを示した。

1. 研究目的

Salmonella と *Shigella* の腸管上皮細胞への侵入性機構には類似点が多い。*Shigella* の場合、大プラスミド上にコードされる細胞侵入性遺伝子群が深く関与し、中でも *ipaBCD* 遺伝子産物は菌の上皮細胞への侵入能を直接担う。また、この *ipaBCD* 遺伝子は同じくプラスミド上にコードされる *virF,invE* という2つの制御遺伝子によって正に調節されることが明らかになっている。さらに、*virF* の発現は pH による制御を受け、それには染色体上にコードされる2成分制御系遺伝子 *cpxR-cpxA* が関与し、特に *cpxR* は *virF* の発現に必須な因子であることが報告されている。

Salmonella における侵入性遺伝子群は染色体上のいわゆる SPII にクラスターを形成している。SPII には *ipaBCD* に相同性を示す *sipBCD*、これらの発現制御遺伝子 *hilA,invF* が存在し、*invF* は *Shigella* の *virF* と相同性を示すこと、等が報告されている。このような背景から、両菌種間の侵入性遺伝子を環境条件、特に pH 依存的に制御する因子も共通している可能性がある。

これらのことから、本研究では *Salmonella* における *cpxR-cpxA* 相同遺伝子の探索、同定及びその遺伝子の *hilA,invF* や *sipBCD* 遺伝子発現、ひいては総体的な病原性への関与を検討、解明することを主たる目的とした。

2. 研究方法

使用したプラスミド: 大腸菌 K-12 株 MC1061。MC1061 を親株として、*cpxR* を人為的にカナマイシン耐性カセットを用いて破壊した株 SN1216。*Salmonella typhimurium* 病原株 TSA1354、SL1344 とそれぞれの isogenic な *cpxR, cpxA* 変異株。*hilA* 遺伝子の発現量をモニターするために作製した *hilA-lacZ* 翻訳融合プラスミド pSN849。TSA1354 由来の *cpxR-cpxA* 相同遺伝子を含むプラスミド pSN450 と pSN902。pSN450 中、*cpxR* 遺伝子のみを破壊した pSN450TcF。TSA1354 由来の *cpxR* 遺伝子のみを含むプラスミド pSJ392。

Salmonella における *cpxR* 相同遺伝子の検出: pSN1018 を鋳型とした PCR 法で *cpxR* reading frame 部分を増幅した。この DNA 産物を probe として *Salmonella* の total DNA に対する Southern hybridization で *cpxR* 相同遺伝子の検出を行った。

Salmonella cpxR 領域のクローニングと塩基配列決定: pHW848 を保持する SN1216 は *cpxR* が破壊されており、*virF* 発現ができないため、*virF-lacZ* 遺伝子からの b-galactosidase 産生がなく、X-gal plate 上で白色を呈する。この SN1216 の表現型は *cpxR* によって相補されるが、サルモネラの *cpxR* 相同遺伝子によってもまた相補される可能性が考えられた。そこで SN1216 の表現型を相補するサルモネラのクローンを分離することで *cpxR* 相同遺伝子のクローニングを試みた。実際の実験では前項の Southern hybridization の結果、4kb の *EcoRV* 断片上に *cpxR* 相同遺伝子が存在することが判明したので、TSA1354 DNA の *EcoRV* 消化物ライブラリーから前述のような相補活性を有するクローンを選択した。このクローンを、pSN450 中、1.2kb の *Hin*II 断片に *cpxR* 相同遺伝子を minimize し、pUC Vector

にサブクローニングして Taq polymerase による cycle sequencing で塩基配列を決定した。さらにこの領域からプライマーを作製して *cpxA* 遺伝子の塩基配列も決定した。

Salmonella cpxR, cpxA 破壊株の作製:

野生株、及び *cpxR, cpxA* 破壊株での *hilA* 遺伝子発現量の測定: *hilA* 遺伝子のプロモーター領域、開始コドンを含む DNA 断片を *hilA* と *lacZ* が in frame になるように翻訳融合させたレポータープラスミド pSN849 を作製し、それぞれの株に導入、Miller の方法に従い、 β -galactosidase 活性を測定、そのユニット数を *hilA* 発現量とした。

野生株、及び *cpxR, cpxA* 破壊株での分泌 SipC 産物の検出: それぞれの株の終夜培養液上清の一部を TCA 沈澱したサンプルを SDS-PAGE 泳動後、メンブランに転写後、抗 SipC 抗体によるウェスタンブロットを施行した。

野生株、及び *cpxR, cpxA* 破壊株の細胞侵入能の検定: ヒト胎児腸管上皮細胞由来の Cell line INT407 を Host とした bacterial invasion assay を行った。 *cpxR-cpxA* が pH 依存的に侵入性遺伝子の発現を調節する可能性を鑑み、pH6.0 及び pH8.0 での培養後、それぞれの菌の侵入度を定量化した。Host cell 5X10⁵/ml に対して bacteria を感染多重度約 10 で 37°C、1 時間感染後、ゲンタマイシン処理で未侵入 bacteria を殺菌して survival bacterial cell を plating した。侵入度は最初の inoculum に対する survival bacterial cell のパーセンテージで定量化した。

二次元電気泳動

終夜培養菌体を超音波処理にて破壊し、蛋白質を定量後、二次元電気泳動に供した。銀染色により蛋白質を染め出し、発現量の増減が見られたスポットの N 末端配列を解析し、蛋白質の同定を行った。

Yersinia pseudotuberculosis CpxR 蛋白質点変異体の転写活性

CpxR 蛋白質の活性に必須と考えられている 9 番目と 51 番目の Asp 残基をそれぞれ Ala と Asn 残基に置換した変異蛋白質では、*virF-lacZ* 融合遺伝子に対する転写活性が 3 倍程度上昇していた。

点変異体の作製

Yersinia pseudotuberculosis 由来の CpxR 蛋白質の Asp 残基を Ala 又は Asn に置換した点変異体を作製した。*virF-lacZ* 融合遺伝子に対する転写活性を β -ガラクトシダーゼ活性に置き換え、定量化を行なった。

3. 研究成果

Salmonella における *cpxR* 相同遺伝子の検出: 大腸菌 *cpxR* 遺伝子の reading frame を PCR で増幅、ラベリングしたものをプローブとし、*Salmonella typhimurium* TSA1354 の total DNA *EcoRI* digest に対して Southern hybridization を行った。Stringent wash の条件でも、大腸菌とほぼ同等の濃度のバンドが検出された。この実験では、他にサルモネラの他の serovar、他の腸内細菌の DNA についても同じ実験を試行してみた。結果、いずれの場合にも大腸菌とほぼ同等の濃度のバンドが検出された。これらのことから、*cpxR* は大腸菌、赤痢菌、サルモネラに限らず、腸内細菌一般に広く、しかも高い相同性を維持して保存されていることが示唆される。

Salmonella cpxR 相同遺伝子のクローニングと塩基配列決定: TSA1354 に *cpxR* 相同遺伝子が存在することが判ったので、その遺伝子をクローニングすることにした。前項の実験で *EcoRI* 消化で 2 本のバンドが検出されたことから、*cpxR* 相同遺伝子内に *EcoRI* site が存在することが明らかになった。クローニングにおいては、他の制限酵素を用いるべく、その選定を行った。結果、*EcoRV* 消化で、約 4kb の単一バンドが観察されたことから、この酵素で消化した DNA から、サルモネラのライブラリーを作製した。クローンの選択には、*cpxR* 相同遺伝子が大腸菌 *cpxR* 破壊株の表現型 (クローン化した *virF* 遺伝子を発現できない) を相補するという仮説に立ち、相補されたコロニーを分離し、そのコロニーの持つライブラリークローンを解析して *cpxR* 相同遺伝子を含むことを確認した。以上の方法で 4kb *EcoRV* 断片がベクター pACYC177 に組み込まれたプラスミド、pSN450 を得た。pSN450 の挿入断片中、1.2kb の *HincII* 断片内に *cpxR* 相同遺伝子部分が完全に含まれることが再度の Southern hybridization で確認できた。そこで、この 1.2kb 断片の塩基配列を決定した。この塩基配列から予想されるサルモネラ CpxR のアミノ酸配列は大腸菌 CpxR のそれと 97.4% の相同性を示した。以上により、両菌種間でのこれら遺伝子の機能的、構造的共通性が実証された。さらに前述の方法により、*cpxA* 遺伝子の配列も決定した。予想されるサルモネラ CpxA のアミノ酸配列は大腸菌 CpxA のそれと 96%

の相同性を示した。

Salmonella cpxR, cpxA 破壊株の作製：いくつかの予備実験により、4kb の *EcoRV* 断片は、染色体上の対応する領域との相同組み換えを起こすには長さが不足していることが示唆された。そこで、この断片を完全に含むさらに長い断片のクローニングを試み、6kb の *SaI* 断片をクローン化した pSN902 を得た。このプラスミド中、サルモネラ *cpxR* 相同遺伝子 reading frame 内 5' 端近傍に *SacI* 部位がただ1つ、サルモネラ *cpxA* 相同遺伝子 reading frame 内中央付近に *AccII* 部位がただ1つ、それぞれ存在することが判明した。これをもとにこのプラスミドにクローニングされた当該遺伝子が薬剤耐性遺伝子カセットで分断破壊された遺伝子座を作製した。すなわち、このプラスミドを *SacI* 消化、または *AccII* 消化で開裂させ、そこにカナマイシン耐性カセットを導入した。この遺伝子座を含む断片を RNaseH 欠損宿主菌以外では複製不能な自殺ベクター pKH5002 に組み込んだプラスミドを作製した。このプラスミドを *Salmonella typhimurium* 野生株に導入し、染色体上の *cpxR, cpxA* 相同遺伝子それぞれが破壊遺伝子座と組み換わった株を作製した。これら破壊株の構造をサザンハイブリダイゼーション法で確認した。

野生株、及び *cpxR, cpxA* 破壊株での *hilA* 遺伝子発現量の測定：*hilA* 遺伝子の発現は、pH6.0 での培養後、*cpxA* 変異株においてのみ、野生株や、*cpxR* 変異株の約 40 分の 1 程度にまで低下した。pH8.0 では野生株、*cpxR* 変異株に対して約 4 分の 1 程度までの発現量低下にとどまった。*cpxR* 変異株では野生株との差が見られなかった (Table 1)。

野生株、及び *cpxR, cpxA* 破壊株での分泌 SipC 産物の検出：研究目的の項で述べたように、HilA 産物は *invF* を通じて *sipBCD* 発現を活性化するので、上記の結果から、*cpxA* 変異株では SipBCD 産物量が低下することが予想される。そこで、SipC に対するウエスタンハイブリダイゼーションを行なったところ、pH6.0 で SipC が検出限界以下まで減少していた。pH8.0 では野生株と同程度のシグナルが観察され、HilA 産物の 4 分の 1 程度までの減少では SipC 発現には大きく影響しないことが示唆された。また、*hilA* 発現測定の結果から予想できるように、*cpxR* 変異は SipC 産物量に影響していなかった。

野生株、及び *cpxR, cpxA* 破壊株の細胞侵入能の検出：SipBCD は宿主細胞侵入の直接のエフェクターであることから、上記の結果は、*cpxA* 変異が細胞侵入に影響することを予想させる。培養細胞 INT407 を用いた MOI=10 のアッセイ系で、pH6.0 での培養後の *cpxA* 変異株の細胞侵入能は野生株や *cpxR* 変異株の約 10 分の 1 まで低下した。また、SipC ウエスタンの結果から予想されるように pH8.0 での培養後は、侵入能低下は観察されなかった。*cpxR* 変異株では野生株との差は認められず、*hilA* 発現、SipC 産物量測定の結果と良く一致している。

二次元電気泳動による解析結果：

cpxA 欠損株と野生株の、pH6 での蛋白質の発現パターンを解析した。*cpxA* 欠損株で発現量が2倍以上に増加した蛋白質としては heat shock protein GrpE, superoxide dismutase, ecotin precursor, histone-like protein (hns), 6-phosphofructokinase 等が見つかった。

Yersinia pseudotuberculosis CpxR 蛋白質点変異体の転写活性

CpxR 蛋白質の活性に必須と考えられている 9 番目と 51 番目の Asp 残基をそれぞれ Ala と Asn 残基に置換した変異蛋白質では、*virF-lacZ* 融合遺伝子に対する転写活性が 3 倍程度上昇していた。

4. 考 察

Shigella, Salmonella 両菌による実際の病態にはかなりの違いがあるが、感染の第一段階である宿主腸管上皮細胞への侵入にフォーカスを置くと、そこには極めて多くの類似性、共通性が見られる。すなわち、侵入能を直接担う遺伝子産物のアミノ酸配列の類似性、その産物が産生される制御系の成り立ちの類似性である。このうち、*Shigella* の *virF* 自身の発現調節については、2成分制御系の1つ、*cpxR-cpxA* 遺伝子がこれに大きく関与していることが我々のグループによって示された。

この背景に立って、*Salmonella* にも *cpxR-cpxA* に相同な遺伝子が存在し、それが *hilA* 遺伝子の発現を pH 依存的に調節し、*Salmonella* の侵入性全体の master regulator であるという可能性を提出した。今回、これらの *Salmonella* の遺伝子を破壊した株を作製し、*hilA* 発現、SipC 産物量、細胞侵入能の検定を行った。今回用いたアッセイ条件では、*cpxA* 破壊株で pH6.0 培養後、いずれの項目も野生株に比較して低下することが判った。従って、*cpxA* は、少なくとも、pH6.0 条件下で *hilA* 発現を通して細胞侵入能を正に調節していることが結論された。

また、*cpxA* と cognate pair をなすレギュレーターと考えた *cpxR* は上記の遺伝子発現や表現型に関与するデータが得られなかった。このことから、この regulatory circuit において、センサーである *cpxA* と連絡し、直接転写活性化をおこなうレギュレーターは *cpxR* 以外のものであると考えられ、それを同定することが次なる課題となった。現在、この目的のため、*cpxA* 変異株の表現型を相補するマルチコピーサプレッサーのクローニングを試行しており、すでに1つの領域については塩基配列決定を行なった。塩基配列の解析を行なったところ、染色体上 96min. 付近にマップされる新規 AraC type の転写因子をコードする遺伝子を発見した。分類上、2成分制御系レギュレーターではない転写因子であるが、この遺伝子の発現が目的とするレギュレーターの支配下にある可能性がある。この遺伝子産物のアミノ酸配列は、既に *hilA* 発現の Activator として報告のある HilD と有為な相同性を示した。

現在、この新規遺伝子が実際に *hilA* 発現制御に関与するかを確認するため、染色体上の当該遺伝子の破壊を試行中である。また、この遺伝子の発現が *cpxA* によって制御されているかの検討も行なう予定である。

5. まとめ

Shigella, *Salmonella* 両菌の細胞侵入に関わる遺伝子産物の相同性、遺伝子発現の様式の共通性等から、*cpxR-cpxA* 遺伝子が *Salmonella* においてもこれらの遺伝子発現を環境依存的に制御する可能性を提出し、当該遺伝子の破壊株を作製し、キャラクターゼーションを行った結果、少なくとも *cpxA* は、ある条件下では細胞侵入能を活性化することがわかった。

6. 研究発表

1. 論文発表

Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. Ro Osawa, Sunao Iyoda, Shu-ichi Nakayama, Akihito Wada, Shiro Yamai, and Haruo Watanabe (2000) J. Med. Microbiol. 49, 565-574

2. 学会発表

cpxA, but not *cpxR* is required for full activation of the *hilA* expression and the consequent phenotype of invasiveness in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. Shu-ichi Nakayama, Akira Kushiro, Kensuke Shimizu, Ryu-ichiro Tanaka, Lan Hu, Dennis J. Kopecko, and Haruo Watanabe (2001) The 36th Joint Conference of U.S.-Japan cooperative medical science program Cholera and other bacterial enteric infection panel. Jan. 2001, Osaka

Salmonella Typhimurium の *cpxR*, *cpxA* 変異株の作製とキャラクターゼーション

(中山周一、清水健介、久代 明、田中隆一郎、渡辺治雄)

第73回日本細菌学会総会 2000年5月、札幌

Salmonella Typhimurium *cpxA* 変異株を相補するマルチコピーサプレッサーの解析

(中山周一、久代 明、朝原 崇、田中隆一郎、渡辺治雄)

第74回日本細菌学会総会 (要旨受理済み) 2001年4月、岡山 (予定)

Table 1 Effects of *cpxR* and *cpxA* mutants on *hila* expression

Strain	Reporter Plasmid	Expression level of <i>hila</i> (β -galactosidase activity in units)	
		pH6.0	pH8.0
SL1344 [<i>cpxR</i> ⁺ , <i>cpxA</i> ⁺]	pSN849	933 \pm 90.7	837 \pm 137
SL1344, <i>cpxR</i> ⁻	pSN849	820 \pm 383	651 \pm 145
SL1344, <i>cpxA</i> ⁻	pSN849	24.5 \pm 1.5	211 \pm 50.2

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社