

Salmonella Pathogenicity Island 1 並びに
べん毛レギュロン発現の共役制御

千葉大学大学院 医学薬学府 分子医薬科学講座

創薬生命科学専攻 微生物薬品化学研究室

鹿毛 宏一

2009 年

目次

目次	1
略号・記号.....	2
序論	4
本論	8
第1章 ClpXP の <i>Salmonella</i> 病原性における役割	8
第1節 ClpXP 欠損 <i>Salmonella</i> の病原性.....	8
第1項 マウス病原性	8
第2項 マクロファージ内増殖能	9
第2節 考察	10
第2章 ATP 依存型プロテアーゼ ClpXP による SPI1 制御機構.....	11
第1節 ClpXP 欠損株におけるマクロファージ細胞死誘導及び上皮細胞侵入能	11
第2節 ClpXP 欠損株における SPI1 発現.....	12
第1項 SPI1 蛋白質分泌量及び細胞内量	12
第2項 <i>hilA</i> 転写活性	14
第3項 <i>hilC</i> 、 <i>hilD</i> 転写活性	15
第3節 ClpXP による FliZ を介した SPI1 発現制御機構	17
第1項 べん毛過剰形成の上皮細胞侵入能への影響.....	18
第2項 FliZ 欠損株における SPI1 蛋白質分泌量	19
第3項 HilA、HilC、HilD 細胞内量.....	19
第4項 FliZ 相補性	21
第5項 FliZ 欠損による <i>hilC</i> 、 <i>hilD</i> 転写活性への影響	22
第6項 HilD 細胞内安定性における FliZ の影響	24
第7項 FliZ による HilD 転写後調節.....	25
第4節 考察	26
総括	30
実験の部	32
材料の項	32
方法の項	36
謝辞.....	43
参考文献.....	44
論文目録	53

略号・記号

1. 抗生物質

Ap	ampicillin
Cm	chloramphenicol
Gm	gentamicin
Km	kanamycin
Nal	nalidixic acid
Tc	tetracycline

2. 試薬

APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BCIP	5'-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	bovine serum albumine
BSG	buffered saline gelatin (0.01% gelatin/PBS)
CBB	coomassie brilliant blue
CIAA	chloroform : isoamylalcohol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IPTG	isopropyl-thio- β -D-galactoside
NBT	nitro blue tetrazolium
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	polyethylene glycol
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA
TCA	trichloroacetic acid
TE	Tris-HCL-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamide
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
bis	<i>N,N'</i> -methylene-bisacrylamide

dNTP	deoxyribonucleotide
β-ME	β-mercaptoethanole

3. 培地

L-agar	Luria agar
L-broth	Luria broth

4. 菌種

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. enterica serovar</i> Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium

5. 遺伝子

<i>clp</i>	caseinolytic protease
------------	-----------------------

6. その他

bp	base pairs
CFU	colony forming unit
DNA	deoxyribonucleic acid
Da	dalton
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Ig	Immuno globulin
MOI	multiplicity of infection
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
WT	wild type

序論

γ -プロテオバクテリア、*Salmonella* 属細菌は DNA 相同性と生化学的性状から 1 属(*Salmonella*)2 菌種(*S. enterica*, *S. bongori*)6 亜種(*S. enterica* subspecies *enterica*, *S. enterica* subspecies *salamae*, *S. enterica* subspecies *arizonae*, *S. enterica* subspecies *diarizonae*, *S. enterica* subspecies *houtenae*, *S. enterica* subspecies *indica*)に分類され (Tindall *et al.*, 2005, Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2005)、更に Kauffman-White 様式による抗原分類に基づいて、細胞壁を構成する耐熱性抗原であるリポ多糖を O 抗原、べん毛を構成する易熱性蛋白抗原を H 抗原、及び一部の細菌が持つ夾膜多糖抗原 Vi 抗原の違いから 2000 種以上の血清型に分類される。サルモネラはヒトに対し、軽微な腸炎から重篤な全身感染を伴うチフス症を引き起こすことで知られるが、ヒトに対する病原性を示すサルモネラは全て *Salmonella enterica* subspecies *enterica* に含まれる。

S. enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium (以下 *S. enterica* serovar Typhimurium と略称)はヒトに対して非チフス性腸炎を、マウスに対してヒトチフス症様の全身感染症を引き起こす病原細菌であり、本菌感染マウスはヒトチフス症のモデルとして世界中で広く研究対象として用いられている (Neidhardt, 1996)。チフス症は世界規模で増加傾向にあり、年間で約 20,000,000 人が感染し、200,000 人以上の患者が死亡している (Crump JA *et al.*, 2004) ことから、*Salmonella* 病原性の研究・解明は感染症対策の重要な課題であると言える。

Salmonella は一般的に、細菌に汚染された飲食物から経口感染する。経口摂取により体内に取り込まれた *Salmonella* は小腸へ到達すると、小腸上皮細胞へ侵入を開始する。小腸上皮細胞への侵入は、*Salmonella* が全身感染へ移行する際に重要な感染初期過程である。*Salmonella* は非貪食細胞である小腸粘膜上皮細胞やパイエル板に存在する M 細胞へ付着後、細胞内への侵入を開始する (Jones *et al.*, 1994)。*Salmonella* は宿主細胞表層へ付着後、アクチン再編成によるメンブレンラフリングを惹起することで、エンドサイトーシスによる効率的な侵入を可能にしている。小腸上皮細胞へ侵入を果たした *Salmonella* は、やがて腸管膜リンパ節マクロファージによって貪食される (Wallis *et al.*, 2000)。マクロファージは異物排除に特化した細胞であり、外部から侵入した細菌は速やかに貪食されファゴソーム内へ取り込む。ファゴソーム内で細菌は急激な pH 低下、貧栄養環境の他、NADPH オキシダーゼにより生成されるスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、窒素酸化物($\text{NO}^\cdot$, NO_2^- , NO_3^-)等のラジカルによる攻撃に曝される。更にプロテアーゼやライソザイム等の加水分解酵素、塩基性蛋白質ディフェンシン作用により、非病原性細菌は速やかに殺菌、分解される。しかし、*Salmonella*、*Yersinia*、*Listeria* 等の細胞内寄生細菌はマクロファージに貪食された後、それぞれの細菌に特化した戦略によりこの殺菌機構を回避し、マクロファージ内で増殖を開始する (Garcia-del Portillo *et al.*, 1995)。*Salmonella* はマクロファージに取り込まれた後、*Salmonella* containing vacuole(SCV)を形成しファゴソーム成熟過程を阻害することでマクロファージによる殺菌機構から逃れ、SCV 内で増殖を開始する (Garcia-del Portillo *et al.*, 1995, Garcia-del Portillo *et al.*, 1992, 1993, 1994, Mills *et al.*, 1998, Rathman *et al.*, 1997)。多くの血清型 *Salmonella* は、腸管膜リンパ節マクロファージで増殖し、そこに留まり腸炎を引き起こすが、ヒトにチフス症を引き起こす *Salmonella enterica* serovar Typhi はマク

ロファージに包まれた状態でリンパ管を経て血中へ入り、肝臓や脾臓へ伝播し、更に組織のマクロファージへ再感染、増殖して重篤な全身感染症を引き起こす。現在、サルモネラ病原性に関わる 10 遺伝子群が病原遺伝子群 *Salmonella* pathogenicity island(SPI)と呼ばれる染色体上の領域に同定されており、このうち SPI1 は上皮細胞侵入、マクロファージ細胞死、炎症応答を引き起こし、SPI2 は全身感染に必須となる。SPI1、SPI2 はそれぞれ *Salmonella* 染色体上の 63 センチゾーム、31 センチゾーム領域に存在し、各々が三型分泌装置(TypeIII secretion system, TTSS) SPI1-TTSS、SPI2-TTSS をコードしている。三型分泌装置は 20 以上の蛋白質から成るニードル様構造体で、細菌由来の蛋白質を宿主細胞へ輸送することに特化した細胞小器官である (Cornelis and VanGijsegem, 2000, Galan and Collmer, 1999, Hueck, 1998)。三型分泌装置は脊椎動物、昆虫、植物の病原細菌、共生細菌に広く保存され、染色体上の Pathogenicity island 領域に近接して遺伝子転移に関与する挿入配列が在ることから、遺伝子の水平伝播によって獲得されたことが示されている。又、三型分泌装置とべん毛構築に関与するべん毛分泌装置を構成する蛋白質が相同性を示し、そこから形成される構造体も類似性を示すことから、共通の祖先型分泌装置から派生した可能性が示唆されている (Blocker *et al.*, 2003)。

Salmonella による一連の宿主殺菌機構に対する抵抗性や宿主生理作用の変化は、主に *Salmonella* から分泌された蛋白質が宿主へ輸送されることで引き起こされる。TTSS から分泌される蛋白質はエフェクターと呼ばれ、SPI1-TTSS からは少なくとも 19 以上の蛋白質が分泌され (Galan and Collmer, 1999)、上皮細胞侵入に関わっている。サルモネラは宿主へ付着すると、SPI1-TTSS を介して SPI1 エフェクター SipB、SipC、SipD を輸送し、宿主細胞膜上へトランスロコンと呼ばれる他の SPI1 エフェクターの輸送に必須な小孔を形成する (Collazo and Galan, 1997)。トランスロコンを介して輸送される SopB、SopE、SopE2、SipA 等の SPI1 エフェクターは宿主アクチンの再編成を行い、サルモネラの効率的な侵入に関わる。SopB、SopE、SopE2 は Rho ファミリー small GTPase Cdc42、Rac1 を活性化することでアクチン再編成を引き起こし、メンブレンラフリングを誘導する (Norris *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 2001, Hardt *et al.* 1998, Rudolph *et al.*, 1999, Bakshi *et al.*, 2000, Stender *et al.*, 2000)。SipA は繊維状アクチン (F-アクチン) へ結合し、F-アクチンの脱重合を阻害し、安定化することでサルモネラ接触面へのメンブレンラフリング及び糸状仮足形成を促す (Zhou *et al.*, 1999)。SopB、SopE、SopE2 は炎症反応にも関与し、MAP キナーゼカスケード活性化により AP-1、NF- κ B の転写を促進し、サイトカインを誘導することで炎症応答を引き起こす (Hobbie *et al.*, 1997, Patel and Galan, 2006, Chen *et al.*, 1996)。SPI1 エフェクターは上皮細胞侵入、炎症反応以外に感染初期にマクロファージ細胞死を引き起こす。これは初期細胞死と呼ばれ、宿主細胞内へ移行した SipB が Caspase-1 の活性化を引き起こし誘導される (Hersh *et al.*, 1999)。SPI1 の制御はレギュロン内にコードされる転写制御因子によって行われる。その転写制御因子の中で、HilA が主要なレギュレーターとして働く。HilA は転写制御因子 OmpR / ToxR ファミリーに属し、*inv* / *spa* オペロンの転写活性化による SPI1 分泌装置の誘導や、*spi* オペロンの活性化による SPI1 エフェクター蛋白質の発現誘導により直接、標的細胞への侵入制御を行っている (Bajaj *et al.*, 1995, Darwin *et al.*, 1999, Eichelberg *et al.*, 1999)。又、HilA は、SPI1 レギュレーター遺伝子の一つである *invF* の転写を活性化することで間接的にも細胞侵入制御を行う (Bajaj *et al.*, 1996)。InvF はシャペロン蛋白質 SicA と複合体を形成し、*sip* オペロンの転写を誘導する (Darwin *et al.*, 2000, 2001)。ホ

モログ蛋白質である HilC、HilD 蛋白質は AraC / XylS 転写制御因子ファミリーに属し、*hilA* 遺伝子上流に存在する *hilA* プロモーター領域へ結合し、*hilA* 遺伝子の転写を誘導する (Schechter *et al.*, 1999, 2001, Olekhovich *et al.*, 2002)。

SPI2-TTSS は、経口感染でマウス病原性が低下した変異株より同定され (Ochman *et al.*, 1996, Shea *et al.*, 1996)、マクロファージ内生存・増殖及びマウス全身感染に必須な因子であることが明らかとなった (Hensel, 2000)。SPI2-TTSS もニードル様構造体を形成する (Holden, 2002)。しかし 1)SPI1、SPI2 の遺伝子構成が互いに異なっている、2)SPI1 が *Shigella* spp. の病原性プラスミド上の *spa/mxl/ipa* 遺伝子群と相同性を示すのに対し、3)SPI2 は *Yersinia* spp. の病原性プラスミド上の *ysc/lcr/yop* 遺伝子群及び EPEC 染色体上の *esc/esp* 遺伝子群と相同性を示すこと等から、SPI1、SPI2 はそれぞれ独立した遺伝子の水平伝播によって獲得されたと考えられている (Hansen-Wester and Hensel, 2001)。SPI2-TTSS はマクロファージ環境内で発現が誘導される (Cirillo *et al.*, 1998, Pfeifer *et al.*, 1999)。SPI2 エフェクターとして、少なくとも 15 蛋白質が同定され (Kuhel and Hensel, 2004, Chakravorty *et al.*, 2005)、SCV 形成、マクロファージ細胞死誘導等に働く。SPI2 では SseC、SseD がトランスロコンを形成する (Chakravorty *et al.*, 2005)。SpiC はエフェクターの輸送に関与する他に、自らも宿主細胞へ輸送され、エンドサイトーシスにおける SCV への膜小胞輸送を阻害し、ファゴソーム成熟を妨げる (Uchiya *et al.*, 1999)。宿主細胞侵入後 4 時間を経過した頃、SCV から微小管に沿って *Salmonella* induced filament (Sif) と呼ばれる管状構造体が形成される (Gracia-del Portillo *et al.*, 1993, Knodler and Steele-Mortimer, 2003)。SifA は Sif 形成に必須な SPI2 エフェクターで (Stein *et al.*, 1996)、SCV 及び Sif の膜上へ局在化し (Alto *et al.*, 2006)、宿主細胞質中の SKIP (SifA-kinesin interacting protein) との結合を介して、微小管モーター蛋白質キネシンによる膜小胞輸送を阻害することで、SCV 並びに Sif の維持に働く (Boucrot *et al.*, 2005)。又、PipB2 がキネシン軽鎖へ結合し、キネシンによる小胞輸送を誘発する (Henry *et al.*, 2006)。つまり、Sif 形成は、SifA と PipB2 が競合的にキネシンと相互作用することにより行われる。SPI2 は感染後期にマクロファージ細胞死を誘導する。SPI2 依存的なマクロファージ細胞死はマクロファージ感染 18-24 時間後に誘導され、全身感染過程の肝臓や脾臓で誘導されることから (Monack *et al.*, 2001)、サルモネラの感染拡大に関わると考えられる。SPI2 遺伝子群の制御には、グローバルレギュレーター PhoP/PhoQ 及び OmpR/EnvZ 二成分制御系によって外界環境の変化 (低 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、リン酸濃度) を感知し、マクロファージ内生存に必要な *pag* 遺伝子群及び、*ssrA*、*ssrB* 遺伝子を発現しこれにより SPI2 レギュロン遺伝子群が発現する (Deiwick *et al.*, 1999)。

Salmonella における最も重要な病原戦略はマクロファージに貪食された後、その殺菌機構を回避して細胞内環境に適応し細胞内で増殖することである。*Salmonella* が増殖の場として利用するマクロファージ内は、前述のとおり様々な殺菌機構に曝される最も過酷な条件下である。当研究室ではマクロファージに貪食された *Salmonella* がストレス応答を誘発し、それにより産生された各種のストレス蛋白質が SPI 関連病原遺伝子群の発現や安定性に深く関わることを見出してきている (Takaya *et al.*, 2002, 2003)。ストレス蛋白質は分子シャペロンと ATP 依存性プロテアーゼに大別される。分子シャペロンは、ストレスによって変性した蛋白質や何らかの理由により適切な三次構造をとる事が出来なかった未熟な蛋白質を認識して、解きほぐし、再度活性型蛋白質に折りたたむ (リフォールド) システムである

(Houry, 2001)。ATP 依存型プロテアーゼは、分子シャペロンによるリフォールドが困難な場合にそれらの蛋白質を分解・除去するシステムである(Dougan *et al.*, 2002)。*Salmonella* は Lon、ClpXP、ClpAP、HslUV、FtsZ 5 種類の ATP 依存型プロテアーゼを持ち、いずれもその特徴から AAA⁺ (ATP associated with diverse cellular activities plus) スーパーファミリーに分類される(Neuwald *et al.*, 1999)。これまでに、Lon プロテアーゼが HilC、HilD を直接認識・分解することで SPI1 発現を負に制御すること、更に Lon による SPI1 発現の負の制御が SPI1 依存的なマクロファージ細胞死の抑制に重要であることを明らかにしている(Takaya *et al.*, 2002, 2005)。このことから、ATP 依存型プロテアーゼが *Salmonella* 病原性発現制御に重要であることが明らかとなった。

本研究では ATP 依存型プロテアーゼの一種である ClpXP に着目した。ClpXP は特定の制御蛋白質の分解と、何らかの理由によりリボソーム上で翻訳が停止したポリペプチドに SsrA タグが付加された転写産物の分解の二つのプロテアーゼ活性から成る(Flynn *et al.*, 2003, Gonzalez *et al.*, 2000, Gottesman *et al.*, 1998, Tomoyasu *et al.*, 2003)。ClpXP を構成している ClpP はリング状の 7 量体が二つ重なった構造をとり、その中心部に蛋白質分解の活性中心が含まれる。ClpX は 6 量体構造で ATPase 活性を持ち、基質蛋白質と結合し、解きほぐしを行い、解きほぐされたポリペプチドをペプチダーゼ活性を持つ ClpP へと送り込み分解を行う(Ortega *et al.*, 2000)。*Salmonella* ClpXP 欠損株における病原性について検討した結果、マウスに対する病原性が著しく低下した。このことから、ClpXP が *Salmonella* 病原性発現制御に関与する可能性を考え、その制御機構の詳細について検討を行った。その結果、ClpXP はべん毛レギュロン遺伝子群の発現制御を介して、SPI1 レギュロン遺伝子群の発現を正に制御することにより、これ等の遺伝子群を共役的に制御することを明らかとした。

第1章 ClpXP の *Salmonella* 病原性における役割

はじめに

当研究室ではこれまでに、マクロファージに貪食された *Salmonella* がストレス応答を誘発し、産生された各種のストレス蛋白質が *Salmonella* 病原性に関わる蛋白質の発現や安定性に深く関与することを見出している(Takaya *et al.*, 2002, 2003)。これ等の事実を背景に、本章ではストレス蛋白質群のメンバーである ATP 依存型 ClpXP プロテアーゼの *Salmonella* 病原性における役割について検討した。

第1節 ClpXP 欠損 *Salmonella* の病原性

第1項 マウス病原性

ClpXP が *Salmonella* 病原性に関与するか否かを検討した。*Salmonella* はマウス感染後、主に脾臓、肝臓内で増殖を繰り返す。そこで、野生株及び ClpXP 欠損株をマウス腹腔内へ投与し、感染5日後のマウスから肝臓及び脾臓を摘出し、各臓器内における生菌数を測定した。その結果、野生株を感染させたマウス脾臓、肝臓内生菌数は共に 1.0×10^6 CFU であったのに対し、ClpXP 欠損株を感染させたマウス脾臓、肝臓内生菌数はそれぞれ、 1.0×10^2 CFU 及び 1.0×10^3 CFU で、野生株に比べ臓器内生菌数は 1/1000 以下に減少していた(Fig.1-1)。次に、野生株及び ClpXP 欠損株を経口感染及び腹腔内へ投与しマウス半数致死量 (LD₅₀) を測定した。その結果、野生株の LD₅₀ は経口感染で 3.0×10^5 CFU、腹腔内投与であった(Table 1-1)。一方、ClpXP 欠損株では経口感染で 5.0×10^8 CFU 以上、腹腔内投与で 8.0×10^5 CFU と野生株に比べ LD₅₀ が顕著に上昇していた(Table 1-1)。これ等の結果から、ClpXP が *Salmonella* 病原性に関与することが明らかとなった。

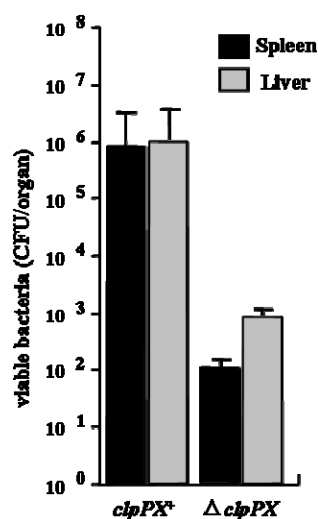


Fig. 1-1. Colonization of the organs of BALB/c mice following intraperitoneal administration of *S. enterica* serovar Typhimurium strains χ 3306 and CS2007($\Delta clpPX$). On day 5 after infection, the number of bacteria recovered from the spleens and livers of five mice were determined. The error bars indicate the standard deviations of the means of these counts.

Table 1-1. Mouse LD₅₀s for wild type and $\Delta clpPX$ strain *

Strain	LD ₅₀ (CFU)	
	oral	i.p.
<i>clpPX</i> ⁺	3.0×10^5	< 50
$\Delta clpPX$	$> 5.0 \times 10^6$	8.0×10^5

* Determination for BALB/c mice by methods of Reed and Muench [Reed and Muench, 1938]

第2項 マクロファージ内増殖能

Salmonella による全身感染は、マクロファージ細胞内に貪食された *Salmonella* がファゴソーム内で増殖を繰り返しながら血流やリンパを介して全身へ伝播することで引き起こされる。ClpXP 欠損株はマクロファージ内増殖能が低下している可能性を考え、マウス腹腔マクロファージ内における増殖能を検討した。マウス腹腔から腹腔マクロファージを採取し、野生株及び ClpXP 欠損株を MOI5 で感染させ、感染後 0、2、24、48 時間後の細胞内生菌数を測定した(Fig.1-2)。その結果、野生株ではマクロファージ感染 2-48 時間後にかけて生菌数は緩やかに上昇しているのに対し、ClpXP 欠損株では感染 24-48 時間後にかけて野生株に比べ細胞内生菌数が顕著に減少した(Fig.1-2)。この結果から、マクロファージ内増殖能の低下が ClpXP 欠損株のマウス病原性低下の主な要因であると考えられた。

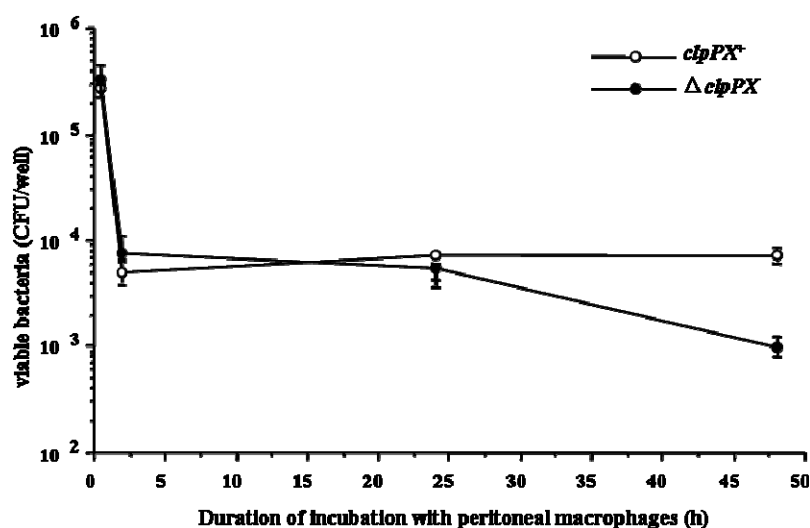


Fig. 1-2. Fate of serovar Typhimurium strain $\chi 3306$ and CS2007 ($\Delta clpPX$) derivatives within peritoneal macrophages prepared from BALB/c mice. The error bars are indicate the standard deviations of the means of triplicate samples assayed individually.

第2節 考察

本章では ClpXP の *Salmonella* 病原性における役割を明らかにする目的で、はじめに ClpXP 欠損株を用いてマウスに対する病原性を検討した。その結果、マウス腹腔内投与による臓器内生菌数は脾臓、肝臓共に ClpXP 欠損株で野生株の約 1/1000 以下 (Fig.1-1)、経口感染及び腹腔内投与によるマウス半数致死量 LD₅₀ はいずれも野生株に比べ ClpXP 欠損株で顕著に減少していた (Table.1-1)。このことから、ClpXP は *Salmonella* 病原性に必須な因子であることが明らかとなった。*Salmonella* 感染におけるマウス全身感染は、マクロファージに貪食された *Salmonella* がマクロファージファゴソーム内で増殖を繰り返しながら全身へ伝播することで引き起こされる。そこで、マウス腹腔から採取した腹腔マクロファージへ ClpXP 欠損株を感染させ、感染後の細胞内生菌数を測定した。その結果、ClpXP 欠損株では野生株に比べ感染後 24・48 時間のマクロファージ内生菌数が顕著に減少した (Fig.1-2)。この結果から、マクロファージ内増殖能の低下が ClpXP 欠損株における *Salmonella* 病原性低下の主な要因であると考えられた。*Salmonella* 病原性は SPI 上にコードされる病原遺伝群により制御され、その感染過程において SPI1、SPI2 が特に重要な役割を担っている。*Salmonella* は感染過程の環境因子に応答して SPI1、SPI2 の発現を巧みにコントロールすることで感染を成立させる。エンドサイトーシスによりマクロファージ内に取り込まれた *Salmonella* は SCV (*Salmonella* containing vacuole) と呼ばれる小胞に包まれ、生存・増殖を行う (Salcedo *et al.*, 2001)。通常、細菌を取り込んだファゴソームはエンドソームとの融合過程を経て成熟し、最終的にリソソームと融合して内包する細菌を消化するが、マクロファージ内に貪食された *Salmonella* は SPI2 により宿主の一連のメンブレントラフィックを阻害することでその殺菌機構から逃れ、増殖することが可能である。一方、感染初期の SPI2 機能が十分に発揮していない時期には、*Salmonella* はマクロファージに細胞死を誘導しその殺菌機構から逃れる。これは初期細胞死と呼ばれ SPI1 により制御される。ClpXP 欠損株ではこれ等の機構に異常をきたしている可能性が考えられる。当研究室では ClpXP と同じ ATP 依存型プロテアーゼの一種である Lon が HilC、HilD を直接認識・分解することで SPI1 発現を負に制御すること、更に Lon による SPI1 発現の負の制御が SPI1 依存的なマクロファージ細胞死の抑制に重要であることを明らかとしている (Takaya *et al.*, 2002, 2005)。ClpXP、Lon は通常、細胞内では σ^{70} により発現は一定量に保たれているが、ストレス環境下に曝されると σ^{32} により過剰に発現が誘導されることから (Yura and Nakahigashi., 1999, Tomoyasu *et al.*, 2001)、ClpXP は Lon と共に *Salmonella* 病原性発現の厳密な制御に関わっている可能性が考えられる。ClpXP による *Salmonella* 病原性発現制御機構の詳細については次章で検討を行う。

第2章 ATP 依存型プロテアーゼ ClpXP による SPI1 制御機構

はじめに

第一章で、*Salmonella* ClpXP 欠損によりマウスに対する病原性の低下、マクロファージ内増殖の著しい低下を示すことを見出した。この結果から、ClpXP が *Salmonella* 全身感染に必須な因子であること、更にマクロファージ内増殖能の低下が ClpXP 欠損株のマウス病原性低下の主な要因であることが示唆された。本章では、ClpXP によるサルモネラ病原性制御機構の詳細なメカニズムの解明を目的として研究を行った。

第1節 ClpXP 欠損株におけるマクロファージ細胞死誘導及び上皮細胞侵入能

Salmonella はマクロファージ殺菌機構に抵抗性を示し、マクロファージファゴソーム内で増殖する能力を有するが、この機構が十分に発揮していない感染初期には、マクロファージへ細胞死を誘導することでマクロファージ殺菌機構から逃れる。この細胞死は、初期細胞死と呼ばれ *Salmonella* 感染後 10 時間までに引き起こされる (Hersh *et al.*, 1999)。つまり *Salmonella* 感染におけるマクロファージ細胞死の誘導はサルモネラ感染成立における重要な戦略の一つであると言える。そこで、*Salmonella* 感染におけるマクロファージ細胞死誘導能について検討を行った。マクロファージ細胞死の検出には Rhoche Diagnostics 社の Cell Death Detection ELISA^{PLUS} を用いた。細胞死の際に宿主細胞に誘導されるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化を細胞死の指標とし、サルモネラ感染 6 時間後のマクロファージ細胞質中の断片化 DNA を分離し、DNA に結合したヒストン量を ELISA により比較した。その結果、ClpXP 欠損株で野生株に比べ、感染 6 時間後に約 2 倍の DNA 断片化が起きていたことから(Fig.2-1A)、ClpXP 欠損株の感染により、野生株よりも過剰な初期細胞死の誘導が起きていることが明らかとなった。

Salmonella 感染によるマクロファージ初期細胞死の誘導は *Salmonella* Pathogenicity island (SPI1) により制御される (Hersh *et al.*, 1999)。SPI1 には SPI 1 三型分泌装置 (SPI1-Type III secretion system :SPI1-TTSS) がコードされ、同じく SPI1 にコードされる SPI1 エフェクターが SPI1-TTSS を介して宿主細胞へ輸送されることにより引き起こされる。ClpXP 欠損株を感染させたマクロファージでは初期細胞死が過剰に誘導されていたことから、SPI1 発現が上昇している可能性が考えられた。この可能性について更に検討を行う為、*Salmonella* 上皮細胞侵入能について検討を行った。*Salmonella* 上皮細胞侵入は SPI1 により制御され、SPI1-TTSS を介して宿主細胞へ輸送された SPI1 エフェクターにより、宿主細胞のアクチン再編成から細胞膜のラフリングを惹起することで、サルモネラの効率的な宿主細胞への取り込みを可能にする (Norris *et al.* 1998, Zhou *et al.* 2001, Hardt *et al.* 1998, Rudolph *et al.* 1999, Bakshi *et al.* 2000, Stender *et al.* 2000)。腸管上皮細胞への侵入過程は 1) 上皮細胞への付着 2) 上皮細胞内への侵入から成る。侵入能は 1) に対する 2) の割合から侵入効率として求めることが可能である。野生株及び ClpXP 欠損株、それぞれの菌体を MOI10 で培養上皮細胞 Intestine-407 へ加え 2 時間

後に培地を取り除き細胞へ付着した菌数（Attachment）を測定した。その後、ゲンタマイシン 100 μ g / mL 含有培地で3時間培養し、細胞外に付着した生菌を殺菌し、細胞内菌数（Internalization）を測定した。測定結果を元に、宿主細胞へ付着した菌数に対する宿主細胞内へ侵入した菌数の割合から侵入効率（Invasion efficiency）を算出した。*clpPX*⁺株と Δ *clpPX*株の上皮細胞侵入効率を比較した結果、 Δ *clpPX*株で侵入効率が2.5倍に上昇していた（Fig.2-1B）。このことから、ClpXP が *Salmonella* 上皮細胞侵入能制御に関与することが明らかとなった。

以上の結果から、ClpXP 欠損株ではSPI1 発現が上昇している可能性が強く示唆された。

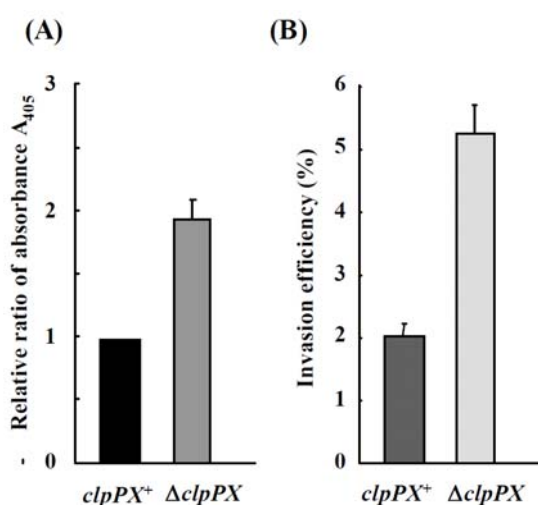


FIG. 2-1. (A) Levels of cytoplasmic nucleosomal fragments in macrophages infected with *S. enterica* serovar Typhimurium strain χ 3306 (*clpPX*⁺) and CS2007 (Δ *clpPX*). RAW264.7 cells were infected with bacteria at a MOI 10. At 6 h after infection, the levels of histone-associated cytoplasmic DNA fragments were measured by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay using an antihistone antibody as described in Materials and Methods. The data are the means and standard derivations for each strain tested in triplicate. (B) Invasion efficiency of strains χ 3306 (*clpPX*⁺) and CS2007 (Δ *clpPX*).

Cultured Intestine-407 cells were used to assess invasiveness as described in Materials and Methods. The data are the means and standard derivations for each strain tested in triplicate. Invasion efficiency was expressed as the ratio of the number of intracellular bacteria to the number of bacteria adhering to the cultured cells.

第2節 ClpXP 欠損株における SPI1 発現

第1節で ClpXP 欠損株ではSPI1 発現が上昇している可能性が示唆された。そこで、ClpXP によるSPI1 発現制御の可能性について検討した。

第1項 SPI1 蛋白質分泌量及び細胞内量

Salmonella は、染色体上のSPI1 遺伝子群にコードされるSPI1 三型分泌装置(SPI1-TTSS)によって、同じくSPI1 上にコードされるエフェクター蛋白質を分泌し、直接宿主細胞へ輸送することで宿主細胞生理作用の変化をもたらす。SipB は宿主 caspase-1 と相互作用し活性化することマクロファージ初期細胞死に関与する (Hersh *et al.*, 1999)。SipC は宿主細胞のアクチンフィラメントへ直接作用し、効率

的な上皮細胞侵入を可能にする (Galan and Collmer *et al.*, 1999, Hayward *et al.*, 1999)。そこで、ClpXP 欠損株で SPI1 発現が上昇している可能性を検討する為、はじめにマクロファージ初期細胞死に関与する SPI1 エフェクター SipB と上皮細胞侵入能に関与する SipC 細胞内蛋白質量の比較をウェスタンブロットにより行った(Fig.2-2A)。その結果、 $\Delta clpPX$ 株で $clpPX^+$ 株よりも SipB、SipC 共に細胞内蛋白質量が増加していた(Fig.2-2A)。SPI1 エフェクターはサルモネラの培養上清中に検出が可能である (Wood *et al.*, 1998) ことから、培養上清中の分泌蛋白質を SDS-PAGE により確認した結果、細胞内量の増加を反映して $\Delta clpPX$ 株において SPI1 エフェクター SipA 及び SipC 分泌量が増加していた (Fig.2-2C)。SipA は標的細胞内においてアクチン繊維を再編成させることで宿主細胞侵入に関与する (Zhou *et al.*, 1999)。又、ClpXP 欠損株ではべん毛構成蛋白質 FliC、FljB の蛋白質量が増加していた (Fig.2-2C)。この結果は、以前に当研究室で ClpXP 欠損株においてべん毛関連蛋白質量の増加を示した結果と一致する (Tomoyasu *et al.*, 2002)。

次に、ClpXP 欠損株における SPI1 エフェクター細胞内量の増加原因について検討した。SipB、SipC をコードする遺伝子は SPI1 レギュロンの最下流に位置し、HilA により正の転写制御を受けていることから (Darwin *et al.* 2000, 2001)、HilA 細胞内蛋白質量の増加による影響の可能性を考えた。この可能性を検討する為、抗 HilA 抗血清を用いたイムノブロットにより HilA 細胞内量の比較を行った。その結果、 $\Delta clpPX$ 株で $clpPX^+$ 株よりも HilA 細胞内量が増加していた(Fig.2-2A)。HilA は、AraC / XylS 転写制御因子ファミリーに属する HilC、HilD によってその転写を正に制御される (Schechter *et al.* 1999, 2001, Olekhnovich *et al.* 2002)、ClpXP 欠損株における HilA 細胞内量の増加が HilC、HilD 細胞内量増加による影響である可能性を検討する為、抗 HilC、HilD 抗血清を用いたイムノブロットにより HilC、HilD 細胞内量の比較を行った。その結果、 $\Delta clpPX$ 株で $clpPX^+$ 株よりも HilC 及び HilD 細胞内蛋白質量が増加していた(Fig.2-2A)。つまり、 $\Delta clpPX$ 株における SPI1 エフェクターの細胞内量の増加は、HilC、HilD 細胞内量の増加に伴った HilA 細胞内量の増加に起因することが示唆された。

この結果から、ClpXP 欠損株における過剰なマクロファージ初期細胞死誘導と上皮細胞侵入能の上昇は SPI1 エフェクター細胞内量増加に伴った分泌量増加が原因であることが示唆された。ClpXP 欠損株で HilA、HilC、HilD 細胞内量が増加していたことから、ClpXP は HilC、HilD に依存した機構によって SPI1 レギュロンの発現を負に制御する可能性が示唆された。

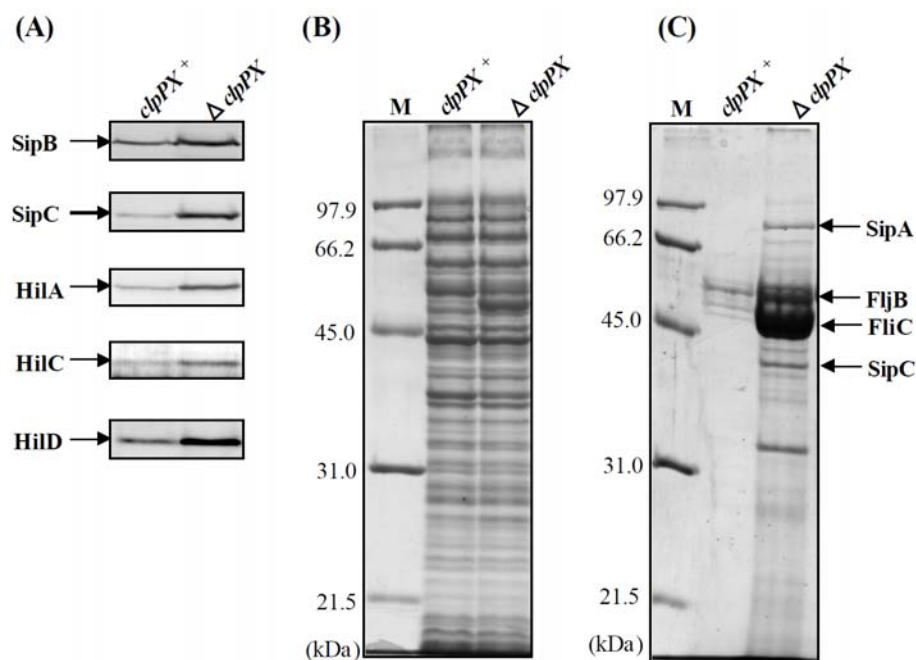


FIG. 2-2. Effect of depletion of ClpXP protease on cellular levels of various SPI1 proteins. Bacterial cells of strains, χ 3306 (*clpXP⁺*) and CS2007 ($\Delta clpXP$) were used. (A) Immunoblotting analysis of the cellular lysates using anti-SipB, anti-SipC, anti-HilA, anti-HilC, and anti-HilD sera. (B) Coomassie-brilliant blue-stained 10% SDS-PAGE patterns of the same samples used for immunoblotting analysis. Lane M contains the following molecular mass standard from top to bottom: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0 and 21.5 kDa. (C) Coomassie brilliant blue-stained gel patterns of the proteins secreted into the medium. The proteins were prepared as described in Materials and Methods.

第2項 *hilA* 転写活性

ClpXP による HilC、HilD 依存的な SPI1 発現制御の可能性を検討する為、*clpXP⁺*株及び $\Delta clpXP$ 株へ HilC 欠損、HilD 欠損及び HilC、HilD 両遺伝子欠損を導入した株を構築し、*hilA* 転写活性に対する影響を検討した。転写活性の測定は、各菌株の染色体上 *hilA* プロモーターへ *lacZ* 遺伝子を導入し、 β -galactosidase assay により行った。 $\Delta clpXP$ 株では *clpXP⁺*株に比べ、*hilA* 転写活性が約 6 倍に上昇していた (Fig.2-3A)。 $\Delta clpXP$ 株で上昇した *hilA* 転写活性は、HilC 欠損、HilD 欠損、HilC、HilD 両遺伝子欠損の導入によって *clpXP⁺*株レベルまで低下した (Fig.2-3A)。抗 HilA 抗血清を用いたイムノブロットで HilA 細胞内量を比較した結果、*hilA* 転写活性の結果と同様、 $\Delta clpXP$ 株の HilA 量の増加効果は *hilC* 及び *hilD* 欠損の導入によって野生株レベルまで減少した (Fig.2-3B)。このことから、ClpXP は HilC、HilD 双方を介して *hilA* 転写活性を制御することで SPI1 レギュロン遺伝子群を制御することが明らかとなった。

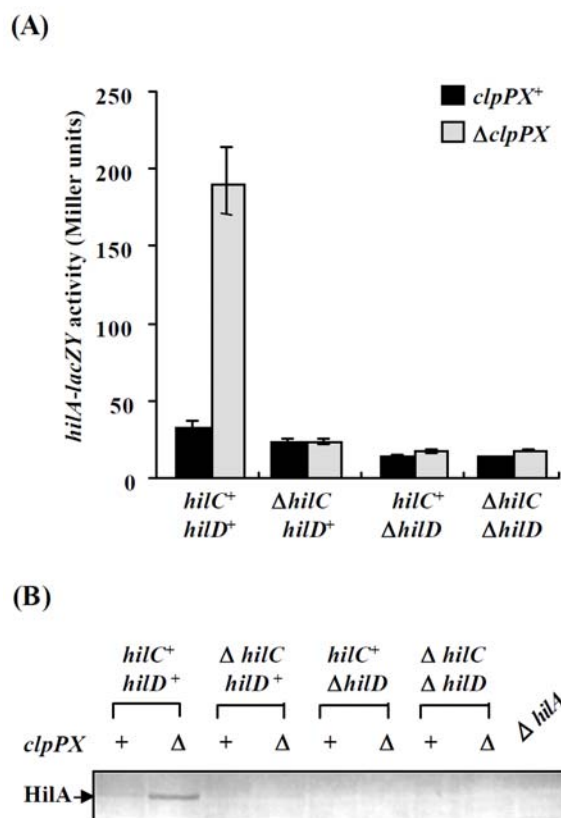


FIG. 2-3. Effect of depletion of ClpXP protease on the expression of the *hilA* gene in the absence of the *hilC* and/or *hilD* gene. (A) The expression levels of *lacZ* fusion to *hilA* promoter were assayed. The values represent the means and standard derivations of samples tested at least in triplicate. The strains used were CS2110 (*clpPX⁺ hilC⁺ hilD⁺*), CS2120(Δ *clpPX hilC⁺ hilD⁺*), CS2732(*clpPX⁺ Δ hilC hilD⁺*), CS2733(*clpPX⁺ hilC⁺ Δ hilD*), CS2815(*clpPX⁺ Δ hilC Δ hilD*), CS3319(Δ *clpPX Δ hilC hilD⁺*), CS3320(Δ *clpPX hilC⁺ Δ hilD*) and CS3321(Δ *clpPX Δ hilC Δ hilD*). (B) Immunoblotting analysis of the cellular lysates using anti-HilA serum. The strains used were χ 3306 (*clpPX⁺ hilC⁺ hilD⁺*), CS2007 (Δ *clpPX hilC⁺ hilD⁺*), CS2724 (*clpPX⁺ Δ hilC hilD⁺*), CS3322 (Δ *clpPX Δ hilC hilD⁺*), CS2725 (*clpPX⁺ hilC⁺ Δ hilD*), CS3325 (Δ *clpPX hilC⁺ Δ hilD*), CS2802 (*clpPX⁺ Δ hilC Δ hilD*), CS3328 (Δ *clpPX, Δ hilC, Δ hilD*), and CS2110 (Δ *hilA*).

第3項 *hilC*、*hilD* 転写活性

次に、ClpXP 欠損による *hilC*、*hilD* 転写活性への影響について検討した。*hilC*、*hilD* 転写活性の測定および比較は、*hilC*、*hilD* プロモーター領域の下流へ *lacZ* 遺伝子をつないだ断片をクローニングしたプラスミド pTKY559(*phlC-lacZ*)及び pTKY562(*phlD-lacZ*)を各株へ導入し、それらの株の β -ガラクトシダーゼ活性を測定し比較を行った。その結果、*clpPX⁺*株に比べ Δ *clpPX* 株では *hilC* 転写活性が約 2.6 倍、*hilD* 転写活性が約 1.9 倍に上昇していた(Fig.2-4A)。*HilC*、*HilD* は互いの転写を正に制御す

ることから (Lostroh *et al.*, 2001, Olekhovich *et al.*, 2002)、 $\Delta clpPX$ 株へ *hilC* 欠損、*hilD* 欠損を導入し *hilC*、*hilD* 転写活性の測定、比較を行った。その結果、*hilC* 欠損および *hilD* 欠損の導入によって、ClpXP 欠損による *hilC*、*hilD* 転写活性の増加効果は消失した (Fig.4A)。抗 HilC 及び抗 HilD 抗血清を用いたイムノブロットでも、転写活性と同様に、 $\Delta clpPX$ 株で *clpPX*⁺ 株に比べ増加していた HilC、HilD 細胞内蛋白質量は、*hilC* 及び *hilD* 欠損の導入によって消失した (Fig.2-4B)。従って、ClpXP 欠損による *hilC*、*hilD* プロモーター活性の上昇は HilC、HilD 蛋白質内量の増加効果によるオートレギュレーションを反映したものと考えることができる。

以上の結果より、ClpXP は *hilC*、*hilD* の転写後或いは翻訳後調節に関わり、HilC、HilD 細胞内量の制御を介して SPI1 レギュロン遺伝子群の調節を行っていることが示唆された。

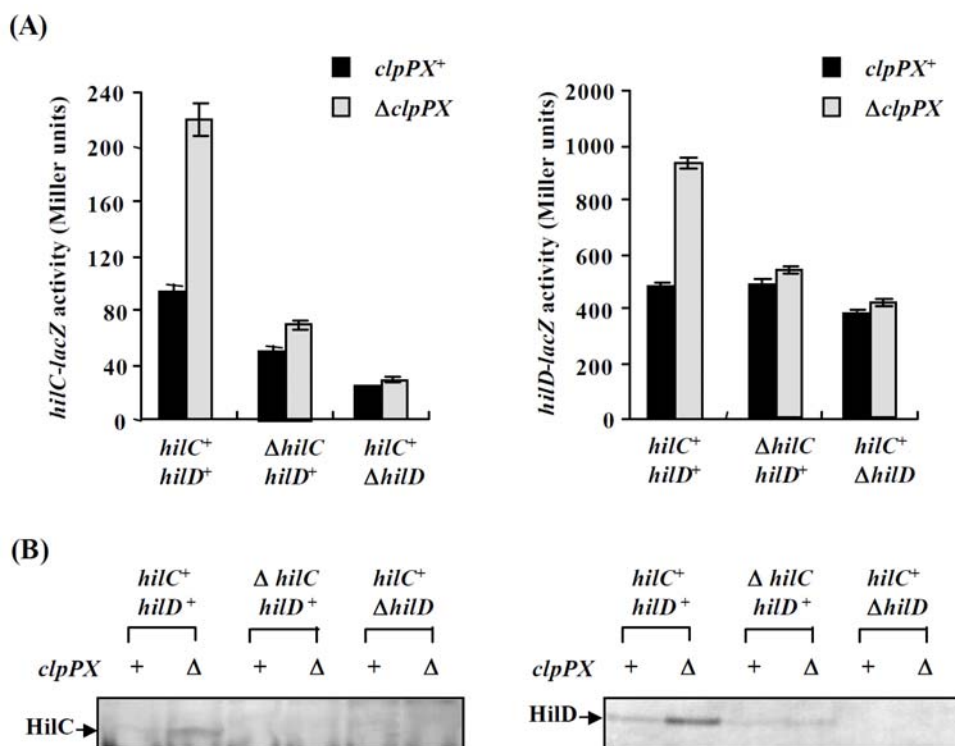


Fig. 2-4. Effect of depletion of ClpXP protease on the expression of the *hilC* and *hilD* genes in the absence of *hilC* or *hilD* gene. (A) The expression levels of *lacZ* fusions to *hilC* and *hilD* promoters were assayed. The values represent the means and standard derivations for samples tested at least in triplicate. Plasmid pTKY559 (*hilC* promoter-*lacZ* fusion) or pTKY562 (*hilD* promoter-*lacZ* fusion) was introduced into bacterial strains χ 3306 (*clpPX*⁺ *hilC*⁺ *hilD*⁺), CS2007 ($\Delta clpPX$ *hilC*⁺ *hilD*⁺), CS2724 (*clpPX*⁺ $\Delta hilC$ *hilC*⁺), CS3322 ($\Delta clpPX$ $\Delta hilC$ *hilD*⁺), CS2725 (*clpPX*⁺ *hilC*⁺ $\Delta hilD$), and CS3325 ($\Delta clpPX$ *hilC*⁺ $\Delta hilD$). The resultant strains were used for determination of β -galactosidase activity. (B) Immunoblotting of the cellular lysates using anti-HilC and anti-HilD sera. The strains used were χ 3306, CS2007, CS2724, CS3322, CS2725, and CS3325.

第3節 ClpXP による FliZ を介した SPI1 発現制御機構

ClpXP による HilC、HilD 細胞内量調節機構について詳細な検討を行った。*Salmonella* は SPI1、べん毛の二つの三型分泌装置を持つ。2つの三型分泌装置はその構造と機能の類似性から進化的起源を同じくすると推定されている (Blocker *et al.*, 2003)。当研究室では、ClpXP がべん毛レギュロンの最上位で働くマスターレギュレーター FlhDC 複合体を特異的に認識、分解することによって、べん毛レギュロン遺伝子群の発現を負に制御することを明らかにしている (Tomoyasu *et al.*, 2003)。べん毛形成に関与している 50 以上の遺伝子群は 3 つのクラス class1、class2、class3 に分類される転写階層を形成している (Fig. 2-5)。この転写階層の頂点に位置するのが、class1 *flhDC* オペロンにコードされる FlhC、FlhD であり、FlhDC 複合体を形成し class2 の σ^{70} プロモーターを活性化することでべん毛レギュロンの転写を正に制御するマスターレギュレーターとして作用する (Kutsukake *et al.* 1980, Ikebe *et al.* 1999, Liu *et al.*, 1994)。べん毛レギュロン class2 に在る 7 つのオペロンの内、*fliAZY* オペロンには class3 遺伝子群の転写に必須な σ 因子 FliA (σ^{28}) と FliZ、FliY がコードされている。以前に、染色体上の *fliAZY* オペロンの *fliA* 領域へ薬剤耐性カセット挿入により減少した *hilA-lacZ* 転写活性が、*fliZ* を相補することでその転写活性が回復したことから、FliZ が *hilA* 遺伝子の転写を活性化する可能性が指摘されていた (Kutsukake *et al.*, 2000, Lucas *et al.* 2000, Iyoda *et al.* 2001)。これらの事実から、ClpXP は FliZ 依存的な経路によって SPI1 レギュロン遺伝子群の発現調節を行うという仮説を立て、検討を試みた。

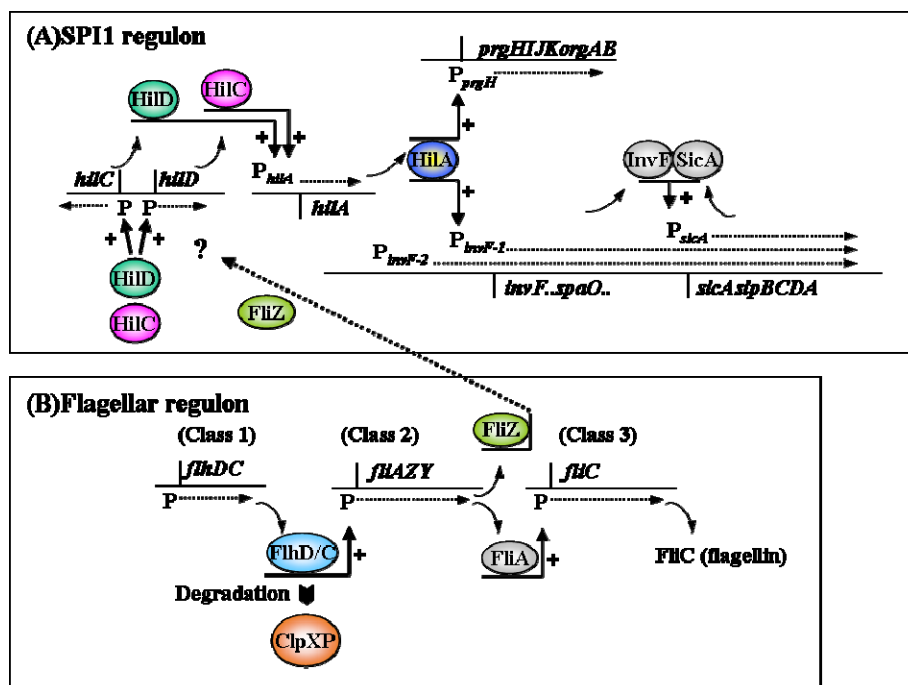


FIG. 2-5. A Schematic diagram of SPI1 and flagellar regulon: Regulatory cascade of SPI1 gene expression (A) and flagellar gene expression. ClpXP degrades the FlhD / FlhC complex, a master regulator of

flagellar regulon, leading to the down-regulation of flagellar regulon expression. *FliZ* is encoded by *fliAZY* operon of flagellar regulon class2. Previous studies suggested that *FliZ* is required for *hilA* expression. However, it is unclear about the mechanism of *FliZ* dependent *hilA* expression control.

第1項 べん毛過剰形成の上皮細胞侵入能への影響

病原細菌におけるべん毛の機能は、運動器官としてだけでなく初期感染課程で宿主細胞表層への付着に関与し、効率的な感染にも役立つことが知られる (Schmitt *et al.*, 2001)。 *Salmonella* においても、べん毛蛋白質フラジェリン欠損株で宿主細胞侵入能が低下することが報告されており、べん毛が *salmonella* の宿主細胞侵入能に関与することが示唆されている (Schmitt *et al.*, 2001)。当研究室では、ClpXP 欠損株においてべん毛が過剰形成されることを明らかにしている (Tomoyasu *et al.*, 2002)。そこで ClpXP 欠損株におけるべん毛過剰形成が上皮細胞侵入能に与える影響について検討した (Fig.2-6)。 *S. enterica* serovar Typhimurium はべん毛を構成する2つのフラジェリン *FliC*、*FljB* を持つ。そこでフラジェリンをコードする2つの遺伝子 *fliC*、*fljB* の二重欠損を野生株及び ClpXP 欠損株へ導入した株を構築し、宿主上皮細胞侵入能を比較した。 Fig. 2-1(B)の結果と比較すると、*FliC* *FljB* 欠損導入株において *clpPX*⁺ Δ *fliC* Δ *fljB* 株及び Δ *clpPX* Δ *fliC* Δ *fljB* 株どちらも侵入効率は半減していたが、*clpPX*⁺ Δ *fliC* Δ *fljB* 株に対する Δ *clpPX* Δ *fliC* Δ *fljB* 株の侵入効率の比はべん毛欠損導入前と変化しなかった (Fig.2-6)。この結果から、べん毛は上皮細胞侵入能の上昇に影響を与えるが、上皮細胞侵入能の上昇の原因ではないことが明らかとなった。以上から、ClpXP 欠損株におけるべん毛過剰形成は上皮細胞侵入能の上昇の原因ではないことが明らかとなった。

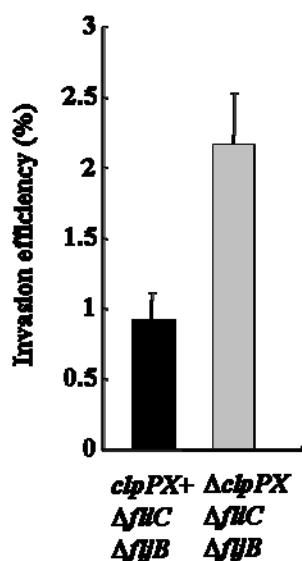


FIG. 2-6. Effect of flagella-overproduction on invasion of Intestine-407 cells by *S. enterica* serovar Typhimurium. The ability of strains CS2055 (*clpPX*⁺ Δ *fliC* Δ *fljB*), and CS2056 (Δ *clpPX* Δ *fliC* Δ *fljB*) to invade the cultured intestine-407 cells were examined as described in Materials and Methods. The data are the means and standard derivations for each strains tested in triplicate. Invasion efficiency was expressed as the ratio of the number of intracellular bacteria to the number of bacteria adhered to the cultured cells.

第2項 FliZ 欠損株における SPI1 蛋白質分泌量

FliZ 依存的な経路による SPI1 レギュロン遺伝子群の制御の可能性について検討する為、*clpPX*⁺株及び Δ *clpPX* 株へ FliZ 欠損を導入し、培養上清中の分泌蛋白質を SDS-PAGE 及び抗 SipB、SipC 抗血清を用いたイムノブロットにより比較を行った(Fig.2-7)。その結果、ClpXP 欠損株では SPI1 エフェクター SipB、SipC 分泌量が増加した (Fig.2-7A)。ClpXP 欠損株でみられた SipB、SipC 分泌量増加効果は FliZ 欠損の導入により消失した (Fig.2-7A)。このことから、ClpXP が FliZ を介して SPI1 レギュロン遺伝子群の発現を制御する可能性が示唆された。

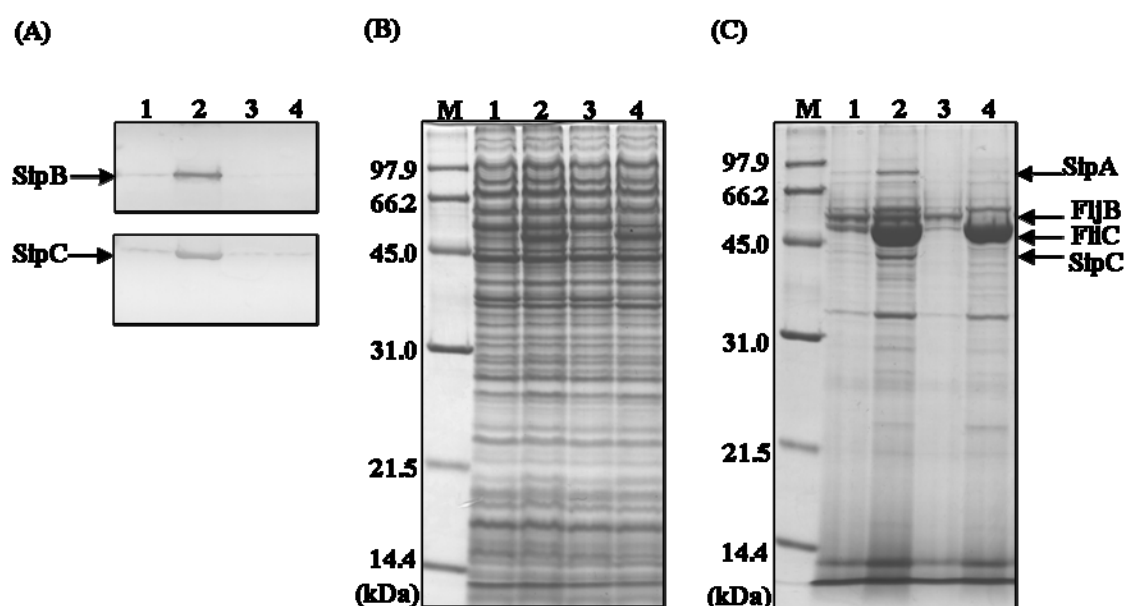


Fig. 2-7. Effect of depletion of FliZ on proteins secreted into medium by *Salmonella* cells. Bacterial strains used were as follows, lane1; χ 3306 (*clpPX*⁺*fliZ*⁺), lane2; CS2007 (Δ *clpPX* *fliZ*⁺), lane3; CS2462 (*clpPX*⁺ Δ *fliZ*) and lane4; CS2464 (Δ *clpPX* Δ *fliZ*). (A) Immunoblotting analysis of the secreted SPI1 proteins using anti-SipB and anti-SipC sera. (B) Coomassie-brilliant blue-stained 10% SDS-PAGE pattern of the same samples used for immunoblotting analysis. Lane M contains the following molecular mass standard from top to bottom: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5 and 14.4 kDa. (C) Coomassie brilliant blue-stained gel patterns of the proteins secreted into the medium. The proteins were prepared as described in Materials and Methods.

第3項 HilA、HilC、HilD 細胞内量

FliZ による SPI1 レギュロン遺伝子群制御機構の詳細について検討を行う為、HilA 細胞内量の比較をイムノブロットにより行った。その結果、FliZ 欠損株では *clpPX*⁺株に比べ、HilA 細胞内量が低下して

いた(Fig. 2-8)。このことから、FliZ は HilA 発現を正に制御することで SPI1 エフェクター蛋白質分泌を制御していることが示唆された。FliZ 欠損株において HilA 細胞内量が減少していた原因について検討を行う為、*hilA* 転写を正に制御する HilC、HilD の細胞内量を比較した。その結果、FliZ 欠損株では *clpPX*⁺株に比べ細胞内 HilC、HilD 量が低下していた(Fig.2-8)。このことから、FliZ は HilC、HilD を介して *hilA* 転写を正に制御していることが示唆された。次に ClpXP と FliZ の関係について検討するため、*clpPX*⁺ *Δ fliZ* 株と *Δ clpPX Δ fliZ* 株の HilA 細胞内量を比較した結果、*Δ clpPX* 株で増加していた HilA 細胞内量が FliZ 欠損を導入した *Δ clpPX Δ fliZ* 株では *clpPX*⁺ *Δ fliZ* 株レベルまで減少したことから(Fig.2-8)、ClpXP が FliZ 依存的な機構を介して HilA 細胞内量を制御している可能性が示唆された。ClpXP 欠損株で増加していた HilC、HilD 細胞内量は FliZ 欠損導入後、*clpPX*⁺株レベルまで減少したことから、ClpXP は FliZ を介して HilC、HilD 発現を制御し、間接的に *hilA* 転写を活性化することで SPI1 レギュロン遺伝子群を正に制御していることが明らかとなった。又、べん毛レギュロンのマスターレギュレーター FlhDC 欠損導入により、*Δ clpPX*株の HilA、HilC、HilD 細胞内量が *clpPX*⁺株レベルまで減少した(Fig.2-8)。この結果は、ClpXP がべん毛レギュロンを介して SPI1 レギュロン遺伝子群の発現制御を行うことを裏付けている。以上の結果から、ClpXP はべん毛レギュロン遺伝子群の FliZ を介して SPI1 レギュロン遺伝子群の調節を行うことが明らかとなった。更に、FliZ は HilC、HilD を介して SPI1 レギュロン遺伝子群の正の制御因子として機能する可能性が示唆された。

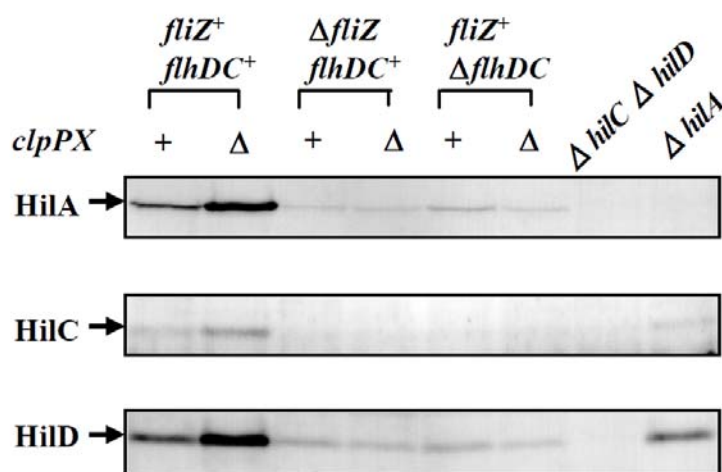


FIG. 2-8. Effects of *fliZ* or *flhDC* disruption on enhancement of cellular levels of SPI1 regulator proteins by depletion of ClpXP. Whole cell lysates were prepared from *Salmonella* cells grown in the SPI1-activating conditions and then separated in 10 % SDS-polyacrylamide gels. Immunoblotting analyses were performed using anti-HilA, anti-HilC, or anti-HilD serum. Bacterial strains used were as follows, χ 3306(*clpPX*⁺ *fliZ*⁺ *flhDC*⁺), CS2007(*Δ clpPX* *fliZ*⁺ *flhDC*⁺), CS2462(*clpPX*⁺ *Δ fliZ* *flhDC*⁺), CS2464(*Δ clpPX* *Δ fliZ* *flhDC*⁺), CS2609(*clpPX*⁺ *fliZ*⁺ *Δ flhDC*), CS2610(*Δ clpPX* *fliZ*⁺ *Δ flhDC*), CS2802 (*Δ hilC* *Δ hilD*), and CS3222 (*Δ hilA*).

第4項 FliZ 相補性

Fig.2-8 で得られた結果が、FliZ 欠損によるものであることを確認する為、FliZ 相補株を構築しイムノブロットにより検討を行った。FliZ 相補株は、Low copy number vector pMW118 へ *fliZ* 遺伝子をクローニングした plasmid pTKY554 を FliZ 欠損株へ導入することで得た。 $\Delta fliZ$ 株、 $\Delta clpPX \Delta fliZ$ 株いずれの株も FliZ 相補により、HilA、HilC、HilD 細胞内量が *clpPX*⁺ 株レベルまで回復したことから (Fig.2-9)、FliZ 欠損株における HilA、HilC、HilD 細胞内量の低下が FliZ 欠損によることが確かめられた。この結果から、FliZ が SPI1 レギュロン遺伝子群の正の制御因子として機能することが確認された。

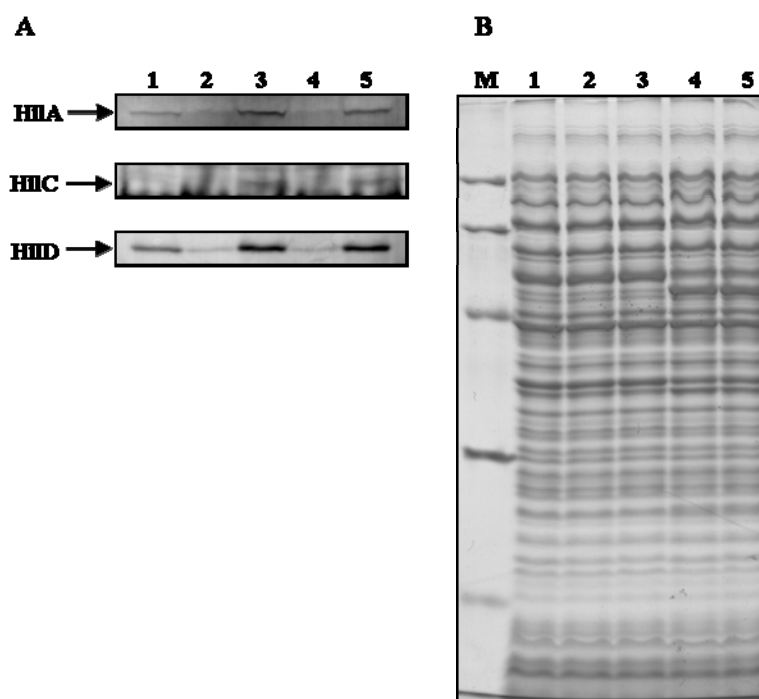


Fig. 2-9. (A)Immunoblot analysis of proteins from serovar Typhimurium strains CS3550 (*clpPX*⁺ *fliZ*⁺/p; lane1), CS3551 (*clpPX*⁺ $\Delta fliZ$ /p; lane2), CS3552 (*clpPX*⁺ $\Delta fliZ$ /p*fliZ*; lane3), CS3553 ($\Delta clpPX$ $\Delta fliZ$ /p; lane4), and CS3554 ($\Delta clpPX$ $\Delta fliZ$ /p*fliZ*; lane5) with the anti-HilA (Fig. 2-9(A); upper panel), anti-HilC (Fig.2-9(A); middle panel) and anti-HilD(Fig. 2-9(A); lower panel) antibody, respectively. (B)CBB stained SDS-PAGE patterns of whole-cell lysates.

第5項 FliZ 欠損による *hilC*、*hilD* 転写活性への影響

FliZ による HilC、HilD 細胞内量制御機構に、*hilC*、*hilD* 転写調節が関与している可能性を検討する為、FliZ 欠損株における *hilC*、*hilD* 転写活性の比較を行った (Fig.2-10)。 *hilC*、*hilD* 転写活性は、*hilC* プロモーター又は *hilD* プロモーターの下流へ *lacZ* 遺伝子を結合した DNA 断片を含むプラスミドを各株へ導入し、 β -galactosidase assay により測定を行った。その結果、 Δ *fliZ* 株における *hilD* 転写活性は *fliZ*⁺ 株の約 80%に減少するに留まり、転写活性に大きな差は見られなかった (Fig.2-10(B))。しかしながら、Fig.8 の結果で Δ *fliZ* 株は FliZ⁺ 株に比べ HilD タンパク質が大きく減少していた。このことから、FliZ は HilD の転写後或いは翻訳後調節のどちらかもしくはその両方により HilD 蛋白質量を制御する可能性が示唆された。一方 *hilD* 転写活性とは対照的に、*hilC* 転写活性は Δ *fliZ* 株で大きく減少していた (Fig.2-10(A))。近年、HilD 欠損によって *hilC* 転写活性は大きく低下するが、HilC 欠損は *hilD* 転写活性に影響しないことから、HilD が SPI1 レギュロン遺伝子群調節の頂点に位置することが示されている (Ellermeier *et al.*, 2005, 2007)。実際に *hilC* 欠損を導入した株では *hilD* 転写活性は変化を示さなかったが (Fig. 2-4(B),10(B))、*hilD* 欠損によって *hilC* 転写活性は半分以下に減少した (Fig.2-4(A),10(A))。 *hilD* 欠損を遺伝的背景に FliZ⁺ 株及び Δ *fliZ* 株の *hilC* 転写活性を比較した結果、これ等の株で *hilC* 転写活性に差は見られなかった (Fig.2-10A)。以上から、 Δ *fliZ* 株における *hilC* 転写活性の低下は、FliZ 欠損による HilD 細胞内量の低下による結果であると考えられる。

この結果から、FliZ は HilD の転写後或いは翻訳後調節を介して HilD 細胞内量を調節する可能性が示唆された。

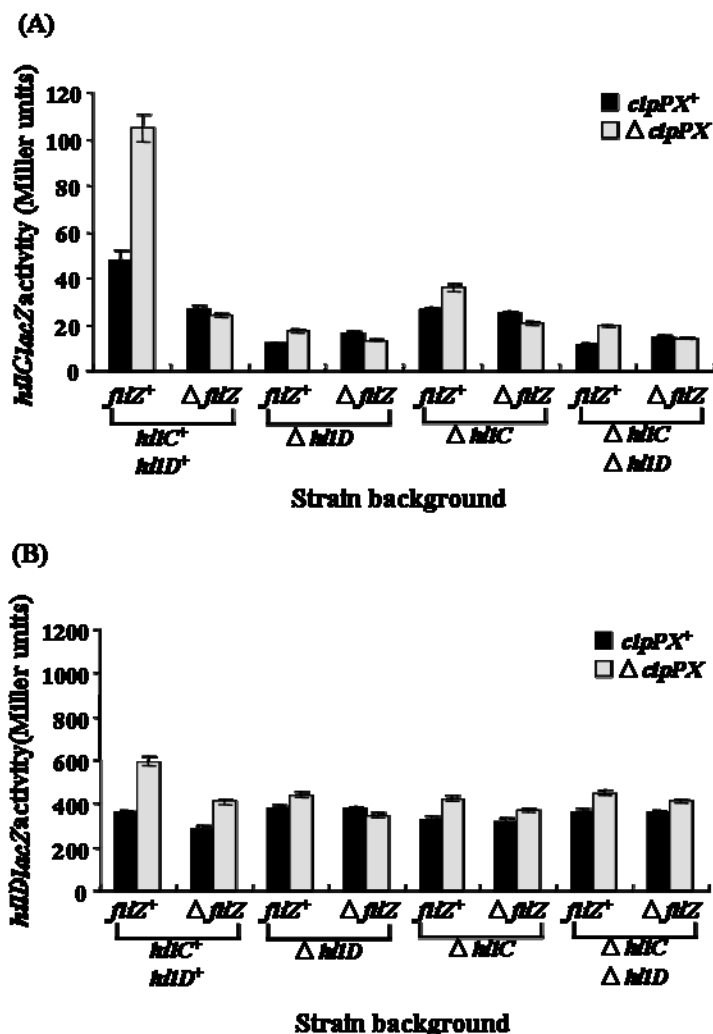


FIG. 2-10. Transcriptional levels of *hilC* and *hilD* genes in the absence of ClpXP and /or FliZ in cells. The expression of levels of *lacZ* fusion to *hilC* (A) or *hilD* (B) promoter in cells with different genetic background were assayed. Plasmid pTKY559 (*hilC* promoter-*lacZ* fusion) or pTKY562 (*hilD* promoter-*lacZ*) were introduced into bacterial strains as follows, χ 3306(*clpPX*⁺ *fliZ*⁺ *hilC*⁺ *hilD*⁺), CS2007(Δ *clpPX* *fliZ*⁺ *hilC*⁺ *hilD*⁺), CS2462(*clpPX*⁺ Δ *fliZ* *hilC*⁺ *hilD*⁺), CS2464(Δ *clpPX* Δ *fliZ* *hilC*⁺ *hilD*⁺), CS2725(*clpPX*⁺ *fliZ*⁺ *hilC*⁺ Δ *hilD*), CS3325(Δ *clpPX* *fliZ*⁺ *hilC*⁺ Δ *hilD*), CS3326(*clpPX*⁺ Δ *fliZ* *hilC*⁺ Δ *hilD*), CS3327(Δ *clpPX* Δ *fliZ* *hilC*⁺ Δ *hilD*), CS2724(*clpPX*⁺ *fliZ*⁺ Δ *hilC* *hilD*⁺), CS3322(Δ *clpPX* *fliZ*⁺ Δ *hilC* *hilD*⁺), CS3323(*clpPX*⁺ Δ *fliZ* Δ *hilC* *hilD*⁺), CS3324(Δ *clpPX* Δ *fliZ* Δ *hilC* *hilD*⁺), CS2802(*clpPX*⁺ *fliZ*⁺ Δ *hilC* Δ *hilD*), CS3328(Δ *clpPX* *fliZ*⁺ Δ *hilC* Δ *hilD*), CS3329(*clpPX*⁺ Δ *fliZ* Δ *hilC* Δ *hilD*), CS3330(Δ *clpPX* Δ *fliZ* Δ *hilC* Δ *hilD*). The resultant stains were used for determination of β -galactosidase activity. The values represent the means and standard derivations of samples tested at least in triplicate.

第6項 HilD 細胞内安定性における FliZ の影響

FliZ が翻訳後調節により HilD 細胞内量を調節している可能性について検討する為、FliZ 欠損株における HilD 安定性について調べた。まず pUHE21-2 Δ fd12 vector へ *hilD* 遺伝子をクローニングした plasmid (pTKY651)と pZA4 *lacI^q* plasmid それぞれを、 Δ *hilC* Δ *hilD* *fliZ⁺*株及び Δ *hilC* Δ *hilD* Δ *fliZ*株へ導入し、IPTG による HilD 誘導が可能な株を構築した。HilD 安定性は、終夜培養した菌液を新たな L-broth へ 1/100 希釈で植菌し、37°Cで OD₆₀₀=0.5 まで培養後、IPTG 終濃度 1mM を添加し、更に 37°C、一時間培養し HilD 誘導を行った。HilD 誘導後、遠心により集めた菌体を 2%グルコース、40 μ g / mL クロラムフェニコールを含む L-broth へ再懸濁、37°Cで静置培養し、経時的にサンプリングした。このサンプルを用いて immuno blotting を行い(Fig.2-11)、検出されたシグナルから HilD 半減期を算出した結果、*fliZ⁺*株及び Δ *fliZ*株の HilD 半減期に顕著な差は見られなかったことから (Fig.2-11)、FliZ は HilD 蛋白質の安定性には関与しないことが明らかとなった。この結果から、FliZ による HilD 細胞内量調節に翻訳後調節は関与しないことが明らかとなった。

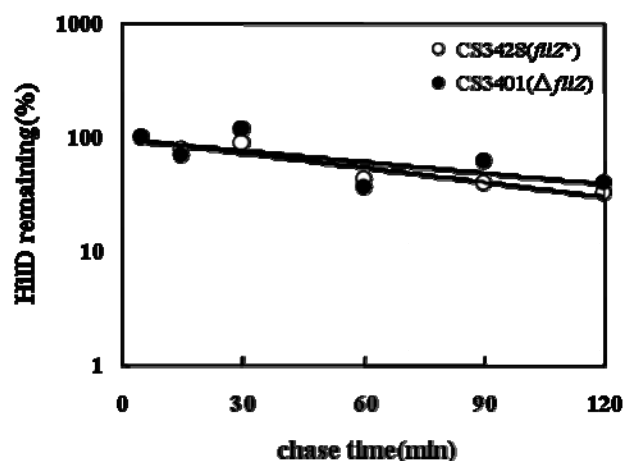


FIG. 2-11. *In vivo* stabilities of HilD proteins. Cells of strains CS3428(Δ *hilC* Δ *hilD*) and CS3401(Δ *hilC* Δ *hilD* Δ *fliZ*), which containing pTKY651(*phlD⁺*) and pZA4*lacI^q*, were grown to exponential phase, followed by the induction of *hilD* with 1mM IPTG for 1h. Cells were treated with chloramphenicol at 37°C. Samples were taken at indicated times, followed by SDS-PAGE and immunoblotting with the anti-HilD antibody. Quantification of the precipitated proteins relative to the value at time 5 min.

第7項 FliZ による HilD 転写後調節

FliZ による HilD 蛋白質の転写後調節の可能性について検討する為、FliZ⁺株及び Δ FliZ 株に *hilC hilD* 二重欠損を導入した株へ、P_{A11lacO-1} プロモーターへ *hilD* 遺伝子 ORF をつないだプラスミド pTKY651 を導入し、OD₆₀₀=1.0 まで培養後それぞれの株の HilD 細胞内量をイムノブロットによって比較した。これらの株で、HilD は IPTG 無添加条件下で P_{A11lacO-1} プロモーターからのリードスルーから発現していた(Fig.2-12A)。このときの HilD 細胞内量を比較した結果、 Δ fliZ 株では *fliZ*⁺株に比べ HilD 細胞内量が減少していた(Fig.2-12A)。P_{A11lacO-1} プロモーターが同一であることから転写産物の量は両株で一定であると考えられる。しかし、HilD 細胞内量が FliZ 欠損株で減少していることから、FliZ は HilD の転写後調節介して HilD 細胞内量を調節している可能性が示唆された。以上の結果から、FliZ は HilD の転写後調節により HilD 細胞内量を調節することが示された。

以上の結果から ClpXP 欠損によりべん毛レギュロンマスターレギュレーターFlhCD 複合体の分解が抑えられ細胞内に蓄積することで、べん毛レギュロン遺伝子群の発現が上昇し、増加したべん毛レギュロン class2 に属する FliZ は転写後調節に関わることで HilD 細胞内量の増加を導き、その結果 SPI1 レギュロン発現の上昇を引き起こすと考えられた。

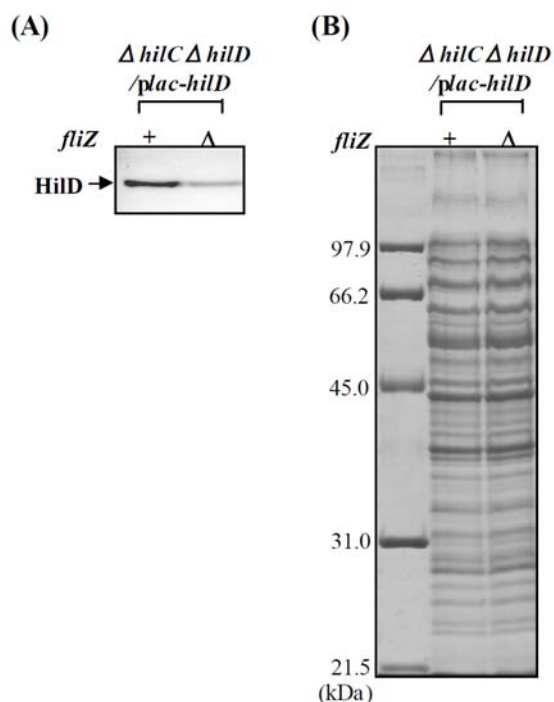


Fig. 2-12. Cellular levels of HilD protein expressed by a P_{A11lacO-1} promoter-*hilD* fusion in wild type and FliZ-depleted cells. Plasmid pTKY651(P_{A11lacO-1} promoter-*hilD* fusion) was introduced into bacterial strain CS2802 (*fliZ*⁺ Δ *hilC* Δ *hilD*) and CS3329(Δ *fliZ* Δ *hilC* Δ *hilD*). Cells of the resultant strains were grown to an optical density at 600 nm of 1.0, collected, lysed, and run on SDS-10% polyacrylamide gels. The separated proteins were transferred to a membrane and then immunostained with anti-HilD antiserum (A). Coomassie brilliant blue-stained gel electrophoretic patterns of the same samples used for immunoblotting are also shown (B). The leftmost lane in panel B contains molecular mass standards.

第4節 考察

本研究は、サルモネラ ClpXP による病原遺伝子群制御機構を解明する目的で研究を行った。ClpXP 欠損株は過剰なマクロファージ初期細胞死誘導並びに上皮細胞侵入能の上昇を示した (Fig.2-1)。これ等の現象は SPI1 エフェクターにより惹起されることから、ClpXP 欠損株と野生株の SPI1 蛋白質量を比較した。ClpXP 欠損株では SPI1 エフェクター蛋白質分泌量、細胞内量が増加していたことから (Fig.2-2(A),(C))、ClpXP が SPI1 蛋白質量制御に関与すると考えられた。SPI1 エフェクターは SPI1 レギュロン遺伝子群の下流に位置し、同じく SPI1 上にコードされる転写制御因子 HilA により正に転写を制御される (Bajaj *et al.*, 1995)。そこで HilA 細胞内量について検討した結果、ClpXP 欠損株で増加が確認された (Fig.2-2(A))。更に、ClpXP 欠損株では *hilA* の正の転写制御因子 HilC、HilD 細胞内量が増加していたことから (Fig.2-2(A))、ClpXP が HilC、HilD に依存した *hilA* 転写制御を介して SPI1 レギュロン遺伝子群の発現を調節する可能性が示唆された。実際に、ClpXP 欠損株では *hilA* 転写活性が上昇を示し、この転写活性の上昇は HilC、HilD 欠損導入によって消失したことから (Fig.2-3)、ClpXP は HilC、HilD を介して *hilA* 転写活性を制御することが明らかとなった。更に ClpXP 欠損が *hilC*、*hilD* 転写活性に与える影響について検討した結果、ClpXP 欠損株では *hilC*、*hilD* 転写活性が上昇していた (Fig.2-4(A))。一方、ClpXP 欠損株へ HilC、HilD 欠損を導入することで *hilC*、*hilD* 転写活性上昇効果は消失した (Fig.2-4A)。HilC、HilD は自身と互いの転写を正に制御することから (Lucus *et al.*, 2001, Olekhnovich *et al.*, 2002)、ClpXP 欠損による *hilC*、*hilD* 転写活性の上昇は HilC、HilD 細胞内量増加による影響であると考えられた。これらの結果から、ClpXP が HilC、HilD 細胞内量の調節を介して SPI1 レギュロン遺伝子群を制御することが示唆された。

そこで ClpXP による HilC、HilD 細胞内量制御機構の詳細について検討を行った。当研究室では、ClpXP がべん毛レギュロン遺伝子群のマスターレギュレーターである FlhDC 複合体を特異的に認識・分解することでべん毛レギュロン遺伝子群の発現を負に制御することを明らかにしていることから (Tomoyasu *et al.* 2003) (Fig.2-13)、ClpXP はべん毛レギュロン制御を介して HilC、HilD 細胞内量を調節していると考えた。サルモネラべん毛レギュロンは class1-3 に分類される転写階層を形成している (Fig.2-13)。これ迄の研究から、class2 *flhDC* オペロンにコードされる FliZ が *hilA* 転写を活性化することが明らかとなっていることから (Kutsukake *et al.*, 1999、Iyoda *et al.*, 2001)、ClpXP は FliZ を介して HilC、HilD 細胞内量を制御する仮説を立て検証を行った。FliZ 欠損導入によって ClpXP 欠損株で増加した HilC、HilD 細胞内量は野生株レベルまで減少したことから (Fig.2-8)、ClpXP は FliZ 依存的に HilC、HilD を制御すると結論することができた。又、べん毛レギュロンマスターレギュレーター *flhDC* 欠損導入により ClpXP 欠損株の HilC、HilD 細胞内量が野生株レベルまで減少したことから、ClpXP がべん毛レギュロンを介して SPI1 遺伝子群の発現制御を行うことが裏付けられた (Fig.2-8)。FliZ による HilD、HilC 細胞内量制御が *hilC*、*hilD* の転写調節によるものか検討する為、*hilC*、*hilD* 転写活性を測定した結果、前述の HilD 細胞内量の顕著な減少とは異なり、FliZ 欠損株の *hilD* 転写活性は、わずかに減少するに留まった (Fig.2-10(B))。従って、FliZ は転写後或いは翻訳後のどちらかもしくはその両方により HilD 細胞内量制御する可能性が示唆された。一方、*hilC* 転

写活性は FliZ 欠損により野生株の 1/2 まで減少していた (Fig.2-10(A))。HilD は SPI1 レギュロン発現制御の頂点に位置し、*hilC* 転写を正に制御することから (Ellermeier *et al.*, 2005, 2007)、FliZ 欠損における *hilC* 転写活性の低下は HilD 細胞内量の低下に起因すると考えられた。FliZ が HilD 転写後或いは翻訳後調節に関与する可能性について検討した結果、HilD 細胞内安定性の比較では野生株、FliZ 欠損株で差は見られなかったこと (Fig.2-11)、P_{AllacO-1} プロモーターにより HilD 発現を制御した株で FliZ 欠損株の HilD 細胞内量は野生株より減少していたことから、FliZ は転写後調節により HilD 量を調節することが明らかとなった (Fig.2-12)。

fliZ 存在下における *hilC*、*hilD* 転写活性を比較したとき、 $\Delta clpPX$ 株では *clpPX*⁺ に比べ *hilC*、*hilD* 転写活性は顕著に上昇していた (Fig.2-2,10)。HilC、HilD は互いの転写を正に制御する転写制御ループを構成し、HilD はこの転写制御ループの頂点に位置することから (Ellermeier *et al.*, 2005, 2007)、 $\Delta clpPX$ 株における *hilC*、*hilD* 転写活性の上昇は、蓄積した FliZ が転写後調節により HilD 細胞内量の増加を導き、その結果 *hilC*、*hilD* 転写制御ループ間の活性化が引き起こされた為であると考えられる。一方、 $\Delta clpPX\Delta hilC$ 株で $\Delta clpPX$ 株における *hilA* 転写活性の上昇効果は消失していたが (Fig.2-3)、これは $\Delta clpPX\Delta hilC$ 株で HilD 細胞内量が蓄積していない為であると考えられる (Fig.2-4)。従って、FliZ による HilD 細胞内量の増加には *hilC*、*hilD* 転写制御ループの活性化が必要不可欠であると考えられる。

これ迄に、FliZ と相同性を示す蛋白質や既知の蛋白質モチーフは見つかっていない。その為、FliZ による HilD 転写後調節の詳細な機構を、その蛋白質構造や類似した蛋白質から予測することは困難である。HilD 制御に関与する因子は複数同定されている。RNA 結合蛋白質 CsrA (carbon storage regulator A) は RNase E と共同して *hilD* mRNA 安定性を制御するモデルが提唱されている (Altier *et al.*, 2000, Fahlen *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 1995)。CsrA は RNA 結合蛋白質の一種で、標的遺伝子の翻訳、標的 mRNA の安定化に関与する (Baker *et al.*, 2002, Dubey *et al.*, 2003, Romeo, 1998)。CsrA は標的 mRNA の SD 配列近傍へ結合することでリボソームの結合を阻害し、更に mRNA 不安定化を促進する一方、標的 mRNA を安定化することで、結果として標的 mRNA からの翻訳産物量を増加させる (Wei *et al.*, 2001)。CsrA は主に non-coding RNA である CsrB、CsrC と 2 成分制御系 BarA/SirA による制御を受ける。CsrB、CsrC は small ncRNA で、CsrA に結合することで CsrA を不活化する (Liu *et al.*, 1997, Weilbacher *et al.*, 2003)。CsrB、CsrC は BarA/SirA によって制御される (Fortune *et al.*, 2006, Teplitski *et al.*, 2003, 2006)。Salmonella では、HilD が存在する場合のみ、*hilA-lacZ* 転写活性が上昇する (Ellermeier *et al.*, 2005)。つまり、SirA により誘導された CsrB、CsrC が CsrA 活性を阻害することにより、間接的な *hilD* 転写後調節を介して SPI1 レギュロン遺伝子群の制御をしている (Fortune *et al.*, 2006)。Hfq は近年発見された RNA シャペロンで、細菌の主要な転写後調節因子として働くことが知られ (Valentin-Hansen *et al.*, 2004)、small RNA の安定性制御を介して、標的 mRNA の翻訳を正ないし負に制御する (Sledjeski *et al.*, 2001)。*hfq* が欠損した Salmonella は病原性の著しい低下を示すが (Sittka *et al.*, 2007) これは Hfq が *hilC*、*hilD*、*rtsA* mRNA 量の調節を介して *hilA* mRNA 量の調節を行っている為である。HilE は HilD 蛋白質の活性を制御する蛋白質として知られ、HilE が HilD へ直接結合することでその活性を負に制御する (Baxter *et al.*, 2003, Fahlen *et al.*, 2000)。HilE 欠損株では *hilA* 転写が上昇するが、これは二成分制御系 PhoP/PhoQ、PhoR/PhoB やタイプ 1 線毛発現に

関与する FimZY、糖代謝に関与するグローバルレギュレーターMlcによる SPI1 レギュロン制御も HilE を介していると考えられている (Baxter *et al.*, 2003,2005, Behlau *et al.*, 1993, Pegues *et al.*, 1993, Ellermeier *et al.*, 2007)。我々は以前、AAA⁺プロテアーゼ Lon が HilD を特異的に認識し分解することで SPI1 レギュロン遺伝子群の発現を制御することを明らかにしている (Takaya *et al.*, 2005)。本研究とこれらの報告から、HilD が複数の転写後、翻訳後調節を介して制御されることで、SPI1 レギュロン遺伝子群発現は厳密に制御されていると推察される。現在明らかとなっている HilD 転写後調節機構から推察すると、FliZ は HilD の mRNA 安定性に関与している可能性が考えられる。又は、既存の *hilD* mRNA レベルでの転写後調節とは全く別な機構、例えば *hilD* 翻訳効率に関与しているのかもしれない。

前述のとおり、当研究室では ATP 依存型プロテアーゼ Lon が HilC、HilD を直接分解することで SPI1 発現を負に制御することを明らかとしている (Takaya *et al.*, 2002)。又、ストレス蛋白質である ClpXP、Lon は共にストレス条件下で σ^{32} による制御を受ける (Yura and Nakahigashi., 1999, Tomoyasu *et al.*, 2001)。このことから、マクロファージ環境下において ClpXP はべん毛レギュロンを介した経路により、Lon は直接 HilC、HilD を分解することで厳密に SPI1 発現を制御しているものと思われる。そして、この厳密な制御は *Salmonella* 感染成立の際に、感染初期にはマクロファージ殺菌機構からの回避、感染後期には増殖の場としてのマクロファージ細胞内を確保するのに必須であるといえる。

本研究から ClpXP は SPI1 発現を正に制御すること、そしてこの制御はべん毛レギュロン class2 に位置する FliZ による HilD 転写後調節を介して行われることが明らかとなった。自身の増殖の場でもあるマクロファージに対して過剰な細胞死を誘導することは *Salmonella* 感染成立の妨げとなる。故に、マクロファージに貪食された *Salmonella* がマクロファージ内ストレスを感知してストレス蛋白質を誘発し、そのメンバーである ClpXP が SPI1 発現を適切なレベルにコントロールすることは、マクロファージ細胞死を抑制し、*Salmonella* 感染成立を確実にすると言える。又、べん毛はマクロファージ表層では TLR5 により、細胞質内では Ipaf により抗原として認識され宿主免疫応答を誘発する (Hayashi *et al.*, 2001, Miao *et al.*, 2006, Franchi, 2006)。従って、マクロファージ内で ClpXP がべん毛レギュロンを負に制御することは宿主免疫応答の遅延をもたらし、感染拡大につながると考えられる。故に、ClpXP による SPI1-べん毛の共役制御は、非常に合理的な病原性発現制御システムであるといえる。

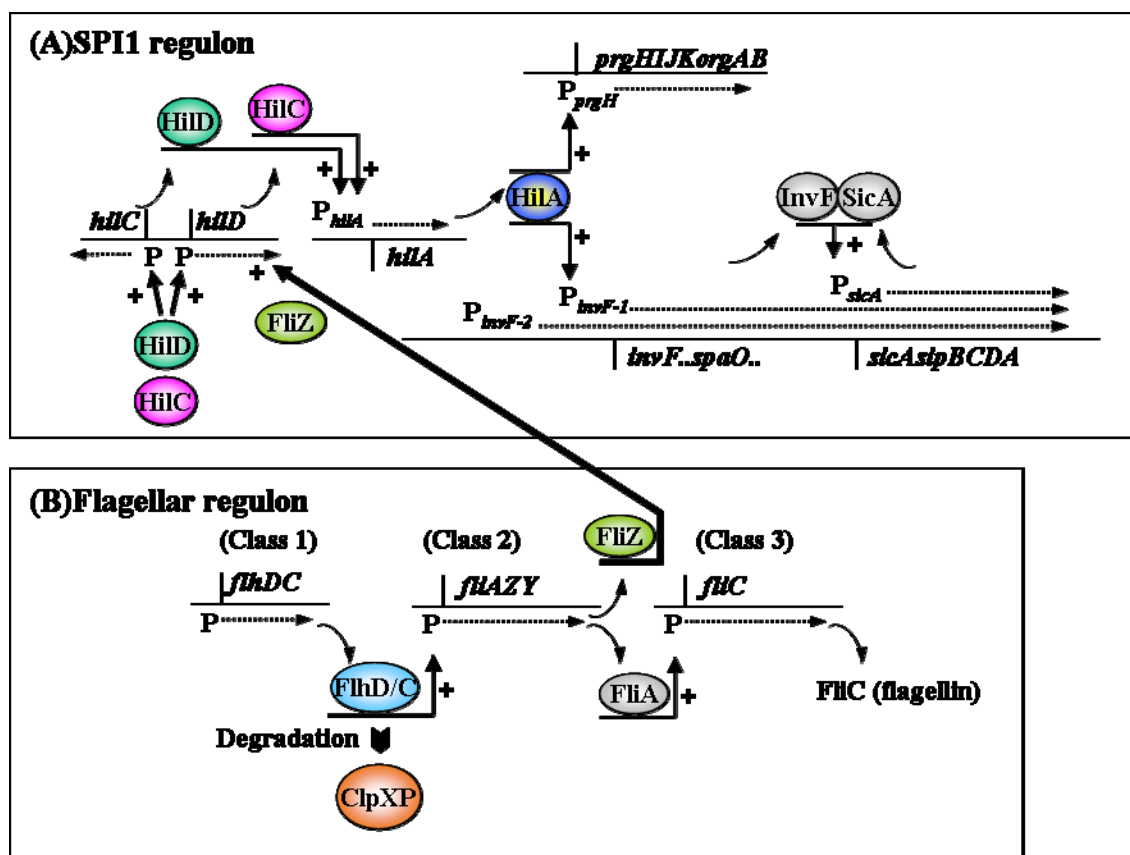


FIG. 2-13. A model of coordinate regulation of SPI1 gene expression and flagellar gene expression by ClpXP protease. (A) Regulatory cascade of SPI1 gene expression. HilC and HilD bind directly to the upstream of the master regulator gene *hila* to induce its expression. HilA directly activate the SPI1-encoded *prg/org* and *inv/spa* operons by binding just upstream of P_{prgH} and P_{invF-1} . The *inv/spa* transcript reads through the *sic/sip* operon. Activation of P_{invF-1} leads to production of InvF, in a complex with the chaperone protein SicA, then induces expression of *sic/sip* operon. (B) Regulatory cascade of flagellar gene expression. The products, FlhD and FlhC, act together in FlhD/FlhC complex as master regulator at the apex of transcription hierarchy comprising three classes of genes. FlhA which is an alternative sigma factor, σ^{28} , is required for the transcription of class 3 genes. ClpXP degrades the FlhD/FlhC complex, leading to the down-regulation of flagellar regulon expression. FlhZ, which is encoded by *fliAZY* operon of flagellar regulon, activates the expression of *hilD* at the posttranscriptional level, leading to the stimulation of SPI1 gene expression. ClpXP negatively regulates the expression of SPI1 genes through the repression of flagellar regulon expression. See the text for details and reference.

総括

細胞内寄生細菌にとって宿主細胞内は必ずしも安全な住处ではなく、絶えず宿主細胞からの攻撃に曝されている。細菌はこうした環境下においてストレス応答により、一群のストレス蛋白質の発現を誘導する。当研究室ではマクロファージに貪食された *Salmonella* がストレス応答を誘発し産生された各種のストレス蛋白質が *Salmonella* 病原性の発現制御に深く関与することを明らかとしている。本研究ではストレス蛋白質群のメンバーである ATP 依存型プロテアーゼ ClpXP に着目し、ClpXP による *Salmonella* 病原性発現制御機構の解明を目的として行った。本研究により得られた結果を以下に要約した。

1. ATP 依存型プロテアーゼ ClpXP は *Salmonella* 全身感染に必須であり、マクロファージ内増殖能の低下が ClpXP 欠損株のマウス病原性の低下の主要因であることが明らかとなった。
2. ClpXP 欠損株でマクロファージにおける初期細胞死の過剰な誘導及び上皮細胞侵入能の上昇が認められた。いずれの現象も SPI1 に制御されることから、ClpXP 欠損株では SPI1 発現が上昇している可能性が強く示唆された。
3. ClpXP は HilC、HilD 双方を介して SPI1 の中心的レギュレーター *hilA* 転写活性を制御すると結論できた。
4. ClpXP は *hilC*、*hilD* の転写後或いは翻訳後調節に関わり、それらの蛋白質の細胞内量を制御する可能性が考えられた。
5. ClpXP はべん毛レギュロン *class2* に位置する FliZ 依存的に HilC、HilD 細胞内量を制御することが明らかとなった。
6. FliZ は *hilD* 転写後調節を介して HilD 細胞内量を調節していると考えられた。HilC 細胞内量の増加に関しては、FliZ による HilD 細胞内量制御の結果であると考えられた。

以上から、ClpXP がべん毛レギュロン *class2* に位置する FliZ による HilD 転写後調節を介して SPI1 レギュロンの発現を制御することが明らかとなった。ClpXP が SPI1、べん毛発現を適切なレベルにコントロールすることは、マクロファージ細胞死を抑制し、宿主免疫応答の遅延をもたらし、*Salmonella* 感染成立を確実なものとし、感染拡大につながると言える。従って、ClpXP による SPI1-べん毛の共役制御は非常に合理的な病原性発現制御システムであるといえる。

病原性発現制御機構の解明は感染症対策の重要な課題であるといえる。本研究から、ClpXP による *Salmonella* 病原性発現制御機構が明らかとなった。我々は更に、*Salmonella* ClpXP 欠損株がマウスに

持続感染をすることを見出しており、*Salmonella* 感染症に対するワクチンとしての可能性を秘めていると考えている。*Salmonella* による感染症は発展途上国を中心として依然として世界規模で増加傾向にあり、多くの患者が犠牲となっている。本研究の成果が *Salmonella* 感染症におけるより効果的な治療及び予防法の確立に役立つことを期待する。

実験の部

材料の項

1) 菌株

使用した菌株は全て Table 1 に記載した。

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strains	Relevant characteristicsa	Reference or source
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium		
χ3306	Virulent strain, <i>gyrA</i>	Gulig and Curtiss, (1987)
CS2007	<i>clpP</i> :: Cm in χ3306	Yamamoto <i>et al.</i> , (2001)
CS2055	χ3306 <i>fljB</i> :: Tn10 <i>fliC-lac</i>	Tomoyasu <i>et al.</i> , (2002)
CS2056	CS2007 <i>fljB</i> :: Tn10 <i>fliC-lac</i>	Tomoyasu <i>et al.</i> , (2003)
CS2110	<i>hilA</i> ::Tn5 <i>lacZY</i> in χ3306	Takaya <i>et al.</i> , (2002)
CS2120	<i>hilA</i> ::Tn5 <i>lacZY</i> in CS2007	This study
CS2370	χ3306 harboring pTKY554	This study
CS2462	Δ <i>fliZ</i> ::Km in χ3306	This study
CS2464	Δ <i>fliZ</i> ::Km in CS2007	This study
CS2609	<i>flhD</i> ::Tn10 in χ3306	Tomoyasu <i>et al.</i> , (2003)
CS2610	<i>flhD</i> ::Tn10 in CS2007	Tomoyasu <i>et al.</i> , (2003)
CS2724	Δ <i>hilC</i> in χ3306	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
CS2725	Δ <i>hilD</i> in χ3306	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
CS2732	<i>hilA</i> ::Tn5 <i>lacZY</i> in CS2724	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
CS2733	<i>hilA</i> ::Tn5 <i>lacZY</i> in CS2725	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
CS2802	Δ <i>hilC</i> Δ <i>hilD</i> in χ3306	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
CS2815	<i>hilA</i> ::Tn5 <i>lacZY</i> in CS2802	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
CS3222	<i>hilA</i> ::Km in χ3306	This study
CS3319	<i>clpPX</i> ::Cm in CS2732	This study
CS3320	<i>clpPX</i> ::Cm in CS2733	This study
CS3321	<i>clpPX</i> ::Cm in CS2815	This study
CS3322	<i>clpP</i> ::Cm in CS2724	This study
CS3323	<i>fliZ</i> ::Km in CS2724	This study
CS3324	<i>fliZ</i> ::Km in CS3322	This study
CS3325	<i>clpP</i> :: Cm in CS2725	This study
CS3326	<i>fliZ</i> :: Km in CS2725	This study
CS3327	<i>fliZ</i> ::Km in CS3325	This study
CS3328	<i>clpP</i> ::Cm in CS2802	This study
CS3329	<i>fliZ</i> ::Km in CS2802	This study
CS3330	<i>fliZ</i> ::Km in CS3328	This study
CS3342	χ3306 harboring pCB182	This study
CS3343	CS2007 harboring pCB182	This study
CS3344	CS2462 harboring pCB182	This study
CS3345	CS2462 harboring pTKY559	This study
CS3346	CS2462 harboring pTKY562	This study
CS3347	CS2464 harboring pCB182	This study
CS3348	CS2464 harboring pTKY559	This study
CS3349	CS2464 harboring pTKY562	This study
CS3350	CS2724 harboring pCB182	This study
CS3351	CS2725 harboring pCB182	This study
CS3352	CS2802 harboring pCB182	This study
CS3353	CS3322 harboring pCB182	This study
CS3354	CS3322 harboring pTKY559	This study
CS3355	CS3322 harboring pTKY562	This study

Table 1. (continued)

CS3356	CS3323 harboring	pCB182	This study
CS3357	CS3323 harboring	pTKY559	This study
CS3358	CS3323 harboring	pTKY562	This study
CS3359	CS3324 harboring	pCB182	This study
CS3360	CS3324 harboring	pTKY559	This study
CS3361	CS3324 harboring	pTKY562	This study
CS3362	CS3325 harboring	pCB182	This study
CS3363	CS3325 harboring	pTKY559	This study
CS3364	CS3325 harboring	pTKY562	This study
CS3365	CS3326 harboring	pCB182	This study
CS3366	CS3326 harboring	pTKY559	This study
CS3367	CS3326 harboring	pTKY562	This study
CS3368	CS3327 harboring	pCB182	This study
CS3369	CS3327 harboring	pTKY559	This study
CS3370	CS3327 harboring	pTKY562	This study
CS3371	CS3328 harboring	pCB182	This study
CS3372	CS3328 harboring	pTKY559	This study
CS3373	CS3328 harboring	pTKY562	This study
CS3374	CS3329 harboring	pCB182	This study
CS3375	CS3329 harboring	pTKY559	This study
CS3376	CS3329 harboring	pTKY562	This study
CS3377	CS3330 harboring	pCB182	This study
CS3378	CS3330 harboring	pTKY559	This study
CS3379	CS3330 harboring	pTKY562	This study
CS3401	CS3329 harboring	pTKY651and pZA4lacIq	This study
CS3428	CS2802 harboring	pTKY651and pZA4lacIq	This study
CS3550	γ3306 harboring	pMW118	This study
CS3551	CS2462 harboring	pMW118	This study
CS3552	CS2462 harboring	pTKY554	This study
CS3553	CS2464 harboring	pMW118	This study
CS3554	CS2464 harboring	pTKY554	This study
<i>E. coli</i>			
DH5α	<i>F-recA endA gyrA thi hsdR supE relA</i> <i>Δ(lacZYA-argF)deoR Φ80lac (ΔlacZ)M15</i>		Our collection
DH5αZ1	DH5α <i>lacIq</i>		Our collection

a. Abbreviations: Cm, chloramphenicol-resistance; Km, kanamycin-resistance.

2) プラスミド

使用したプラスミドは全て Table 2 に記載した。

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
pTKY554	pMW118 with 611 bp <i>flhZ</i> fragment	This study
pTKY559	pCB182 with 5063 bp fragment containing <i>hilC</i> promoter	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
pTKY562	pCB182 with 1061 bp fragment containing <i>hilD</i> promoter	Takaya <i>et al.</i> , (2005)
pTKY651	pUHE21-2Δfd12 with 1050bp <i>hilD</i> fragment	Takaya <i>et al.</i> , (2005)

Table 2. (continued)

pCB182	Promoter cloning vector	Schneider <i>et al.</i> , (1986)
pMW118	Cloning vector	Our collection
pUHE21-2Δfd12	P _{A1lacO-1} system vector	Gamer <i>et al.</i> , (1992)
pZA4 <i>lacI</i> ^q	<i>lacI</i> ^q	Our collection

3) 細菌培養用培地

細菌の培養には以下の培地を用いた。

L-broth

Tryptone (DIFCO)	20g	
Yeast extract (DIFCO)	5g	
NaCl	5g	/ L pH7.4

SOC 培地

Tryptone (DIFCO)	20g	
Yeast extract (DIFCO)	5g	
NaCl	0.584g	
KCl	0.186g	/ L

別に MgSO₄、MgCl₂ と glucose を溶解、滅菌し、それぞれ終濃度 10mM、10mM、20mM となるように無菌的に混合する。

4) 培養細胞および培地

Intestine-406 細胞は杏林大学の神谷茂博士に分与いただいた。培養には DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; SIGMA)を用いた。添加した FCS (Fetal calf serum)は JRH Bioscience 社製品をロットチェックにより、本細胞の培養に適したロットを選択して購入した。

5) 抗体及び抗血清

S. enterica serovar Typhimurium の SipC、HilA、HilC、HilD に対する各項血清は北海道医療大学歯学部の高貝恵美子博士に作成していただいた。イムノブロッティングの 2 次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を用いた。

6) 薬剤

Ap、Cm、Km、Sp は和光純薬株式会社、Gm、Nal は SIGMA よりそれぞれ購入した。

7) 酵素試薬

制限酵素及び修飾酵素等は宝酒造、ニッポンジーン、New England Biolabs、東洋紡績、SIGMA の各社より購入した。QIAEX II Gel Extraction Kit は QIAGEN より、Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP は Amersham より購入した。

8) アガロースゲル及びアクリルアミドゲル電気泳動

アガロースはニッポンジーン及び FMC Bioproducts 社より購入した。アクリルアミド、N-N ビスメチレンアクリルアミド、過硫酸アンモニウム、SDS、CBB、TEMED は和光純薬株式会社より購入した。

方法の項

1) 染色体 DNA の調整【Stauffer *et al.*, 1981】

Stauffer らの方法に従い以下のように調整した。

まず菌を対数増殖期後期まで培養し、培養液 40mL を集菌した。菌体に 0.15M NaCl-0.1M EDTA を 2.5mL 加えた。懸濁後、0.1M NaCl-0.1M Tris-HCl pH8.0-1%SDS 溶液を加え転倒混和し、-80℃で凍結させ、その後 65℃で融解した。凍結融解を 3 回繰り返した後、等量 (15mL) の CIAA を加え、20 分間転倒混和した。室温で遠心分離(16000×g, 10min)後、等量 (15mL) の Tris-saturated phenol を加え、20 分間転倒混和した。室温で遠心分離 (16000×g, 10min) 後、水層を分取、等量の CIAA を加え 10 分間転倒混和した。室温で遠心分離 (16000×g, 10min) 後、水層を分取し、エタノール 30mL を加え、染色体 DNA を析出させ、回収した。70%エタノールを 800 μ L 加え、4℃で遠心分離(18000×g, 5min)後、上清を完全に除去し、乾燥後、TE buffer 300 μ L に膨潤させた。

2) プラスミド DNA の調整【Sambrook *et al.*, 1989】

Alkaline lysis 法により調整を行った。

まずプラスミド保持菌を対数増殖期後期まで培養し、培養液を集菌した。菌体に Solution I を 60 μ L 加え、懸濁後、10mg/mL Lysozyme 溶液を 40 μ L 加え攪拌し、5 分間室温放置した。次に Solution II を 200 μ L 加え、転倒混和後、氷上で 5 分間放置した。更に、3M 酢酸カリウム溶液を 150 μ L 加えて転倒混和後、氷上で 10 分間放置した。4℃で遠心分離 (16000×g, 10min) 後、上清を分取し、等量 (450 μ L) の Tris-saturated phenol を加え、5 分間転倒混和した。室温で遠心分離 (16000×g, 5min) 後、水層を分取、等量 (450 μ L) の CIAA を加え、3 分間転倒混和した。室温で遠心分離 (16000×g, 5min) 後、水層を分取し、エタノール 1mL を加え、5 分間室温放置した。室温で遠心分離 (16000×g, 5min) 後、上清を完全除去した。乾燥後、TE buffer 20 μ L に膨潤させた。

プラスミド DNA を塩基配列決定に用いる場合には以下に示す RNase 処理及び PEG 沈殿を行った。まず RNaseA を終濃度 10 μ g/mL となるように DNA 溶液へ加え、37℃、30 分間インキュベートした。そこに、0.6 倍容の 20%PEG8000/2.5M NaCl 溶液を加え、1 時間以上氷上に放置した。4℃で遠心分離 (18000×g, 15min) 後、上清を完全に除去し、乾燥後、TE buffer 20 μ L に膨潤させた。

収量は制限酵素反応後、アガロース電気泳動を行い、ethidium bromide 染色像から推定した。

Solution I

25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA, 50mM Glucose

Solution II

1%SDS, 0.2%NaOH

Solution III

5M potassium acetate 60mL, glacial acetic acid 11.5mL, H₂O 28.5mL

The resulting solution is 3M with respect to potassium and 5M with respect to acetate.

Tris-saturated phenol

Phenol containing 0.1% hydroxyquinoline equilibrate with an equal volume of 0.4M Tris.

CIAA

Chloroform : Isoamylalcohol=24 : 1 (w/v)

TE buffer

10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)

3) 制限酵素反応【Sambrook *et al.* 1989】

制限酵素反応は各社の示す相対活性データを参考に、適当な **Reaction buffer** を用いて行った。反応は 37℃で 2 時間から 4 時間行った。反応の進行はアガロースゲル電気泳動により確認した。

4) DNA の電気泳動【Sambrook *et al.* 1989】

DNA の電気泳動は制限酵素反応液などに **Stop dye solution** を 1/5 容量加えて反応を停止し、0.8～1.2%アガロースゲルを用いて TAE buffer 中で Mupid®-2 (コスモバイオ) を用いて 100V の定電圧で電気泳動を行った。泳動後、ゲルは 1 μ g/mL ethidium bromide 溶液中で 15 分間染色した後、数回水洗いを行い、トランスイルミネーター FAS II (東洋紡績) により DNA バンドを観察した。DNA フラグメントのサイズは λ フェージ DNA (宝酒造) の *Hind*III 消化物を同時に電気泳動することにより算出した。

TAE buffer

40mM Tris-acetate (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)

5) DNA 断片の精製

DNA 断片はアガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide 染色像により断片の存在するゲルを切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) により断片を精製した。

6) ライゲーション

DNA 断片の結合は T4 DNA ligase (Roche)を用いた。反応条件などは添付文書に従った。

7) 形質転換

大腸菌とサルモネラの形質転換にはそれぞれ (1) CaCl₂ 法、(2) Electroporation 法を用いた。

(1)CaCl₂ 法【Madel *et al.*, 1970】

100mM CaCl₂-10mM Tris-HCl(pH7.2)溶液処理により、competent cell を調整した。この competent cell 100 μ L に適量の DNA 溶液を加え氷上 30 分間放置し、42°C、30 秒間熱ショックを与え、1mL の SOC 培地を加えて 37°C、1 時間インキュベートした。この菌液を寒天平板上に塗布し、37°C、一晚培養した。

(2)Electroporation 法【Calvin *et al.*, 1988, Wirth *et al.*, 1989】

electro competent cell は、菌体を 1mM HEPES(pH7.2)で 4 回洗浄後、10% Glycerol に懸濁して調整した。electro competent cell 50 μ L に適量の DNA 溶液を加え、軽く混和後、キュベットに移し 1800V の条件で EasyjecT Prima(EQUIBIO)を用いて形質導入を行った。菌液を SOC 培地 1mL 中で 30°C、1 時間培養した後に適量の培養液を薬剤を含む寒天平板に塗布し 37°C、終夜培養した。

8) P22 トランスダクション

供与菌を適量接種した L 液体培地に P22 ファージを適量加え 37°C で振盪した。溶菌した菌液にクロロホルムを加え 37°C、30 分間振盪し、遠心後の上清を分取して lysate とした。lysate と終夜培養した受容菌液を選択薬剤入りの寒天平板上で混和し塗布した。

9) オリゴ DNA

クローニング用の DNA プライマー及び塩基配列の決定に用いた FITC-labeled DNA プライマーは SIGMA 及びサワディー・テクノロジーに合成を依頼した。Table 3 に用いたプライマーを示した。

Table 3. Synthesized oligo DNA used in this study.

Primer	Purpose	Annealing site	Sequence
M422-FITC	DNA sequence	<i>lacZ</i>	5'-CCAGGGTTTCCCAGTCACGCC-3'
RV22-FITC	DNA sequence	<i>lacZ</i>	5'-CACACAGGAAACAGCTATGACC-3'
<i>fliZ</i> F	<i>fliZ</i>	<i>fliZ</i> :-12→17	5'-CCAGGGGATCCCATGACGGTGCAGCAACC-3'
<i>fliZ</i> R	<i>fliZ</i>	<i>fliZ</i> :569←599	5'-GGTTTGCCAAGCTTCACCAACACGACTCTGC-3'

1 0) PCR 法

PCR は TaKaRa *Thermal Cycler* MP(宝酒造)を用いて行った。LA Taq polymerase(宝酒造)と添付の 10×buffer を用いて、通常 50 μ L のスケールで反応を行った。

1 1) 塩基配列決定法

RNaseA で処理したプラスミド DNA を鋳型として、Dideoxy chain termination 法により行った。適当な蛍光プライマーを用い、Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP(Amercham)を用いて反応を行った。泳動は 1.2×TBE buffer 中で 4.2%尿素ゲルを用いて DNA シークエンサーDSQ-2000 システム (島津製作所) により行った。

4.2%尿素ゲル

尿素	20g
10×TBE buffer	6mL
Long Ranger™ 50% Gel Solution(FMC)	4mL / 50mL

10×TBE buffer

89mM Tris-borate, 2.5mM EDTA

1 3) 塩基配列の解析

既知塩基配列は Microbial Genomes Blast Database より入手した。これらの解析には GENETYX Ver.8 を用いた。

1 4) 電気泳動用細菌蛋白質及び分泌蛋白質画分の調整

細菌蛋白質分画は、回収した菌体を電気泳動用 Sample buffer(0.05M Tris-HCl(pH6.8), 2% SDS, 5% β -メルカプトエタノール, BTB)に懸濁し、94℃、5 分間熱処理した後、4℃で遠心分離(16000×g, 10min)を行い、電気泳動用サンプルとして用いた。

分泌蛋白質分画を調製する菌体は、終夜培養した菌液を L-broth に 100 倍希釈し、37℃、好気性条件下で OD₆₀₀=0.5 ないし 1.0 まで培養した菌液を用いた。培養液を 4℃で遠心分離(13000×g, 30min)を行い、上清回収後、Millex-HV filter(0.45 μ m-pore size ; Millipore)を用いて菌体を完全に除去した。終濃度 10%になるように TCA を加え、数分間氷上に放置した後、4℃で遠心分離(16000×g, 10min)を行い、アセトンで洗浄後、再度 4℃で遠心分離(16000×g, 5min)を行い、分泌蛋白質を回収した。Sample buffer に懸濁し、94℃、5 分間熱処理した後、電気泳動用サンプルをして用いた。

1 5) SDS-PAGE による細菌蛋白質の分離【Laemmli, 1970】

SDS-PAGE は以下示す Laemmli の方法に従って行った。

アクリルアミドゲル(130×150×1mm)、電気泳動にはマリソル垂直型スラブ電気泳動装置を使用した。

電気泳動は一次元電気泳動の際は 40mA、二次元電気泳動の際は Stacking gel 20mA、Separating gel 30mA の定電流で行った。分子量マーカー(Bio-Rad)を同時に電気泳動した。染色は CBB を用い、7% 酢酸、25%メタノール溶液で脱色した。

Separating gel

30%アクリルアミド溶液	適宜
Tris-HCl (pH8.8)	0.375M
SDS	0.1%
過硫酸アンモニウム	0.1%
TEMED	0.1%

Stacking gel

30%アクリルアミド溶液	4.5%
Tris-HCl(pH6.8)	0.125M
SDS	0.1%
過硫酸アンモニウム	0.6%
TEMED	0.1%

30%アクリルアミド溶液

アクリルアミド	30%
N-N ビスメチレンアクリルアミド	1.2%

Running buffer (pH8.3)

Tris	30g
グリシン	14.4g
SDS	1.0g / L

1 6) イムノブロッティング【Burnett, 1981, Towbin *et al.*, 1979】

イムノブロッティングは Towbin らの方法に従って行った。

方法の項-15 に従い、電気泳動によりゲル上に展開した菌の蛋白質を TRANS-BLOT™ CELL(Bio-Rad)を用いて Immobilon-P PVDF 膜(Milipore)に転写し、膜上の蛋白質を一次抗体及び二次抗体と反応させた後、一次抗体と反応した蛋白質を二次抗体に結合しているアルカリフォスファターゼ活性を利用して 0.3mg / mL NBT 及び 0.15mg / mL BCIP を用いて検出した。

1 7) クロラムフェニコール添加法による蛋白質半減期の算出

終夜培養した菌液を、L-broth に 100 倍希釈し、37℃で OD₆₀₀=0.5 まで振盪培養した後、終濃度

1mM IPTG を添加し 1 時間振盪培養し蛋白質産生を誘導した。遠心分離により集菌後、L-broth で洗浄し IPTG を除去した。遠心分離により集菌した菌体を、蛋白質合成を停止させる目的で、2%グルコース、40 μ g/mL 含有 L-broth へ懸濁した。この菌液を 37℃へ静置し、経時的に分取した菌液 900 μ L へ終濃度 5%TCA を加え、氷上で 15 分間放置した後、室温で遠心分離 (15000 $\times$ g, 10min) 後、上清を完全除去、アセトンで洗浄後、乾燥させ、Sample buffer に懸濁し SDS-PAGE で分離した。イムノブロットにより、SDS-PAGE で分離した目的蛋白質を検出後、Quantity one(Bio-Rad)により定量を行った。

1 8) β -ガラクトシダーゼアッセイ【Miller, 1972】

β -ガラクトシダーゼ活性は Miller の方法に従って測定した。

各培養条件に従って培養した菌液を氷中で 20 分間放置し、一部を採取して OD₆₀₀ を測定した。0.2mL の菌液を 0.8mL の Z buffer と混合し、40 μ L のクロロホルムと 20 μ L の 0.1%SDS 溶液を加えてボルテックスにより菌体を溶菌させた。28℃でプレインキュベーションした後、0.8mg の o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside[ONPG; 0.4mg / mL in Na-phosphate pH7.0]を加えて 28℃で反応を行った。OD₄₂₀ が 0.6~0.9 になるまで反応した後、0.5mL の 1M Na₂CO₃ 溶液を加えて反応を停止し、OD₄₂₀ と OD₅₅₀ を分光光度計により測定した。Miller unit は以下の式で算出した。

$$\text{Unit} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / t \times v \times \text{OD}_{600}$$

t=反応時間(分) v=アッセイに使用した菌体液の量(mL)

Z buffer

60mM Na₂HPO₄

40mM NaH₂PO₄

10mM KCl

1mM MgSO₄

50mM β -mercaptoethanol

1 9) 上皮細胞様培養細胞株の培養

Intestine-407 細胞の培養は、10% FCS を添加した DMEM 培地中で 5% CO₂、95%空気を含むガス及び飽和水蒸気存在下、37℃で行った。数日間の培養の後、25 または 75cm² の培養フラスコに 70-90 飽和(monolayer)まで細胞を増殖した後、0.25%トリプシン-EDTA 溶液処理により細胞を剥がし、HBSS 洗浄後、1 $\times$ 10⁵cells / mL になるように細胞増殖用培地で希釈し、継代した。

2 0) 上皮細胞への付着と上皮細胞内生菌数の測定【Galan and Curtiss, 1989】

Galan らの方法に従って行った。

24 ウェルプレートに Intestine-407 細胞を 2 $\times$ 10⁵cells/well で 5%CO₂、95%空気を含むガス及び飽

和水蒸気存在下、37℃で終夜培養した。培地を取り除き HBSS で 3 回洗浄後、10% FCS 及び Gm 100 μ g/mL を添加した DMEM を加え、5%CO₂、95%空気を含むガス及び飽和水蒸気存在下、37℃で 3 時間培養し、細胞外に存在する細菌を殺菌した。培地を取り除いた後、HBSS で 3 回洗浄し、0.2% TritonX-100(SIGMA)を加えて細胞を溶解し細菌液を回収した。回収した細菌液を BSG で段階希釈した後、Nal 25 μ g/mL を含む L 寒天平板上に塗布し、37℃で終夜培養後、生菌数を測定した。また、べん毛量の違いによる細胞付着機能のへ影響を除外する為、細菌を細胞に感染させた直後、2000×g で 5 分間遠心することにより菌体を細胞に付着させ、同様に実験を行った。

2 1) *Salmonella* 感染によるマクロファージ細胞死誘導の検出・定量

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 へ MOI10 で感染させる。感染 10 時間後 HBSS で洗浄し、0.5 mL の lysis buffer を加え室温、30 分静置後、200×g、4℃、10 分間遠心を行った。遠心後得られた上清の内 300 μ L を分取し、更に 1/100 希釈したものをアッセイに用いた。ヒストン結合 DNA 断片の検出・定量には Roche Daiagnostics 社の Cell Death Detection ELISA^{PLUS} を用いた。

2 2) 腹腔内投与における感染マウスでの *S. enterica* serovar Typhimurium の臓器内生菌数

BALB/c マウス腹腔内へ 100CFU の菌体を含む菌液を投与した。感染 5 日後のマウスから脾臓及び肝臓を摘出し、ホモジナイズした溶液を PBS に 1/10 ごとに系列希釈した後、選択寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養し、生菌数を測定した。

2 2) マウス腹腔マクロファージ内生菌数の測定

BALB/c マウス腹腔から PBS を用いて腹腔マクロファージを回収した後、HBSS で洗浄し、10%FCS 及び 50 μ M β -mercaptoethanol を含む DMEM へ懸濁し、24 ウェルプレートへ分注、37℃で一晩培養した。感染に用いる菌体は 50% fresh normal mouse serum で 37℃、15 分間オプソニン化を行った後、DMEM へ希釈した。菌体を MOI5/well で加え、500×g で 5 分間遠心した後、5%CO₂、95%空気を含むガス及び飽和水蒸気下、37℃、30 分間培養し吸着、貪食させた。HBSS で 3 回洗浄した後、10%FCS 及び Gm100 μ g/mL を含む DMEM を加え、5%CO₂、95%空気を含むガス及び飽和水蒸気存在下、37℃、90 分間培養し、細胞外に存在する菌体を殺菌した。HBSS で 3 回洗浄した後、10%FCS 及び Gm10 μ g/mL を含む DMEM を加えた。一定時間培養した後、培地を除いて HBSS で 3 回洗浄し、0.1% sodium deoxycholate を含む PBS を加えてマクロファージを溶解することで細菌液を回収した。この細菌液を BSG で段階希釈した後、選択寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養し、生菌数を測定した。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 山本友子教授に心より感謝申し上げます。

種々の御助言、御協力を頂きました千葉大学薬学研究院 高屋明子講師、千葉大学薬学研究院 大矢麻衣助教に深く感謝申し上げます。

本研究に対し、多大なる御協力を頂きました千葉大学大学院医学薬学府 松井真理氏、北川良氏、山口陽氏、小林里美氏、北川奈緒美氏、白川阿矢子氏、岡安優太氏、奥山香織氏、都竹奈巳氏、山田公之氏、千葉大学薬学部微生物薬品化学研究室 黒江由佳乃氏、谷川育己氏、原貴史氏、藤縄みず季氏並びに卒業生の方々に心より感謝いたします。

最後にこのような環境で学ぶ機会を与えて下さり、いつも暖かく見守って下さった家族に心から御礼申し上げます。

参考文献

- Altier, C., Suyemoto, M., Lawhon, SD. (2000) Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun.* **68**:6790-6797.
- Alto, NM., Shao, F., Lazar, CS., Brost, RL., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, SA., Ghosh, P., Hughes, TR., Boone, C., Dixon, JE. (2006) Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell.* **124**: 133-145.
- Bajaj, V., Hwang, C., Lee, CA. (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. *Mol Microbiol.* **18**: 715-727.
- Bajaj, V., Lucas, RL., Hwang, C., Lee, CA. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol.* **22**: 703-714.
- Baker, CS., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., Babitzke, P. (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **44**: 1599-1610.
- Bakshi, CS., Singh, VP., Wood, MW., Jones, PW., Wallis, TS., Galyov, EE. (2000) Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol.* **182**: 2341-2344.
- Baxter, MA., Fahlen, TF., Wilson, RL., Jones, BD. (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun.* **71**: 1295-1305.
- Baxter, MA., Jones, BD. (2005) The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun.* **73**: 1377-1385.
- Behlau, I., Miller, SI. (1993) A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells. *J Bacteriol.* **175**: 4475-4484.
- Blocker, A., Komoriya, K., Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 3027-3030.
- Boucrot, E., Henry, T., Borg, JP., Gorvel, JP., Méresse, S. (2005) The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science.* **308**: 1174-1178.

- Burnett, W.N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112**: 195-203.
- Calvin, N.M., and Hanawalt, P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* **170**: 2796-2801.
- Chakravorty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J., Hensel, M. (2005) Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *EMBO J.* **24**: 2043-2052.
- Chen, LM., Hobbie, S., Galán, JE.. (1996) Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science.* **274**: 2115-2118.
- Collazo, CM., Galán, JE. (1997) The invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol.* **24**: 747-756.
- Cornelis, GR., Van, Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* **54**: 735-774.
- Crump, JA., Luby, SP., Mintz, ED. (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* **82**: 346-353.
- Darwin, KH., Miller, VL. (1999) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol.* **181**: 4949-4954.
- Darwin, KH., Miller, VL. (2000) The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella* Typhimurium virulence genes. *Mol Microbiol.* **35**: 949-960.
- Darwin, KH., Miller, VL. (2001) Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella* Typhimurium. *EMBO J.* **20**: 1850-1862.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., Hensel, M. (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol.* **31**: 1759-1773.
- Dougan, DA., Mogk, A., Bukau, B. (2002) Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cell Mol Life Sci.* **59**: 1607-1616.
- Dubey, AK., Baker, CS., Suzuki, K., Jones, AD., Pandit, P., Romeo, T., Babitzke, P. (2003) CsrA regulates translation of the

- Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol.* **185**: 4450-4460.
- Ellermeier, CD., Ellermeier, JR., Slauch, JM. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* **57**: 691-705.
- Ellermeier, JR., Slauch, JM. (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol.* **10**: 24-29.
- Fahlen, TF., Mathur, N., Jones, BD. (2000) Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **28**: 25-35.
- Flynn, JM., Neher, SB., Kim, YI., Sauer, RT., Baker, TA. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell.* **11**: 671-683.
- Fortune, DR., Suyemoto, M., Altier, C. (2006) Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun.* **74**: 331-339.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, TD., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, EP., Núñez, G. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol.* **7**: 576-582.
- Galan, J., and Curtiss III, R. (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**: 6383-6387.
- Galán, JE., Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* **284**: 1322-1328.
- García-del Portillo, F., Finlay, BB. (1994) Invasion and intracellular proliferation of *Salmonella* within non-phagocytic cells. *Microbiologia.* **10**: 229-238.
- Garcia-del Portillo, F., Finlay, BB. (1995) The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol.* **3**: 373-380.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, JW., Maguire, ME., Finlay, BB. (1992) Characterization of the micro-environment of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol.* **6**: 3289-3297.

- Garcia-del Portillo, F., Zwick, MB., Leung, KY., Finlay, BB. (1993) *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 10544-10548.
- Garcia-del Portillo, F., Zwick, MB., Leung, KY., Finlay, BB. (1993) Intracellular replication of *Salmonella* within epithelial cells is associated with filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins. *Infect Agents Dis*. **2**: 227-231.
- Gonzalez, M., Rasulova, F., Maurizi, MR., Woodgate, R. (2000) Subunit-specific degradation of the UmuD/D' heterodimer by the ClpXP protease: the role of trans recognition in UmuD' stability. *EMBO J*. **19**: 5251-5258.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., Sauer, RT. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev*. **12**: 1338-1347.
- Hayashi, F., Smith, KD., Ozinsky, A., Hawn, TR., Yi, EC., Goodlett, DR., Eng, JK., Akira, S., Underhill, DM., Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. **410**: 1099-1103.
- Hayward, RD., Koronakis, V. (1999) Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J*. **18**: 4926-4934.
- Hansen-Wester, I., Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect*. **3**: 549-559.
- Hardt, WD., Chen, LM., Schuebel, KE., Bustelo, XR., Galán, JE. (1998) *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. **93**: 815-826.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, LA., Lecine, P., Steele-Mortimer, O., Borg, JP., Gorvel, JP., Méresse, S. (2006) The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 13497-13502.
- Hensel, M. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*. **36**: 1015-1023.
- Hersh, D., Monack, DM., Smith, MR., Ghori, N., Falkow, S., Zychlinsky, A. (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 2396-2401.
- Hobbie, S., Chen, LM., Davis, RJ., Galán, JE. (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella* Typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol*.

- 159: 5550-5559.
- Holden, DW. (2002) Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic*. **3**: 161-169.
- Houry, WA. (2001) Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci*. **2**: 227-244.
- Hueck, CJ. (1997) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**: 379-433.
- Ikebe, T., Iyoda, S., Kutsukake, K. (1999) Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology*. **145**: 1389-1396.
- Iyoda, S., Kamidoi, T., Hirose, K., Kutsukake, K., Watanabe, H. (2001) A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog*. **30**: 81-90.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. (2005) The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int J Syst Evol Microbiol*. **55**: 519-520.
- Jones, BD., Ghori, N., Falkow, S. (1994) *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med*. **180**: 15-23.
- Knodler, LA., Steele-Mortimer, O. (2003) Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic*. **4**: 587-599.
- Kuhle, V., Hensel, M. (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci*. **61**: 2812-2826.
- Kutsukake, K., Ikebe, T., Yamamoto, S. (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet Syst*. **74**: 287-292.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol*. **172**: 741-747.
- Liu, MY., Yang, H., Romeo, T. (1995) The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol*. **177**: 2663-2672.

- Liu, MY., Gui, G., Wei, B., Preston, JF 3rd., Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, DP., Romeo, T. (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **272**: 17502-17510.
- Liu, X., Matsumura, P. (1994) The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol.* **176**: 7345-7351.
- Lostroh, CP., Lee, CA. (2001) The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P(prgH) from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol.* **183**: 4876-4885.
- Lucas, RL., Lostroh, CP., DiRusso, CC., Spector, MP., Wanner, BL., Lee, CA. (2000) Multiple factors independently regulate *hila* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **182**: 1872-1882.
- Madel, M., and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* **53**: 159-162
- Miao, EA., Alpuche-Aranda, CM., Dors, M., Clark, AE., Bader, MW., Miller, SI., Aderem, A. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol.* **7**: 569-575.
- Miller, J. (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.*
- Mills, SD., Ruschkowski, SR., Stein, MA., Finlay, BB. (1998) Trafficking of porin-deficient *Salmonella* Typhimurium mutants inside HeLa cells: *ompR* and *envZ* mutants are defective for the formation of *Salmonella*-induced filaments. *Infect Immun.* **66**: 1806-1811.
- Monack, DM., Detweiler, CS., Falkow, S. (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. *Cell Microbiol.* **3**: 825-837.
- Neuwald, AF., Aravind L, Spouge, JL., Koonin, EV. (1999) AAA⁺: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**: 27-43.
- Norris, FA., Wilson, MP., Wallis, TS., Galyov, EE., Majerus, PW. (1998) SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 14057-14059.
- Ochman, H., Soncini, FC., Solomon, F., Groisman, EA. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 7800-7804.

- Olekhnovich, IN., Kadner, RJ. (2002) DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **184**: 4148-4160.
- Ortega, J., Singh, SK., Ishikawa, T., Maurizi, MR., Steven, AC. (2000) Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. *Mol Cell.* **6**: 1515-1521.
- Patel JC, Galán JE. (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol.* **175**: 453-463.
- Rathman, M., Barker, LP., Falkow, S. (1997) The unique trafficking pattern of *Salmonella* Typhimurium-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun.* **65**: 1475-1485
- Rudolph, MG., Weise, C., Miold, S., Hillenbrand, B., Bader, B., Wittinghofer, A., Hardt, WD. (1999) Biochemical analysis of SopE from *Salmonella* Typhimurium, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for RhoGTPases. *J Biol Chem.* **274**: 30501-30509.
- Romeo, T. (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* **29**: 1321-1330.
- Salcedo, SP., Noursadeghi, M., Cohen, J., Holden, DW. (2001) Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell Microbiol.* **3**: 587-597.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Schechter, LM., Damrauer, SM., Lee, CA. (1999) Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol.* **32**: 629-642.
- Schechter, LM., Lee, CA. (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* Typhimurium *hilA* promoter. *Mol Microbiol.* **40**: 1289-1299.
- Schmitt,CK., Ikeda, JS., Darnell, SC., Watson, PR., Bispham, J., Wallis, TS., Weinstein, DL., Metcalf, ES., O'Brien, AD. (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun.* **69**: 5619-5625.

- Shea, JE., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, DW. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 2593-2597.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., Vogel, J. (2007) The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol*. **63**: 193-217.
- Stauffer, G.V., Plamann, M.D., and Stauffer, L.T. (1981) Construction and expression of hybrid plasmids containing the *Escherichia coli* *glaA* gene. *Gene*. **14**: 63-72
- Stein, MA., Leung, KY., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F., Finlay, BB. (1996) Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol*. **20**: 151-164.
- Stender, S., Friebe, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S., Hardt, WD. (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella* Typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol*. **36**: 1206-1221.
- Tindall, BJ., Grimont, PA., Garrity, GM., Euzéby, JP. (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. **55**: 521-524.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., Yamamoto, T. (2005) Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol*. **55**: 839-852.
- Takaya, A., Suzuki, M., Matsui, H., Tomoyasu, T., Sashinami, H., Nakane, A., Yamamoto, T. (2003) Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. *Infect Immun*. **71**: 690-696.
- Takaya, A., Tomoyasu, T., Tokumitsu, A., Morioka M, Yamamoto T. (2002) The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol*. **184**: 224-232.
- Teplitski, M., Goodier, RI., Ahmer, BM. (2003) Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol*. **185**: 7257-7265.
- Teplitski, M., Goodier, RI., Ahmer, BM. (2006) Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*. **296**: 449-466.

- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol.* **40**: 397-413.
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K., Yamamoto, T. (2002) The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **184**: 645-653.
- Tomoyasu, T., Takaya, A., Isogai, E., Yamamoto, T. (2003) Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol Microbiol.* **48**: 443-452.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**: 4350-4354
- Uchiya, K., Barbieri, MA., Funato, K., Shah, AH., Stahl, PD., Groisman, EA. (1999) A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* **18**: 3924-3933.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., Udesen, C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol.* **51**: 1525-1533.
- Wallis, TS., Galyov, EE. (2000) Molecular basis of Salmonella-induced enteritis. *Mol Microbiol.* **36**: 997-1005.
- Wei, BL., Brun-Zinkernagel, AM., Simecka, JW., Prüss, BM., Babitzke, P., Romeo, T. (2001) Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **40**: 245-256.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, AK., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, CS., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **48**: 657-670.
- Wood, MW., Jones, MA., Watson, PR., Hedges, S., Wallis, TS., Galyov, EE. (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol.* **29**: 883-891.
- Yura, T., Nakahigashi, K. (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol.* **2**: 153-158.
- Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Shears SB, Galán JE. (2001) A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol.* **39**: 248-259.

Zhou, D., Mooseker, MS., Galán, JE. (1999) An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 10176-10181

論文目録

主要論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Kage. H, Takaya. A, Ohya. M, Yamamoto. T. (2008) Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. *J Bacteriol.* **190**:2470-2478.

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	山口直人
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	堀江利治
副査	城西国際大学教授（薬学部）	薬学博士	平田隆弘