

Ⅲ型分泌機構を介した *Salmonella* 病原性発現機構に関する研究

平成 25 年度

北里大学大学院薬学研究科博士課程

DP-08103 吉田 雪絵

目次

要旨	P.1
緒言	P.7

第 1 章

序論	P.8
材料および方法	P.11
1. 菌株および培地	P.11
2. 細胞培養	P.11
3. 分子遺伝学的手法	P.12
4. プライマー	P.12
5. プラスミドの作製	P.12
6. CyaA 融合タンパク質発現プラスミドの構築	P.12
7. 各種欠失変異株の作製	P.13
8. SseE の局在検討	P.13
9. タンパク質の検出	P.13
10. SseE 分泌試験 (CyaA assay)	P.14
11. 全菌体タンパク質試料および培養上清試料の調製	P.15
12. ゲンタマイシン処理によるタンパク質安定性試験	P.16
13. Pull-down assay	P.16
14. マウス感染実験	P.17

結果	P.19
1. SseE の細胞内局在の検討	P.19
2. III型分泌機構依存性分泌能の解析 (CyaA assay)	P.19
3. SseE の機能解析	P.20
4. ゲンタマイシン処理によるタンパク質安定性試験	P.21
5. SseE-SseG 相互作用	P.23
6. マウス病原性試験	P.23
考察	P.24
図表	P.28

第 2 章

序論	P.40
材料および方法	P.45
1. 菌株および培地	P.45
2. 細胞培養	P.45
3. 分子遺伝学的手法	P.46
4. プライマー	P.46
5. プラスミドの作製	P.46
6. 各種欠失変異株の作製	P. 48
7. $\Delta ssaD$ $\Delta ssaN$ 二重変異株の作製	P.48
8. 全菌体タンパク質試料および培養上清試料の調製	P.48
9. タンパク質の検出	P.49

10. エフェクター分泌試験	P.50
11. マウス感染実験	P.52
12. ATPase 活性の測定	P.53
12-1. Myc-His ₆ 融合タンパク質の精製	
12-2. 酵素活性の測定	
13. Pull-down assay	P.54
14. 各種 HA 融合タンパク質の局在検討	P.55
15. Chaperone release assay	P.55
結果	P.57
1. SsaN 点変異体の作製	P.57
2. <i>ssaN</i> 変異による SPI-2 III 型分泌機構への影響	P.58
3. SsaN のマウス病原性への関与	P.60
4. SsaN の酵素活性の測定	P.61
5. SsaN と相互作用する SPI-2 タンパク質の同定	P.62
6. <i>ssaQ</i> 欠失変異株 (Δ <i>ssaQ</i>)、 <i>ssaK</i> 欠失変異株 (Δ <i>ssaK</i>) および Δ <i>ssaK</i> Δ <i>ssaQ</i> 二重変異株における SsaN の局在	P.63
7. SsaN によるシャペロン-エフェクター複合体の解離	P.63
考察	P.65
図表	P.68
謝辞	P.83
参考文献	P.84

要旨

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

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

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

いて、また、第2章では、アミノ酸の相同性から *Salmonella* SPI-2 III型分泌機構特異的 ATPase と予測される SsaN の ATPase 活性とその機能について解析を行った。

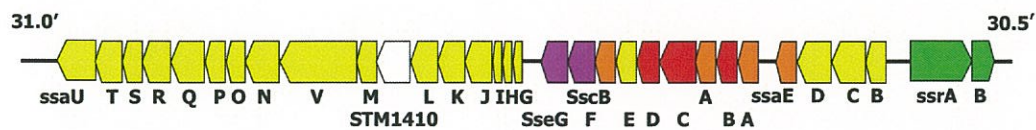


図1 *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) 領域の遺伝子組成

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

第1章 シャペロンタンパク質 SseE の機能解析

Salmonella SPI-2 遺伝子領域にコードされるタンパク質の中で、他のIII型分泌機構には相同性のないタンパク質の1つとして SseE が知られている。これまで、SseE は、SPI-2 III型分泌機構により分泌されるエフェクタータンパク質の1つと考えられていた。そこで本研究では、SseE の機能解析を行った。まず、SseE の細胞内局在を調べるために、*S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 株（野生株）のゲノム上の *sseE* 遺伝子を、2HA タグを付加した *sseE*-2HA 遺伝子に置換した変異株を作製した。SPI-2 発現誘導条件下で培養後、遠心分離により菌体と培養液（上清）、さらに菌体を可溶化画分（細胞質画分）と不溶化画分（膜画分）に分画した。SseE (SseE-2HA) は、細胞質画分にもみ検出され、上清中には検出されなかった。さらに SseE の宿主細胞への分泌について、SseE-CyaA 融合タンパク質を利用した cAMP 生成定量法により確認した。百日咳菌の産生する毒素の1つである CyaA は、宿主細胞内でアデニル酸シクラーゼ活性を発揮し、細胞内 ATP を分解し、cAMP へ変換する。SseE-CyaA、SseG-CyaA

(陽性コントロール) および CyaA (陰性コントロール) を発現するプラスミドを導入した *Salmonella* 野生株を HeLa 細胞に感染させ、感染 20 時間後の細胞内 cAMP を定量した結果、SPI-2 エフェクターである SseG のみが感染細胞における cAMP 量の増加を示した。したがって、SseE は SPI-2 III 型分泌機構により分泌されるエフェクターでないことが確認された。

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

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

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

内におけるエフェクター分泌およびその機能発現に関与していることが強く示唆された。

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

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

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

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

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

本研究では、*Salmonella* SPI-2 にコードされるタンパク質のうち、これまで機能未知とされてきた SsaE が SsaB に対する特異的なシャペロンであることを明らかにした。また、SsaN が ATPase 活性を有することを明らかにし、SsaN と相互作用する他のⅢ型分泌装置タンパク質の同定を行った。さらに、SsaN が ATPase 活性によりシャペロンとエフェクターの解離に関与することを明らかにした。今後、SPI-2 タンパク質の機

能解析が進むことにより、多くの病原細菌が保持するⅢ型分泌機構を標的とした治療法の確立がなされることを期待する。

緒言

Salmonella enterica は腸内細菌科に属するグラム陰性、通性嫌気性、細胞内寄生性細菌であり、外膜多糖 (O 抗原) および鞭毛 (H 抗原) の抗原性の違いによって 2500 種以上の血清型に分類される。*Salmonella* 感染症の起因菌となる *Salmonella enterica* (*S. enterica*) のうち、*S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) および serovar Paratyphi A (*S. Paratyphi A*) はヒトのみを宿主として、それぞれ腸チフスおよびパラチフスと呼ばれる重篤な全身感染を引き起こす。一方、*S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) は、ネズミなどの齧歯類を感染宿主としたとき、ヒトの腸チフスに似た全身感染を引き起こすことから、*S. Typhimurium* によるマウス感染はヒトの腸チフスモデルとして古くから研究に用いられている。

現在、世界で年間 2700 万人が腸チフスに感染し、21.7 万人が死に至っていると報告されている(14)。*Salmonella* 感染症の治療にはニューキノロン系を中心とした抗生物質が用いられているが、抗生物質に対する *Salmonella* の耐性化が進行しつつあり、効果的なワクチンによる感染予防効果への期待が高まっている。

Salmonella が全身感染を発症するための主要な病原形質は、マクロファージに対する殺菌抵抗性すなわち細胞内増殖性である。したがって、マクロファージ内増殖に関わる病原性発現機構を解析することは、*Salmonella* に対する新たなワクチン・治療法を考える上で重要であると考えられる。

本研究では、*Salmonella* SPI-2 III 型分泌機構に関わるタンパク質を解析することにより、これらのタンパク質の *Salmonella* 病原性に対する役割について、明らかにすることを試みた。

序論 (第 1 章)

Salmonella enterica は腸内細菌科に属するグラム陰性、通性嫌気性、細胞内寄生性細菌である。経口感染した *Salmonella* は小腸回盲部腸管粘膜に付着、定着した後、パイエル板 M 細胞または粘膜上皮細胞より侵入し、さらに腸間膜リンパ節に至る。ここでマクロファージをはじめとする食細胞内で殺菌される場合は、限局的な胃腸炎を起こすのみであるが、マクロファージ内で増殖した細菌が脾臓や肝臓へと拡散して増殖を繰り返すと、敗血症などの重篤な全身感染を引き起こす (25, 31, 53)

Salmonella の病原性に関わる遺伝子の多くは、染色体上の *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) と呼ばれる領域とビルレンスプラスミド上の *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) 領域に存在する。これまでに *Salmonella* 感染に関わる 5 つの SPI 領域が報告されており、腸管粘膜下組織への侵入には SPI-1 および SPI-5、マクロファージ内での生存には SPI-2、SPI-3、および *spv* が関与している。特に SPI-1 および SPI-2 は腸管粘膜下組織への侵入およびマクロファージ内での増殖に必要なⅢ型分泌機構 (Type III secretion system ; T3SS) をそれぞれコードしている (29, 34, 46, 61, 68)。

一般に、マクロファージは細菌をファゴソーム (初期ファゴソーム) に取り込んだ後、リソソームとファゴソームを融合してファゴリソソームを形成する。ファゴリソソーム内は、低 pH となり、リソソーム酵素 (酸性加水分解酵素) の活性化、活性酸素、ディフェンシンの放出などにより、取り込まれた細菌は分解・消化される。一方、*Salmonella* は宿主細胞の初期ファゴソームに取り込まれた後、エンドソームとの融合を繰り返して *Salmonella* 特異的な小胞、サルモネラ小胞 (*Salmonella*-containing vacuole ; SCV)

を形成する (63)。SCV に包まれた *Salmonella* はリソソーム酵素および NADPH オキシダーゼ輸送系による殺菌作用から逃れ、この中で増殖する (23, 40)。すなわち、*Salmonella* は SPI-2 T3SS によりエフェクターを宿主細胞の細胞質内に分泌することで、SCV を形成・維持し、マクロファージの殺菌作用に抵抗する (40)。SCV 内の低 pH、低マグネシウムおよび低リン酸イオン濃度といった環境の変化により、SPI-2 の発現が誘導されると考えられている。

これまで、*Salmonella* SPI-2 にコードされる SseE は、*in vitro* SPI-2 発現誘導条件下において培養上清中に分泌されないことから、エフェクターではないと考えられてきたが、他の細菌の保持するⅢ型分泌機構のタンパク質との相同性が低いことから、機能の推測が困難であり、詳細な機能は未だ不明であった (10, 41)。さらに、*sseE* 変異株のマウスに対する病原性が野生株と同等であること (35)、*sseE* 変異株のマクロファージ内増殖能が野生株と同等であること (35) から、*Salmonella* 病原性における重要性は低いとされてきた。

しかし近年、SseE は enteropathogenic *Escherichia coli* の病原性遺伝子群 LEE 領域にコードされるⅢ型分泌機構のシャペロンタンパク質 CesD2 (22% identity/ 44% similarity) との相同性から、SPI-2 シャペロンである可能性が示唆された (55)。

エフェクターおよびトランスロケーターは自身の安定化および分泌のために、適切なシャペロンを必要とする (54)。*Salmonella* においては、これまでに、SPI-1 にコードされる InvB, SicA および SicP が SPI-1 Ⅲ型分泌機構のシャペロンとして報告されている (9, 16, 27)。SPI-2 遺伝子領域にコードされ、SPI-2 Ⅲ型分泌機構に関わるシャペロンには、SseA、SscA、SscB および SsaE がある。SseA は SPI-2 トランスロケーター SseB および SseD のシャペロンであり (58)、SscA は SPI-2 トランスロケーター

SseC のシャペロンである (11)。また、SscB は SPI-2 エフェクター SseF のシャペロンであり (15)、SsaE は SPI-2 トランスロケーター SseB のシャペロンである (45)。III 型分泌機構のシャペロンタンパク質には、(i) 14 ~ 19 kDa の小さなタンパク質であること、(ii) 対応する基質をコードする遺伝子の近くにコードされていること、(iii) 等電点が酸性側にあることなどの特徴がある (15)。

SseE は 138 個のアミノ酸からなる 16.1 kDa のタンパク質で、*sseE* 遺伝子は SPI-2 エフェクターをコードする *sseF* および *sseG* の近傍に存在し、また、SseF のシャペロンである SscB のすぐ上流に位置している (図 1 参照)。エフェクター SseF のシャペロンが同定されている一方、エフェクター SseG のシャペロンは未だ同定されていない。

本研究では、SseE が SseG のシャペロンであることを明らかにした。まず、SseE が *in vivo* および *in vitro* において培養上清中および宿主細胞内へ分泌されないことを確認した。また、SseE がシャペロンとして SseG の分泌性および菌体細胞質における安定性に与える影響を検討し、さらに SseE と SseG との相互作用を Pull-down assay により検討した。また、*sseE* 変異株を作製し、*sseE* 変異が *Salmonella* のマウス脾臓内増殖性に与える影響について、マウス感染モデルを用いて解析をおこなった。

材料および方法（第 1 章）

1. 菌株および培地

本研究で使用した菌株は Table 1-1 に示した。*E. coli* および *Salmonella* の培養には、Luria-Bertani (LB) 培地 (LB broth, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を使用した。固形培地として用いる場合には、最終濃度 1.5% となるように寒天末（ナカライテスク株式会社、京都）を添加した。選択培地として用いる場合には、100 µg/ml ampicillin (Ap; 注射用ピクシリン、明治製菓、東京)、25 µg/ml chloramphenicol (Cm; クロラムフェニコール、和光純薬、大阪)、25 µg/ml kanamycin (Km; 硫酸カナマイシン注射、明治製菓)、および 100 µg/ml streptomycin (Sm; ストレプトマイシン硫酸塩、和光純薬) を添加した。*Salmonella* SPI-2 活性化条件による培養には、低濃度リン酸および低濃度マグネシウム (LPM) 培地 [low phosphate and magnesium containing medium; 5 mM KCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM K₂SO₄, 8 µM MgCl₂, 337 µM H₃PO₄, 0.3% glycerol, 80 mM MES (morpholineethanesulfonic acid; 同仁化学研究所、熊本) (pH5.8), 0.1% casamino acids (Difco)] (10) を用いた。

2. 細胞培養

本研究で用いた培養細胞および培養方法は以下の通りである。

- ・ HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来上皮細胞株）

本細胞の培養は Minimum essential medium eagle (MEM; Sigma-Aldrich) に非働

化した 10% fetal bovine serum (FBS; Intergen Co., Purchase NY, USA) を添加したものを使用し、37℃、5% CO₂ 飽和水蒸気下の孵卵器内で培養した。また、必要に応じて 100 µg/ml gentamicin (ゲンタマイシン硫酸塩、和光純薬) および 60 µg/ml kanamycin (Km; 硫酸カナマイシン注射、明治製菓) を添加した。

3. 分子遺伝学的手法

プラスミド DNA の調製および精製、PCR (polymerase chain reaction)、クローニングおよび形質転換などの分子遺伝学的方法は、Molecular Cloning (30) および本研究室のプロトコールに従って行った。

4. プライマー

本研究で使用したプライマーは、Table 1-2 に示した。

5. プラスミドの作製

本研究で使用したプラスミドは Table 1-1 に記した。

6. CyaA 融合タンパク質発現プラスミドの構築

S. Typhimurium SL1344 株のゲノム DNA を鋳型として、目的の遺伝子に対して特異的なプライマーセット (Table 1-2) を用いて PCR を行った。PCR 産物は Qiagen PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、精製した PCR 産物は制限酵素で消化 (*Xho*I および *Bg*III) 後、pACPJ-CyaA-2HA の *Xho*I/*Bg*III 部位へ T4 DNA Ligase (NEB) を用いて連結し、p ACPJ-*sseE*-CyaA-2HA を作製した。

7. 各種欠失変異株の作製

S. Typhimurium 野生株 SL1344 由来の変異株は、 λ Red disruption system (17) により作製した。

8. SseE の局在検討

試験菌を LB 液体培地を用いて、37℃、8 時間振とう培養した。一晚培養液を PBS (-) にて 2 回洗浄後、LPM 培地 (pH 5.8) に 100 倍希釈し、37℃、一晚振とう培養した。試験菌液を遠心 (7200×*g*、10 分間、4℃) し、上清を TCA 沈殿し、培養上清画分 (Supernatant) として調製した。また、得られた沈殿を 5 mM MgCl₂、1 mM PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride) 含有 10 mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁し、試験菌液とした。超音波発生装置 (TOMY ULTRASONIC DISRUPTER UD-200) を用いて菌体を超音波破碎した。遠心 (10000×*g*、1 分間、4℃) により未破碎菌体を除去した上清を、さらに遠心 (10000×*g*、30 分間、4℃) し、上清を細胞質画分 (Cytoplasm) とした。また、沈殿を膜画分 (Membrane) とした。

9. タンパク質の検出

・ウエスタンブロット法 (Western blot 法)

タンパク質試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) にて展開・分離後、セミドライ型トランスファー装置を用いて、アクリルアミドゲルからタンパク質を polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜; Immobilon, Millipore) に転写した。タンパク質が転写された

PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 PBS (-) にてブロッキングした後、PBS (-) で洗浄し、一次抗体を用いて室温で 1 時間反応した。0.05% Tween20 含有 PBS (-) で洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間反応した。発色には、Sigma Fast™ BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) を用いた。

1 次抗体にはマウスモノクローナル抗体である抗 HA 抗体 (1:1,000, Covance)、抗 FLAG 抗体 (1: 20,000, Sigma-Aldrich)、抗 DnaK 抗体 (1:2,000, Calbiochem)、マウスポリクローナル抗体である抗 SseB 抗体 (45) およびウサギポリクローナル抗体である抗 PagC 抗体 (45) を用いた。2 次抗体には alkaline phosphatase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:10,000, Sigma-Aldrich) および抗ウサギ IgG 抗体 (1:10,000, Sigma-Aldrich) を用いた。

10. SseE 分泌試験 (CyaA assay)

SPI-2 エフェクタータンパク質 SseE の宿主細胞内への移行性は、HeLa 細胞を用いた培養細胞感染系を用いた cAMP Enzyme Immunoassay (cAMP EIA) により検討した。

試験菌を LB 液体培地にて、37℃、一晩振とう培養した。新たな LB 液体培地に 33 倍希釈し、37℃、2 時間振とう培養した。滅菌 PBS (-) を用いて、 $OD_{600} \approx 0.6$ となるように調製 (2×10^8 cfu/ml) した。12 mm 径マイクロカバーグラス (松浪硝子工業株式会社、大阪) をウェル底に敷いた 24 ウェルプレート (Corning) に 1×10^5 cells/well の細胞密度で単層培養した HeLa 細胞に対して、MOI=100 となるように菌液 50 μ l (1×10^7 cfu) を接種した。遠心 (500 $\times g$ 、10 分間、20℃) により、菌体と細胞を強制的に接触させた後、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気下の孵卵器内で 30 分間培養した。Hanks'

液（日本製薬、東京）で3回洗浄した後、侵入せずに細胞外に残存している菌を殺滅するために、100 µg/ml gentamicin および 60 µg/ml kanamycin を含む MEM に交換し、さらに、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気下の孵卵器内で1時間30分培養した。Hanks' 液で3回洗浄した後、10 µg/ml gentamicin および 6 µg/ml kanamycin を含む MEM に交換し、さらに、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気下の孵卵器内で16時間培養した。

細胞を滅菌 PBS で洗浄後、Cyclic AMP EIA Kit (Cayman Chemical) を用い、同プロトコールに従って細胞を溶解させた後 EIA を行い、iMark™ Microplate Reader (Bio Rad) を用いて cAMP 量の測定を行った。

11. 全菌体タンパク質試料および培養上清試料の調製

Kaniga ら (39) の方法に従い、一部改変した。

試験菌を LB 液体培地を用いて、37℃、8時間振とう培養した。この培養液を LPM に100倍希釈し、37℃、16時間振とう培養した。

試験菌液の吸光度 (A_{600 nm}) を測定した後、遠心 (10000×g、10分間、4℃) し、得られた沈殿物をサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、0.1% bromophenol、10% glycerol、100 mM dithiothreitol (DTT)) で懸濁し、全菌体タンパク質試料とした。また、遠心により得られた上清は、ポアサイズ 0.22 µm のメンブレンフィルター (Millipore) を用いて濾過し、菌体を完全に除去したものを培養上清とした。培養上清液に最終濃度 10% (v/v) となるように、100 %トリクロロ酢酸 (TCA; trichloroacetic acid)、および最終濃度 0.025% (w/v) となるようにデオキシコール酸 (deoxycholate) を加え、4℃、一晩静置し、上清タンパク質を沈殿させた。遠心 (10000×g、30分間、4℃) により、沈殿物を回収した後、冷アセトンにて洗浄した。得られ

た沈殿物を乾燥させた後、サンプルバッファーに懸濁し、培養上清タンパク質試料とした。全菌体タンパク質試料および培養上清タンパク質試料の最終濃度は、一晚培養液の吸光度により補正した。

12. ゲンタマイシン処理によるタンパク質安定性試験

SseG-2HA または SseF-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミド (p2HA-*sseG* または p2HA-*sseF*) を $\Delta ssaV$ 変異株, $\Delta ssaV \Delta sseE$ 二重変異株および $\Delta ssaV \Delta sscB$ 二重変異株に導入した菌株を Cm 含有 LB 液体培地を用いて、37℃、8 時間振とう培養した。この培養液を LPM 液体培地に 100 倍希釈し、37℃、16 時間振とう培養した。タンパク質合成を停止する目的で、gentamicin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、0、10、20、30、60、90 および 120 分後にサンプルを採取した。菌体は遠心 (10000 $\times g$ 、1 分間、4℃) により回収し、SDS-PAGE および Western blot 法により解析した。

13. Pull-down assay

FLAG または 2HA 融合タンパク質発現株を Ap 含有 LB 液体培地にて 37℃、一晚振とう培養した。一晚培養液を新しい LB 液体培地 5mL に 100 倍希釈し、37℃、2 ~ 3 時間 (OD₆₀₀ \approx 0.5) 振とう培養した。その後、IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; Sigma-Aldrich) を最終濃度 0.4 mM となるように添加し、さらに 37℃、2 時間振とう培養した。

菌液を遠心 (10000 $\times g$ 、1 分間、4℃) し、菌体を CellLytic™ B Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) に懸濁した。5 分間室温にて静置した後、遠心 (10000 $\times g$ 、1 分間、4℃) して上清 (融合タンパク質粗精製画分) を得た。

FLAG pull-down 法は、ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を用いた。

Affinity Gel に粗精製 FLAG 融合タンパク質を含む画分 (FLAG Lysate) を加え、ロータリーシェイカーを用いて 4℃ で 2 時間反応した。その後、遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) し、未結合の FLAG 融合タンパク質を除去した。さらに Affinity Gel を TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) 500 μl で 3 回、100 μl で 1 回洗浄後、Affinity Gel に粗精製 HA 融合タンパク質を含む画分 (HA Lysate) を加え、ロータリーシェイカーを用いて 4℃ で 2 時間反応した。その後、遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) し、未結合の 2HA 融合タンパク質を除去した。さらに Affinity Gel を TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) 500 μl で 3 回、100 μl で 1 回洗浄し、最後の遠心後の上清を溶出前洗浄液 (Final wash) とした。溶出は Affinity Gel に 3 x FLAG peptide (90 ng / 1 ml TBS) 50 μl を加え、2 分ごとにタッピングし、室温にて計 10 分間静置した。遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) し、上清を溶出液 (Pull down) とした。

14. マウス感染実験

試験菌 (*S. Typhimurium* 野生株あるいは変異株) を、LB 液体培地を用いて、37℃、一晩振とう培養した。一晩培養液を新しい LB 液体培地に 100 倍希釈し、37℃、2.5 時間振とう培養 ($OD_{600} \approx 0.65$) した。遠心 (10000×*g*, 1 分間) により、菌体を回収した後、 1×10^6 CFU/mL となるように滅菌 PBS (-) で希釈した。この菌液 100 μl (計 1×10^5 CFU) を BALB/c マウス (*n* = 3 ~ 9) に腹腔内接種し、48 時間後、マウスを CO₂ ガス吸入法により安楽死後、脾臓を摘出した。摘出した脾臓はホモジナイズし、脾臓内生菌数を測定するために滅菌 PBS で段階希釈後、Sm 含有 LB 寒天培地に塗布し、37℃、一晩培養した。寒天培地に生育したコロニー数を数え、野生株および変異株の脾臓内生

菌数を算出した。

○

○

結果（第 1 章）

1. SseE の細胞内局在の検討

SseE の機能解析を行う上で、まず、SseE の菌体内局在について明らかにした。SseE の検出のために、*Salmonella* 野生株 SL1344 のゲノム上の *sseE* 遺伝子を、2HA タグを付加した *sseE*-2HA 遺伝子に置換した変異株を作製した。*sseE*-2HA 発現変異株の SPI-2 機能が野生株と同じであることは、SseB の分泌で確認した（データ不掲載）。LPM 培地にて試験菌（SseE-2HA 発現株）を培養後、遠心により培養上清を回収し、その後、菌体を細胞質（可溶化）および膜（不溶化）画分に分画した。その結果、SseE（SseE-2HA）は培養上清および膜画分には検出されず、細胞質画分でのみ検出された（Fig. 1）。このことから、SseE は分泌タンパク質ではなく、細胞内タンパク質であることが強く示唆された。

2. III型分泌機構依存性分泌能の解析（CyaA assay）

SseE が SPI-2 III型分泌機構を介して分泌されるエフェクターではないということ、CyaA assay により確認した。CyaA は *Bordetella pertussis* の産生する 1706 アミノ酸から成るタンパク質毒素で、N 末端の 1~400 アミノ酸領域（AC domain）にアデニル酸シクラーゼ酵素活性を持つ(32, 59)。CyaA が宿主細胞内に移行すると、細胞内のカルモジュリンと結合し、酵素活性により ATP から cAMP が産生される (67)。そのため、III型分泌タンパク質と CyaA の AC domain の融合タンパク質が細胞内に移行した時、細胞内 cAMP の上昇が起こる(66)。

SseE-CyaA-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミド (pSseE-CyaA-2HA) を作製

し、*S. Typhimurium* SL1344 野生株に形質転換した。陽性コントロールとして SseG-CyaA-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミド (pSseG-CyaA-2HA) を野生株に導入した株を用いた。また、陰性コントロールとして、pSseG-CyaA-2HA を SPI-2 III型分泌装置欠損株である *ssaV* 欠失変異株 ($\Delta ssaV$) に導入した株を用いた。cAMP assay におけるバックグラウンドは、空ベクター (pACPJ-CyaA-2HA) を導入した野生株および *Salmonella* 非感染 HeLa 細胞を用いて測定した。

HeLa 細胞に各形質転換体を感染後、18 時間で CyaA assay おこなった。その結果、SseG-CyaA-2HA 融合タンパク質発現ベクターを導入した野生株においては、cAMP 濃度は上昇し (陽性コントロール)、 $\Delta ssaV$ 変異株では cAMP 濃度の有意な上昇は見られなかった (陰性コントロール)。陽性コントロールと比較して、SseE-CyaA-2HA 融合タンパク質を発現株の感染による cAMP 濃度の有意な上昇は見られず、陰性コントロールと同様であった (Fig.2)。このことから SseE は宿主細胞内へトランスロケーションされる SPI-2 エフェクターではないことが明らかとなった。

3. SseE の機能解析

SseE は 138 アミノ酸からなる 16.1 kDa のタンパク質である。SPI-BLAST による相同性解析の結果、SseE は enteropathogenic *Escherichia coli* の病原性遺伝子群 LEE 領域にコードされる III 型分泌機構のシャペロンタンパク質 CesD2 (22% identity/ 44% similarity) と相同性を示したことから、SseE は SPI-2 エフェクターのシャペロンとして機能する可能性が考えられた (Fig. 3)。

SPI-2 領域の *sseE* 近傍には、3 つのトランスロケーター (SseB、SseC、SseD) および 2 つのエフェクター (SseF、SseG) がコードされている。そのうち、シャペロンタンパク質の存在が報告されていないものは SseG のみである。そこで、SseE が SseG のシャペロンであると仮定して以下の実験を行った。

まず、*sseE* 変異による SseG 分泌性への影響を調べるために、野生株、*sseE* 欠失変異株 ($\Delta sseE$) およびその相補株に対して SseG-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミドを形質転換した。これらの株を SPI-2 発現条件下にて培養後、全菌体および培養上清中の SseG を検出し、それぞれの株で比較した。野生株および SseE 相補株では、SseG は全菌体および培養上清に検出されたが、 $\Delta sseE$ 変異株では SseG の発現が著しく減少し、全菌体および培養上清中いずれにおいても検出されなかった (Fig. 4A)。一方、SPI-2 トランスロケーターである SseB タンパク質は、 $\Delta sseE$ 変異株においても発現量に変化は見られなかった (Fig. 4A)。同様にして、 $\Delta sseE$ 変異株における SseF の全菌体内の発現量を野生株と比較した。その結果、野生株と $\Delta sseE$ 変異株では変化が見られなかった (Fig. 4B)。これらの結果から、SseE は SseG の発現に関与することが強く示唆された。

4. ゲンタマイシン処理によるタンパク質安定性試験

Ⅲ型分泌機構特異的シャペロンは、基質タンパク質の分泌に関わるだけでなく、菌体内における基質タンパク質の安定化にも関与する (15)。そこで、SseE の SseG に対する菌体内での安定性に及ぼす影響について検討した。

Dai らの方法 (15)に従って、SseG-2HA または SseF-2HA を発現するプラスミドを

導入したⅢ型分泌装置変異株 ($\Delta ssaV$) および $\Delta ssaV\Delta sseE$ 二重変異株を用いて、SseE 存在、非存在下における SseG および SseF の細胞内タンパク質をウエスタンブロット法により検出した。SPI-2 活性化条件下で培養後、タンパク質合成を停止させる目的で gentamicin を添加した。gentamicin 添加 0、10、20、30、60、90 および 120 分後の全菌体タンパク質を SDS-PAGE にて展開、Western blot 法にて解析した。DnaK は SseE の影響を受けないことから、菌体内タンパク質の等量性の指標とした。その結果、gentamicin 添加後、 $\Delta ssaV$ 変異株において、SseG-2HA の細胞内タンパク質量に大きな変化は見られなかったが、 $\Delta ssaV\Delta sseE$ 二重変異株における SseG-2HA 細胞内タンパク質量は時間の経過とともに著しく減少した (Fig. 5A および C)。一方、SseF-2HA の細胞内タンパク質量は $\Delta ssaV$ 変異株および $\Delta ssaV\Delta sseE$ 二重変異株では変化しなかった (Fig. 5B および D)。このことから、SseE が *Salmonella* 細胞質内での SseG の安定性に関与していることが示唆された。

同様にして、 $\Delta ssaV$ 変異株および $\Delta ssaV\Delta sscB$ 二重変異株を用いて、SseE 存在、非存在下における SseG および SseF の細胞内タンパク質を検出した。SseB を菌体内タンパク質の等量性の指標とした。その結果、gentamicin 添加後、 $\Delta ssaV$ 変異株において、SseF-2HA の細胞内タンパク質量に大きな変化は見られなかったが、 $\Delta ssaV\Delta sscB$ 二重変異株における SseF-2HA 細胞内タンパク質量は時間の経過とともに著しく減少した (Fig. 6B および C)。一方、SseG-2HA の細胞内タンパク質量は $\Delta ssaV$ 変異株および $\Delta ssaV\Delta sscB$ 二重変異株では変化しなかった (Fig. 6A および C)。

5. SseE-SseG 相互作用

次に SseE が SseG のシャペロンであることを明らかにするために、SseE と SseG の特異的結合性を調べた。SseE-FLAG を発現するプラスミド (pSsaE-FLAG) および SseG-2HA を発現するプラスミド (pSseG-2HA) をそれぞれ導入した *E. coli* の Lysate を用いて、FLAG pull down assay をおこなった。結合したタンパク質は SDS-PAGE およびマウス抗 FLAG 抗体を用いた Western blot 法を用いて検出した。その結果、SseE が SseG と相互作用することが明らかとなった (Fig. 7A)。一方、SseE と SseF との相互作用について調べたが、両者による結合性はみられなかった (Fig. 7B)。また、SseE が SPI-2 ATPase SsaN と相互作用することが明らかとなった (Fig. 7C)。

6. マウス病原性試験

SseE がマウス病原性に及ぼす影響について調べるために、野生株、Ⅲ型分泌装置変異株 ($\Delta ssaV$)、*sseE* 欠失変異株 ($\Delta sseE$)、*sseG* 欠失変異株 ($\Delta sseG$) を作製し、マウス感染実験をおこなった。各 *Salmonella* 菌液を腹腔内接種し、48 時間後のマウス脾臓内生菌数を測定した。その結果、野生株に比較して、 $\Delta sseE$ 変異株では、マウス病原性が顕著に低下した。また、*sseE* 変異株におけるマウス病原性の低下は SPI-2 エフェクターである SseG と同程度であった。さらに、 $\Delta sseE$ 変異株に野生型 SseE を発現するプラスミド (pACPJ-*sseE*-2HA) を導入し相補した場合、マウス病原性は野生株ほど回復しないが、*sseE* 変異株に比較して有意に上昇した (Fig. 8)。

考察（第 1 章）

SPI-2 領域にコードされるタンパク質の多くは、他の細菌のもつタンパク質との相同性からの予測、または実験による解析の結果から、Ⅲ型分泌機構の装置タンパク質、エフェクター、シャペロンおよび転写調節因子に分類されている。しかし、SPI-2 にコードされる SseE は他の細菌のもつタンパク質との相同性が低いことから、長い間、機能未知タンパク質に分類されてきた。本研究では、SseE の機能解析を目的として、まずエフェクターとしての分泌能について明らかにした。*in vitro* における SPI-2 発現誘導時に、SseE は細胞質に局在し、菌体外へは分泌されず、また、CyaA assay による宿主細胞へのトランスロケーション能においても細胞内への移行はみられなかった。通常、Ⅲ型分泌機構に関わるエフェクターの N 末端側には、シグナル配列が存在するが、SseE には存在しない。さらに、他の研究においても SseE は培養上清中には分泌されないという報告がある (10, 41)。以上のことから、SseE が SPI-2 エフェクターであることは強く否定された。

SseE は、Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) におけるⅢ型分泌機構のシャペロンタンパク質 CesD2 との相同性から、*Salmonella* SPI-2 Ⅲ型分泌機構におけるシャペロンである可能性が報告されている(55)。シャペロンをコードする遺伝子は、基質となるタンパク質をコードする遺伝子の近傍に位置することが多い。*sseE* は SPI-2 上に存在する同一オペロン中において、エフェクターをコードする *sseF* および *sseG* 遺伝子上流に位置しており、SseG のシャペロンとして機能している可能性が考えられた。そこで、*sseE* 変異が SseG 分泌性に与える影響を調べた。その結果、 $\Delta sseE$ 変異株では SseG の培養上清中への分泌は検出されず、野生型 SseE 発現プラスミドにより

相補した場合には、SseG の分泌が回復した。また、このとき細胞質内における SseG 量低下が見られた。

一般に、III型分泌機構依存的に分泌されるエフェクターは、宿主細胞内へのトランスロケーションのためにシャペロンを必要とする。シャペロンは菌体細胞質において基質タンパク質を安定化させる機能をしている(15)。そこで、SseE の SseG に対する細胞質内での影響を明らかにするため、protein stability assay を行った。その結果、 $\Delta ssaV$ $\Delta sseE$ 二重変異株において 20 分以降に菌体細胞質中に存在する SseG の減少が見られた。すなわち、シャペロンである SseE が存在しないため、基質タンパク質である SseG の不安定化が起きたためと考えられた。一方、*sseE* 変異による SseF の安定性への影響はみられなかった。

さらに、Pull-down 法により、SseE が SseG と相互作用することを明らかにした。また、SseE は SseF とは相互作用しなかった。このことから、SseE が SseG の特異的シャペロンであることが強く示唆された。また SseE は SPI-2 ATPase である SsaN と相互作用することが明らかとなった。第 2 章において SsaN は他の SPI-2 シャペロンと相互作用することが明らかとなったことから、SseE が SPI-2 シャペロンであることが示唆された。

本研究では、マウスに *Salmonella* 野生株および各変異株をそれぞれ単独投与することにより、*sseE* の病原性評価を試みた。その結果、野生株に対して、 $\Delta sseE$ 変異株では、マウス病原性が有意に低下した。また、野生型 SseE を用いて相補株した場合、 $\Delta sseE$ 変異株と比較して病原性は有意に上昇したが、野生株と同程度の病原性回復は見られなかった。これは、相補に用いたプラスミドによって SseE が過剰に発現した結果、SseG および他のタンパク質の発現および機能に影響が出たためと考えられた。

Salmonella は、マイクロピノサイトーシスにより宿主細胞内に侵入し、ファゴソームに取り込まれる。その後、Ⅲ型分泌機構によりエフェクターを分泌し、*Salmonella* containing vacuole (SCV) を形成する。SCV は宿主細胞のエンドソームと融合を繰り返して成熟し、後期エンドソームマーカである、LAMP1 などの糖タンパク質を膜上にもつようになる。成熟した SCV は微小管に沿って移動し、微小管形成中心 (microtubule organizing center; MTOC) およびゴルジ体のある核近傍に集まり、マイクロコロニーを形成する。このとき *Salmonella* induced filaments (Sifs) と呼ばれる SCV 膜が微小管に沿って放射状に広がった構造がみられる。このように、*Salmonella* の増殖には、SCV が MTOC・ゴルジ体領域に移動し、局在することが重要である(8, 33, 42, 60)。SseE の基質となる SseG は、SseF と相互作用し、SCV の MTOC・ゴルジ体領域に局在して Sifs の形成に関与すると考えられている(19)。本研究において、 $\Delta sseE$ 変異株によるマウス病原性の低下が *sseG* 変異株に見られる病原性の低下と同程度であったことから、*sseE* 変異によるマウス病原性の低下は、SPI-2 エフェクター SseG の機能低下による、SCV 局在および Sif 形成異常に起因すると推察された。以上より、SseE が SseG の特異的シャペロンであることを明らかにした。

SseE と相同性を有する CesD2 は、EPEC のⅢ型分泌機構をコードする病原性遺伝子群 LEE 上にコードされている。SseE と異なり、CesD2 はⅢ型分泌機構のトランスロケーター EspD のシャペロンとして機能する(52)。本研究においては、SseE と、SseE と同じオペロンに存在する SPI-2 トランスロケーター SseBCD との相互作用については明らかにしておらず、今後検討する必要があるが、 $\Delta sseE$ 株におけるマウス病原性の低下が $\Delta ssaV$ 変異株に見られる程の顕著な低下ではないことから、SseE がⅢ型分泌装置の構成タンパク質であるトランスロケーターと相互作用する可能性は低いと考

えられる。

本研究は SPI-2 SseE の機能を明らかにした初めての報告である。今後、さらにⅢ型分泌機構の詳細が明らかにされ、*Salmonella* 感染症に対する有効な治療法、ワクチンが開発されることを期待する。

Table 1-1 本章で使⽤した菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Description	Reference
<i>Salmonella</i> strains		
SL1344	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>rpsL hisG</i>	(36)
TM133	Nonpolar deletion of <i>ssaV</i> (Δ <i>ssaV</i>)	
Δ <i>ssaV</i> Δ <i>sseE</i>	Double mutant, Δ <i>ssaV</i> Δ <i>sseE</i>	This study
Δ <i>ssaV</i> Δ <i>sseB</i>	Double mutant, Δ <i>ssaV</i> Δ <i>sseB</i>	This study
<i>sseE::kan</i>	Nonpolar <i>sseE::kan</i> mutant	This study
<i>sseG::kan</i>	Nonpolar <i>sseG::kan</i> mutant	This study
Plasmids		
pFLAG-CTC	FLAG fusion vector	Sigma-Aldrich
p2HA-CTC	pFLAG-CTC derivative containing 2HA instead of FLAG	(45)
pACPJ-2HA	pACYC184 derivative containing 2HA with <i>sseJ</i> promoter	(45)
pACPJ-CyaA-2HA	pACPJ-2HA containing <i>cyaA</i> mutant	(45)
p2HA-SseE	p2HA-CTC expressing SseE-2HA	This study
p2HA-SseF	p2HA-CTC expressing SseF-2HA	This study
p2HA-SseG	p2HA-CTC expressing SseG-2HA	This study
pFLAG-SseE	pFLAG-CTC expressing SseE-FLAG	This study
pFLAG-SseF	pFLAG-CTC expressing SseF-FLAG	This study
pFLAG-SseG	pFLAG-CTC expressing SseG-FLAG	This study
pFLAG-SsaN	pFLAG-CTC expressing SsaN-FLAG	This study
pSseE-2HA	pACPJ-2HA expressing SseE-2HA	This study
pSseF-2HA	pACPJ-2HA expressing SseF-2HA	(45)
pSseG-2HA	pACPJ-2HA expressing SseG-2HA	This study
pSseE-CyaA-2HA	pACPJ-CyaA-2HA expressing SseE-CyaA-2HA	This study
pSseG-CyaA-2HA	pACPJ-CyaA-2HA expressing SseG-CyaA-2HA	This study

Table 1-2 本章で使したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Description
sseE-red-FW	CGGTTCTTGCTGAAATACTCCGGGCATTAACGAGGTAAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	for mutant construction
sseE-red-RV	ATTGTTATTTTACGTGATAATGATTTACGTCAGGAAGGTCATATGAATATCCTCCTTAG	for mutant construction
sseG-red-FW	TAGCCCAAATGCTCAGGTAGGAGGGCAACGTCCTGTAAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	for mutant construction
sseG-red-RV	TGAACATCCGGTATATACCTGAAAAACGATTACTCCGGCGCCATATGAATATCCTCCTTAG	for mutant construction
sscB-red-FW	GACGTAATTCATTATCACGTGAAAAAACAATCAATAGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	for mutant construction
sscB-red-RV	ACGGAATATGAATTTTCATATTTCTGTTCTGTATTAAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG	for mutant construction
sseE-XhoI-FW	GGGCTCGAGCAAGAAATAGAGCAATGGTTA	for plasmid construction
sseE-BamHI-RV	CCCGGATCCAAAACGTCGCTGGATAAGATG	for plasmid construction
sseG-FW-XhoI	AAAGGATCCCTCCGGCGCACGTTGTCTGG	for plasmid construction
sseG-RV-BamHI	AAAGGATCCCTCCGGCGCACGTTGTCTGG	for plasmid construction
sseF-FW-XhoI	AAACTCGAGATTATATCCGTCAGCGGCA	for plasmid construction
sseF-RV-BamHI	AAAGGATCCTGGTTCTCCCCGAGATGTAIG	for plasmid construction

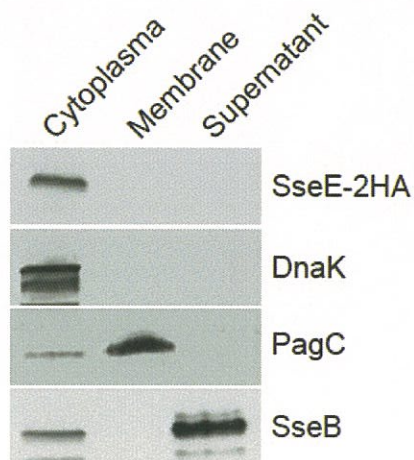


Fig. 1 SseE の局在検討

SseE-2HA 発現株を SPI-2 活性化条件で培養したときの細胞質画分 (Cytoplasm)、膜画分 (Membrane) および培養上清画分 (Supernatant) を調製し、試料とした。SDS-PAGE にて展開した後、抗 HA 抗体を用いた Western blot 法により SseE-2HA を検出した。各画分に含まれるタンパク質のクロスコンタミネーションの有無は、細胞質に局在する DnaK、膜タンパク質である PagC およびトランスロケーターとして上清に分泌される SseB に対する抗体により検出した。

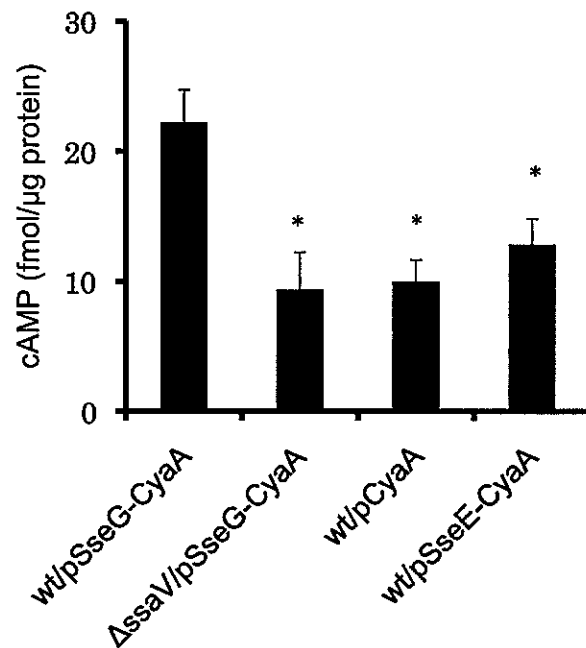


Fig. 2 cAMP enzymeimmuno assay (CyaA assay)

SseE-CyaA-2HA 融合タンパク質を発現する *S. Typhimurium* SL1344 (野生株) を HeLa細胞に感染させ (MOI=100)、18時間後に細胞を 0.1M HCl で溶解し、Cyclic AMP EIA Kit (Cayman Chemical) により cAMP 濃度を測定した。陽性コントロールとして、SseG-CyaA-2HA 融合タンパク質を発現する野生株、陰性コントロールとして SseG-CyaA-2HA 融合タンパク質を発現する装置変異株($\Delta ssaV$) を用いた。また、バックグラウンドとして、空ベクター (pACPJ-CyaA-2HA) を導入した野生株および *Salmonella* 非感染 HeLa 細胞を用いた。(* $P < 0.01$)

	1	10	20	30	40	50
SseE:	MV-----	QEIEQW	LRRHQV	TEPAYL	GETAIL	LGGQFIL
CesD2:	MVDTFN	DEVLNH	YLEQKY	TIQKEF	LCGSAFF	IGWRIET
						SFFSLAY
						RLDEQEL
						ILCSFEAR
	60	70	80	90	100	110
SseE:	LTPGQPR	PQQLFH	LLGLLR	GIFVHP	---QLTCL	KMLIIT
CesD2:	NQTGLNG	P--VLSL	TRLEEL	YHHFSG	IKKISAM	KSKIGSD
						SERQKRE
						ELFNYFI
						R-----
						K
	120	130				
SseE:	GATFTQL	DGDNWT	VLSAEHL	IQRRF		
CesD2:	GAVQQET	EDGIWF	VMNVNS	-----		

Fig. 3 SseE および CesD2 のアミノ酸一次配列の相同性

SPI-BLAST による相同性解析の結果、SseE は Enteropathogenic *Escherichia coli* の病原性遺伝子群 LEE 領域にコードされる III 型分泌機構のシャペロン CesD2 と高い相同性を示した; CesD2 (22% identity/ 44% similarity)。

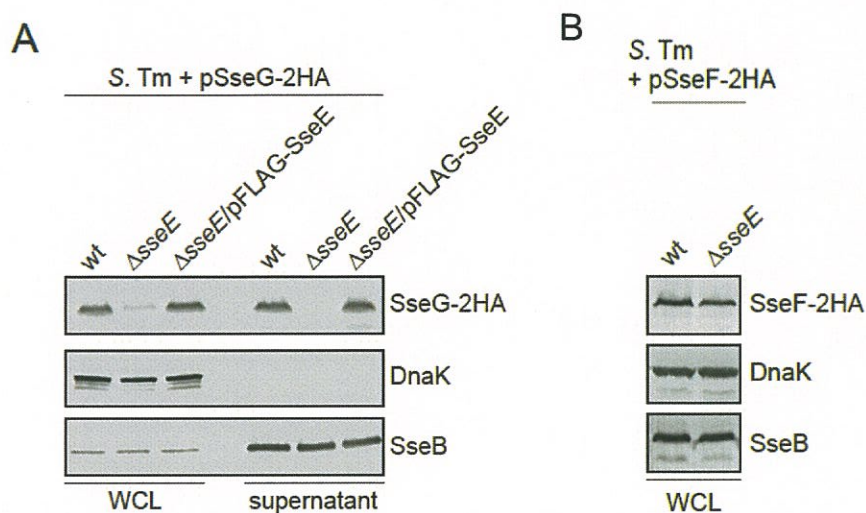


Fig. 4 $\Delta sseE$ 変異株における SPI-2 エフェクター SseG の分泌能

SseG-2HA 融合タンパク質発現プラスミドを導入した *S. Typhimurium* SL1344 (野生株)、 $\Delta sseE$ 変異株および *sseE* 相補株 (SseE-FLAG 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入した $\Delta sseE$ 変異株) を SPI-2 活性化条件下で培養したときの培養上清画分 (supernatant) および全菌体溶出液 (WCL; whole cell lysate) を調製し、試料とした。SDS-PAGE にて展開した後、抗 HA 抗体を用いた Western blot 法により SseG-2HA を検出した。菌体内タンパク質発現量の内部コントロールとして抗 DnaK 抗体を用いて DnaK、培養上清タンパク質発現量のコントロールとして抗 SseB 抗体を用いて SPI-2 トランスロケーター SseB を検出した。

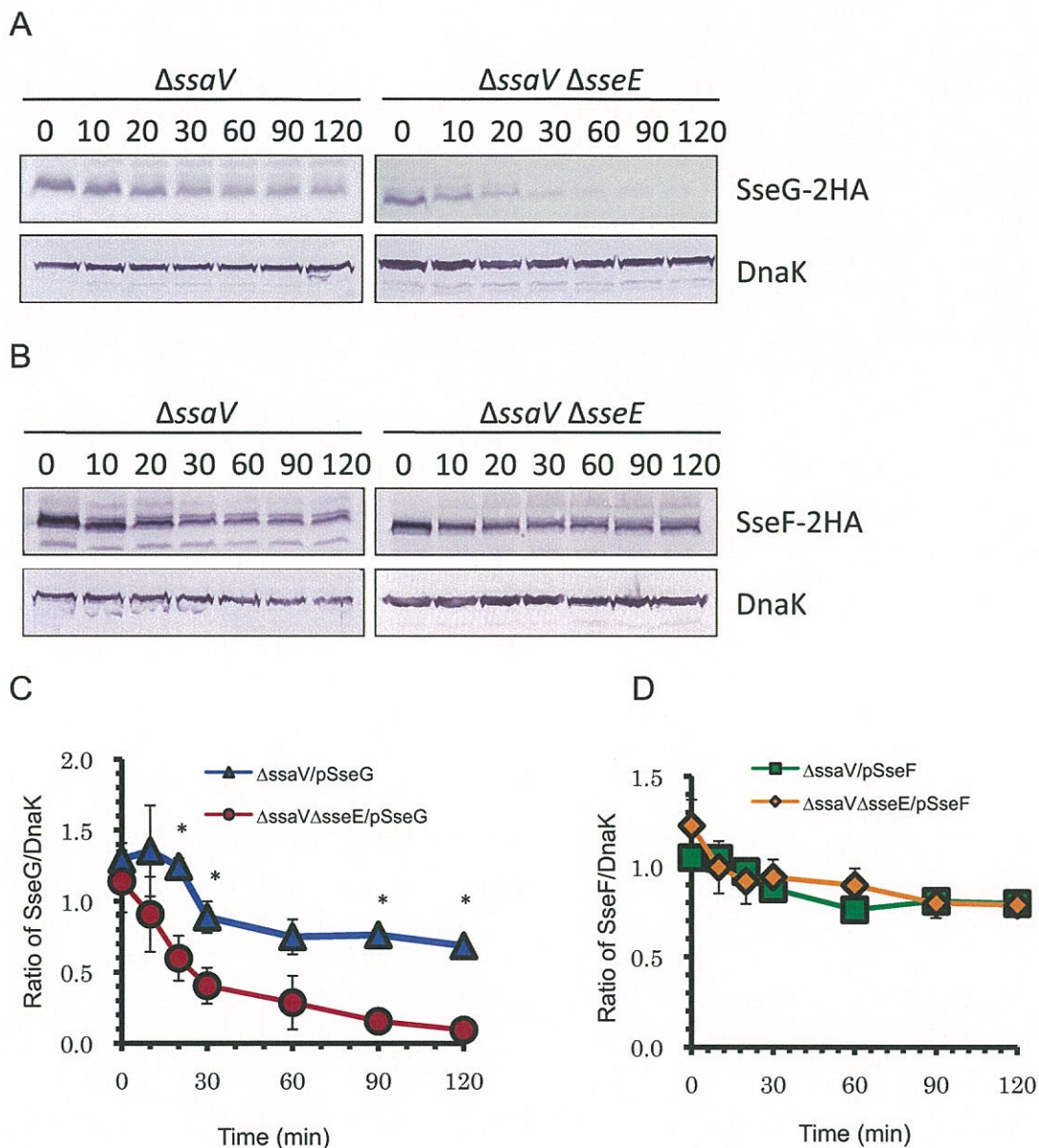
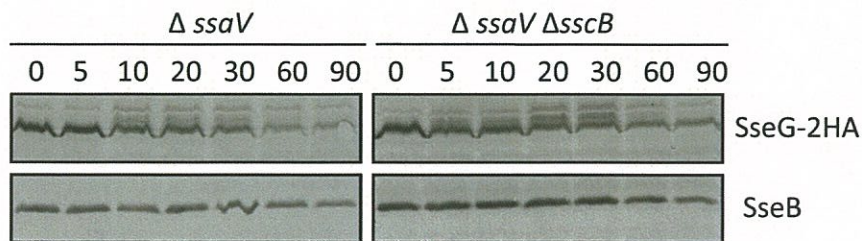


Fig. 5 SPI-2 エフェクター SseG の安定性 -1-

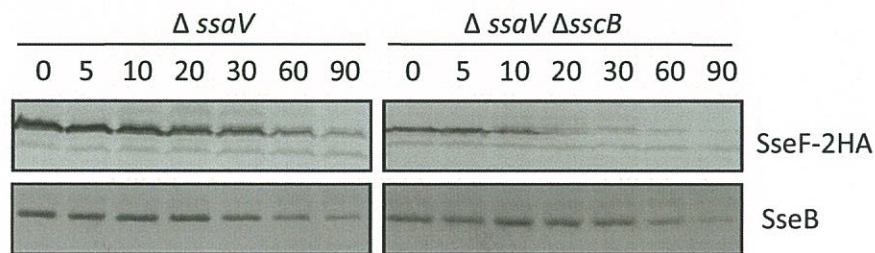
SseG-2HA または SseF-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入したⅢ型分泌装置欠失株 ($\Delta ssaV$ 変異株) および $\Delta ssaV \Delta sseE$ 二重変異株を SPI-2 誘導条件下で培養した。その後、タンパク質合成を停止するため gentamicin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。gentamicin 処理後、0、10、20、30、60、90 および 120 分後のサンプルを SDS-PAGE

にて展開した後、抗 HA 抗体を用いた Westen blot 法により SseG-2HA (A)または SseF-2HA (B)を検出した。また、ImageJ を用いてバンドの強度を数値化し、DnaK に対する SseG-2HA (C) または SseF-2HA (D) の量を求めた。(*P < 0.05)

A



B



C

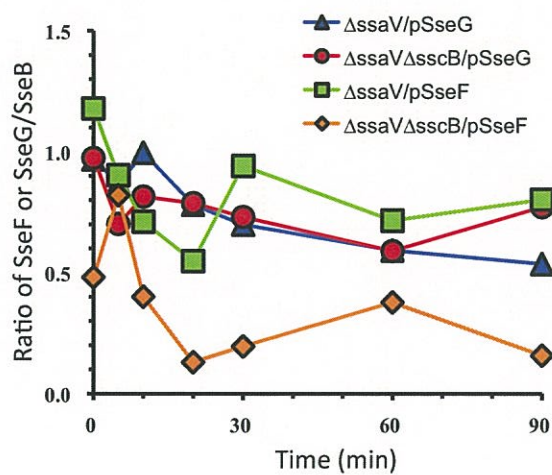


Fig. 6 SPI-2 エフェクター SseG の安定性 -2-

SseG-2HA または SseF-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入したⅢ型分泌装置欠失株 ($\Delta ssaV$ 変異株) および $\Delta ssaV \Delta sscB$ 二重変異株を培養し、SPI-2 誘

導条件下で培養しタンパク質の発現を誘導した。その後、タンパク質合成を停止するため gentamicin (100 μ g/ml) を添加した。gentamicin 処理後、0、5、10、20、30、60 および 90 分後のサンプルを SDS-PAGE にて展開した後、抗 HA 抗体を用いた Western blot 法により SseG-2HA (A)または SseF-2HA (B) を検出した。また、ImageJ を用いてバンドの強度を数値化し、SseB に対する SseG-2HA または SseF-2HA の量を求めた (C)。

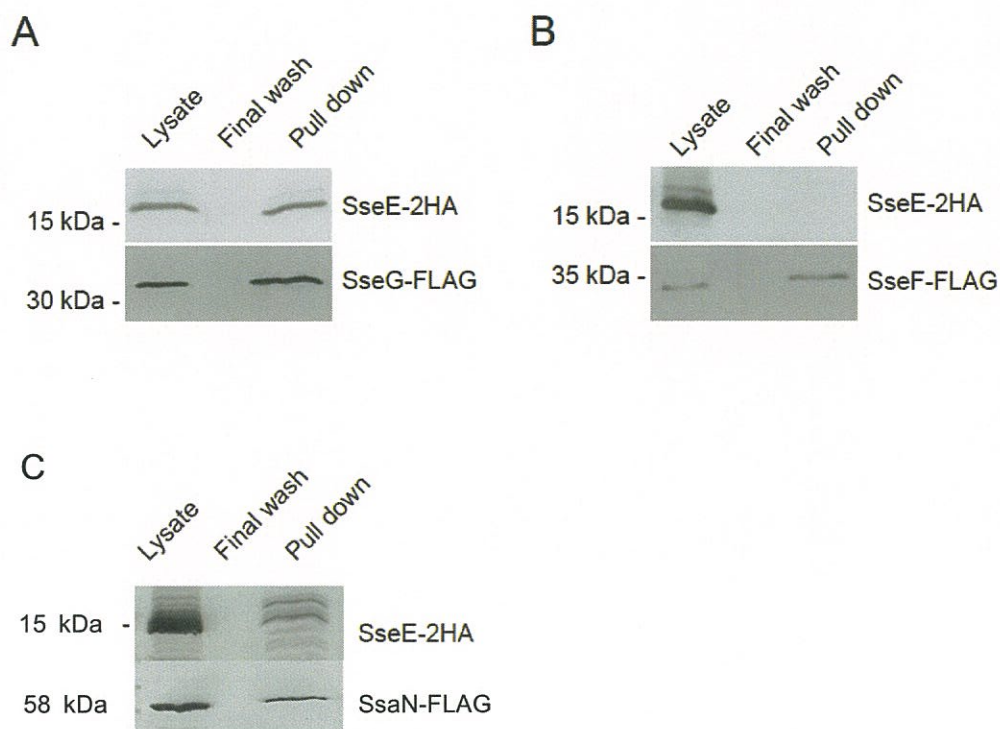


Fig. 7 pull-down assay

SseE と SPI-2 エフェクター SseG (A) 、SseF (B) および III型分泌機構特異的ATPase と予測される SsaN (C) との結合性を ANTI-FLAG M2 Affinity Gel を用いた pull-down 法により検討した。

Affinity Gel に粗精製 FLAG 融合タンパク質を含む画分 (FLAG Lysate) を加え、4℃ で 2 時間反応した。Affinity Gel を TBS で洗浄後、Affinity Gel に粗精製 HA 融合タンパク質を含む画分 (HA Lysate) を加え 4℃、2 時間反応した。さらに Affinity Gel を TBS で洗浄し、最後の遠心後の上清を溶出前洗浄液 (Final wash) とした。Affinity Gel に 3 x FLAG peptide (90 ng / 1 ml TBS) 50 μ l を加え、10 分後に遠心し、上清を溶出液 (Pull down) とした

等量のサンプル (Lysate, Final wash および Pull down) を SDS-PAGE にて展開後、抗 HA および抗 FLAG 抗体を用いた Western blot 法にてそれぞれ SseE (SseE-2HA)、SseG (SseG-FLAG) (A) 、SseF (SseF-FLAG) (B) および SsaN (SsaN-FLAG) (C) を検出した。

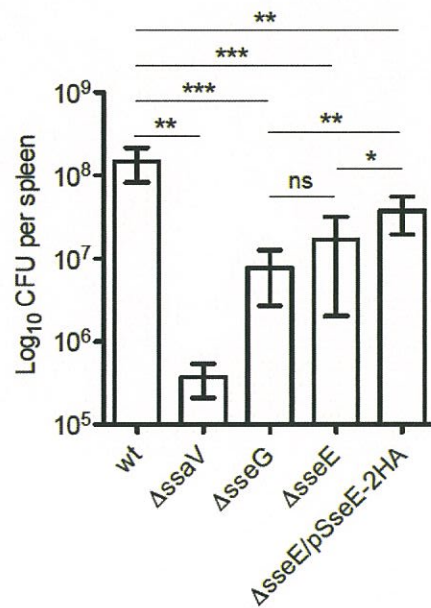


Fig. 8 マウス病原性試験

各種 *Salmonella* 菌液 (1×10^5 CFU) を BALB/c マウス (♀) に腹腔内接種し、48 時間後、マウスの脾臓を摘出、ホモジナイズし、脾臓内生菌数 (CFU) を測定した。

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

序論 (第 2 章)

Ⅲ型分泌装置は、菌体内膜から外膜にわたって局在する基部体 (basal body) および菌体外膜から突出するニードル様複合体 (needle-like complex) から構成される高分子オルガネラであり、この装置を介してエフェクターが分泌される。

Ⅲ型分泌装置の基部体は、内膜リング (MS ring)、内膜分泌装置 (IM export apparatus)、外膜リング (OM secretion ring) で構成されている。また、ニードル複合体はニードルの土台となるロッド (Rod)、親水性トランスロケーター (Hydrophilic translocator) および宿主細胞膜に孔を形成する疎水性トランスロケーター (Hydrophobic translocator) で構成されている。さらに、Ⅲ型分泌装置が機能するためには、基部体に結合している C リング (C ring)、ATPase および ATPase/C ring の機能調節をしていると予測される ATPase/C ring 相互作用体 (ATPase/C ring interactors) が必要である (Fig. 1) (20, 50)。

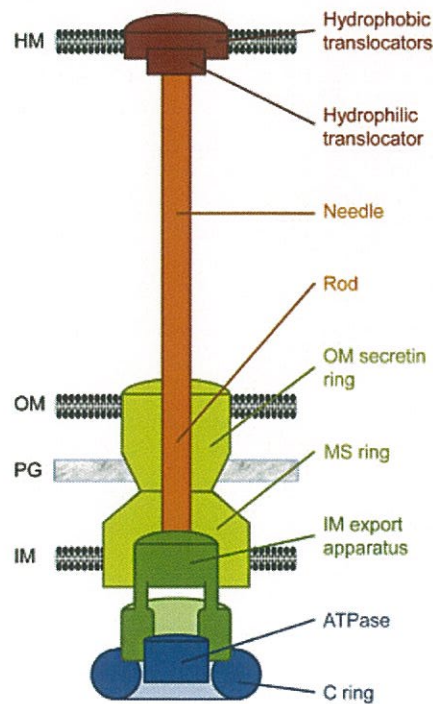


Fig.1 III型分泌装置

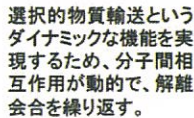
HM, host membrane; OM, outer membrane; PG, peptidoglycan; IM, inner membrane; MS, membrane and supramembrane.

(Diepold, A., et al., *Assembly of the Yersinia injectisome: the missing pieces*. Mol Microbiol. 85(5):

p. 878-92 (2010))

III型分泌装置は鞭毛の基部体と構造が類似していることから、鞭毛を起源に進化したと考えられており (28)、III型分泌装置を構成するタンパク質のうち、少なくとも 8 つのタンパク質は異菌種間で高度に保存されている (13)。このうち、すべてのIII型分泌装置に必須な構成タンパク質が ATPase であり、そのアミノ酸配列はミトコンドリア内膜に存在する F_0F_1 -ATPase の β サブユニットと高い相同性を示す (21, 22, 24, 65)。

Ⅲ型分泌機構特異的 ATPase は、内膜リングを構成するタンパク質に結合して細胞質側に局在し、ヘキサマーを形成することで活性化する (4, 57)。次に、Ⅲ型分泌装置特異的 ATPase はエフェクターと結合状態にあるシャペロンを認識し、シャペロンの輸送ゲートからの解離および分泌タンパク質の最初の unfolding に機能する (1)。例えば、*S. Typhimurium* の鞭毛特異的Ⅲ型分泌装置によるタンパク質の分泌は、FliH-FliI (ATPase) 複合体と FliJ (シャペロン)-分泌タンパク質複合体が細胞質中で結合し、FliH-FliI- FliJ -分泌タンパク質複合体を形成することではじまり、6 つの膜貫通型タンパク質 (FliA、FliB、FliO、FliP、FliQ、FliR) により構成される輸送ゲートに複合体が結合する。その際、FliI は 6 量体のリング構造を形成し、リング中央に結合した分泌タンパク質を N 末端側から輸送ゲートに挿入する。その後、FliH、FliI および FliJ は輸送ゲートから解離し、輸送ゲートからはプロトンポンプにより残りの長いポリペプチド鎖を解きほぐしつつ (unfolding)、標的タンパク質が細胞外方向へ分泌される。この一連の分泌過程において、ATPase によって産生されたエネルギーは 6 量体の形成、FliH、FliI および FliJ の輸送ゲートからの解離および分泌タンパク質の最初の unfolding に利用される (37, 49) (Fig. 2)。このように、Ⅲ型分泌機構における一連のエフェクター分泌過程には ATPase によるエネルギー産生が不可欠である。



(Minamino & Numba, *Nature*. 451, 485-488 (2008))

Salmonella SPI-2 にコードされる SsaN は 433 個のアミノ酸からなる 47 kDa のタンパク質で、アミノ酸の 1 次配列による相同性から III 型分泌機構特異的 ATPase であると予測される。本章では、SsaN の SPI-2 III 型分泌機構に対する役割を明らかにす

るために、*ssaN* 変異株を作製し、*in vitro* での SPI-2 III型分泌機構依存性エフェクターの分泌能を解析し、SPI-2 III型分泌機構によるマウス全身感染能について SsaN の関与を *in vivo* 感染実験により検討した。また、精製した SsaN を用いて ATPase としての酵素活性を測定した。さらに、SPI-2 III型分泌装置において SsaN と相互作用を示すタンパク質を明らかにすることを試みた。

材料および方法（第 2 章）

1. 菌株および培地

本研究で使用した菌株は Table 2-1 に示した。 *E. coli* および *Salmonella* の液体培養には、Luria-Bertani (LB) 培地 (LB broth, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を使用した。固形培地として用いる場合には、最終濃度 1.5% となるように寒天末（ナカライテスク株式会社、京都）を添加した。選択培地として用いる場合には、100 µg/ml ampicillin (Ap; 注射用ピクシリン、明治製菓、東京)、25 µg/ml chloramphenicol (Cm; クロラムフェニコール、和光純薬、大阪)、25 µg/ml kanamycin (Km; 硫酸カナマイシン注射、明治製菓)、25 µg/ml nalidixic acid (Nal; Nalidixic acid sodium salt, Sigma-Aldrich)、100 µg/ml streptomycin (Sm; ストレプトマイシン硫酸塩、和光純薬) および 15 µg/ml tetracyclin (Tc; テトラサイクリン塩酸塩、和光純薬) を添加した。

Salmonella SPI-2 活性化条件による培養には、低濃度リン酸および低濃度マグネシウム (LPM) 培地 [low phosphate and magnesium containing medium; 5 mM KCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM K₂SO₄, 8 µM MgCl₂, 337 µM H₃PO₄, 0.3% glycerol, 80 mM MES (morpholineethanesulfonic acid; 同仁化学研究所、熊本) (pH5.8), 0.1% casamino acids (Difco)] を用いた(10)。

2. 細胞培養

本研究で用いた培養細胞および培養方法は以下の通りである。

・ HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来上皮細胞株)

本細胞の培養は Minimum essential medium eagle (MEM; Sigma-Aldrich) に非働化した 10% fetal bovine serum (FBS; Intergen Co., Purchase NY, USA) を添加したものを使用し、37°C、5% CO₂ 飽和水蒸気下の孵卵器内で培養した。また、必要に応じて 100 µg/ml gentamicin (ゲンタマイシン硫酸塩、和光純薬) および 60 µg/ml kanamycin (Km; 硫酸カナマイシン注射、明治製菓) を添加した。

3. 分子遺伝学的手法

プラスミド DNA の調製および精製、PCR (polymerase chain reaction)、クローニングおよび形質転換などの分子遺伝学的方法は、Molecular Cloning (30) および本研究室のプロトコールに従って行った。

4. プライマー

本研究で使用したプライマーは、Table 2-2 に示した。

5. プラスミドの作製

本研究で使用したプラスミドは Table 2-1 に記した。

・ Myc - His₆ 融合タンパク質発現プラスミドの構築

ssaN は *S. Typhimurium* SL1344 株、*escN* は enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69 株のゲノム DNA を鋳型として、目的の遺伝子に対して特異的なプライマーセット (Table 2-2) を用いて PCR を行った。PCR 産物は Qiagen PCR purification kit

(Qiagen) を用いて精製し、精製した PCR 産物は制限酵素で消化 (*Xho*I および *Kpn*I) 後、pBAD-Myc-HisC の *Xho*I/*Kpn*I 部位へ T4 DNA Ligase (NEB) を用いて連結し、pBAD-*ssaN*-Myc-HisC、pBAD-*escN*-Myc-HisC を得た。また、*S. Typhimurium* SL1344 株のゲノム DNA を鋳型として遺伝子特異的なプライマー SsaN-His-*Xho*I および SsaN-His-*Kpn*I (Table 2-2) を用いて PCR を行い、pGEM T-Easy ベクター (Promega) に TA クローニングし、pGEM-*ssaN* を作製した。次に、pGEM-*ssaN* を鋳型として、遺伝子特異的なプライマーセット SsaN-R192G-FW および SsaN-R192G-RV (Table 2-2) を用いて、QuickChange Site-directed mutagenesis kit (Stratagene) による *ssaN* への点変異導入を行った。目的の部位にのみ点変異が導入されていることは、DNA シーケンスにより確認した。各点変異 *ssaN* を含む *Xho*I/*Kpn*I 断片を pBAD-Myc-HisC の *Xho*I/*Kpn*I 部位へ T4 DNA Ligase (NEB) を用いて連結し、pBAD-*ssaNG167C*-Myc-HisC、pBAD-*ssaNR192G*-Myc-HisC および pBAD-*ssaNR194H*-Myc-HisC を得た。

・ pMW-*ssaN*-FLAG の構築

pFLAG-*ssaN* を鋳型として、目的の遺伝子に対して特異的なプライマーセット FLAG-SphI-FW および FLAG-BamHI-RV (Table 2-2) を用いて PCR を行い、*ssaN-flag* 遺伝子を増幅した。この遺伝子断片を pGEM T-Easy ベクター (Promega) に TA クローニングし、pGEM-FLAG-*ssaN* を作製した。このプラスミドを制限酵素で消化 (*Sph*I および *Sac*I) して得た断片を pMW119 (Nippon Gene) の *Sph*I/*Sac*I 部位に挿入し、pMW-*ssaN*-FLAG を得た。

・ 2HA 融合タンパク質発現プラスミドの構築

S. Typhimurium SL1344 株のゲノム DNA を鋳型として、目的の遺伝子に対して特異的なプライマーセット (Table 2-2) を用いて PCR を行った。PCR 産物は Qiagen PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、精製した PCR 産物は制限酵素で消化 (*Xho*I および *Bgl*III) 後、p2HA-CTC の *Xho*I/*Bgl*III 部位へ T4 DNA Ligase (NEB) を用いて連結し、*pssaK*-2HA、*pssaN*-2HA、*psscA*-2HA および *psscB*-2HA を作製した。

6. 各種欠失変異株の作製

S. Typhimurium 野生株 SL1344 由来の変異株は、 λ Red disruption system (17) により作製した。

7. *Salmonella* Δ *ssaD* Δ *ssaN* 二重変異株の作製

P22 ファージによる形質導入法 (64)を用いて、 Δ *ssaD* 遺伝子配列を Δ *ssaN* 株に形質導入し、 Δ *ssaD* Δ *ssaN* 二重変異株を得た。

8 全菌体タンパク質試料および培養上清試料の調製

Kaniga ら (39) の方法に従い、一部改変した。

試験菌を LB 液体培地で、37℃、8時間振とう培養した。一晚培養液を LPM 培地 (pH 5.8) に 100 倍希釈し、さらに 37℃、一晚振とう培養した。

試験菌液の吸光度 ($A_{600\text{ nm}}$) を測定した後、遠心 ($10000\times g$ 、10 分間、4℃) し、得られた沈殿物をサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、0.1% bromophenol、10% glycerol、100 mM dithiothreitol (DTT)) で懸濁し、全菌体

タンパク質試料とした。また、遠心により得られた上清は、ポアサイズ 0.22 μm のメンブレンフィルター (Millipore) を用いて濾過し、菌体を完全に除去したものを培養上清とした。培養上清液に最終濃度 10% (v/v) となるように、100 %トリクロロ酢酸 (TCA; trichloroacetic acid)、および 最終濃度 0.025% (w/v) となるようにデオキシコール酸 (deoxycholate) を加え、4℃ にて一晩静置し、上清タンパク質を沈殿させた。遠心 (10000×*g*、30 分間、4℃) により、沈殿物を回収した後、冷アセトンにて洗浄した。得られた沈殿物を乾燥させた後、サンプルバッファーに懸濁し、培養上清タンパク質試料とした。全菌体タンパク質試料および培養上清タンパク質試料の最終濃度は、一晩培養液の吸光度により補正した。

9. タンパク質の検出

・ Western blot 法

タンパク質試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) にて展開・分離後、セミドライ型トランスファー装置を用いて、アクリルアミドゲルからタンパク質を polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜; Immobilon, Millipore) に転写した。タンパク質が転写された PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 PBS (-) にてブロッキングした後、PBS (-) で洗浄し、一次抗体を用いて室温で 1 時間反応した。0.05% Tween20 含有 PBS で洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間反応した。発色には、Sigma Fast™ BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) を用いた。

1 次抗体にはマウスモノクローナル抗体である抗 HA 抗体 (1:1,000, Covance)、抗 FLAG 抗体 (1:20,000, Sigma-Aldrich)、抗 DnaK 抗体 (1:2,000, Calbiochem)、抗 GST

抗体 (1:2,000, Upstate)、抗 6×His 抗体 (1:1000, 和光純薬)、マウスポリクローナル抗体である抗 SseB 抗体 (44) およびウサギポリクローナル抗体である抗 Omp 抗体 (56) を用いた。2 次抗体には alkaline phosphatase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:10,000, Sigma-Aldrich) および抗ウサギ IgG 抗体 (1:10,000, Sigma-Aldrich) を用いた。

・ CBB 染色法

ゲルに 0.25% CBB (Coomassie brilliant blue, 45% methanol, 10% acetic acid) を加え、室温で 1 時間振とうした後、CBB 溶液を除去し、脱色液 (45% methanol, 10% acetic acid) を加えて室温で 1 時間振とうした。

10. エフェクター 分泌試験

SPI-2 エフェクター SseJ の菌体表層への分泌は、HeLa 細胞を用いた培養細胞感染実験により行った。

試験菌を LB 液体培地にて、37℃、一晚振とう培養した。新たな LB 液体培地に 33 倍希釈し、37℃、3 時間振とう培養した。滅菌 PBS (-) を用いて、OD₆₀₀=0.6 となるように調製 (2×10⁸ cfu/ml) した。12 mm 径マイクロカバーグラス (松浪硝子工業株式会社、大阪) をウェル底に敷いた 24 ウェルプレート (Corning) に 1×10⁵ cells/well の細胞密度で単層培養した HeLa 細胞に対して、MOI=100 となるように菌液 50 μl (1×10⁷ cfu) を接種した。遠心 (500×g、10 分間、20℃) し、菌体と細胞を強制的に接触させた後、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気下の孵卵器内で 1 時間培養した。Hanks' 液 (日

本製薬、東京) で 3 回洗浄した後、侵入せずに細胞外に残存している菌を殺滅するために、100 µg/ml gentamicin および 60 µg/ml kanamycin を含む MEM に交換し、さらに、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気下の孵卵器内で 1 時間 30 分培養した。Hanks' 液 で 3 回洗浄した後、10 µg/ml gentamicin および 6 µg/ml kanamycin を含む MEM に交換し、さらに、37℃、5% CO₂、飽和水蒸気下の孵卵器内で 21 時間 30 分培養した。Hanks' 液 で 3 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒドを加え、4℃にて 30 分間静置し、細胞を固定した。

固定した細胞標本を PBS (-) で 3 回洗浄した後、0.1% Triton X-100 含有の PBS (-) を加え、室温で 5 分間静置し、細胞を浸透化した。PBS (-) で 2 回洗浄後、SsaN-HA 融合タンパク質を標識するため、マウス抗 HA 抗体 (1:1000, Covance) に浸し、室温にて 1 時間静置した。PBS (-) で 3 回洗浄後、0.1% Triton X-100 を用いて Alexa Flour 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1:500, Molecular Probes) に浸し、室温暗所にて 1 時間静置した。さらに PBS (-) で 3 回洗浄後、菌体を標識するため、ウサギ抗 *Salmonella* LPS O4 群抗体 (1:5000, デンカ生研) で室温にて 30 分間反応した。PBS (-) で 3 回洗浄後、0.1% Triton X-100 を用いて 500 倍希釈した Alexa Flour 594 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes) に浸し、室温暗所にて 30 分間静置した。最後に、PBS (-) および精製水で洗浄し、蛍光退色防止剤 Vectashield (Vector Laboratories Inc. Burlingame) を用いて、マイクロスライドガラス (蛍光顕微鏡用; 松浪硝子工業株式会社) に貼付け、観察材料とした。

観察資料は共焦点レーザー顕微鏡 (LMS510META Version 3.0; Carl Zeiss Co., Ltd.) を用いて観察した。

11. マウス感染実験

Salmonella の感染実験には BALB/c マウス（♀、5 ～ 6 週齢）を用いた。マウスはオリエンタル酵母工業株式会社（東京）より購入し、北里大学薬学部動物実験施設にて約 1 週間飼育した後、使用した。マウスの飼育および感染実験は、北里大学における動物実験等に関する規定に従った。

BALB/c マウスを用いた感染実験には、*S. Typhimurium* の腹腔内接種による competitive index (CI) assay を用いた。

試験菌 (*S. Typhimurium* 野生株あるいは変異株) を、LB 液体培地を用いて、37℃、一晩振とう培養した。一晩培養液を新しい LB 液体培地に 100 倍希釈し、37℃で 2.5 時間振盪培養 (OD₆₀₀ = 0.65) した。1×10⁶ cfu/mL となるように滅菌 PBS (-) で希釈後、各々同量混合したものを用いた。

この菌液 100 μl (1×10⁵ CFU) を BALB/c マウスに腹腔内接種し、48 時間後、マウスを CO₂ ガス吸入法により安楽死後、脾臓を摘出した。摘出した脾臓はホモジナイズし、脾臓内生菌数を測定するために滅菌 PBS (-) で段階希釈後、Sm 含有 LB 寒天培地、Km 含有 LB 寒天培地および Ap 含有 LB 寒天培地に塗布し、37℃、一晩培養した。寒天培地に生育したコロニー数を数え、野生株および変異株の脾臓内生菌数を算出した。

CI 値の算出は以下の式に従った。

CI = 脾臓内の野生株菌数に対する変異株菌数の割合 / 接種した野生株菌数に対する変異株菌数の割合

12. ATPase 活性の測定

Andrade らの方法 (3) に従った。

12-1. Myc-His₆ 融合タンパク質の精製

Myc-His₆ 融合タンパク質発現株を LB 液体培地 10 ml にて、37℃、一晚振とう培養した。一晚培養液を ampicillin 含有 LB 液体培地 1L に 100 倍希釈し、37℃、2 ~ 3 時間 (OD₆₀₀ ≒ 0.5) 振とう培養した。D-(-)-arabinose (和光純薬) を最終濃度 0.2 % となるように加え、さらに 37℃、2 時間振とう培養した。菌液を遠心 (7200×g、10 分間、4℃) し、得られた沈殿物を 8M urea (和光純薬) 含有 Lysis buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole (和光純薬) (pH 8.0)) で懸濁し、室温にて 1 時間ゆっくりと振とうした。遠心 (10000×g、20 分間、室温) し、上清を Ni-NTA Agarose (Qiagen) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製の手順は、A hand book for high-level expression and purification of 6 x His-tagged proteins (Qiagen) に従った。得られた精製タンパク質は、透析膜 (SnskeSkin® Plested Dialysis Tubing, Thermo Scientific) を用いて滅菌 TBS (pH 7.6) で透析後、Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore) を用いて遠心し、タンパク質を濃縮した。タンパク質の濃度は Blodford 法を用いて測定した。また、精製タンパク質試料を SDS-PAGE にて展開・分離した後、CBB 染色法により検出した。

12-2. 酵素活性の測定

精製タンパク質に ATP と反応液 (4mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を加え、37℃、30 分間反応させた。遊離したリン酸を malachite green assay (BIOMOL

GREEN™; Enzo Life Sciences International, Inc.) により測定した。

13. Pull-down assay

FLAG または 2HA 融合タンパク質発現株を Ap 含有 LB 液体培地にて 37℃、一晩振とう培養した。一晩培養液を新しい LB 液体培地 5mL に 100 倍希釈し、37℃、2 ~ 3 時間 (OD₆₀₀ ≒ 0.5) 振とう培養した。その後、IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; Sigma-Aldrich) を最終濃度 0.4 mM となるように添加し、さらに 37℃、2 時間振とう培養した。

菌液を遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) し、菌体を CellLytic™ B Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) に懸濁した。5 分間室温にて静置した後、遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) して上清 (融合タンパク質粗精製画分) を得た。

FLAG pull-down 法は、ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を用いた。

Affinity Gel に粗精製 FLAG 融合タンパク質を含む画分 (FLAG Lysate) を加え、ロータリーシェイカーを用いて 4℃ で 2 時間反応した。その後、遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) し、未結合の FLAG 融合タンパク質を除去した。さらに Affinity Gel を TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) 500 μl で 3 回、100 μl で 1 回洗浄後、Affinity Gel に粗精製 HA 融合タンパク質を含む画分 (HA Lysate) を加え、ロータリーシェイカーを用いて 4℃ で 2 時間反応した。その後、遠心 (10000×*g*, 1 分間、4℃) し、未結合の 2HA 融合タンパク質を除去した。さらに Affinity Gel を TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) 500 μl で 3 回、100 μl で 1 回洗浄し、最後の遠心後の上清を溶出前洗浄液 (Final wash) とした。溶出は Affinity Gel に 3 x FLAG peptide (90 ng /

1 ml TBS) 50 μ l を加え、2 分ごとにタッピングし、室温にて計 10 分間静置した。遠心 (10000 $\times g$ 、1 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を溶出液 (Pull down) とした。

14. 各種 HA 融合タンパク質の局在検討

試験菌を LB 液体培地を用いて、37 $^{\circ}$ C、8 時間振とう培養した。一晚培養液を PBS (-) にて 2 回洗浄後、LPM 培地 (pH 5.8) 20 mL に 100 倍希釈し、37 $^{\circ}$ C、16 時間振とう培養した。試験菌液を遠心 (7200 $\times g$ 、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、得られた沈殿を 5 mM MgCl₂、1 mM PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride) 含有 10 mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁し、試験菌液とした。超音波発生装置 (TOMY ULTRASONIC DISRUPTER UD-200) を用いて菌体を超音波破碎した。遠心 (10000 $\times g$ 、1 分間、4 $^{\circ}$ C) により未破碎菌体を除去した上清を、さらに遠心 (10000 $\times g$ 、30 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を細胞質画分 (Soluble) とした。また、沈殿物を膜画分 (Membrane) とした。

15. Chaperone release assay

GST-ssaE 融合タンパク質発現株および SseB-FLAG 融合タンパク質発現株を Ap 含有 LB 液体培地にて 37 $^{\circ}$ C、一晚振とう培養した。一晚培養液を 100 倍希釈し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間振とう培養した。その後、IPTG を最終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 37 $^{\circ}$ C、2 時間振とう培養した。遠心にて集菌後、TBS (pH7.6) に懸濁し、菌体を超音波破碎機にて破碎した。遠心後、上清を融合タンパク質含有画分とした。精製した GST- SsaE 融合タンパク質含有画分を glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) に加え、4 $^{\circ}$ C にて 2 時間反応させた。結合していない融合タンパク質を除くため、ビーズを TBS で 5 回洗浄した。同様にして、SseB-FLAG 融合タンパク質含有画分を

glutathione-Sepharose 4B に加え、4℃にて 2 時間反応した。反応後、ビーズを TBS で 5 回洗浄した。次に、精製 SsaN-Myc-His₆ 融合タンパク質あるいは SsaN_{R192G}-Myc-His₆ 融合タンパク質 (1 μg) を加え、150 μM ATP または ATP-γS の存在下、4℃にて 1 時間、穏やかに振とうした。遠心後、上清を TCA 沈殿後、20 μl の SDS サンプルバッファーに懸濁した。試料は SDS-PAGE により展開し、抗 GST および抗 FLAG 抗体を用いた Western blot 法にてそれぞれ SsaE および SseB を検出した。

結果 (第 2 章)

1. SsaN 点変異体の作製

Salmonella SPI-2 遺伝子領域において、*ssaN* は *ssaO* の上流および *ssaV* の下流に位置する (要旨 図 1 参照)。SsaN は 433 アミノ酸からなる 47.8 kDa のタンパク質であり、III 型分泌機構特異的 ATPase である Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) の EscN (51 % identity/ 68 % similarity) (3)、*S. Typhimurium* SPI-1 の InvC (45%/ 63%) (2, 7, 22)、*Yersinia pestis* の YscN (53% / 64%) (62) と高い相同性を有する。これらの ATPase には、共通して Walker BoxA、Walker Box B、および DCCD Box (dicyclohexylcarbodiimide-binding site) などの特異的モチーフが存在する (Fig. 3)。これらは ATP との結合に必須なモチーフであり、*S. Typhimurium* SPI-1 特異的 ATPase である InvC では、これらのモチーフに属する特定のアミノ酸を変異を導入すると ATPase 活性が低下もしくは喪失することが明らかとなっている(2)。SsaN の機能解析のために、まず、これらのモチーフ内のアミノ酸点変異導入体の作製を試みた。すなわち、Walker BoxA 内の 167 番目のグリシンをシステインに置換した SsaN_{G167C}、DCCD Box に属している SsaN の 192 番目のアルギニンをグリシンに置換した SsaN_{R192G} および 194 番目のアルギニンをヒスチジンに置換した SsaN_{R194H} を QuickChange Site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて作製した。次いで、精製点変異型 SsaN タンパク質の酵素活性を調べた。その結果、SsaN_{G167C} は野生型 SsaN と同程度の ATPase 活性を保持していた。また、SsaN_{R194H} は Myc-His₆ 融合タンパク質として発現が弱いことから精製タンパク質を得ることができなかった (データ不掲載)。

2. *ssaN* 変異による SPI-2 III型分泌機構への影響

III型分泌機構特異的な ATPase の役割は、菌体内のトランスロケーターおよびエフェクターをIII型分泌装置の輸送ゲートに誘導し、装置内を通過させ、菌体外へと輸送することである。そこで、*ssaN* 変異が SPI-2 III型分泌機構に与える影響を明らかにするために、*S. Typhimurium* SL1344 株 (野生株) を親株として *ssaN* 欠失変異株 (Δ *ssaN*) を作製し、SPI-2 III型分泌機構によるタンパク質分泌能を野生株と比較した。

まず、*ssaN* 欠失変異による SPI-2 III型分泌機構の分泌能に対する影響を調べるために、SPI-2 III型分泌機構に特異的なトランスロケーターである SseB の分泌を比較した。野生株、 Δ *ssaN* 変異株、*ssaN* 相補株 (野生型 *ssaN* を有するプラスミドを導入した Δ *ssaN* 変異株) および SPI-2 III型分泌装置変異株である *ssaD* 欠失変異株 (Δ *ssaD*) を LPM 培地 (pH 5.8) で一晩振とう培養した後、培養上清中への SseB の分泌をマウス抗 SseB 抗体を用いた Western blot 法にて検出した。その結果、野生株および *ssaN* 相補株において培養上清中に SseB の分泌が見られたが、 Δ *ssaN* 変異株および Δ *ssaD* 変異株では検出されなかった (Fig. 4A)。次に、SPI-2 エフェクターである SseJ への影響を調べるために、上記 4 株に対して SseJ-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入し、培養上清への分泌を観察した。その結果、SseJ も SseB と同様、野生株および *ssaN* 相補株において培養上清中に SseJ の分泌が見られたが、 Δ *ssaN* 変異株では Δ *ssaD* 変異株と同様に分泌は見られなかった (Fig. 4B)。次に、SseB の分泌に SsaN の ATPase 活性が関与することを確認するために、野生株、 Δ *ssaN* 変異株、*ssaN* 相補株および *ssaN_{R192G}* 相補株 (*SsaN_{R192G}* を発現するプラスミドを導入した Δ *ssaN* 変異株) を用いて、SseB の分泌について比較検討した。まず、*ssaN* 相補株および *ssaN_{R192G}* 相補株における SsaN および *SsaN_{R192G}* 発現量には違いがないことを確認

した (Fig. 4C)。 *ssaN* 相補株に対して Δ *ssaN* 変異株および *ssaN*_{R192G} 相補株では培養上清中への SseB の分泌が見られなかったことから、SsaN によるエフェクター／トランスロケーターの分泌には ATPase 活性が重要であることが明らかとなった (Fig. 4D)。

Salmonella は、宿主細胞に侵入後、ファゴソームに取り込まれ、そこで *Salmonella*-containing vacuole (SCV) を形成し、SPI-2 III型分泌機構によりエフェクターを宿主細胞の細胞質にトランスロケートする (18, 26)。次に、宿主細胞内におけるエフェクター分泌能に対する *ssaN* 変異の影響について検討した。

SseJ-2HA 融合タンパク質を発現するプラスミド (pACPJ-*sseJ*-2HA) を野生株、 Δ *ssaN* 変異株、*ssaN* 相補株および Δ *ssaD* 変異株に形質転換した。各菌株における菌体内 SseJ-2HA の発現量に差がないことを、マウス抗 HA 抗体を用いた western blot 法により確認した (データ不掲載)。各菌株を HeLa 細胞に感染させ、22 時間後における SseJ-2HA 融合タンパク質の宿主細胞での局在を、マウス抗 HA 抗体を用いた免疫蛍光染色で確認した。

野生株では SseJ (SseJ-2HA) は細胞質にトランスロケートされ、*Salmonella* induced filaments (Sifs) の構成タンパク質として検出された。一方、 Δ *ssaN* 変異株および Δ *ssaD* 変異株においては、SseJ は細胞質では検出されなかった。また、*ssaN* 相補株ではトランスロケーション能が回復していた (Fig. 5)。以上のように、*in vitro* および *in vivo* 分泌実験により SsaN は SPI-2 III型分泌装置の機能発現に必須であることが明らかとなった。

3. SsaN のマウス病原性への関与

SPI-2 III型分泌機構は、*Salmonella* がマウスに対して全身感染を引き起こすために必須の病原因子である。 $\Delta ssaN$ 変異株において SPI-2 III型分泌機構の活性低下が認められたことから、 $\Delta ssaN$ 変異株のマウス感染時における病原性低下が推測された。そこで、 $\Delta ssaN$ 変異株におけるマウス全身感染能を評価するために、competitive index (CI) assay (44) を行った。CI 値は、混合接種した野生株と変異株の病原性が同程度であればおよそ 1 となり、野生株に比べて変異株の病原性が低下している場合には 1 より小さくなる。野生株 (SL1344) とプラスミド保有株の混合感染 (SL1344/pMW119) では、CI 値は 0.98 (n=4) であり、両株の病原性発現にプラスミドの影響はないということが示された。次に、野生株と $\Delta ssaN$ 変異株の混合感染では CI は 0.00035 (n=3) であり、野生株に比べ $ssaN$ 変異株ではマウスに対する病原性が著しく低下していることが明らかとなった。また、野生株と $ssaN$ 相補株との混合感染では CI 値は 0.94 (n=3) であった。すなわち、 $\Delta ssaN$ 変異株の病原性低下は、 $ssaN$ の欠失によるものであることが示唆された。また、 $ssaN$ 変異によるマウス全身感染能の低下が SPI-2 III型分泌機構の機能低下によるものであることを SPI-2 III型分泌装置変異株である $\Delta ssaD$ 変異株との比較により検討した。 $\Delta ssaD$ 変異株と $\Delta ssaN$ 変異株との混合感染では、CI 値は 1.11 (n=3) となった。さらに、 $\Delta ssaN \Delta ssaD$ 二重変異株と $\Delta ssaN$ 変異株または $\Delta ssaD$ 変異株との混合感染では、 $\Delta ssaN \Delta ssaD$ 二重変異株と $\Delta ssaN$ 変異株では CI 値は 0.97 (n=3)、 $\Delta ssaN \Delta ssaD$ 二重変異株と $\Delta ssaD$ 変異株では CI 値は 0.81 (n=3) となった。すなわち、 $ssaN$ 変異によるマウス病原性の低下は、III型分泌装置変異株である $\Delta ssaD$ 変異株と同様、III型分泌機構の機能低下に依存するものであることが示唆された (Fig. 6)。

4. SsaN の酵素活性の測定

SsaNのATPase活性を解析した。positive controlとしてEPECのⅢ型ATPase EscN、negative controlとして点変異型 SsaN_{R192G}を用いた。酵素活性の測定には Myc-His₆ 融合タンパク質として大腸菌内で発現させた後 Ni-NTA Agarose を用いて精製したものをを用いた (Fig.7)。

SsaN-Myc-His₆ および SsaN_{R192G}-Myc-His₆ 融合タンパク質と ATP 基質溶液 (3 mM ATP, 4 mM MgCl₂)を混合し、37℃にて反応させた。反応開始から 5、10、15、20、25 および 30 分後、遊離したリン酸量を BIOMOL GREEN™ を用いて定量し、ATP 加水分解量 (遊離リン酸量)を測定した。その結果、SsaN は反応時間依存的に ATP 加水分解量が増加した。また、点変異型 SsaN_{R192G}-Myc-His₆ では ATP 加水分解量に時間依存的変化は見られなかった (Fig. 8A)。次に、各濃度 (0.025-0.45 μM) の SsaN-Myc-His₆、SsaN_{R192G}-Myc-His₆、EscN-Myc-His₆ 融合タンパク質に ATP 基質溶液 (3 mM ATP, 4 mM MgCl₂) を加え、37℃、30 分間反応し、ATPase 活性の変化を調べた。その結果、SsaN は、タンパク質濃度依存的に ATPase 活性が増加した。EscN と同様の増加を示した。また、点変異型 SsaN_{R192G} では ATP の分解および活性はみられなかった (Fig. 8B、C)。さらに、0.25 μM の SsaN-Myc-His₆、SsaN_{R192G}-Myc-His₆、EscN-Myc-His₆ に ATP を各最終濃度 (0.25-4.5 mM)、MgCl₂ を最終濃度 4 mM となるように加え、37℃、30 分間反応し、遊離したリン酸量を測定した。その結果、SsaN-Myc-His₆ は ATP 濃度依存的に ATP 活性が増加した。一方、SsaN_{R192G}-Myc-His₆ では ATPase 活性はみられなかった (Fig. 8D)。このグラフを二重逆数プロットで描き直し、Km および Vmax を求めたところ、SsaN の Km は 0.81 ± 0.20 mM、Vmax は 0.36 ± 0.06 μmol/min/mg、EscN の Km は 0.73 ± 0.10 mM、Vmax は $0.43 \pm$

0.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ となり、SsaN は EscN と同程度の ATPase 活性を有することが示された (Fig. 8E)。

5. SsaN と相互作用する SPI-2 タンパク質の同定

これまでに、内膜に局在する III 型分泌装置タンパク質として、膜貫通領域をもつ SsaDRSTUV、膜貫通領域をもたない SsaNKQ が報告されている。SsaDRSTUV は III 型分泌装置の内膜リングを形成し、SsaNKQ はこの内膜リング直下に結合し C リング複合体を形成すると予想されている (20, 41, 50)。そこで SsaN と C リングを形成する SsaK および SsaQ との結合性について Pull-down 法を用いて検討した。

SsaN-FLAG 融合タンパク質および各 2HA 融合タンパク質は *E. coli* で大量発現し、CellLytic™ B Cell Lysis Reagent を用いて可溶化した。SsaN-FLAG 融合タンパク質を結合した affinity gel に各 2HA 融合タンパク質を含む画分を加え反応し、3×FLAG peptide を用いて結合した融合タンパク質を溶出した。溶出液は SDS-PAGE にて分離後、抗マウス FLAG 抗体および抗マウス HA 抗体を用いた Western blot 法により検出した。SsaN は SsaK および SsaQ と特異的に結合した (Fig. 9)。

一方、SsaN と相同性を有する SPI-1 ATPase は、シャペロン-エフェクター複合体と結合し、III 型分泌装置を介してエフェクターを細胞外へ輸送する働きを有する (1)。SsaN にも同様の機能を持つことが予測されたため、SsaN と SPI-2 シャペロン分子 (SscA、SscB、SsaE および SseA) との結合性を Pull-down 法により確認した。

SscA は SPI-2 トランスロコン SseC (71)、SscB は SPI-2 エフェクター SseF (15)、SsaE は トランスロコン SseB (45)、SseA は トランスロコン SseB および SseD に対するシャペロンである (58, 70, 71)。SsaN はこれらすべてのタンパク質と特異的に結合する

ことが明らかとなった (Fig. 9)。

6. *ssaQ* 欠失変異株 ($\Delta ssaQ$)、*ssaK* 欠失変異株 ($\Delta ssaK$) および $\Delta ssaK \Delta ssaQ$ 二重変異株における SsaN の局在

Pull-down 法により、SsaN が SsaQ および SsaK と相互作用することが明らかとなったため、*ssaQ* 変異 および *ssaK* 変異が SsaN に与える影響について調べた。

SsaN 相補株 (野生型 *ssaN* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaN$ 変異株)、SsaQ 相補株 (野生型 *ssaQ* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaQ$ 変異株) および SsaK 相補株 (野生型 *ssaK* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaK$ 変異株) の菌体を超音波破砕機により破砕し、細胞質画分 (Soluble) および膜画分 (Membrane) に分画した結果、SsaN、SsaQ および SsaK はいずれも細胞質画分および膜画分に検出された (Fig. 10A)。一方、*ssaQ* 欠失変異株 ($\Delta ssaQ$)、*ssaK* 欠失変異株 ($\Delta ssaK$) および $\Delta ssaK \Delta ssaQ$ 二重変異株においても、SsaN は細胞質画分および膜画分に検出された (Fig. 10B)。以上のことから、SsaN は SsaQ および SsaK の非存在下でも膜に局在することが明らかとなった。

7. SsaN によるシャペロン-エフェクター複合体の解離

Ⅲ型分泌機構のシャペロンは、分泌直前に、Ⅲ型分泌機構特異的 ATPase によりシャペロン-エフェクター複合体から解離する。そこで、SseB とそのシャペロンである SsaE の形成する複合体、SseB-SsaE が SsaN によって解離するかを調べた。まず、ATP あるいはその加水分解抵抗性アナログである ATP- γ S の存在下において、野生型 SsaN あるいは ATPase 活性をもたない点変異型 SsaN_{R192G} を SsaE (GST-SsaE) -SseB

(SseB-FLAG) 複合体と反応させ、複合体の解離を検討した。野生型 SsaN および ATP 存在下では、SseB は SsaE から解離して培養上清中に分泌された (Fig. 11)。一方、ATPase 活性をもたない点変異型 SsaN_{R192G}あるいは ATP- γ S の存在下では、SseB は培養上清中に分泌されず、SsaE からの解離はみられなかった (Fig. 11)。これらの結果から、SPI-2 III型分泌機構においてシャペロン-エフェクター複合体からエフェクターが解離する際には、SsaN による ATP の加水分解が必要であることが明らかとなった。

考察(第 2 章)

本研究によって、SsaN は ATPase 活性を有することが示された。また、点変異型 SsaN_{R192G} を用いた解析により、SsaN の ATPase 活性には SsaN 上の DCCD Box に属する 192 番目のアルギニンが必須であることが明らかとなった。したがって、 Δ ssaN 変異株においては ATP の加水分解によるエネルギー産生が行われず、SPI-2 III 型分泌装置がエフェクターの輸送を行えなくなることから、 Δ ssaN 変異株は SPI-2 III 分泌機構の機能を喪失したものと考えられた。

ssaN は SPI-2 の *ssaMVNOPQ* オペロンにコードされており、他の細菌にみられる III 型分泌装置の構造解析から、SsaNK は複合体を形成し、C リングを構成している SsaQ に結合していると予想されている。本研究において、SsaN は SsaK および SsaQ と相互作用することを明らかにした。SsaN は鞭毛の FliI、*Yersinia enterocolitica* の YscN および EPEC の EscN と相同性を有し、これらのタンパク質は SsaK と相同性をもつ FilH/YscL/EscL および SsaQ と相同性を有する FliN/YscQ/EscQ と相互作用を示す(5, 6, 38, 43, 48)。また、FilH および YscL はそれぞれ 2 量体を形成し、SsaN と相同性を有する FliI および YscN に結合して活性を抑制する(6, 47)。SsaK は YscN および FliI と同様に SsaN の ATPase 活性を抑制することが予測されているが、未だ機能は明らかとなっていない。ssaQ は 322 アミノ酸からなる長鎖 SsaQ (SsaQ_L) および saaQ_L の C 末端の 106 残基からなる短鎖 SsaQ (SsaQ_s)、2 つの分子量の異なるタンパク質を産生することが知られている。SsaQ_L と相同性を有する YscQ および *Shigella* の Spa33 は C リングを構成し、ATPase やそのレギュレーターなどの、III 型分泌装置構成タンパク質と相互作用する(38, 51)。また、SsaQ_L は、SsaN と相互作用

することが既に報告されている(69)。一方、SsaQsは SsaQLのシャペロンとして働き、SsaQLを安定化させて C リングへの結合を可能にしているという報告がある(69)。

本研究により、SsaN は $\Delta ssaQ$ 変異株、 $\Delta ssaK$ 変異株および $\Delta ssaK \Delta ssaQ$ 二重変異株において、細胞質画分および膜画分に局在することが明らかとなった。すなわち、SsaNは SsaQ および SsaK の非存在下であっても膜に局在することが明らかとなった。このことから、SsaN は内膜に結合し、SsaKQ と共に C リング複合体を構成していると考えられた。Ⅲ型分泌機構の ATPase は多量体を形成して存在することが報告されていることから、今後 SsaN の多量体形成性についても明らかにする必要がある。

SsaN と相同性を有する SPI-1Ⅲ型分泌機構の ATPase、InvC は、複合体が宿主細胞内にトランスロケートされる直前に、シャペロン - エフェクター複合体 (SicP-SptP 複合体) と相互作用し、エフェクターをシャペロンから切り離す働きをしていることが報告されている。この作用発現には、InvC の ATPase 活性により産生される ATP の加水分解エネルギーが必須であることが報告されている(1)。本研究において ATPase 活性を有する SsaN は、ATP 存在下、SsaE-SseB 複合体の解離に関わることを明らかにした。また SsaN は SPI-2 特異的シャペロン (SscA、SscB、SsaE および SseA) と結合することができることを明らかにした。また、第 1 章において SseG のシャペロンであることが明らかとなった SseE は SsaN と相互作用を示した (第 1 章 Fig. 7C)。さらに、SsaN は SPI-2 エフェクター SseL および PipB2 のシャペロンである SrcA と結合することが報告されている(12)。SrcA は SPI-2 領域外にコードされるが、SPI-2 の転写調節因子 SsrB により発現が制御されるタンパク質である。以上のことから、SPI-2 依存的なエフェクター分泌の

すべてにおいて SsaN による加水分解作用が必要であることが推察された。

SsaN は SPI-2 III 型分泌装置の ATPase であり、SsaK および SsaQ とともに複合体を形成し、C リングの一部としてエフェクターの輸送・分泌に関与していることが強く示唆された。今後、SsaNKQ 複合体における SsaK および SsaQ の SsaN に対する役割を明らかにしていく必要がある。

近年、*Salmonella* SPI-1 にコードされる III 型分泌装置において、シャペロン-分泌タンパク質複合体を認識し、分泌タンパク質を正しい順に菌体外へと輸送する chaperone-sorting platform が発見された。chaperone-sorting platform は SpaO、OrgA および OrgB により形成される複合体であり、このうち SpaO は SsaQ/FliN/YscQ/EscQ、OrgB は SsaK/FilH/YscL/EscL と相同性を有するタンパク質である。一方、SPI-1 ATPase である InvC は chaperone-sorting platform の形成に必ずしも必要でないと報告されている。今後、SPI-2 においてシャペロン-分泌タンパク質複合体の認識に関わる chaperone-sorting platform が同定され、III 型分泌機構の詳細なメカニズムが明らかとなることを期待する。

Table 2-1 本章で使した菌株およびプラスミド

Strain	Description	Source
SL1344	serovar Typhimurium, wild-type	(36)
TM4239	Nonpolar deletion of <i>ssaN</i> (Δ <i>ssaN</i>)	This study
TM1997	Nonpolar deletion of <i>ssaD</i> (Δ <i>ssaD</i>)	This study
TM203	Double mutant, Δ <i>ssaN</i> , Δ <i>ssaD::kan</i>	This study
Plasmid	Description	Source
pMW119	Low -copy-number expression vector	Nippon Gene
pFLAG-CTC	FLAG-fusion vector	NEB
p2HA-CTC	2HA fusion vector	(45)
pGEX-6P-1	GST fusion vector	GE Healthcare
pBAD-Myc-HisC	Myc-His ₆ fusion	Invitrogen
pACPJ-2HA	pACYC184 derivative containing 2HA with <i>sseJ</i> promoter	(45)
pFLAG-SsaN	pFLAG-CTC expressing SsaN-FLAG fusion protein	This study
pSsaN-FLAG	pMW119 expressing SsaN-FLAG fusion protein	This study
pSseJ-2HA	pACPJ-2HA expressing SseJ-2HA fusion protein	This study
pSsaK-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaK-2HA fusion protein	This study
pSsaQ-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaQ-2HA fusion protein	This study
pSsaE-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaE-2HA fusion protein	This study
pSsaA-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaA-2HA fusion protein	This study
pSsaC-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaC-2HA fusion protein	This study
pSsaB-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaB-2HA fusion protein	This study
pSsaN-2HA	pACPJ-2HA expressing SsaN-2HA fusion protein	This study
pGEX-SsaE	pGEX-6P-1 expressing GST-SsaE	This study
pFLAG-SseB	pFLAG-CTC expressing SseB-FLAG fusion protein	This study
pBAD-SsaN-MH	pBAD-Myc-HisC expressing SsaN-Myc-His ₆ fusion protein	This study
pBAD-SsaN-R192G-MH	pBAD-Myc-HisC expressing SsaN-R192G-Myc-His ₆ fusion protein	This study
pBAD-EscN-MH	pBAD-Myc-HisC expressing EscN-Myc-His ₆ fusion protein	This study

Table 2-2 本章で使したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')*
ssaN-red-FW	GATGCAACGTCTGAGGCTGAAATATCCGCCCCCGATGGT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ssaN-red-RV	ATTGCTTTTCACGCCGCGGATTATCTCCAGCAAAGTTTCC ATATGAATATCCTCCTTAG
ssaD-red-FW	CTCAGTAGTAAATAATGGCATATCTCATGGTTAATCCAAAG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ssaD-red-RV	CTAATGGATAGTTAATCAAAGTATCATAATGTTTAATCGTCA TATGAATATCCTCCTTAG
SseJ-XhoI-FW	AAACTCGAGTTGAGTGTTGGACAGGGTTAT (XhoI)
SseJ-BamHI-RV	CCCGGATCCTTCAGTGAATAATGATGAGC (BamHI)
SsaN-XhoI	GGGCTCGAGAATGAATTGATGCAACGTCTG (XhoI)
SsaN-BamHI	CCCGGATCCCTCGGTGAGTATTTGGTGTA (BamHI)
FLAG-SphI-FW	CCTGCATGCTCACACAGGAGATATCATCTG (SphI)
FLAG-BamHI-RV	CCCGGATCCTATTGTCTCATGAGCGGATAC (BamHI)
SsaK-XhoI	GGCCTCGAGATGAGTTTTACTTCACTTCCT (XhoI)
SsaK-BglII	GGCAGATCTAAAAGAGGTAGCGATGAATAT (BglII)
SsaQ-XhoI	GGCTCGAGTTAAGAATAGCGAATGAAGAGC (XhoI)
SsaQ-BglII	GGAGATCTCGCTGTATTTTGCAAAGATAC (BglII)
SscA-XhoI	GGACTCGAGAAAAAGACCCGACCCTACAA (XhoI)
SscA-BglII	GGAAGATCTGCTCCTGTCAGAAAGTTGCTG (BglII)
SscB-XhoI	GGCCTCGAGATGATGAAAGAAGATCAGAAA (XhoI)
SscB-BglII	GGCAGATCTAGCAATAAGAGTATCAACCAT (BglII)
SsaE-gst-BamHI	ACCGGATCCACAACCTTTGACCCGGTTAGAA (BamHI)
SsaE-gst-XhoI	AGGCTCGAGTTACTCTTGCTCACTCACTAC (XhoI)
SsaN-Myc-His-XhoI	GGGCTCGAGGAAGAATGAATTGATGCAACGTC (XhoI)
SsaN-Myc-His-KpnI	GGCGGTACCCTCGGTGAGTATTTGGTGTAATTT (KpnI)
SsaN-R192G-Fw	GTTCTGGTGTTAATTGGTGAAGGTGGACGAGAAG
SsaN-R192G-Rv	TTCACCAATTAACACCAGAACATTGCTGTC
EscN-Myc-His XhoI	GGCCTCGAGAATTTAGAGCATGATTCTGTAT (XhoI)
EscN-Myc-His KpnI	GGTGGTACCGGCAACCACTTTGAATAGGCTTT (KpnI)

* 太文字は制限酵素サイトを示す。

```

SsaN -----MKNELMQRLRLKYPPP---DGYCRWG-RIQDVSATLLNAWLPGVFMGELCC 47
EscN MISEHDSVLEKYPRIQKVLNSTVPALSLNSSTRYEGKIINIGGTIIKARLPKARIGAFYK 60
InvC -----MKTPrLLQYLAYP-----QKITGPiIEAEIRDVAIGELCE 35

SsaN IKPGEE-----LAEVVGINGSKALLSPFTSTIGLHCGQQVMALRRRHQVPVGEALLGRV 101
EscN IEPSQR-----LAEVIAIDEDVFLLPFEHVSGMYCGQWLSYQGDEFKIRVGDALLGRL 114
InvC IRRGWHQKQVVARAQVVGLQRERTVLSLIGNAQGLSRDVVLYPTGRALSAWVGYSVLGAV 95

SsaN IDGFGRPLDG--RELPDVCWK-DYDAMPPPAMVRQPITQPLMTGIRAIDS VATCGEGQRV 158
EscN VDGIGRPMESN-IAAPYLPFERSLYAEPDPDLLRQVIDQPFILGVRAIDGLLTCGIGQRI 173
InvC LDPTGKIVERFTPEVAPISEERVIDVAPPSYASRVGVREPLITGVRAIDGLLTCGVGQRM 155

SsaN GIFSAPGVGKSTLLAMLCNAPDADSNVLVLIGERGREVREFIDFTLSEETRKRCVIVVAT 218
EscN GIFAGSGVGKSTLLGMI CNASADIIVLALIGERGREVNEFLAL-LPQSTLSKCVLVVTT 232
InvC GIFASAGCGKTMMLHMLIEQTEADVFI GLIGERGREVTEFVDMLRASHKKEKCVLVFAT 215
Walker Box A DCCD Box

SsaN SDRPALERVRLFVATTIAEFFRDNGKRVVLLADSLTRYARAAREIALAAGETAVSGEYP 278
EscN SDRPALERMKAAPTATTIAEYFRDQGNVLLMDSVTRYARAARDVGLASGEPDVRGGFP 292
InvC SDFPSVDRCNAAQLATTVAEYFRDQGNVLLFIDSMTRYARALRDVALASGERPARRGY 275
Walker Box B

SsaN PGVFSALPRLLERTGMGEKGSITAFYTVLVEGDDMNEPLADEVRSLLDGHIVLSRRLAER 338
EscN PSVFSSLPKLLERAGPAPKGSITAIYTVLLESDNVNDPIGDEVRSILDGHIVLTRELAEE 352
InvC ASVFDNLPRLLERPGATSEGSI TAFYTVLLESEEEADPMADEIRSILDGHLYLSRKL AGQ 335

SsaN GHYPAIDVLATLSRVFPVVTSEHRQLAAILRRCLALYQEVELLIRIGEYQRGVDTDTDK 398
EscN NHFPAIDIGLSASRVMHNVVTSEHLRAAAECKKLIATYKNVELLIRIGEYTMGQDPEADK 412
InvC GHYPAIDVLKSVSRVFGQVTTPTHAEQASAVRKLMTREELQLFIDLGEYRPGENIDNDR 395
ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit signature

SsaN AIDTYPDICTFLRQSKDEVCGPELLIEKLHQILTE- 433
EscN AIKNRKLIQNFIQQSTKDISSYEKTIESLFKVVA-- 446
InvC AMQMRDSLKAWLCQPV AQYSSFDDTLSGMNAFADQN 431

```

Fig. 3 SsaN、EscN および InvC の ATPase 特異的モチーフおよびアミノ酸一次配列の比較。Walker Box A および B、dicyclohexylcarbodiimide-binding site (DCCD box)、F₀F₁ α および β subunit signature site を示した。

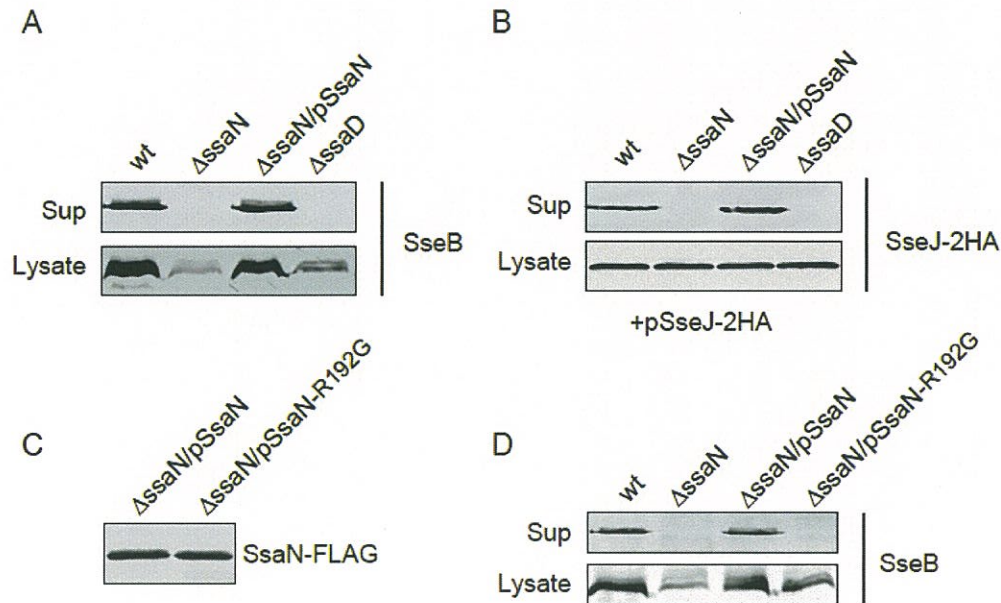


Fig. 4 *ssaN* 変異株における *in vitro* SPI-2 エフェクターの分泌性

S. Typhimurium SL1344 株 (野生株)、*ssaN* 変異株、*ssaN* 相補株および *ssaD* 変異株 (SPI-2 変異株) を SPI-2 活性化条件下で培養したときの培養上清 (Sup) および 全菌体溶菌液 (Lysate) を調製し、試料とした。SDS-PAGE にて展開した後、抗 SseB 抗体 (A) あるいは 抗 HA 抗体 (B) を用いた Western blot 法により SPI-2 トランスロケータ SseB あるいはエフェクター SseJ を検出した。また、*ssaN* 相補株および *ssaN_{R192G}* 相補株における SsaN-Myc-His₆ 融合タンパク質および SsaN_{R192G}-Myc-His₆ 融合タンパク質の発現量には違いがないことを抗 6×His 抗体を用いた Western blot 法により確認し (C)、*ssaN_{R192G}* 相補株における SseB 分泌性を調べた (D)。

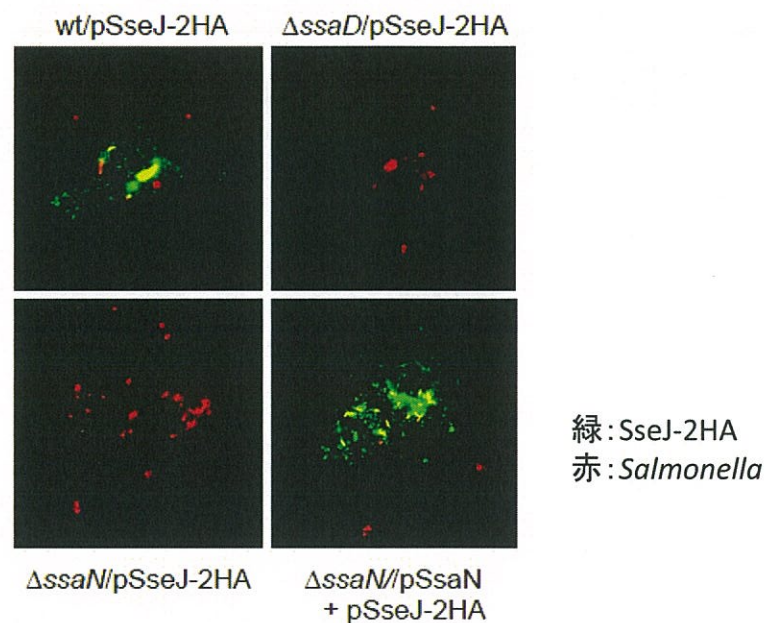


Fig. 5 SPI-2 エフェクター SseJ の感染細胞質内への分泌性

SseJ-2HA 融合タンパク質を発現する *S. Typhimurium* SL1344 株 (野生株)、装置変異株 ($\Delta ssaD$)、 $\Delta ssaN$ 変異株および *ssaN* 相補株を HeLa 細胞に感染させ、24 時間後における SPI-2 エフェクター SseJ の感染細胞質内への分泌を解析した。SseJ-2HA 融合タンパク質は 1 次抗体として、抗 HA 抗体を、2 次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体で蛍光染色し (緑)、*Salmonella* の菌体は 1 次抗体として、抗 LPS 抗体を、2 次抗体として、Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG 抗体で蛍光染色し (赤)、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

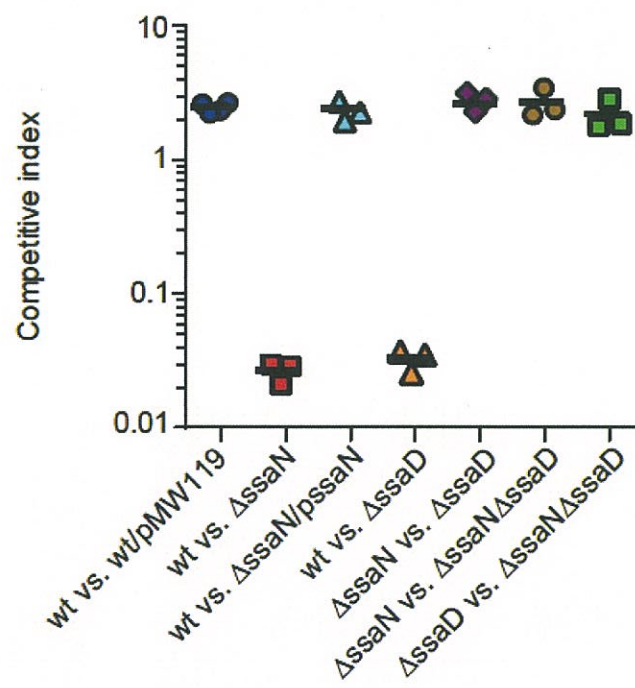


Fig. 6 マウス病原性試験 (competitive index assay)

2 菌株の混合菌液 (1×10^5 cfu) を BALB/c マウス (♀) に腹腔内接種し、48 時間後、マウスの脾臓を摘出、ホモジナイズし、脾臓内生菌数 (CFU) を測定した。

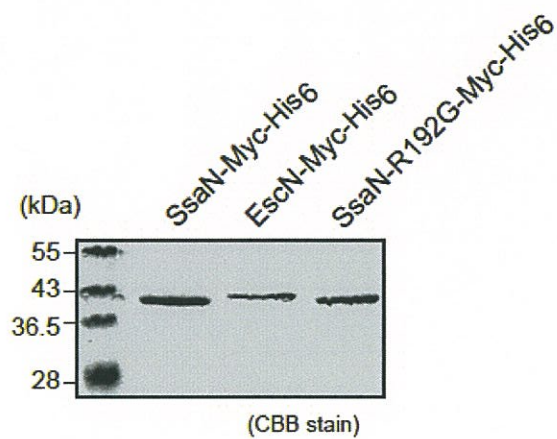


Fig. 7 精製後の SsaN-Myc-His₆、EscN-Myc-His₆ および SsaN_{R192G}-Myc-His₆ 融合タンパク質

各タンパク質は *E. coli* TOP10 を用いて大量発現し 8M urea-TBS で可溶化後、Ni-NTA Agarose を用いて精製した。精製タンパク質溶液は透析後、濃縮した。各精製タンパク質を SDS-PAGE を用いて展開後、CBB 染色法にて精製度を確認した。Image J により算出した精製度は、SsaN: 58%、EscN: 29%、SsaN_{R192G}: 43%であった。

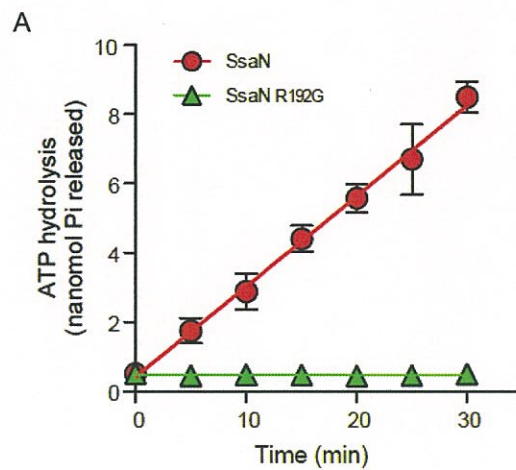


Fig. 8 SsaN の ATPase 活性 -1-

(A) 各反応時間における SsaN および SsaN_{R192G} の ATP 加水分解量

SsaN-Myc-His₆ および SsaN_{R192G}-Myc-His₆ 融合タンパク質と ATP 基質溶液(3 mM ATP, 4 mM MgCl₂)を混合し、37℃にて反応させた。反応開始から 5、10、15、20、25 および 30 分後、遊離したリン酸量を BIOMOL GREEN™を用いて定量し、ATP 加水分解量(遊離リン酸量)を測定した。

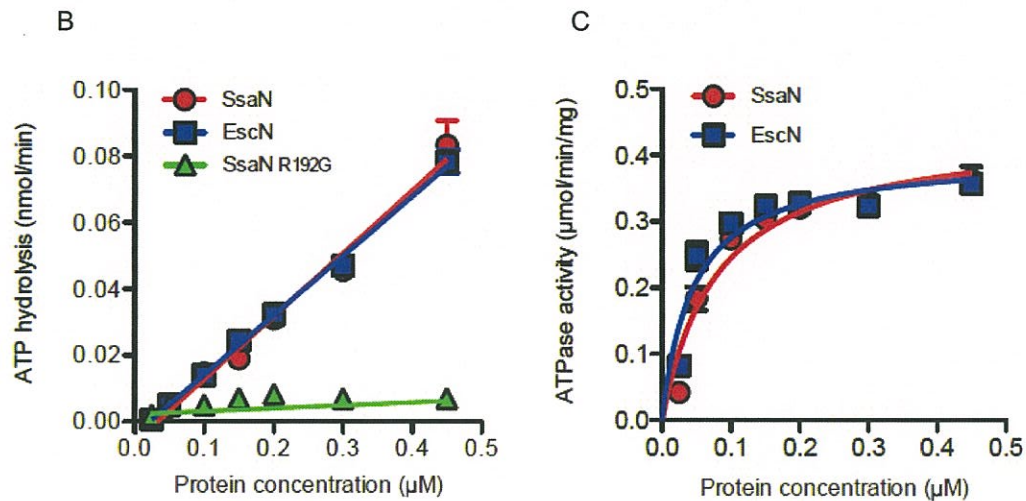


Fig. 8 SsaN の ATPase 活性 -2-

各タンパク質濃度における ATP 加水分解量 (B) および ATP 活性 (C)。

各濃度 (0.025-0.45 μM) の SsaN-Myc-His₆、SsaN_{R192G}-Myc-His₆、EscN-Myc-His₆ 融合タンパク質に ATP 基質溶液 (3 mM ATP, 4 mM MgCl₂) を加え、37°C、30 分間反応し、遊離したリン酸量を定量することにより、タンパク質濃度依存的 ATP 加水分解量 (B) および ATPase 活性 (C) の変化を調べた。

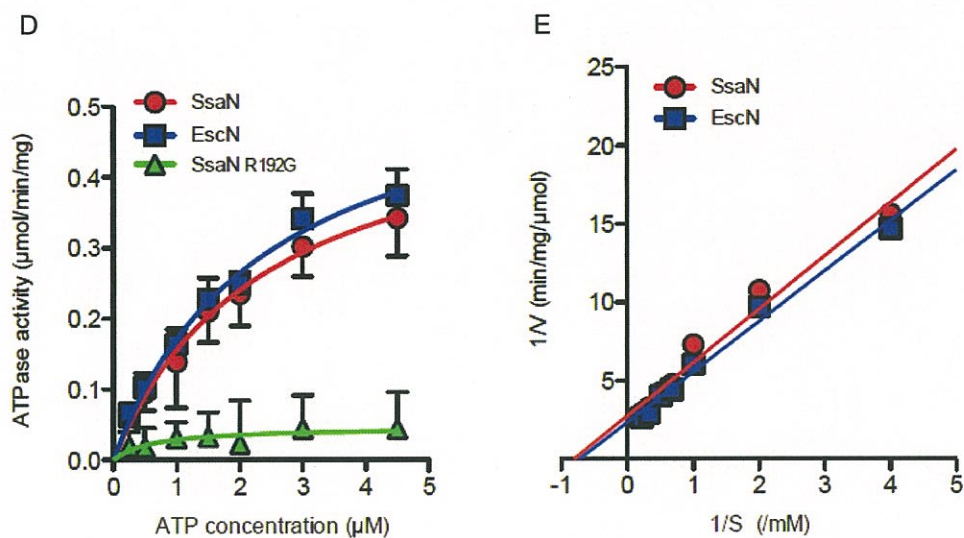


Fig. 8 SsaN の ATPase 活性 -3-

各 ATP 濃度における ATP 活性 (D) および二重逆数プロット (E)。

0.25 μM の SsaN-Myc-His₆、SsaN_{R192G}-Myc-His₆、EscN-Myc-His₆ 融合精製タンパク質に ATP を各最終濃度 (0.25-4.5 mM)、MgCl₂ を最終濃度 4 mM となるように加え、37°C、30 分間反応し、遊離したリン酸量を定量することにより、ATP 濃度依存的 ATPase 活性を求め(D)、二重逆数プロットを描いた (E)。

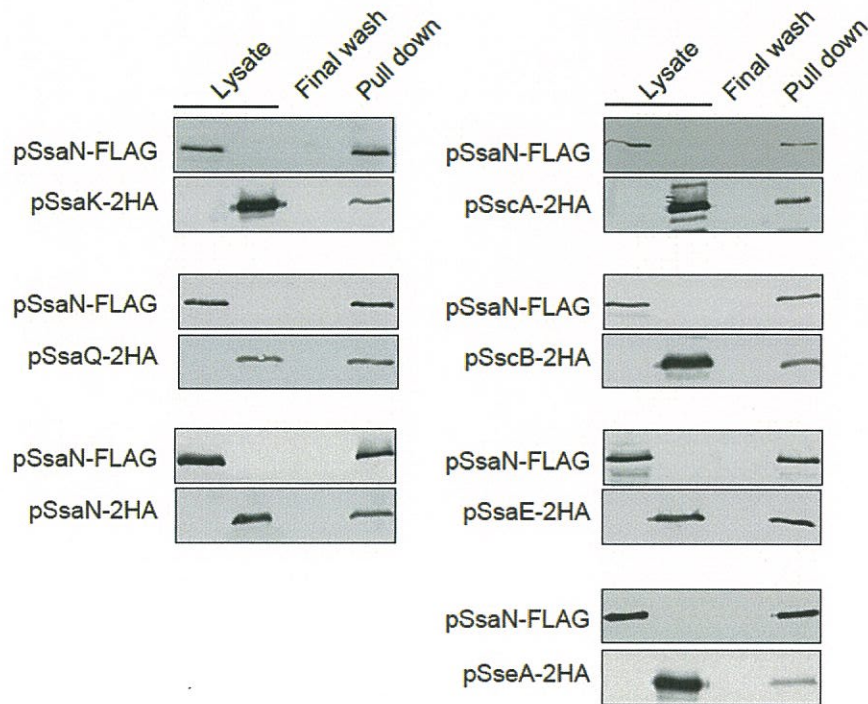


Fig. 9 pull-down 法による特異的結合性の検討

SsaN と SPI-2 III型分泌機構内膜 C リング構成タンパク質 (SsaK および SsaQ) 、 SPI-2 シャペロン分子 (SscA、SscB、SsaE および SseA) および SsaN 自身との結合性を ANTI-FLAG M2 Affinity Gel を用いた Pull-down 法により検討した。

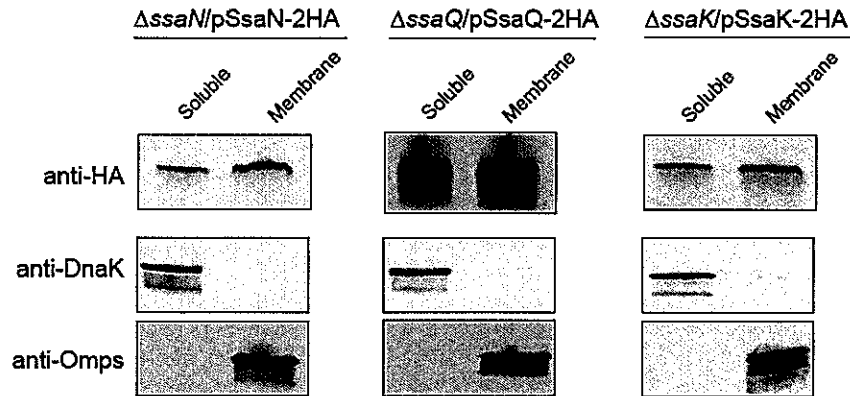
Affinity Gel に粗精製 FLAG 融合タンパク質を含む画分 (FLAG Lysate) を加え、4℃ で 2 時間反応した。Affinity Gel を TBS (pH 7.6) で洗浄後、Affinity Gel に粗精製 2HA 融合タンパク質を含む画分 (2HA Lysate) を加え 4℃ で 2 時間反応した。さらに Affinity Gel を TBS で洗浄し、最後の遠心後の上清を溶出前洗浄液 (Final wash) とした。Affinity Gel に 3 x FLAG peptide (90 ng / 1 ml TBS) 50 μ l を加え、10 分後に遠心し、上清を溶出液 (Pull down) とした。

等量のサンプル (Lysate, Final wash および Pull down) をポリアクリルアミドゲルにて展開後、抗 FLAG または抗 HA 抗体を用いた Western blot 法にて目的タンパク質を検出した。

C

C

A



B

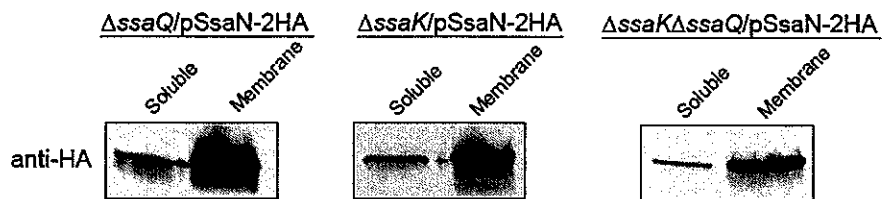


Fig. 10 *ssaQ* 欠失変異株 ($\Delta ssaQ$)、*ssaK* 欠失変異株 ($\Delta ssaK$) および $\Delta ssaK \Delta ssaQ$ 二重変異株における SsaN の局在

SsaN 相補株 (野生型 *ssaN* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaN$ 変異株)、SsaQ 相補株 (野生型 *ssaQ* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaQ$ 変異株) および SsaK 相補株 (野生型 *ssaK* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaK$ 変異株) を SPI-2 活性化条件で培養したときの菌体を超音波破碎機により破碎し、可溶性画分 (Soluble) および膜画分 (Membrane) に分画した。試料を SDS-PAGE にて展開した後、抗 HA 抗体を用いた Western blot 法により目的タンパク質を検出した。各画分に含まれるタンパク質のクロスコンタミネーションの有無は、細胞質に局在する DnaK、膜タンパク質である

Omps に対する抗体により検出した (A)。同様に、野生型 *ssaN* を有するプラスミドを導入した $\Delta ssaQ$ 変異株、 $\Delta ssaK$ 変異株および $\Delta ssaK\Delta ssaQ$ 二重変異株の菌体を分画した (B)。

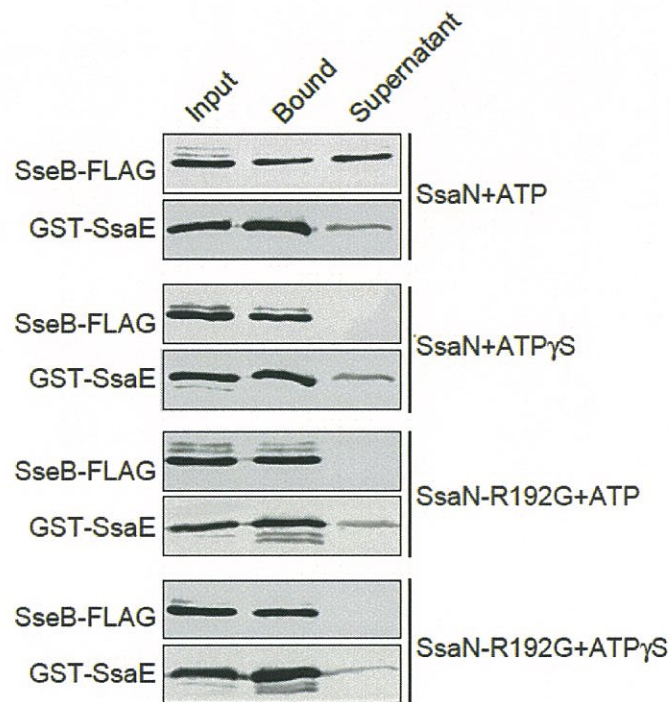


Fig. 11 SsaN の ATPase 活性によるシャペロン-エフェクター複合体の解離

ATP あるいはその加水分解抵抗性アナログである ATP- γ S の存在下において、野生型 SsaN あるいは ATPase 活性をもたない点変異型 SsaN_{R192G}-Myc-His₆ を精製した SsaE (GST-SsaE)-SseB (SseB-FLAG) 複合体と反応させた。分泌された SseB-FLAG (Supernatant) あるいは SseB-FLAG と GST-SsaE との結合 (Bound) は GST-pulldown assay により確認した。等量のサンプル (Input, Bound および Supernatant) を SDS-PAGE にて展開後、抗 FLAG または抗 GST 抗体を用いた Western blot 法にて目的タンパク質を検出した。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご指導いただきましたことに、厚く御礼申し上げます。

本研究を直接ご指導くださいました岡田信彦教授は、ご多忙であるにもかかわらず、いつも丁寧に指導してくださいました。

また、本論文の審査において主査の労を賜りました衛生化学教室、今井浩孝教授、副査の労を賜りました公衆衛生学教室、清野正子准教授、生命科学研究所細菌感染制御学研究室、桑江朝臣准教授に深く感謝致します。

三木剛志講師、伊藤雅洋助教、守屋智草助教には、研究を進める上で多くのご助言をいただきましたことを感謝致します。

薬学部3年次より約10年間にわたりご指導くださりました檀原宏文名誉教授には、いつも温かい言葉をかけていただきました。

心から御礼申し上げます。ありがとうございました。

参考文献

1. Akeda, Y., and J. E. Galan. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437:911-5.
2. Akeda, Y., and J. E. Galan. 2004. Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol* 186:2402-12.
3. Andrade, A., J. P. Pardo, N. Espinosa, G. Perez-Hernandez, and B. Gonzalez-Pedrajo. 2007. Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys* 468:121-7.
4. Auvray, F., A. J. Ozin, L. Claret, and C. Hughes. 2002. Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH. *J Mol Biol* 318:941-50.
5. Biemans-Oldehinkel, E., N. Sal-Man, W. Deng, L. J. Foster, and B. B. Finlay. 2011. Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193:5514-9.
6. Blaylock, B., K. E. Riordan, D. M. Missiakas, and O. Schneewind. 2006. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* 188:3525-34.
7. Boonyom, R., M. H. Karavolos, D. M. Bulmer, and C. M. Khan. 2010. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) type III secretion of SopD involves N- and C-terminal signals and direct binding to the InvC ATPase. *Microbiology* 156:1805-14.
8. Boucrot, E., T. Henry, J. P. Borg, J. P. Gorvel, and S. Meresse. 2005. The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* 308:1174-8.
9. Bronstein, P. A., E. A. Miao, and S. I. Miller. 2000. InvB is a type III secretion chaperone specific for SspA. *J Bacteriol* 182:6638-44.
10. Coombes, B. K., N. F. Brown, Y. Valdez, J. H. Brumell, and B. B. Finlay. 2004. Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential

- requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* 279:49804-15.
11. Cooper, C. A., D. T. Mulder, S. E. Allison, A. V. Pilar, and B. K. Coombes. 2013. The SseC translocon component in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is chaperoned by SscA. *BMC Microbiol* 13:221.
 12. Cooper, C. A., K. Zhang, S. N. Andres, Y. Fang, N. A. Kaniuk, M. Hannemann, J. H. Brumell, L. J. Foster, M. S. Junop, and B. K. Coombes. 2010. Structural and biochemical characterization of SrcA, a multi-cargo type III secretion chaperone in *Salmonella* required for pathogenic association with a host. *PLoS Pathog* 6:e1000751.
 13. Cornelis, G. R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4:811-25.
 14. Crump, J. A., and E. D. Mintz. 2010. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis* 50:241-6.
 15. Dai, S., and D. Zhou. 2004. Secretion and function of *Salmonella* SPI-2 effector SseF require its chaperone, SscB. *J Bacteriol* 186:5078-86.
 16. Darwin, K. H., and V. L. Miller. 2000. The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Mol Microbiol* 35:949-60.
 17. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-5.
 18. de Jong, H. K., C. M. Parry, T. van der Poll, and W. J. Wiersinga. 2012. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog* 8:e1002933.
 19. Deiwick, J., S. P. Salcedo, E. Boucrot, S. M. Gilliland, T. Henry, N. Petermann, S. R. Waterman, J. P. Gorvel, D. W. Holden, and S. Meresse. 2006. The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* 74:6965-72.
 20. Diepold, A., U. Wiesand, M. Amstutz, and G. R. Cornelis. 2012. Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Mol Microbiol* 85:878-92.

21. Dreyfus, G., A. W. Williams, I. Kawagishi, and R. M. Macnab. 1993. Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F₀F₁ ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J Bacteriol* 175:3131-8.
22. Eichelberg, K., C. C. Ginocchio, and J. E. Galan. 1994. Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *InvC* to the F₀F₁ ATPase family of proteins. *J Bacteriol* 176:4501-10.
23. Eswarappa, S. M., V. D. Negi, S. Chakraborty, B. K. Chandrasekhar Sagar, and D. Chakravortty. 2010. Division of the *Salmonella*-containing vacuole and depletion of acidic lysosomes in *Salmonella*-infected host cells are novel strategies of *Salmonella enterica* to avoid lysosomes. *Infect Immun* 78:68-79.
24. Fan, F., and R. M. Macnab. 1996. Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 271:31981-8.
25. Fierer, J., and D. G. Guiney. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 107:775-80.
26. Figueira, R., and D. W. Holden. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* 158:1147-61.
27. Fu, Y., and J. E. Galan. 1998. Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 180:3393-9.
28. Gophna, U., E. Z. Ron, and D. Graur. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312:151-63.
29. Gotoh, H., N. Okada, Y. G. Kim, K. Shiraishi, N. Hiram, T. Haneda, A. Kurita, Y. Kikuchi, and H. Danbara. 2003. Extracellular secretion of the virulence plasmid-encoded ADP-ribosyltransferase SpvB in *Salmonella*. *Microb Pathog* 34:227-38.
30. Green, M. R. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3 Vol. . Cold

Spring Harbor Laboratory.

31. Guiney, D. G. 2005. The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 289:131-50.
32. Guo, Q., Y. Shen, Y. S. Lee, C. S. Gibbs, M. Mrksich, and W. J. Tang. 2005. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J* 24:3190-201.
33. Harrison, R. E., J. H. Brumell, A. Khandani, C. Bucci, C. C. Scott, X. Jiang, B. B. Finlay, and S. Grinstein. 2004. *Salmonella* impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Mol Biol Cell* 15:3146-54.
34. Hensel, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294:95-102.
35. Hensel, M., J. E. Shea, S. R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F. C. Fang, and D. W. Holden. 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30:163-74.
36. Hoiseth, S. K., and B. A. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238-9.
37. Imada, K., T. Minamino, A. Tahara, and K. Namba. 2007. Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:485-90.
38. Jackson, M. W., and G. V. Plano. 2000. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* 186:85-90.
39. Kaniga, K., D. Trollinger, and J. E. Galan. 1995. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* 177:7078-85.
40. Knodler, L. A., and O. Steele-Mortimer. 2003. Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 4:587-99.

41. Kuhle, V., and M. Hensel. 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* 61:2812-26.
42. Marsman, M., I. Jordens, C. Kuijl, L. Janssen, and J. Neefjes. 2004. Dynein-mediated vesicle transport controls intracellular *Salmonella* replication. *Mol Biol Cell* 15:2954-64.
43. McMurtry, J. L., J. W. Murphy, and B. Gonzalez-Pedrajo. 2006. The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry* 45:11790-8.
44. Miki, T., N. Okada, and H. Danbara. 2004. Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *J Biol Chem* 279:34631-42.
45. Miki, T., Y. Shibagaki, H. Danbara, and N. Okada. 2009. Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 191:6843-54.
46. Mills, D. M., V. Bajaj, and C. A. Lee. 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 15:749-59.
47. Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, K. Oosawa, K. Namba, and R. M. Macnab. 2002. Structural properties of FliH, an ATPase regulatory component of the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J Mol Biol* 322:281-90.
48. Minamino, T., and R. M. MacNab. 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol* 37:1494-503.
49. Minamino, T., and K. Namba. 2008. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* 451:485-8.
50. Moest, T. P., and S. Meresse. 2013. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol* 16:38-44.

51. Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama, and C. Sasakawa. 2006. Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* 281:599-607.
52. Neves, B. C., R. Mundy, L. Petrovska, G. Dougan, S. Knutton, and G. Frankel. 2003. CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. *Infect Immun* 71:2130-41.
53. Ohl, M. E., and S. I. Miller. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52:259-74.
54. Page, A. L., and C. Parsot. 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol* 46:1-11.
55. Pallen, M. J., S. A. Beatson, and C. M. Bailey. 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* 5:9.
56. Papenfort, K., M. Bouvier, F. Mika, C. M. Sharma, and J. Vogel. 2010. Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20435-40.
57. Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, N. J. Panopoulos, J. Mansfield, A. P. Pugsley, S. Karamanou, and A. Economou. 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem* 278:25816-24.
58. Ruiz-Albert, J., R. Mundy, X. J. Yu, C. R. Beuzon, and D. W. Holden. 2003. SseA is a chaperone for the SseB and SseD translocon components of the *Salmonella* pathogenicity-island-2-encoded type III secretion system. *Microbiology* 149:1103-11.
59. Sakamoto, H., J. Bellalou, P. Sebo, and D. Ladant. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 267:13598-602.
60. Salcedo, S. P., and D. W. Holden. 2003. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J* 22:5003-14.
61. Schmidt, H., and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial

- pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17:14-56.
62. Sorg, J. A., B. Blaylock, and O. Schneewind. 2006. Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16490-5.
 63. Steele-Mortimer, O., J. H. Brumell, L. A. Knodler, S. Meresse, A. Lopez, and B. B. Finlay. 2002. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 4:43-54.
 64. Sternberg, N. L., and R. Maurer. 1991. Bacteriophage-mediated generalized transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol* 204:18-43.
 65. Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau, and G. R. Cornelis. 1994. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* 176:1561-9.
 66. Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel, and I. Rosenshine. 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 28:143-55.
 67. Wolff, J., G. H. Cook, A. R. Goldhammer, and S. A. Berkowitz. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:3841-4.
 68. Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, and E. E. Galyov. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 29:883-91.
 69. Yu, X. J., M. Liu, S. Matthews, and D. W. Holden. 2011. Tandem translation generates a chaperone for the *Salmonella* type III secretion system protein SsaQ. *J Biol Chem* 286:36098-107.
 70. Zurawski, D. V., and M. A. Stein. 2003. SseA acts as the chaperone for the SseB component of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 translocon. *Mol Microbiol* 47:1341-51.
 71. Zurawski, D. V., and M. A. Stein. 2004. The SPI2-encoded SseA chaperone has discrete domains required for SseB stabilization and export, and binds within the C-terminus of SseB and SseD. *Microbiology*

150:2055-68.

C

C