

サルモネラの DsbA と *Chromobacterium violaceum* の CopE エフェクターの解析

三 木 剛 志¹

¹ 北里大学薬学部微生物学教室
〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1

Chromobacterium violaceum はヒトや哺乳動物に感染し、致命的な敗血症を引き起こすグラム陰性細菌である。本菌によるヒト感染は稀であるが、感染が成立した場合は肺、肝および脾臓に膿瘍が形成される重症感染症となる。本研究では、*C. violaceum* の感染メカニズムの解明を目的として、本菌の病原因子の同定とその機能解析を行った。本菌が保有する 2 つの III 型分泌機構に着目し、マウス感染モデルを用いて、その病原性への関与を検討した結果、遺伝子クラスター *Chromobacterium pathogenicity island 1/1a* (Cpi-1/-1a) にコードされる III 型分泌機構が主要な病原因子の一つであることを明らかにした。さらに、Cpi-1/-1a の III 型分泌装置より分泌される 16 個の新規エフェクターを同定した。CopE と命名したエフェクターは低分子量 GTPase Rho ファミリーのヌクレオチド交換因子であり、Rac1 と Cdc42 を活性化した。また、*copE* 破壊株および CopE のヌクレオチド交換活性を欠失させた変異体発現株ではその病原性が有意に低下した。本研究より、Cpi-1/-1a にコードされる III 型分泌機構は *C. violaceum* の主要な病原因子の一つであり、その装置より分泌される CopE は病原性発現に関与するエフェクターであることが明らかとなった。

はじめに

III 型分泌機構はグラム陰性細菌に特有なタンパク質分泌システムであり、エフェクターと呼ばれる基質タンパク質を宿主細胞内へ直接注入する (4)。III 型分泌機構は病原性発現の中心的な役割を担い、その分泌装置の構造は菌種間において保存されている。一方、装置より宿主細胞内へ注入されるエフェクタータンパク質はその細菌種に特異的であり、それらの多様な生物活性により、その病原細菌の病原性が規定される。すなわち、III 型分泌機構に依存して病原性を発現する細菌の感染メカニズムを理解するためには、分泌装置より分泌されるエフェクターを同定し、その機能解析を行うことが必要である。これまで、著者はサルモネラ属細菌 (11-13, 19) と *Chromobacterium violaceum* (9, 10) における III 型分泌機構の機能発現に関する研究を中心にやってきた。本原稿では、*C. violaceum* の III 型分泌機構に依存した病原性の解析について述べる。

1. *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum は熱帯・亜熱帯地方の土壌や河川にみられるグラム陰性細菌である (8)。本菌が産生する紫色色素のビオラセインは抗菌、抗ウイルスおよび抗ガン活性などの多様な生物活性を有する。また、このビオラセ

インの産生はクオラムセンシングにより制御されていることから、本菌はクオラムセンシング活性を示す指標菌として広く使用されてきた。一方、*C. violaceum* はヒトおよび哺乳動物に感染する病原細菌であり、1927 年にマレーシアで初めてのヒト感染が報告されて以来、世界中で散発的に感染例が報告されている (16, 18)。ほとんどの *C. violaceum* 感染は創傷感染によるものであり、致命的な敗血症を伴い、皮膚症状そして肝、肺、脾臓およびリンパ節に膿瘍が形成される。このような、*C. violaceum* の播種性感染は高い致死率 (60~80%) となる重症感染症であるが、感染に関わる本菌の病原因子およびその感染メカニズムは全く不明であった。

2. 3 つの遺伝子クラスターにコードされる 2 つの III 型分泌機構

C. violaceum 標準株 ATCC 12472 のゲノム配列が発表され、病原因子をコードすると予想されるいくつかの遺伝子 (病原遺伝子) が同定された (2)。これらの中で、特に注目される病原遺伝子が III 型分泌機構をコードする 3 つの遺伝子クラスター (*Chromobacterium pathogenicity island 1, 1a* と 2 : Cpi-1/-1a と -2) であった (1)。そこで、これらの III 型分泌機構の病原性への関与を明らかにするために、まず、ヒト感染を反映した本菌の病原性評価系として、*C.*

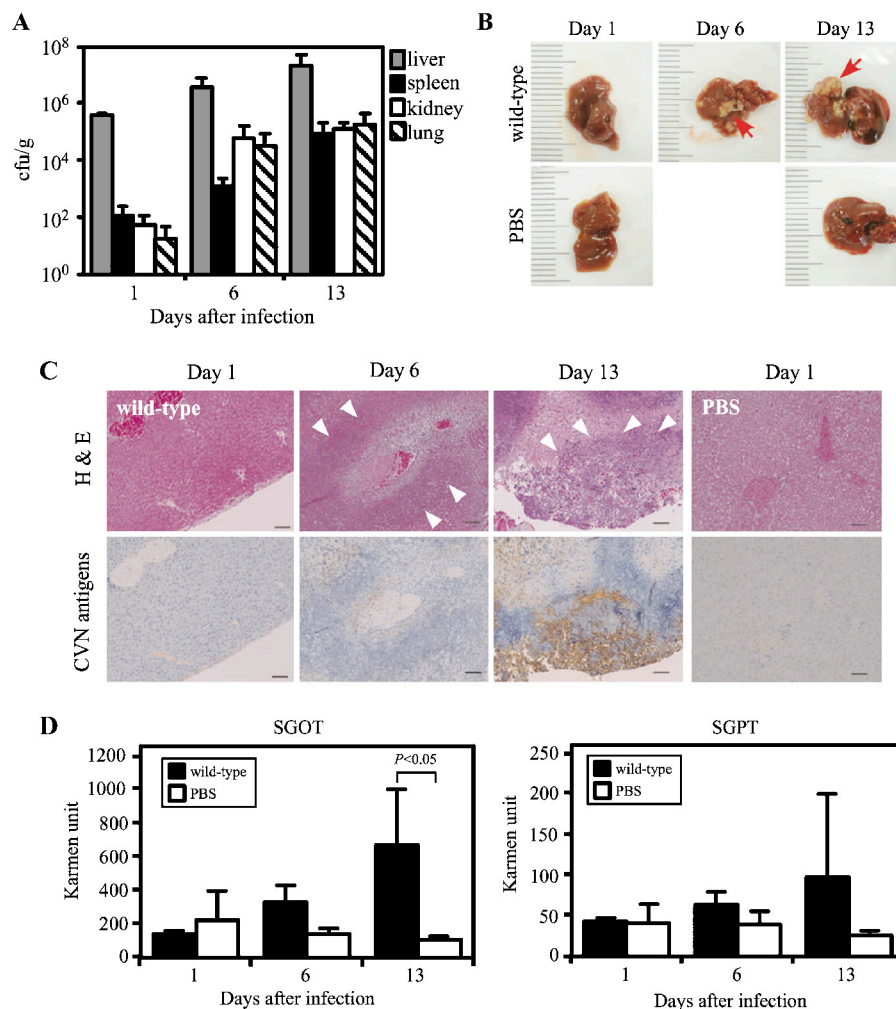
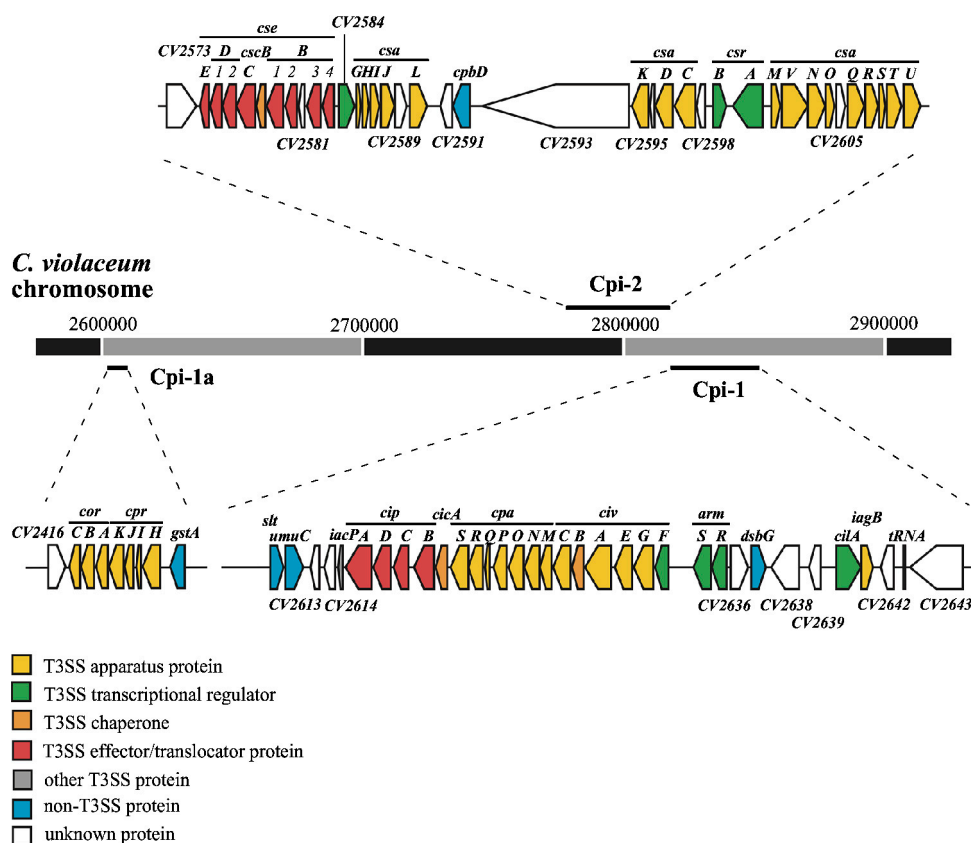


図1. *Chromobacterium violaceum* のマウス感染モデル

1×10^5 cfu の *Chromobacterium violaceum* 野生株 (CVN) を BALB/c マウスに腹腔内投与し、感染1日、6日および13日後に、肝、脾、腎臓および肺を回収した。A. 感染マウスの各臓器内における *C. violaceum* 生菌数。B. 肝臓の膿瘍形成 (矢印は非常に大きな膿瘍)。C. 肝臓の H&E 染色像と抗 *C. violaceum* 抗体を用いた免疫染色像 (矢頭は壊死した部位、棒は 30 μ m を示す)。D. 血清 GOT あるいは GPT 値 (Karmen 単位で示した)。(Miki et al. (2010) Mol. Microbiol. 77, 855–872. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

violaceum のマウス感染モデルを確立した。腹腔内投与により野生型 ATCC 12472 のナリジクス酸自然耐性株 (CVN) が感染したマウスでは、肝臓に膿瘍が形成され、他の臓器 (脾、腎臓および肺) と比べて、多くの本菌が検出された (図 1A と 1B)。また、肝臓の H&E 染色像および抗 CVN モノクローナル抗体を用いた免疫染色により、凝固性の肝細胞死および多形核白血球の浸潤が *C. violaceum* 感染した肝臓において認められ、それらの周辺に本菌が増殖していることが示唆された (図 1C)。さらに、肝臓の組織傷害を示す血清マーカーのグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (glutamic oxaloacetic transaminase : GOT) およびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamic pyruvate transaminase : GPT) は非感染マウスと比較し、CVN 株の感染マウスにおいて有意に高値であった (図 1D)。これらより、*C. violaceum* のマウス感染モデルは本菌のヒト感染と類似しており、感染した本菌が増殖し傷害を引き起こす標的臓器は肝臓であることが示唆された。

図2に示すように、Cpi-1 および Cpi-2 遺伝子クラスターは *C. violaceum* の染色体上に並んで存在しているが、Cpi-1a はこれらより約 200 kbp 上流にある。Cpi 遺伝子にコードされるタンパク質と既知の III 型分泌機構タンパク質の相同性より、Cpi-1 および Cpi-1a (Cpi-1/-1a) にコードされるタンパク質群により一つの III 型分泌装置が構築され、一方、Cpi-2 にコードされるタンパク質群によりもう一つの III 型分泌装置が作られることが予測された。そこで、Cpi-1/-1a および -2 に存在する遺伝子より、装置タンパク質をコードするもの、孔形成因子をコードするもの、および転写調節因子をコードすると予測される遺伝子を選び、それら遺伝子の破壊株を作製した。致死量の破壊株をマウスに腹腔内投与した結果、Cpi-2 にコードされる遺伝子の破壊株は野生株と同様にマウスに対して致死活性を示したのに対し、Cpi-1/-1a にコードされる遺伝子の破壊株はマウスに対する病原性が消失した (10)。さらに、肝臓における増殖能および膿瘍形成を調べた結果、Cpi-1 変異株

図 2. *Chromobacterium* pathogenicity island

染色体を表す棒(黒およびグレー)の数値は *C. violaceum* ATCC 12472 のゲノム配列を基としたヌクレオチド部位を示す。(Miki *et al.* (2010) Mol. Microbiol. **77**, 855–872. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

($\Delta civC$) は肝臓での増殖が認められず、膿瘍も形成されなかった (図 3A と 3B)。また、H&E 染色と免疫染色による肝臓の病理評価および血清トランスアミナーゼの検出試験からも、 $\Delta civC$ 株は野生型や Cpi-2 変異株 ($\Delta csaN$) と異なり、マウスに対する病原性が減弱していた (図 3C と 3D)。これらの結果より、本研究において確立した *C. violaceum* のマウス感染モデルより、Cpi-1/1a にコードされる III 型分泌機構は本菌の主要な病原因子の一つであることが明らかとなった。

3. Cpi-1/1a にコードされる III 型分泌機構依存性の細胞傷害活性

C. violaceum による肝臓の傷害メカニズムを分子レベルで明らかにするために、マウス肝細胞癌由来細胞株 Hepa 1-6 を用いた *in vitro* 感染実験を行った。*C. violaceum* 野生株 (CVN) を Hepa 1-6 細胞に感染させると、Hepa 1-6 細胞は丸く収縮した (rounding)。細胞骨格への影響を調べるために、ファロイジンを用いた免疫蛍光染色をした結果、CVN および Cpi-2 変異株 ($\Delta csaN$) の感染細胞ではアクチンフィラメントの消失が認められた (図 4A)。一方、Cpi-1 変異株 ($\Delta civC$) は非感染細胞と同様に、アクチンフィラメントの変化は認められなかったことから、*C. violaceum* は Cpi-1 依存性の細胞傷害活性を有することが示唆された。*C. violaceum* による細胞傷害活性を定量的に評価するため

に、細胞外への乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH) の遊離量を調べた結果、*C. violaceum* 野生株 (CVN) 感染 2 時間後より細胞傷害活性が認められ、これは Cpi-1 および Cpi-1a に依存した活性であることが示唆された (図 4B)。また、本菌による細胞傷害活性は他の細胞株 (RAW264.7, HepG2 および HeLa) においても同様に、認められた (10)。

C. violaceum に誘導される細胞死がアポトーシスによるものか否かを調べるために、広域カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK) を用いた阻害実験を行ったが、本菌による Hepa 1-6 細胞に対する細胞傷害活性は減弱しなかった (10)。次に、本菌による細胞傷害は宿主細胞膜上に形成された孔が原因となる浸透圧性の溶解であるか否かを調べるために、浸透圧保護剤を用いた阻害実験を行った。その結果、浸透圧保護剤の粒子径が大きくなるにつれ、*C. violaceum* による細胞傷害活性は減弱した (図 5A)。粒子径がおよそ 2.8 nm である PEG2000 によって、細胞傷害活性が有意に阻害されたが、粒子径がおよそ 2.2 nm の PEG1500 では阻害が認められなかったことから、本菌の感染により宿主細胞には 2.2–2.8 nm の孔が形成されることが示唆された。そこで、宿主細胞膜の孔形成が引き金となって、カスパーゼ 1 の活性化を介した IL-1 β や IL-18 の細胞外分泌を伴う炎症誘導性の細胞傷害が *C. violaceum* 感染により誘導されるか否かについて、ELISA 法による

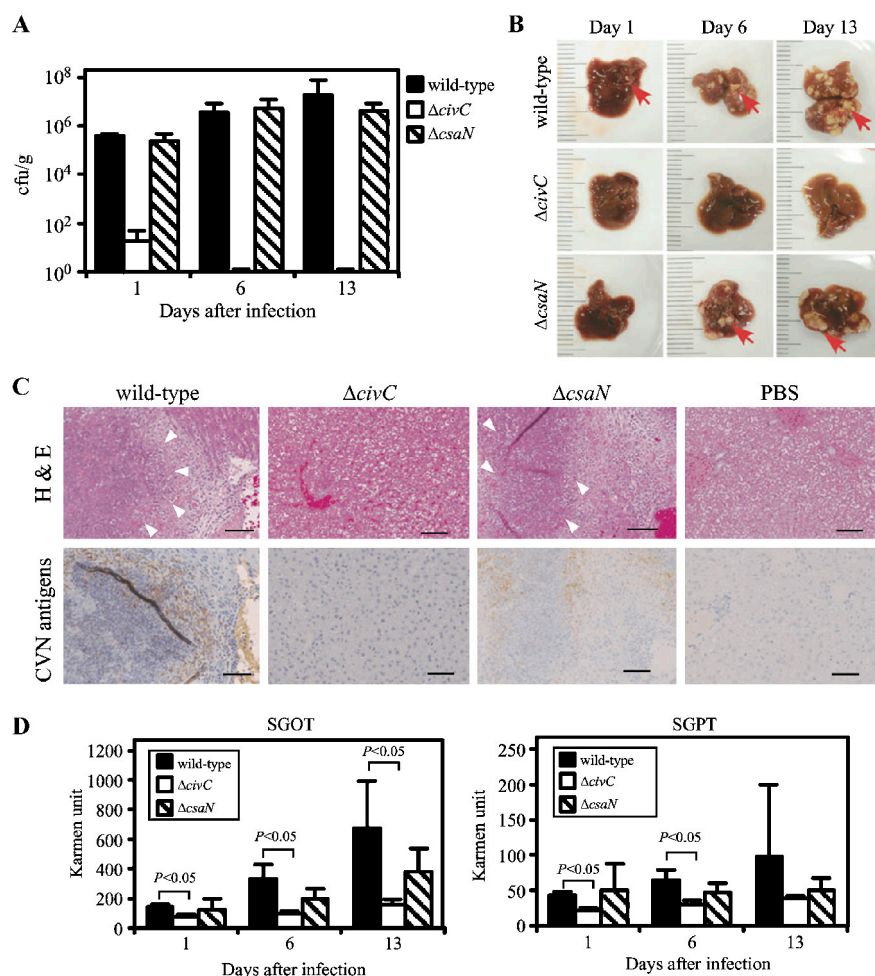


図3. マウス病理性におけるIII型分泌機構の役割

1×10^5 cfu の *Chromobacterium violaceum* 野生株 (CVN), Cpi-1 変異株 ($\Delta civC$) あるいは Cpi-2 変異株 ($\Delta csaN$) を BALB/c マウスに腹腔内投与した。感染1日, 6日および13日後に, 肝, 脾, 腎臓および肺を回収し, 解析した。A. 感染マウスの各臓器内における *C. violaceum* 生菌数。B. 肝臓の膿瘍形成 (矢印は非常に大きな膿瘍)。C. 肝臓の H&E 染色像と抗 *C. violaceum* 抗体を用いた免疫染色像 (矢頭は壊死した部位, スケールバーは 30 μ m を示す)。D. 血清 GOT あるいは GPT 値 (Karmen 単位で示した)。(Miki *et al.* (2010) Mol. Microbiol. **77**, 855–872. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

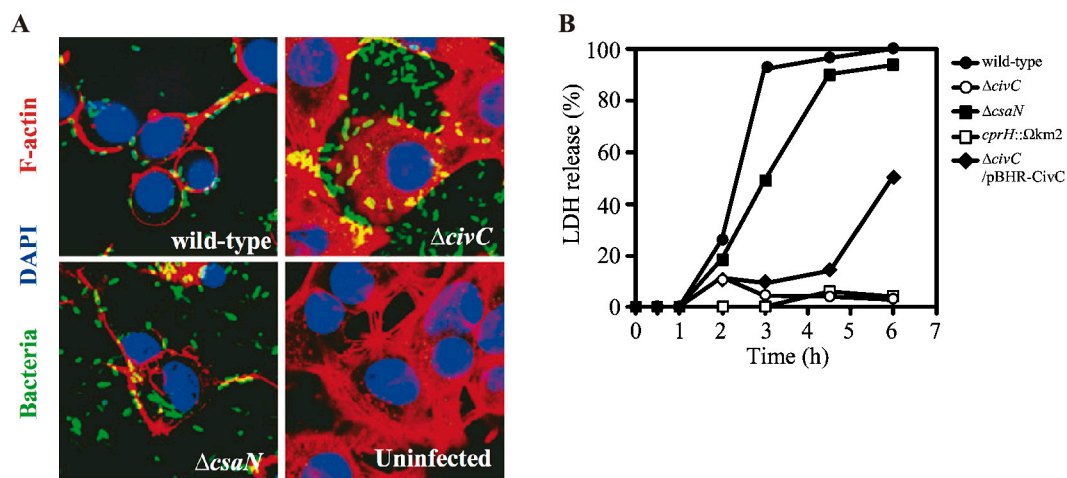


図4. Cpi-1/-1a III型分泌機構依存性の細胞傷害性

A. Hepa1-6 細胞に *C. violaceum* 野生株 (CVN), Cpi-1 変異株 ($\Delta civC$) あるいは Cpi-2 変異株 ($\Delta csaN$) を感染効率 (moi) 10 で感染させ, 3 時間後の免疫蛍光染色像 (*C. violaceum* は緑, F-アクチンは赤, 核は青)。B. 細胞外 LDH 遊離を指標とした細胞傷害性試験。(Miki *et al.* (2010) Mol. Microbiol. **77**, 855–872. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

IL-1 β の細胞外分泌量を調べることによって評価した。*C. violaceum* 野生株 (CVN) 感染細胞では細胞外 IL-1 β 分泌量は非感染細胞と比較し、有意に上昇していた (図 5B)。これは、Cpi-1 変異株 ($\Delta civC$) の感染細胞および野生株の感染細胞をカスパーゼ 1 阻害剤 (Ac-YVAD-CMK) で処理したものでは、IL-1 β の細胞外分泌の上昇は認められなかった (図 5B)。コントロールとして用いた *Salmonella* Typhimurium 野生株 SL1344 および III 型分泌機構変異株 (SB136) においても同様な結果が得られ、*S. Typhimurium* によるカスパーゼ 1 の活性化は阻害剤 Ac-YVAD-CMK により抑制された (図 5B)。次にカスパーゼ 1 阻害によって、*C. violaceum* による細胞傷害活性が抑制されるか否かを調べた。グリシンはサルモネラによるカスパーゼ 1 依存性の細胞傷害活性を阻害することが知られている (3)。そこで、*C. violaceum* 野生株 (CVN) の感染細胞にグリシンを添加したところ、感染初期 (感染 3 時間後まで) では有意に本菌による細胞傷害活性を阻害した (図 5C)。同様に、カスパーゼ 1 阻害剤 (Ac-YVAD-CMK) の処理により、本菌の細胞傷害活性は抑制された (図 5C)。以上の結果より、*C. violaceum* 感染によって、Cpi-1/-1a にコードされる III 型分

泌機構に依存した細胞傷害が誘導され、これはマウス感染時に肝臓で認められた病変の一因であることが明らかとなった。また、*C. violaceum* による細胞傷害は非アポトーシスであり、一部はカスパーゼ 1 の活性化に依存することが示唆された。

4. 孔形成因子 CipB トランスロケーター

III 型分泌装置より分泌され、宿主細胞膜に孔を形成する III 型分泌機構の基質タンパク質をトランスロケーターと呼ぶ。アミノ酸配列の相同性より、Cpi-1/-1a にコードされる III 型分泌装置により分泌される基質タンパク質 (トランスロケーター) をコードする遺伝子として、Cpi-1 遺伝子クラスターに存在する *cipB*、*cipC* および *cipA* が予測された。そこで、これらの遺伝子にコードされる CipB、CipC および CipA タンパク質が III 型分泌装置を介して宿主細胞内へ移行するか否かを、百日咳菌の CyaA タンパク質を用いたレポーターアッセイにより評価した。その結果、CipB、CipC および CipA タンパク質は Cpi-1/-1a にコードされる III 型分泌装置を介して、宿主細胞へ移行する基質タンパク質であることが示唆された (図 6A)。次に、孔形

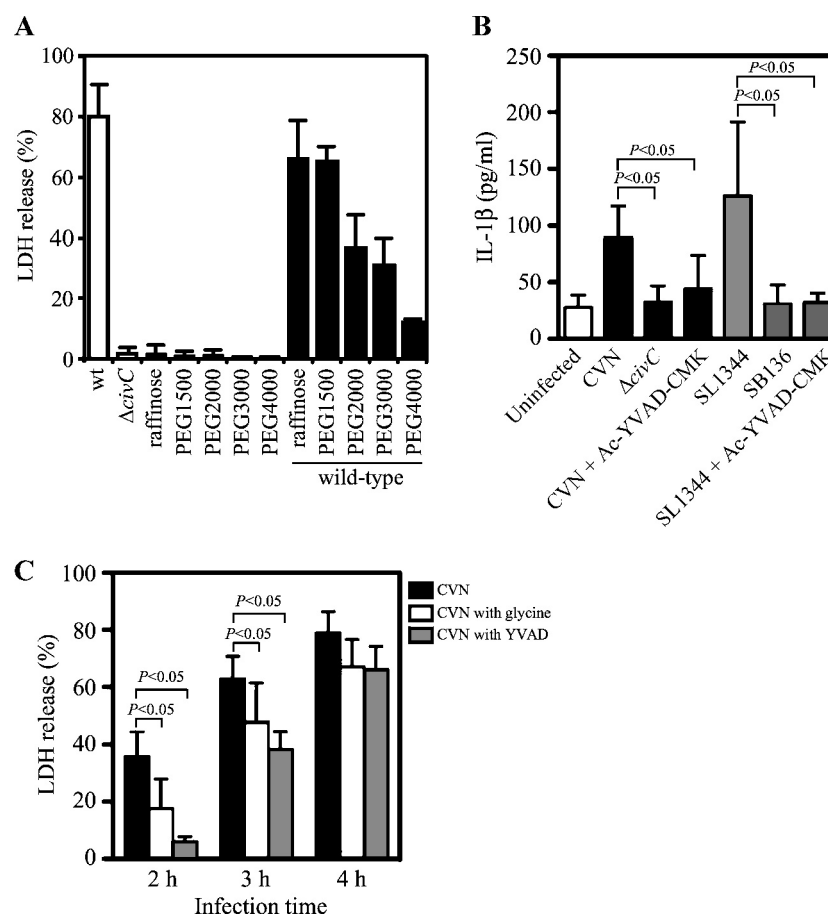


図 5. 孔形成による *C. violaceum* の細胞傷害活性

A. 浸透圧保護剤存在下における *C. violaceum* の細胞 (Hepa1-6) 傷害活性。各浸透圧保護剤の分子直径は raffinose: 1.2–1.4 nm; PEG1500: 2.2–2.3 nm; PEG2000: 2.8 nm; PEG3000: 3.2 nm; PEG4000: 3–3.5 nm である。B. *C. violaceum* 感染細胞 (RAW264.7) における IL-1 β の細胞外放出。細胞外 IL-1 β 量を ELISA にて定量した。コントロールとして *Salmonella* Typhimurium 野生株 (SL1344) とその III 型分泌機構変異株 (SB136) を使用した。Caspase-1 阻害剤として、Ac-YVAD-CMK を使用した。C. グリシンあるいは Ac-YVAD-CMK 前処理における *C. violaceum* の細胞傷害活性。(Miki *et al.* (2010) Mol. Microbiol. **77**, 855–872. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

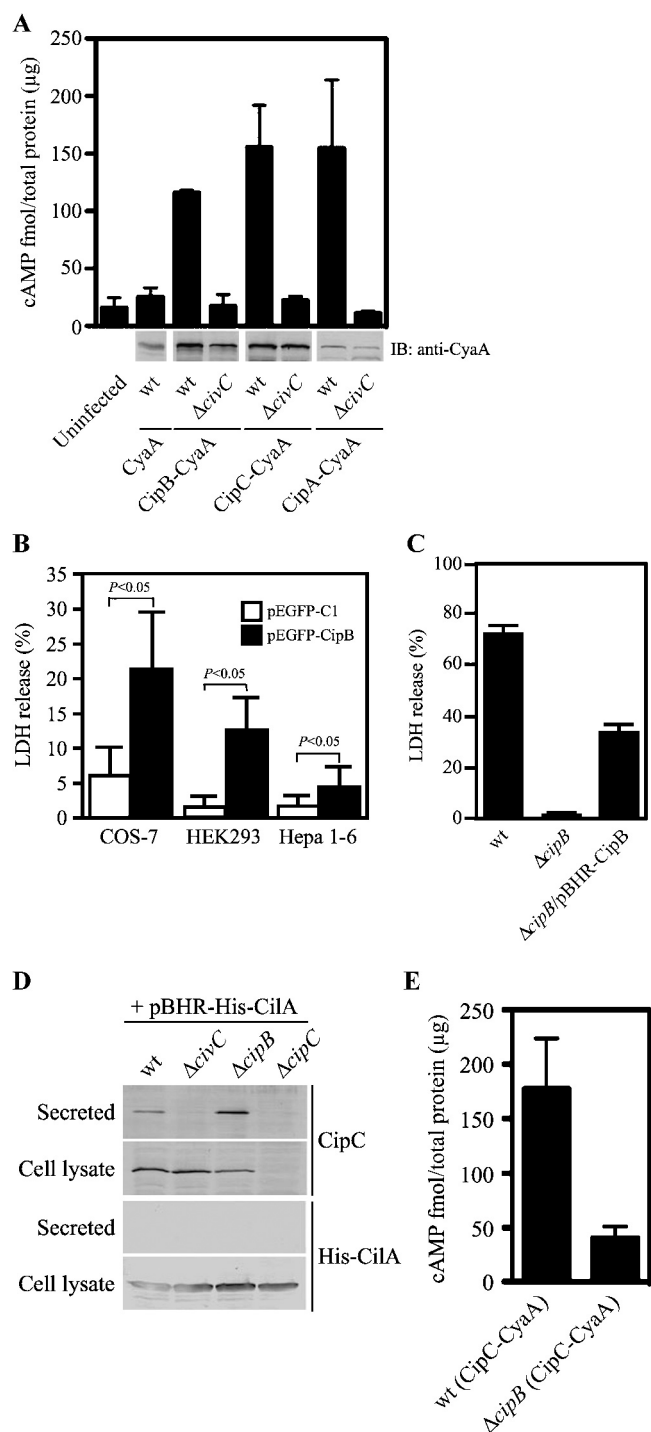


図6. 孔形成性トランスロケーターCipBタンパク質
A. cAMP ELISAによる細胞 (Hepa1-6) 内タンパク質移行試験。CipB-CyaA, CipC-CyaA および CipA-CyaA 融合タンパク質の細胞内移行量について細胞内 cAMP 量を測定することにより算出した。B. CipB 発現細胞 (COS-7, HEK293 および Hepa1-6) の細胞外 LDH 遊離活性。C. *cipB* 変異株による細胞 (Hepa1-6) 傷害活性。D. CipC トランスロケーターの *in vitro* 分泌。菌体外および菌ライセートを基質として用いて SDS-PAGE にて展開後、抗 CipC 抗体あるいは抗 His 抗体を用いたイムノブロットにより解析した。E. 野生株 (CVN) あるいは *cipB* 変異株 (Δ cipB) における CipC-CyaA 融合タンパク質の細胞内移行 (cAMP ELISA を用いた細胞内移行試験)。(Miki *et al.* (2010) Mol. Microbiol. **77**, 855–872. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

成性を調べるために、それぞれの細胞内発現株を作製し、細胞傷害活性を評価したところ、CipB 発現細胞株において細胞傷害活性が認められた (図 6B)。さらに、*cipB* 遺伝子の欠失変異株の細胞傷害活性は野生株と比較し、著しく低下した (図 6C)。これらの結果より、CipB は Cpi-1/-1a にコードされる III 型分泌装置より分泌され、宿主細胞内へ移行するエフェクター分子であることが示唆された。また、細胞内で発現した CipB は細胞傷害因子として機能することが明らかとなった。

C. violaceum の III 型分泌機構による細胞傷害活性は細胞膜上の孔形成に依存していることから、CipB による孔形成の可能性、すなわち CipB がトランスロケーターとして機能するか否かについて検討した。III 型分泌装置の欠失株では、エフェクターの菌体外分泌および宿主細胞内への移行が起こらない。一方、トランスロケーター欠失株では宿主細胞内への移行は認められないが、エフェクターは野生株と同様に、菌体外に分泌される。そこで、*cipB* 欠失変異株におけるエフェクター分子 CipC の菌体外分泌および宿主細胞内移行について調べた結果、*cipB* 欠失変異株では CipC は菌体外へ分泌されたが、宿主細胞内には移行しなかった (図 6D と 6E)。これより、CipB はトランスロケーターとして機能し、その孔形成性により *C. violaceum* の細胞傷害活性に関与していることが示唆された。

5. Cpi-1/-1a 遺伝子クラスター特異的転写因子 Cila

III 型分泌機構遺伝子の発現 (転写活性) はその遺伝子クラスター内にコードされる特異的転写因子によって、制御されている。アミノ酸配列の相同性解析より、Cpi-1/-1a および Cpi-2 内に存在し、転写因子をコードすると予想される 5 つの遺伝子 (*cilA*, *civF*, *armR*, *csrB* および *csrC*) が同定された。そこで、それぞれの欠失株を作製し、定量的リアルタイム PCR 法により Cpi 遺伝子に及ぼす影響について、野生株との比較解析をした。その結果、*cilA* 欠失株では調べた Cpi-1/-1a に存在するほぼ全ての遺伝子の発現量 (転写活性) が野生株と比較し、有意に減少した (9)。また、*civF* 欠失株では Cpi-1/-1a エフェクター CipC をコードする *cipC* 遺伝子の発現量が減少した。一方、*csrB* 欠失株では調べたほぼ全ての Cpi-2 遺伝子の発現量が有意に低下した。*armR* および *csrC* 欠失株においては、いくつかの遺伝子の発現量に変化が認められたが、野生株と比較して顕著な違いではなかった。これらより、Cila は Cpi-1/-1a の特異的転写活性因子であり、CivF は Cila の制御下において *cipC* 遺伝子を含むエフェクター/トランスロケーター領域 (オペロン) の転写活性を正に制御する転写因子として機能することが明らかとなった。一方、CsrB は Cpi-2 の転写活性因子であることが示唆された。

6. Cpi-1/-1a の III 型分泌機構エフェクターの同定

III 型分泌装置より宿主内へ移行するエフェクターの多様な作用により、その III 型分泌機構を介した感染現象を

説明できる。すなわち、III 型分泌機構に依存した感染メカニズムを明らかにするためには、まず、III 型分泌機構エフェクターを同定し、それらの機能解析を行い、個々のエフェクターの機能を繋ぎあわせることが必要である。

多くのエフェクターはIII 型分泌機構の遺伝子クラスター外にあり、染色体あるいはプラスミド上に点在している。また、それらのエフェクター遺伝子は遺伝子クラスター外にあるにも関わらず、遺伝子クラスター内の特異的転写因子によりその発現は制御されている。そこで、*C. violaceum* の感染現象をさらに分子レベルで理解するために、Cpi-1/-1a のIII 型分泌機構に特異的なエフェクターの網羅的な同定を試みた。*cilA* 欠失株 ($\Delta cilA$) およびその相補株 ($\Delta cilA$ /pBHR-His-CilA) を用いた DNA マイクロアレイにより、CilA によって発現が調節される遺伝子群を明らかにした (9)。さらに、これらの中から CilA により正に調節される遺伝子を同定し、いくつかの遺伝子については定量的 PCR によっても発現量の増加を確認した (9)。これらの遺伝子には Cpi-1/-1a にコードされる III 型分泌機構の遺伝子のほぼ全てが含まれており、本実験の妥当性が示唆された。

同定した CilA により正に調節される遺伝子の中には、酵素や機能未知のタンパク質をコードするものがあり、これらは新規エフェクター遺伝子 (候補遺伝子) である可能性が示唆された。そこで、新規の Cpi-1/-1a にコードされる III 型分泌機構エフェクターを同定するために、これらの候補遺伝子にコードされるタンパク質の宿主細胞移行性について、百日咳菌のアデニレートシクラーゼ (CyaA) をレポーターとするトランスロケーションアッセイを行った。その結果、すでにエフェクターとして同定していた

CipB, CipC および CipA を含む 16 個の新規エフェクターを同定した (表 1)。これらのうち、既知の III 型分泌機構エフェクターと相同体であるものは *Chromobacterium* outer protein (Cop) とし、既知の相同体がなく機能未知であるものは *Chromobacterium* translocated effector (Cte) と命名した。

7. CopE (*Chromobacterium* outer protein E) : RhoGTPase のアクチベーター

同定した新規エフェクターである CopE (*Chromobacterium* outer protein E) は SopE GEF ファミリーとして知られる低分子量 GTPase Rho ファミリー (RhoGTPase) のヌクレオチド交換因子 (guanine exchange factor : GEF) として機能する SopE, SopE2 および BopE の相同体である。SopE GEF ファミリーは RhoGTPase の活性化によって、アクチン骨格の再構成や宿主遺伝子の発現変化を及ぼし、それぞれの病原細菌の感染過程において重要な役割を担っている。そこで、CopE が RhoGTPase の GEF として機能するか否かを調べるために、まず、RhoGTPase の RhoA, Rac1 および Cdc42 との結合活性を検討した。MBP (maltose-binding protein)-CopE 融合タンパク質を固相化したビーズと精製した GST 融合 RhoGTPase (GST-RhoA, GST-Rac1 あるいは GST-Cdc42) を用いたプルダウンアッセイを行った結果、CopE は Rac1 および Cdc42 との結合活性を示したが、RhoA とは結合しなかった (図 7A)。宿主細胞のライセートを用いた実験においても同様な結果が得られた (9)。さらに、SopE との結合活性が報告されている RhoG との結合性を検討したが (15), CopE は RhoG と結合しないことが示唆された (9)。

次に、CopE がその GEF 活性により Rac1 および Cdc42

表 1. *C. violaceum* Cpi-1/-1a III 型分泌装置から分泌される III 型エフェクター

| ORF ID | タンパク質 | ホモログ | 細菌名 | 活性・機能 |
|--------|-------|--------|-----------------------------|---------------------|
| CV2617 | CipD | SipD | <i>S. Typhimurium</i> | トランスロケーター |
| CV2619 | CipB | SipB | <i>S. Typhimurium</i> | トランスロケーター |
| CV0974 | CopH | YopH | <i>Yersinia pestis</i> | チロシンホスファターゼ |
| CV2618 | CipC | SipC | <i>S. Typhimurium</i> | トランスロケーター |
| CV2266 | CopJ | SseJ | <i>S. Typhimurium</i> | ホスホリパーゼ A |
| CV2292 | CopD | SopD | <i>S. Typhimurium</i> | セリン / スレオニンキナーゼ |
| CV2038 | CopC | OspC1 | <i>Shigella flexneri</i> | |
| CV2616 | CipA | IpaA | <i>S. flexneri</i> | |
| CV2639 | CteA | | | |
| CV2638 | CteB | | | |
| CV1467 | CteC | | | |
| CV0296 | CopE | SopE2 | <i>S. Typhimurium</i> | Rho GTPase (GEF 活性) |
| CV2980 | CopA | HopAD1 | <i>Pseudomonas syringae</i> | |
| CV1308 | VirA | SpvC | <i>S. Typhimurium</i> | ホスホスレオニンリアーゼ |
| CV2613 | CteD | | | |
| CV4134 | CteE | | | |

Cop: *Chromobacterium* outer protein, Cte: *Chromobacterium* translocated effector (Miki et al. (2011) Mol. Microbiol. 80, 1186–1203. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾と改変)

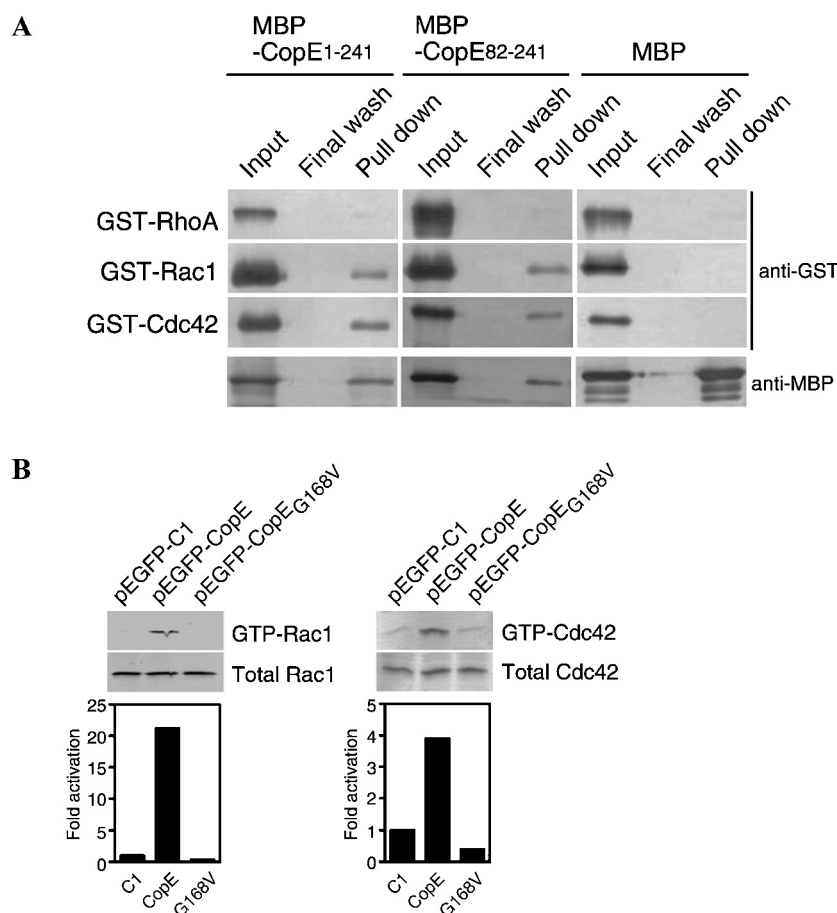


図7. CopE の Rac1 および Cdc42 に対する GEF 活性

A. CopE の Rac1 および Cdc42 に対する結合活性。精製した GST-RhoA, GST-Rac1 および GST-Cdc42 を用いたプルダウンアッセイにより CopE とそれぞれの結合活性を調べた。B. CopE の Rac1 および Cdc42 に対する GEF 活性。CopE あるいは CopEG168V 発現 HEK293 株の細胞ライセートを用いた GST-Pak-CRIB プルダウンアッセイ。GTP-Rac1 あるいは GTP-Cdc42 は抗 Rac1 抗体あるいは抗 Cdc42 抗体を用いた免疫ブロット法により定量した。(Miki *et al.* (2011) Mol. Microbiol. **80**, 1186–1203. John Wiley & Sons, Inc. より転載 許諾)

を活性化するか否かについて、p21 活性化キナーゼ (Pak) の Cdc42 および Rac1 相互結合ドメイン (CRIB : Cdc42-and Rac1-interacting binding domain) の GST 融合タンパク質 (GST-Pak-CRIB) を用いたプルダウンアッセイを用いて検討した。CopE 発現 HEK293 細胞のライセートと GST-Pak-CRIB 融合タンパク質を固相化したグルタチオンビーズを混合し、プルダウンしたものを SDS-PAGE にて展開し、抗 Rac1 および抗 Cdc42 抗体を用いた Western ブロット法により解析した結果、陰性コントロール (CopE を発現しない HEK293 細胞のライセート) と比較して、GTP 結合型 Rac1 および Cdc42 が検出されたことより、CopE による Rac1 および Cdc42 の活性化が示唆された (図 7B)。一方、GEF 活性に必要な 168 番目のグリニンシンをバリンに置換した点変異型 CopE を発現する HEK293 細胞のライセートを使用した場合、陰性コントロールと同様に、GTP 結合型は検出されず、Rac1 および Cdc42 の活性化は認められなかった (図 7B)。これらより、CopE はヌクレオチド交換因子 (GEF) として機能することにより、RhoGTPase の Rac1 および Cdc42 を活性化することが明らかとなった。

8. CopE によるアクチン再構成の誘導と *C. violaceum* 感染における CopE 依存性 Rac1 活性化

Rac1 および Cdc42 の活性化はそれぞれ、ラメリポディア (葉状仮足) およびフィロポディア (糸状仮足) を誘導する。そこで、CopE によるこれらのアクチン骨格再構成の誘導を検討した結果、EGFP-CopE 融合タンパク質の発現細胞では著しいアクチン重合が観察され、ラメリポディアおよびフィロポディアによるアクチン骨格の再構成が誘導された (図 8A)。一方、点変異型 CopEG168V 発現細胞ではアクチン骨格の再構成は認められなかった。

次に、*C. violaceum* 感染により、RhoGTPase の活性化が誘導されるか否かを検討した。マウス肝細胞株 Hepa 1-6 に *C. violaceum* 野生株 (CVN) あるいは Cpi-1/-1a 変異株 ($\Delta civC$) あるいは *copE* 欠失株 ($\Delta copE$) を感染させ、それらの細胞ライセートと GST-Pak-CRIB が固相化したグルタチオンビーズを用いたプルダウンアッセイを行い、SDS-PAGE にて展開後、抗 Rac1 抗体を用いた Western ブロット法により評価した。また、ローディングコントロールとして β -アクチンを用いた。その結果、CVN 感染細胞

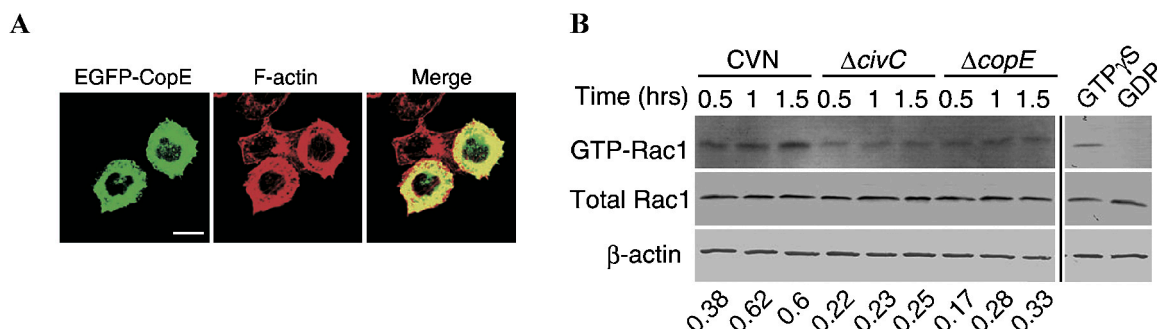


図 8. CopE によるアクチン骨格の再構成と *C. violaceum* 感染細胞における Rac1 活性化

A. CopE 発現細胞 (HeLa) における免疫蛍光染色。細胞内で発現した EGFP-CopE は緑、F-アクチンは赤、スケールバーは 50 μ m を示す。
B. *C. violaceum* 感染細胞における Rac1 活性化。野生株 CVN, $\Delta civC$ あるいは $\Delta copE$ 変異株を Hepa1-6 細胞に感染させ、その細胞ライセートを基質として SDS-PAGE にて展開した後、抗 Rac1 抗体を用いたイムノブロットにより GTP 結合型および全 Rac1 を検出した。ローディングコントロールとして、抗 β -アクチン抗体を用いて β -アクチンを検出した。下部の数値は GTP-Rac1 のバンド強度より全 Rac1 のバンド強度を除いたものであり、Rac1 活性化相対値を示している。バンド強度は ImageJ ソフトウェアにより算出した。(Miki *et al.* (2011) Mol. Microbiol. **80**, 1186–1203. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

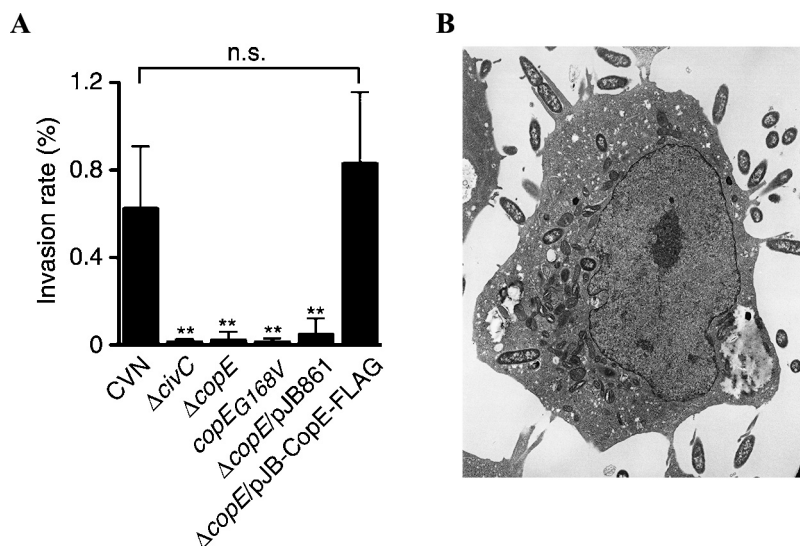


図 9. *C. violaceum* における CopE 依存性細胞侵入

A. HeLa 細胞に *C. violaceum* 野生株 (CVN), Cpi-1 変異株 ($\Delta civC$), $copE$ 変異株 ($\Delta copE$ あるいは $copEG168V$) あるいは $copE$ 相補株を感染効率 (moi) 50 で感染させ、1 時間後における細胞内侵入率 (%) を算出した。(Miki *et al.* (2011) Mol. Microbiol. **80**, 1186–1203. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾) B. HeLa 細胞に侵入した *C. violaceum* 野生株 (CVN) の電子顕微鏡写真。

では感染時間の経過と共に、GTP 結合型 Rac1 が検出され、感染 1.5 時間後の全 Rac1 における GTP 結合型の割合は 60% であった (図 8B)。一方、 $\Delta civC$ および $\Delta copE$ 感染細胞では、感染 1.5 時間後の GTP 結合型 Rac1 の割合はおよそ 20–30% であった。以上の結果より、*C. violaceum* 感染により CopE 依存的な Rac1 の活性化が誘導されることが示唆された。

9. CopE 依存性の細胞侵入

SopE GEF ファミリーである *Salmonella* 属細菌の SopE/SopE2 および *Burkholderia* 属細菌の BopE は上皮細胞のような非貪食細胞への菌の侵入を誘導することによって、それぞれの感染において重要な役割を担っている (6, 17)。そこで、CopE もまた同様な役割を担っているか否かを調べるために、まず、*C. violaceum* の細胞侵入能を検討した。

その結果、野生型 CVN 株は上皮細胞に侵入し、その細胞侵入率はおおよそ 0.6% であった (図 9A と図 9B)。一方、Cpi-1-1a 変異株 ($\Delta civC$) における細胞侵入能は CVN 株と比較して、著しく低下した (図 9A)。同様に、 $copE$ 欠失株 ($\Delta copE$) および GEF 活性変異株 ($copEG168V$) の細胞侵入能は $\Delta civC$ 株と同程度であり、CVN 株と比較し、著しく減弱していた (図 9A)。さらに、この細胞侵入能の減弱は $copE$ 遺伝子をコードするプラスミドの導入により相補された。これらより、*C. violaceum* は上皮細胞へ侵入し、これは Cpi-1-1a にコードされる III 型分泌装置より分泌される CopE エフェクターによることが示唆された。

10. *C. violaceum* の病原性発現における CopE の役割

最後に、*C. violaceum* の病原性発現における CopE の役割を明らかにするために、 $copE$ 変異株を用いたマウス感

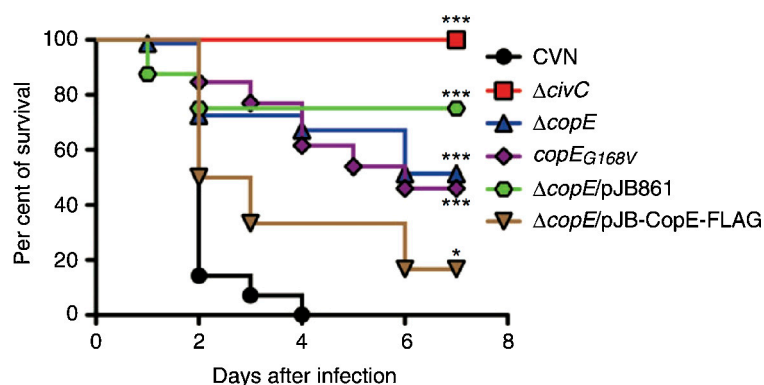


図 10. マウスに対する CopE 依存性の病原性発現

1×10^6 cfu の *C. violaceum* 野生株 (CVN), Cpi-1 変異株 ($\Delta civC$), *copE* 変異株 ($\Delta copE$ および *copEG168V*) あるいは *copE* 相補株を C57BL/6J マウスに腹腔内投与にて感染させた。感染 7 日まで毎日観察し、生死判定をして生存率 (%) を算出した。(Miki et al. (2011) Mol. Microbiol. **80**, 1186–1203. John Wiley & Sons, Inc. より転載許諾)

感染実験を行った。C57BL/6J マウスに致死量の *C. violaceum* 野生株 (CVN), Cpi-1-1a 変異株 ($\Delta civC$), *copE* 変異株 ($\Delta copE$ と *copEG168V*) あるいは、その相補株を腹腔内投与し、感染後 7 日間、感染マウスを観察し、生死判定することによって生存率 (%) を算出した。その結果、CVN 感染マウス群は感染後 4 日以内に、全て ($n=14$) が死亡した (図 10)。一方、 $\Delta civC$ 感染マウス群は感染後 7 日でも、全て ($n=14$) が生存した。*copE* 変異株 ($\Delta copE$, $n=19$ と *copEG168V*, $n=13$) 感染マウスは感染後 1 日より死亡が認められたが、感染後 7 日において、約半数のマウスは生存した (図 10)。また、*copE* 変異株における死亡遅延は *copE* 遺伝子をコードするプラスミドを導入した相補株 ($\Delta copE/pJB-CopE-FLAG$) 感染マウス群では認められず、感染後 7 日における生存率は 20% であった。これらの結果より、*C. violaceum* のマウス感染モデルにおいて、CopE はその病原性発現に必要なことが強く示唆された。

おわりに

健康人における *C. violaceum* の感染は稀であることから、病原性が決して強くない本菌がどのようにして、感染するのかは全く不明であった。本研究より、*C. violaceum* の主要な病原因子は III 型分泌機構であり、それより宿主細胞内へ注入されるエフェクターにより、本菌の病原性は規定されることが明らかになった。さらに、本研究では網羅的にエフェクターを同定したが、今後、これらのエフェクターの作用機序を解明することによって、本菌の感染メカニズムの全貌が明らかになることが期待される。

1927 年に *C. violaceum* によるヒト感染が報告されて以来、本菌による感染は熱帯・亜熱帯地方において散発的であったが、1970 年以降、本菌による感染例は非常に増え続けている (18)。本邦では 1999 年に大阪で初めて、敗血症例が報告され (7)、近年では岡山 (2014 年) において、本菌による感染例が報告された (5)。この他に、熊本 (2003 年) および島根 (2013 年) においても *C. violaceum* 感染が認められている。また、注目されるのが、2013 年に日本

で報告された同属菌の *C. haemolyticum* による敗血症である (14)。我々は本臨床分離株のゲノム解析を行っており、今後、そのゲノム情報をもとに、*C. haemolyticum* の病原性発現機序を明らかにする予定である。

C. violaceum は熱帯・亜熱帯地方の環境微生物として認識され、その生息範囲は温暖な地域に限定したものであると考えられていた。しかし、前述したように本菌による感染は高い致死率の重症感染症であり、また温暖化に伴い北上し、その感染地域の拡大が懸念される。さらに、本邦では高齢化による易感染性宿主の増加が予想されることから、*C. violaceum* および *C. haemolyticum* は、これまで以上に警戒をしなければならぬ病原菌であろう。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導を賜りました岡田信彦先生 (北里大学教授) に厚く御礼申し上げます。また、御助言と激励を賜りました檀原宏文先生 (北里大学名誉教授) に厚く御礼申し上げます。黒屋奨学賞への推薦を賜りました大西真先生 (国立感染症研究所・細菌第一部部長) に深く御礼申し上げます。本奨学賞の応募に関し、御助言を賜りました阿部章夫先生 (北里大学教授) および桑江朝臣先生 (北里大学准教授) に深く感謝申し上げます。本研究に御助言と御協力いただきました、北里大学薬学部微生物学教室の教職員、大学院生および卒業研究実習生の皆様に感謝いたします。最後に、お世話になりました全ての方に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Betts, H.J., Chaudhuri, R.R., Pallen, M.J. (2004): An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*. Trends Microbiol. **12**, 476–482.
- 2) Brazilian National Genome Project Consortium (2003): The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 11660–11665.
- 3) Fink, S.L., Cookson, B.T. (2006): Caspase-1-dependent pore

- formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* **8**, 1812–1825.
- 4) Galan, J.E., Wolf-Watz, H. (2006): Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567–573.
 - 5) Hagiya, H., Murase, T., Suzuki, M., Shibayama, K., Kokumai, Y., Watanabe, N., Maki, M., Otsuka, F. (2014): *Chromobacterium violaceum* nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit. *J. Infect. Chemother.* **20**, 139–142.
 - 6) Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., Galan, J.E. (1998): *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815–826.
 - 7) Hiraoka, N., Yoshioka, K., Inoue, K., Kawahito, Y., Kasamatsu, Y. (1999): *Chromobacterium violaceum* sepsis accompanied by bacteria-associated hemophagocytic syndrome in a Japanese man. *Arch. Intern. Med.* **159**, 1623–1624.
 - 8) Koburger, J.A., May, S.O. (1982): Isolation of *Chromobacterium* spp. from foods, soil, and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1463–1465.
 - 9) Miki, T., Akiba, K., Iguchi, M., Danbara, H., Okada, N. (2011): The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **80**, 1186–1203.
 - 10) Miki, T., Iguchi, M., Akiba, K., Hosono, M., Sobue, T., Danbara, H., Okada, N. (2010): *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. *Mol. Microbiol.* (in press)
 - 11) Miki, T., Okada, N., Danbara, H. (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**, 34631–34642.
 - 12) Miki, T., Okada, N., Shimada, Y., Danbara, H. (2004): Characterization of *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion-dependent hemolytic activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* **37**, 65–72.
 - 13) Miki, T., Shibagaki, Y., Danbara, H., Okada, N. (2009): Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **191**, 6843–6854.
 - 14) Okada, M., Inokuchi, R., Shinohara, K., Matsumoto, A., Ono, Y., Narita, M., Ishida, T., Kazuki, C., Nakajima, S., Yahagi, N. (2013): *Chromobacterium haemolyticum*-induced bacteremia in a healthy young man. *BMC Infect. Dis.* **13**, 406.
 - 15) Patel, J.C., Galan, J.E. (2006): Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J. Cell Biol.* **175**, 453–463.
 - 16) Sneath, P.H., Whelan, J.P., Bhagwan Singh, R., Edwards, D. (1953): Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. *Lancet* **265**, 276–277.
 - 17) Stevens, M.P., Friebe, A., Taylor, L.A., Wood, M.W., Brown, P.J., Hardt, W.D., Galyov, E.E. (2003): A *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity. *J. Bacteriol.* **185**, 4992–4996.
 - 18) Yang, C.H., Li, Y.H. (2011): *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. *J. Chin. Med. Assoc.* **74**, 435–441.
 - 19) Yoshida, Y., Miki, T., Ono, S., Haneda, T., Ito, M., Okada, N. (2014): Functional characterization of the type III secretion ATPase SsaN encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *PloS One* **9**, e94347.

Virulence determinant of *Chromobacterium violaceum*

Tsuyoshi MIKI¹

¹*Department of Microbiology, School of Pharmacy, Kitasato University,
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan*

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative bacterium that infects humans and animals with fatal sepsis. The infection with *C. violaceum* is rare in case of those who are healthy, but once established, *C. violaceum* causes severe disease accompanied by abscess formation in the lungs, liver and spleen. Furthermore, *C. violaceum* is resistant to a broad range of antibiotics, which in some cases renders the antimicrobial therapy for this infection difficult. Thus, the infection with *C. violaceum* displays high mortality rates unless initial proper antimicrobial therapy. In contrast, the infection mechanism had completely remained unknown. To this end, we have tried to identify virulence factors-associated with *C. violaceum* infection. Two distinct type III secretion systems (TTSSs) were thought to be one of the most important virulence factors, which are encoded by *Chromobacterium* pathogenicity island 1/1a and 2 (Cpi-1/-1a and -2) respectively. Our results have shown that Cpi-1/-1a-encoded TTSS, but not Cpi-2, is indispensable for the virulence in a mouse infection model. *C. violaceum* caused fulminant hepatitis in a Cpi-1/-1a-encoded TTSS-dependent manner. We next have identified 16 novel effectors secreted from Cpi-1/-1a-encoded TTS machinery. From these effectors, we found that CopE (*Chromobacterium* outer protein E) has similarities to a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rho GTPases. CopE acts as GEF for Rac1 and Cdc42, leading to induction of actin cytoskeletal rearrangement. Interestingly, *C. violaceum* invades cultured human epithelial cells in a CopE-dependent manner. Finally, an inactivation of CopE by disruption of *copE* gene or amino acid point mutation leading to loss of GEF activity attenuates significantly the mouse virulence of *C. violaceum*. These results suggest that Cpi-1/-1a-encoded TTSS is a major virulence determinant for *C. violaceum* infection, and that CopE contributes to the virulence in part of this pathogen.