

Salmonella 属菌における百日咳毒素様
ADP-リボシル化毒素（ArtAB）の産生機構に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

三浦 祥

目次

緒言	1
第 I 章 <i>Salmonella</i> 属菌の <i>artAB</i> をコードするプロファージに関する解析	7
1. 序文	8
2. 材料と方法	9
3. 結果	14
4. 考察	20
5. 小括	22
第 II 章 <i>Salmonella</i> 属菌における <i>artAB</i> の SOS 応答誘発物質による発現誘導	23
1. 序文	24
2. 材料と方法	25
3. 結果	30
4. 考察	36
5. 小括	41
第 III 章 <i>Salmonella</i> 属菌における <i>artAB</i> の細胞内発現	42
1. 序文	43
2. 材料と方法	44
3. 結果	49
4. 考察	58
5. 小括	63
総括	64
謝辞	68
引用文献	69
英文要旨	83

緒言

Salmonella 属菌は通性嫌気性のグラム陰性桿菌であり、腸内細菌科の一属に分類される。本菌は *Salmonella enterica* と *S. bongori* の 2 菌種に分類され、さらに *S. enterica* は 6 亜種 (*enterica*、*salamae*、*arizonae*、*diarizonae*、*houtenae*、*indica*) に分類される [10,35]。ほ乳類や鳥類の病気の原因となる菌の多くは、*S. enterica* subsp. *enterica* に属する。また、*Salmonella* は、菌体抗原 O 抗原および鞭毛抗原 H 抗原および一部の細菌がもつ Vi 抗原の違いにより、2,500 以上の血清型に分類され、血清型ごとに病原性の程度や宿主域が異なる。哺乳類、鳥類への感染症の多くは *Salmonella enterica* subsp. *enterica* に属するとされている [18]。*S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhi (*S. Typhi*)、*S. Paratyphi*、*S. Gallinarum*、*S. Pullorum*、*S. Abortusequi* といった血清型は特定の動物のみに疾患を起こすことが知られている [15,17,29,94]。

Salmonella はマクロファージ等の貪食細胞中で生存することができる細胞内寄生菌である。経口により感染した *Salmonella* は小腸粘膜上皮細胞やパイエル版の M 細胞に侵入し、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生を誘発して炎症を引き起こす [29,45]。その後、直下のマクロファージに貪食されるが、マクロファージの持つ殺菌機構をエスケープして細胞内で増殖する。ほとんどの血清型の *Salmonella* は、腸間膜リンパ節のマクロファージで増殖し、そこにとどまり腸炎を起こす。しかし、人に宿主特異性の強い血清型 Typhi (チフス菌) の場合は、増殖した菌がマクロファージに包まれたままリンパ管を経て血中に入り、肝臓や脾臓に伝搬し、さらに組織のマクロファージ内で増殖して全身感染症を引き起こす [29]。このような病原性発現に関連する遺伝子のほとんどは染色体上の *Salmonella pathogenicity islands* (SPIs) という領域に含まれる [15,17,37,45,48,62]。現在までのところ 10 種類の SPI の存在が知られているが、中でも感染初期に発現し、小腸上皮細胞への侵入、IL-8 産生誘発による炎症の惹起などの機能を発現する SPI1 および感染後数時間で発現が上昇し、マクロファージ内での生存・増殖に必須な領域 SPI2 が病原性発現に必須な領域とし

で知られる。これに加え、一部の血清型では病原性に関連した血清型特異的なプラスミドを保有する [86,93]。血清型特異的病原性プラスミド上には、マクロファージ内での増殖に関与する *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) 領域が共通に存在する [14,55]。 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) は約 94 kb の血清型特異的病原性プラスミドを保有しており、*spv* 領域以外に、線毛に関連する *pef* (plasmid-encoded fimbriae) オペロンや、補体抵抗性に関連する *rck* (resistance to complement killing) および *srgA*、*srgB*、*srgC* (*SdiA*-regulated genes) 等の因子を含んでいる [9]。

Salmonella は、食中毒や家畜のサルモネラ症の原因となる。このうち、牛のサルモネラ症は種々の血清型の *Salmonella* 属菌に起因する伝染性疾病であり、感染牛に下痢や敗血症を引き起こす。わが国において *S. Typhimurium* は牛のサルモネラ症の主な原因血清型として重要であり、北海道内においては乳用牛のサルモネラ症原因菌の約 8 割を占める [72-74]。牛のサルモネラ症は従来子牛の疾病として重要であったが、1990 年代に入ってから成牛、特に搾乳牛のサルモネラ症が顕在化した。*S. Typhimurium* には、200 種類以上のファージ型が存在する [2]。1990 年代になってから、欧米諸国において、多剤耐性の definitive phage type 104 (DT104) と呼ばれるファージ型の *S. Typhimurium* に起因した食中毒の発生が増加し、公衆衛生上の大きな問題となった [40,104,111]。この菌は 1984 年に英国において人から初めて分離され、その後 1988 年に牛からの分離が報告され、さらに豚、羊、家禽等の家畜からの分離例も急増している [6,34,89]。成牛型サルモネラ症の増加した 1992 年ごろから我が国の牛サルモネラ症においても高率に多剤耐性 DT104 が分離されていたことが明らかとなり、DT104 と成牛型サルモネラ症との関連性が指摘されている [53,98,100]。このように DT104 は、同時期に家畜や人のサルモネラ症の原因菌として我が国を含む世界中に急速に広まった。DT104 の多くはアンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、サルファ剤、テトラサイクリンの 5 剤耐性であり、その耐性遺伝子は染色体上の *Salmonella* genomic island 1 に含まれるインテグロン構造中に

存在する [104]。マウス個体や細胞を用いた実験では、DT104 が他のファージ型菌より高病原性であるという結果は得られていないが[1]、他のファージ型菌が感染した場合と比較して重症化しやすいことなどから、病原性が強いものと考えられ [39]、新たな病原性因子を獲得した菌である可能性が指摘されていた [42]。

近年、DT104 が共通に保持する遺伝子として百日咳毒素遺伝子と同一性を示す *artA* および *artB* (*artAB*) が見出された [88]。*artAB* はファージゲノムが宿主菌の染色体にインテグレートしたプロファージ上に存在しており、その産物である ArtA/ArtB (*ArtAB*) は、DT104 にマイトマイシン C (MTC) あるいは H₂O₂ を添加して培養することにより培養上清中に分泌される [108]。*ArtAB* はコレラ毒素や百日咳毒素と同様に A1B5 型の集合体構造、すなわち ADP-ribosyltransferase としての酵素活性を有する 1 個の ArtA と細胞との結合活性を持つ 5 個の ArtB から成る 6 量体で構成されている[99]。*ArtAB* はマウスへの腹腔内接種により致死活性を示し、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に対する細胞集塊形成活性、インスリンの分泌亢進活性など百日咳毒素と同様の活性を示すが、白血球増多活性が見られない等、百日咳毒素と異なる点も明らかにされている [78,99]。また、マウスのマクロファージ由来細胞 RAW264.7 細胞に対して *ArtAB* は、cAMP 合成酵素 (adenylate cyclase, AC) の活性を調節する細胞内情報伝達因子として知られる G 蛋白質のうち、AC 抑制性 Gi 蛋白質を ADP-リボシル化し、マウスのマクロファージ由来細胞 RAW264.7 細胞の cAMP 濃度を上昇させる活性を持つことが報告されている [99]。

artAB 遺伝子は少数 (11/303; 3.6%) ではあるが DT104 以外の *S. Typhimurium* にも検出される[99]。また、血清型の異なる *S. Worthington*、*S. Agoueve* および他菌種である *S. bongori* においても *ArtAB* ホモログの産生が認められ、これらの菌に由来する *ArtAB* も DT104 由来のものと類似した生物活性を示す [99]。*S. Worthington* および *S. Agoueve* 由来の *ArtA* および *ArtB* のアミノ酸配列は完全に一致しているが、*S. Typhimurium* DT104 と *S. Worthington* 間では *ArtA* で 99%、*ArtB* で 85%の同一性を示す。また、*S. bongori* では、*S. Typhimurium* DT104 の *ArtA* と 91%の同一性を示すが、

ArtB との相同性は低い (25%) [99]。一方、人のチフスの原因菌である *S. Typhi* においても百日咳毒素様蛋白をコードする遺伝子 *pltA* および *pltB* (*pltAB*) の存在が知られ、その遺伝子産物である PltA と ArtA のアミノ酸配列は 59%、PltB と ArtB 間では 73% と高い相同性を示す [14,67,69,88]。PltA は、宿主細胞の蛋白質を ADP-リボシル化するが、標的となる蛋白質の詳細は明らかとなっていない [96]。*S. Typhi* は、宿主細胞のアポトーシスの誘導や、細胞周期の阻害に関連する細胞膨化致死因子 (cytotoxic distending toxin, CDT) を産生する [68,69,95]。PltA および PltB は、CDT の一つの構成要素である CdtB と複合体を成し、CdtB を標的細胞内へ輸送する役割を果たすと考えられている [36,41,96]。*cdtB*、*pltA*、*pltB* の 3 遺伝子は、染色体上の CdtB-islet と呼ばれる領域にあり、*S. Typhi* の他に、*S. Montevideo*、*S. Javiana* 等、複数の血清型においても当該領域の存在が報告されている [66,68]。このように百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素は、現在のところその生物学的機能について不明な点が多いが、*Salmonella* 属菌における新たな病原性遺伝子として注目されている [14,15,27,28]。

細菌の DNA に放射線や化学変異原物質で損傷を与えたり、DNA 合成を停止させる処理を行なうと、細胞分裂の停止、プロファージやコリシンの産生の誘発、DNA 修復能の向上、突然変異の誘導など、一連の反応が起こる。これらを総称して SOS 応答 (SOS は細胞の緊急事態の発生を告げる信号を意味する) と呼ぶ [4,92]。腸管出血性大腸菌 (EHEC) は病原因子として志賀毒素 1 (Stx1) と志賀毒素 2 (Stx2) を産生するが、*stx1* 遺伝子と *stx2* 遺伝子は共に EHEC の染色体中に溶原化している志賀毒素転換ファージと呼ばれるプロファージ上に存在している [64,79,85]。このうち、Stx2 をコードするファージは MTC、H₂O₂、キノロン系の抗生物質などの外部環境からの刺激により宿主大腸菌の SOS 応答によって Stx2 転換ファージが溶原サイクルから溶菌サイクルに移行する [7,13,20,25,52,56,60,63,105]。このように SOS 応答を誘発する刺激により溶原ファージが溶菌サイクルに移ることを誘導とよぶ。*S. Typhimurium* DT104 における *artAB* の発現も MTC や H₂O₂ により誘導的に発現する

ことから、Stx2 と類似した発現機構が想定されるが、その詳細については不明である。

S. Typhimurium DT104 以外の *Salmonella* 菌において *artAB* 遺伝子のゲノム上の位置については明らかとなっていないが、その発現は DT104 と同様に MTC により誘導されることから、本遺伝子がプロファージ上にあることが予想される。また、動物体内における *artAB* の発現については明らかにされていないが、*S. Typhimurium* DT104 において H₂O₂ が *artAB* の発現誘導因子となることから、マクロファージや好中球に食菌された菌が、これらの細胞内において殺菌物質として働く H₂O₂ などの活性酸素種 (ROS) の暴露を受けることにより発現誘導が起こることが推測されているが、ArtAB の *in vivo* における産生は不明である [99,108]。

本研究においては、ArtAB の産生機構を解明する目的として、*artAB* ホモログを保有する *S. Typhimurium* DT104、*S. Worshington* および *S. bongori* における当該遺伝子のゲノム上の位置およびそれらをコードするプロファージの探索を実施した。また、*S. Typhimurium* DT104 における *artA* および *artB* はプロファージ上においてタンデムに位置し同一方向に転写されているが、それらの転写産物を同定し、プロファージ上における *artAB* のオペロン構造について解析した (第 I 章)。ArtAB は SOS 応答を誘導する物質の一つである MTC により誘導的に産生されるが、誘導物質として知られるキノロン系抗生物質などによる産生誘導と、それらが転写レベルでの誘導であることの検証を行った。さらに、*S. Worshington* および *S. bongori* においても *S. Typhimurium* DT104 と同様に H₂O₂ による *artAB* の発現誘導が起こるか否かについても解析した。また、EHEC の *stx* 遺伝子の発現誘導にみられるような SOS 応答によって引き起こされる溶原ファージの誘導と *Salmonella* 属菌における *artAB* の発現誘導との関連についても解析した (第 II 章)。さらに、細胞内寄生菌である *Salmonella* 属菌が保有する *artAB* のマウス由来マクロファージ様培養細胞における発現について解析を行うとともに、細胞内における ROS と *artAB* の発現誘導との関連について検討し、その発現機構について考察した (第 III 章)。

以上 *Salmonella* 属菌において新たに見出された ArtAB 毒素の産生機構を明らかにすることで、当該毒素の病原性に果たす役割を解明するための基礎知見を得ることを意図して研究を展開した。

第 I 章 *Salmonella* 属菌の *artAB* をコードするプロファージに関する解析

1. 序文

多くの病原細菌の病原因子が菌の染色体中のファージゲノム（プロファージ）上にコードされており、この遺伝子の水平伝搬により細菌は毒素産生能、抗原変換などの病原因子を獲得することが知られている。このようなファージによる遺伝子水平伝搬をファージ変換（溶原変換）と呼ぶ。代表的な例としては、ジフテリア菌のジフテリア毒素、コレラ菌のコレラ毒素、サルモネラ属菌の O 抗原変換、黄色ブドウ球菌のロイコシジン、腸管出血性大腸菌の志賀毒素、ボツリヌス毒素などがある [11,26,112,114]。本研究における百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 ArtAB 遺伝子も同様に *Salmonella Typhimurium* DT104 ゲノムにおけるプロファージにコードされていることが報告されている [88]。しかしながら *artAB* をコードするファージのゲノム構造や宿主菌染色体上の位置については不明である。また、*artAB* 遺伝子は DT104 以外の *S. Typhimurium* において少数ではあるが一定の割合で存在し、さらに同じ亜種 (*S. enterica* subsp. *enterica*) に属し、血清型が異なる *S. Worthington*、*S. Agoueve* および菌種の異なる *S. bongori* においても ArtAB ホモログの産生が認められる [99]。これらの菌に由来する ArtAB も DT104 由来のものと類似した生物活性を示すことが報告されているが、毒素をコードする遺伝子が DT104 と同様にプロファージ上に存在しているかについては不明である。

本研究においては、*artAB* の発現機構を解明するための一環として、*artAB* ホモログを保有する *S. Typhimurium* DT104、*S. Worthington* および *S. bongori* における当該遺伝子のゲノム上の位置を明らかにし、遺伝子をコードするプロファージを探索した。また、*artA* および *artB* は同一方向に転写されており、同一の転写産物に転写されポリシストロン性のオペロンを形成している可能性が考えられ、本研究においてはプロファージ上における *artAB* の転写産物に関する解析も実施した。

2. 材料と方法

1) プロファージゲノム解析

S. Typhimurium DT104 U1 株 [88,99,108]、*S. Typhimurium* SAMEA227254 株、*S. Worthington* 182 株 [99]、*S. Worthington* CFSAN051295 および *S. bongori* ATCC 43975 [99] の全ゲノムシーケンス (GeneBank Accession No. AP025265, HF937208, AP025267, CP029041, FR877557) を PHASTER (<http://phast.wisharlab.com/>) [3] を用いて解析し、各菌株におけるプロファージを探索した。各プロファージゲノムシーケンスにおける遺伝子予測および機能のアノテーションには DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>) [103] を用いた。環状ゲノムマップの作成は Artemis Software の DNAPlotter [12] を用いた。

プロファージゲノム間の相同性解析は BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [51] により実施し、DFAST と BLAST による解析結果を用いて、プロファージ間の関連性を Easyfig 2.2.5 [97] で作図した。

2) 供試プライマーおよび定量逆転写 PCR (Q-RT-PCR) に用いる検量線作成用 mRNA の合成方法

Q-RT-PCR における検量線作成用 mRNA の合成および Q-RT-PCR 反応に用いたプライマーを表 1 に示した。PCR 用のプライマーの設計は Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) [110] を用いて実施した。Q-RT-PCR は *artA*, *artB*, *artA* と *artB* の両方にまたがる遺伝子間領域を標的とした。標的とする mRNA の定量を可能にするため、T7 RNA ポリメラーゼと PCR 産物を用いて、Fey ら[22]の方法に従って各領域に対応する標準 mRNA を作成した。標準 mRNA を作製するためのプライマーは、上述の Q-RT-PCR 用の各標的 DNA に対応するプライマーセットが認識する配列の上流と下流にプライマーを配置した。*Salmonella* のゲノム DNA をテンプレートとして標的 DNA の 5' 側に T7 プロモーター配列 (TAATACGACTCACTATAGGG) を付加したセンスプライマーとアンチセンスプラ

表 1 Q-RT-PCR および検量線作成用 mRNA 合成に用いたプライマー

Target gene ^a	Primer name	Sequence (5' → 3') ^b	Product size (bp)	Accession no.
Generation of				
Standard				
<i>artA</i> (ST DT104)	STartAT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TTGACTCGAGACCTCCGGAT	601	AB104436
	STartAT7R	TGCATCATCCCTGCGTACTC		
<i>artAB</i> (ST DT104)	STartABT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AGGAGTACGCAGGGATGATG	384	AB104436
	STartABT7R	CCCTGACCTATACACGCCATA		
<i>artB</i> (ST DT104)	STartBT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCGTGTATAGGTCAGGGGATA	318	AB104436
	STartBT7R	GGCAACGTAGGTCCCATACA		
PCR primers				
<i>artA</i> (ST DT104)	STartAF1	AGTTTCTACAGCCTTCCGCC	84	AB104436
	STartAR1	CCGCATCATCACTCGCTCAA		
<i>artAB</i> (ST DT104)	STartABF1	TTATGACGCACGGGGAGTTT	225	AB104436
	STartABR1	CACTGGATAACGACGCAAGA		
<i>artB</i> (STDT104)	STartBF1	AAGAGGGGGAGTCAAGTTCC	297	AB104436
	STartBR1	ACATCCTCCCCTGTTGCATA		

^a ST DT104, *S. Typhimurium* DT104; SW, *S. Worthington*; S.b, *S. bongori*.

^b T7プロモーター配列を下線で示した。

イマーを用いて DNA 増幅用サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System9700; PE Biosystem) で PCR を実施した。PCR は TaKaRa ExTaq を用いて既報 [99] に従い実施した。テンプレートに用いたサルモネラゲノム DNA の抽出は既報[88] に従って実施した。得られた PCR 産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) を用いて精製した。その後、ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit (TOYOBO, Japan) を用いて精製した T7 プロモーター配列が付加された PCR テンプレートから *in vitro* 転写を行うことにより標準 mRNA を作製した。続いて、TURBO DNA-free Kit (Ambion, Inc., Applied Biosystem Business) を用いて 37°C で 15 分間処理により含まれるテンプレート DNA を分解後、mRNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) により精製した。Eppendorf BioPhotometer D30 (Eppendorf, Germany) を用いて精製した mRNA の濃度を測定し、Nuclease free water を加えて mRNA 量を調整後、10 倍階段希釈列を作成しこれを検量線の作成に用いた。スタンダード mRNA コピー数の計算は既報 [22] に従った。すなわち、標的 RNA の塩基数に RNA 1 塩基の分子量 (340Da) を乗じて得られた値をスタンダードの分子量とし、1 g のモル数を算出しそれにアボガドロ数 (6.02×10^{23} copies/mol) を乗じることにより 1 g あたりのコピー数を算出した。

3) MTC による発現誘導

MTC による発現誘導は既報 [108] に従い、MTC (ナカライテスク) 添加した培地で *Salmonella* Typhimurium DT104 U1 株を培養することにより *artAB* の発現を誘導した。すなわち、Syncase broth [24] で 37°C、一晩振とう培養 (150 rpm) し、この培養液 0.2 ml を 10 ml の Syncase broth に接種後、同じ条件で振とう培養を行い、3 時間後に MTC を 0.5 μ g/ml の濃度となるように加え、さらに 3 時間振とう培養を続けて発現誘導を行った。

4) Total RNA の抽出と Q-RT-PCR による遺伝子発現量の定量

Total RNA は RNeasy Protect Bacterial Kits (QIAGEN) 、および RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出精製した。3) の方法で MTC により発現誘導を行った培養液 0.5 ml に 1ml の RNA protect bacterial reagent (QIAGEN) を加え、室温で 5 分静置後、菌液を遠心分離 (5,000 g 10 分) した。遠心上清を除去した後、リゾチーム (15 mg/ml; シグマ) を含む 100 μ l の TE バッファー (30 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH8.0) と proteinase K (20 mg/ml;和光純薬) 20 μ l を加えピペッティングにより混和し、10 秒間ボルテックスミキサーで混和後 10 分間室温で TWIN MIXER TM-282 (AS ONE) を用いて混和した。その後、RNeasy Protect Bacterial Kits のプロトコールに従い溶菌液を得て、total RNA を回収した。さらに、2) で述べた方法により TURABO DNase により DNA を除去した後、total RNA 量を測定し、Nuclease free water を用いて 100 ng/ μ l になるように調整した。100 ng の RNA サンプルを ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remove (TOYOBO) を用いて逆転写した。この反応で合成した cDNA を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) と LightCycler480 System II (Roche Applied Sciences) を用いてリアルタイム PCR 法で増幅した。リアルタイム PCR では、希釈した試料 1 μ l を、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix から調製した PCR 混合液 19 μ l に加えた。各プライマーは最終濃度 300 nM の濃度で使用した。リアルタイム PCR は 95°C で 1 分間、95°C で 15 秒、60°C で 1 分間のサイクルを 50 回繰り返すことにより実施した。検量線を作成するために、2) で作成した階段希釈した検量線作成用 mRNA 標準試料を同様に処理し Q-RT-PCR を実施した。増幅後、同システムの自動解析により、Ct (threshold cycle) 値を定め、スタンダードとの比較により定量を行った。PCR 反応後に融解曲線を確認して非特異的反応が起こっていないことを確認した。

5) アガロースゲル電気泳動

PCR 産物のアガロース電気泳動は 0.5 \times TBE バッファー (89 mM Tris pH8.0、89 mM ホウ酸、2 mM EDTA) を用いて定法に従って実施した。

6) 統計解析

mRNA のコピー数の測定においては 3 回の独立した実験を行い平均値 \pm 標準誤差 (SE) を算出した。統計解析は Tukey の方法による多重比較により実施した。

3. 結果

1) *artAB* をコードするプロファージの探索

S. Typhimurium DT104 U1 株、*S. Typhimurium* DT104 SAMEA227254 株、*S. Worthington* 182 株、*S. Worthington* CFSAN051295 株および *S. bongori* ATCC 43975 株の全ゲノムシーケンスについて PHASTER を用いたプロファージの検索を実施した。この結果 *artAB* はいずれの菌株においてもプロファージ上にコードされていることが明らかとなった。*artAB* は *S. Typhimurium* DT104 U1 株および SAMEA227254 株において 45,534 bp のプロファージにコードされており (図 1)、このファージを Art-DT104 とした。両者のプロファージのシーケンスは 99%以上 (45,532/45,534) 一致していた。*S. Worthington* 182 株および CFSAN051295 株ではそれぞれ 48,506 bp および 48,507 bp のプロファージにコードされ、シーケンスの一致率は 99%以上 (48,505/48,507) であり、これらのファージを Art-SW と名付けた。*S. bongori* ATCC 43975 においては 28,770 bp のプロファージ (Art-Sb) にコードされていたが、Art-DT104 および Art-SW が complete prophage にであるのに対して、Art-Sb は incomplete prophage であることが PHASTER により判定された。

2) *artAB* をコードするプロファージゲノムの解析

3 種類のプロファージゲノムシーケンスについて DFAST を用いてアノテーションを行うと共に、ファージ間の相同性について BLAST を用いて解析した。図 2 は各ファージ中のオープンリーディングフレーム (ORF) とファージ間の相同性を図示したものである。Art-DT104 と Art-SW は全領域に渡って高い相同性 (77%) を示したが、Art-Sb は *artAB* とその下流の領域のみ相同性を示し (Art-DT104 に対して 43%)、ファージのゲノムサイズも他の二つと比較して短いものであった。Art-DT104 および Art-SW における *artAB* の上流にはアンチターミネーター Q 遺伝子と相同性を示す ORF が認められ、約 10 kb 上流にはファージの溶原化を維持する機能を有する cI レプレッサー遺伝子に相同性を示す ORF が検出された (図 3A)。一方、

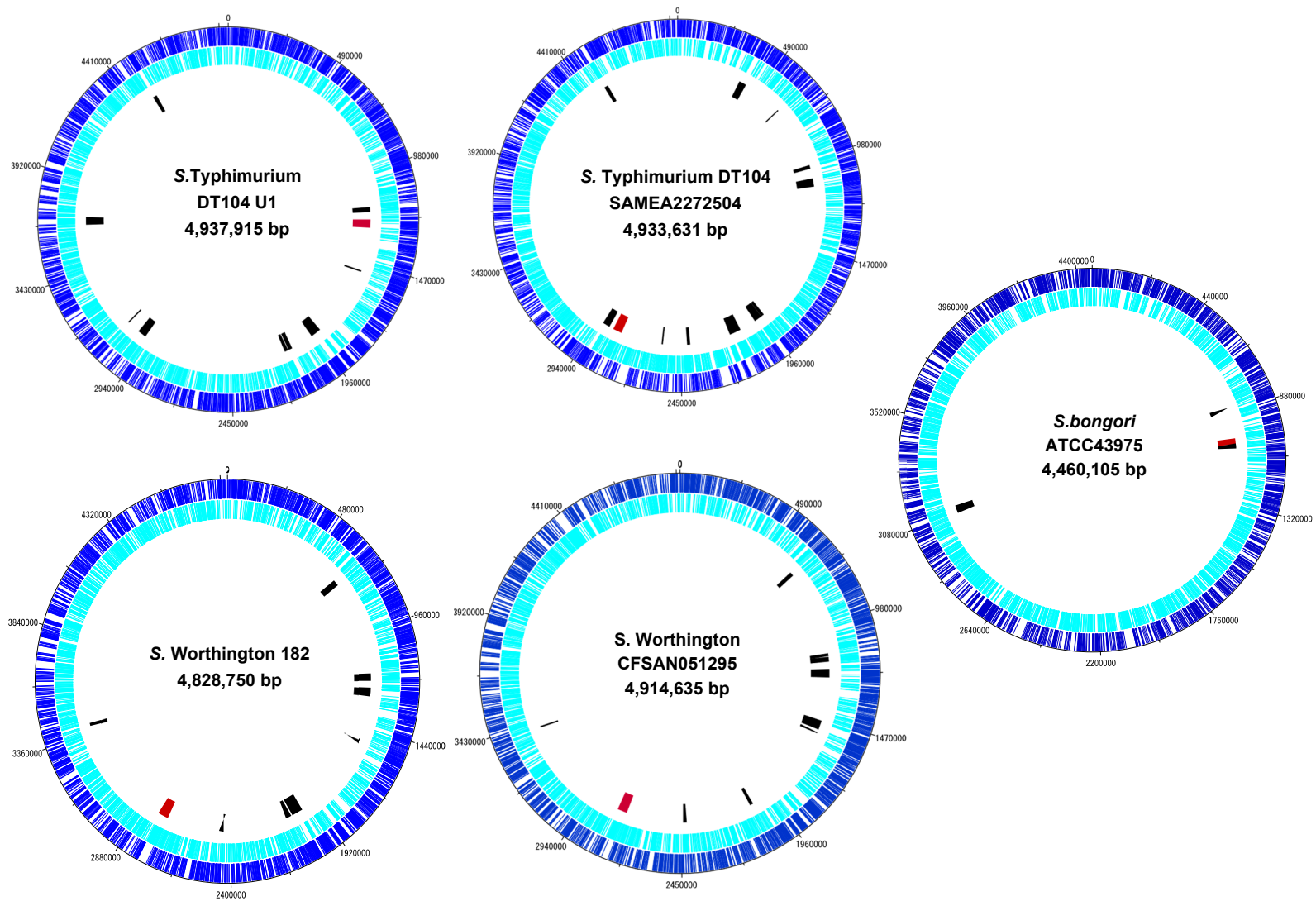


図 1. *Salmonella* の環状ゲノムマップ

外側 2 つの円は +Strand および -Strand の Coding Sequence (CDSs) を表す。外側から 3 つめの円は PHASTER [3] によるプロファージ解析の結果を示す。赤色で示したプロファージは *artAB* 遺伝子をコードするプロファージを表す。

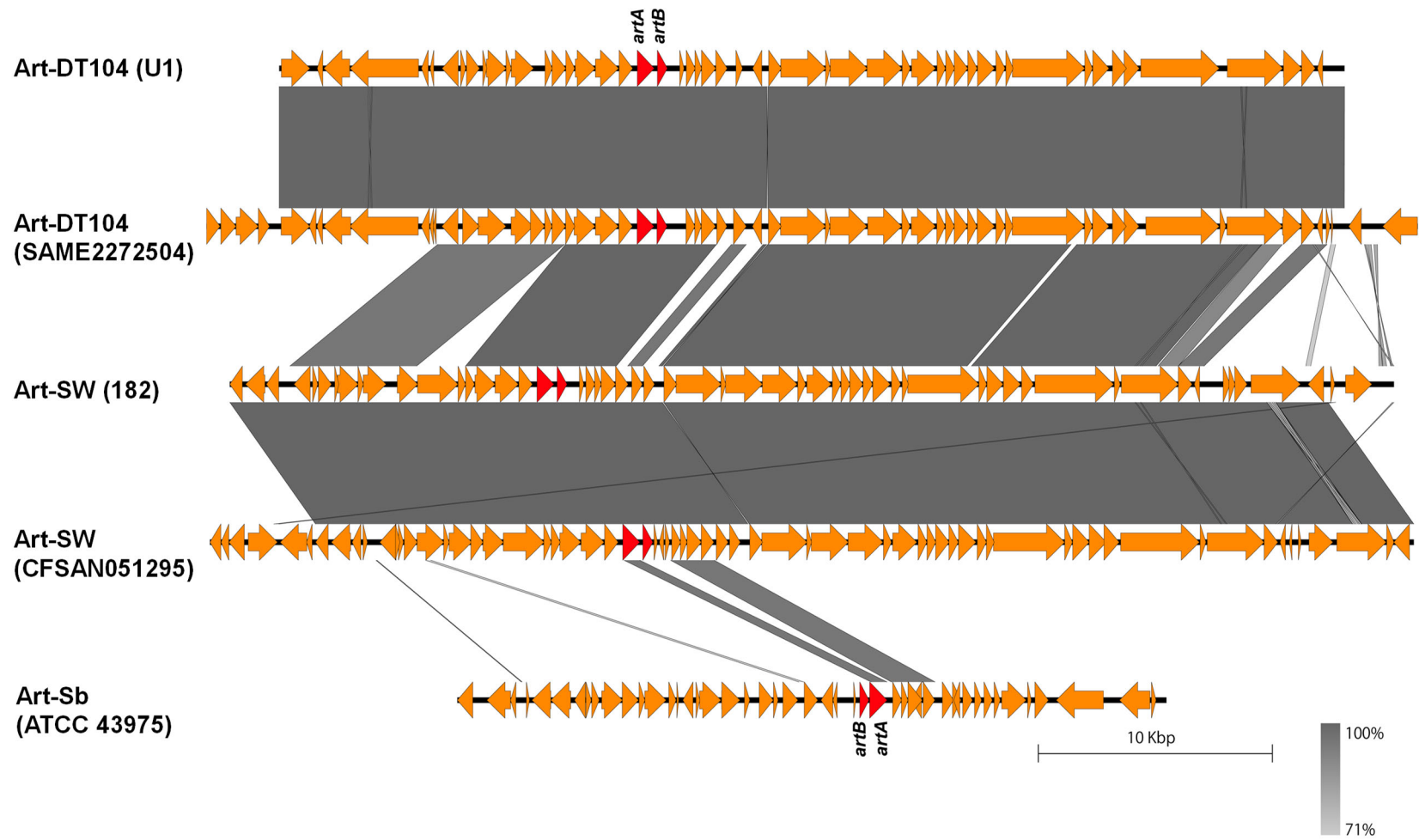


図2 *Salmonella* が保有する Art フェージ間のゲノムアライメント

赤矢印は ArtAB をコードする ORF を表す。ゲノム間のグレーの線は塩基配列の一致を示し、配列類似性が高いほど濃い線で表される。

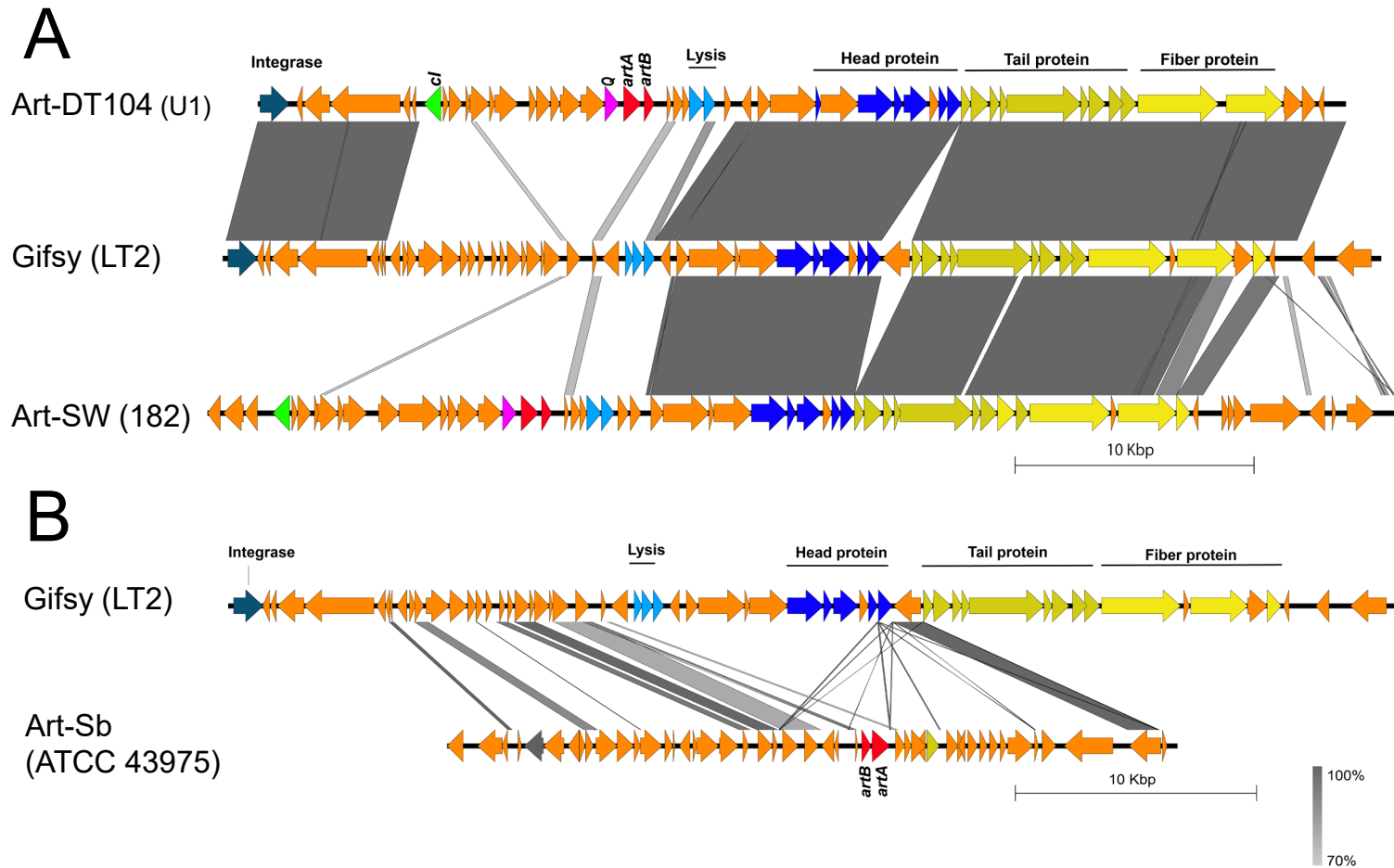


図3 Art ファージと Gifsy ファージ間のゲノムアライメント

(A) Art-DT104 および Art-SW と Gifsy-1 とのアライメント。(B) Gifsy-1 と Art-Sb のアライメント。赤矢印は ArtAB をコードする ORF; ピンクは antiterminator (Q) と同一性を示す蛋白質をコードする ORF ; 緑は cI リプレッサーと同一性を示す蛋白質をコードする ORF を示す。ゲノム間のグレーの線はゲノムに沿った同じ方向の塩基配列の一致を示し示す。配列類似性が高いほど濃い線で表される。

incomplete phage として同定された Art-Sb にはそれらの遺伝子を見出すことはできなかった。Art-DT104 および Art-SW は *Salmonella Typhimurium* LT2 株で報告されている Gifsy-1 ファージ [23,43] に類似しているが、*artAB* とその近傍の領域とはほとんど相同性を示さない (図 3A)。Art-Sb は Gifsy-1 ファージと相同性を示す領域は少なく、Art-DT104 および Art-SW とは由来が異なることが示唆される (図 3B)。

3) *artAB* の転写産物の解析

artA と *artB* が同じオペロンを構成する遺伝子であることを検証するために、*S. Typhimurium* DT104 U1 株の *artA* と *artB* の転写領域を、*artA* 内部領域、*artB* 内部領域、さらに *artA* と *artB* にまたがる領域の断片を直接増幅するプライマー・ペアを用いた PCR により転写産物から得られた cDNA について解析した。図 4A に示した *artA*、*artB* およびその両者の間の non-coding 領域を含む領域 (a、ab、b) を標的として PCR を実施した。ArtAB の産生は MTC 処理により誘導されることが報告されている。そこで *S. Typhimurium* U1 株を MTC で刺激後 3 時間後の total RNA から逆転写処理により作成した cDNA をテンプレートとして PCR を実施した。この結果、逆転写酵素処理をした場合のみ PCR 産物が検出され、*artA* と *artB* にまたがる ab 領域を標的とした場合にも PCR 産物が検出された (図 4B)。また、a、ab、b 領域の転写産物のコピー数にも有意な差は見られなかった (図 4C)。以上のことから *artA* と *artB* は同一の mRNA に転写されており、ポリシストロン性のオペロンを構成していることが示唆された。

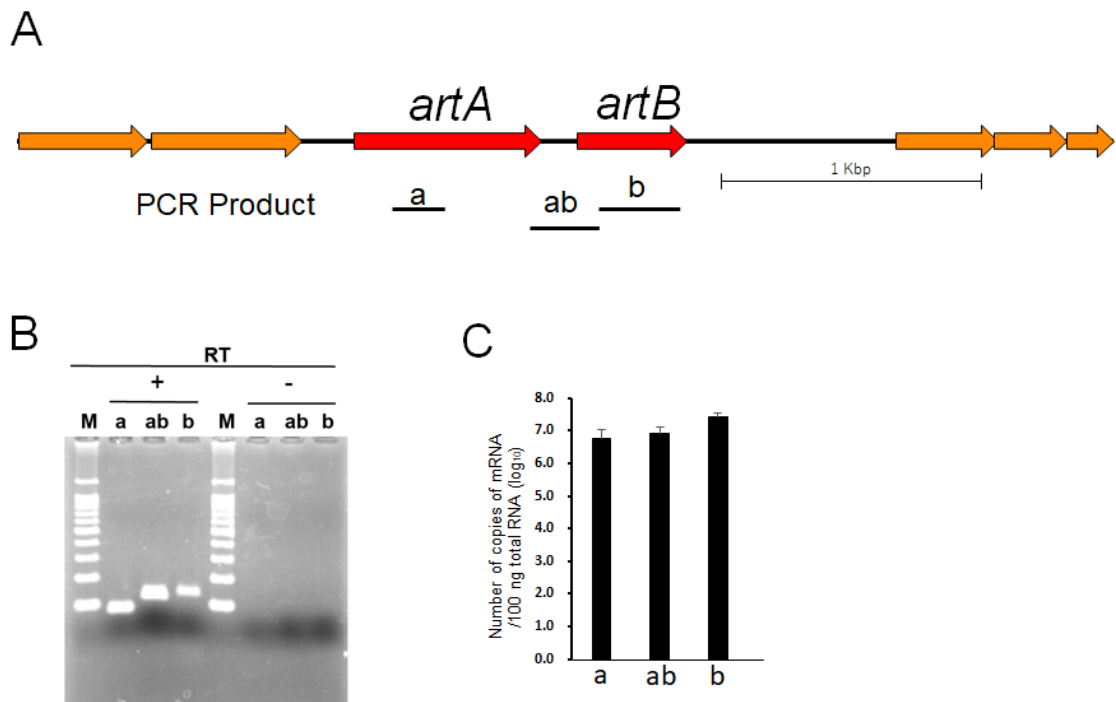


図4 *artAB* の転写産物に関する解析

(A) *artAB* 近傍のマッピング。a、ab、b は PCR の標的領域を示す。(B) PCR 産物の 2% アガロース電気泳動像。total RNA を逆転写酵素で処理 (+) したものおよび非処理 (-) のサンプルをテンプレートとして表 1 に示したプライマーを用いて増幅し、その PCR 産物を泳動した。(C) リアルタイム PCR を用いた各転写産物のコピー数の定量結果。縦軸は *S. Typhimurium* DT104 U1 株を MTC で処理した後 3 時間後の total RNA 100 ng 中における各転写産物のコピー数を示す。(n=3、mean±SE)

4. 考察

artAB 遺伝子は *S. Typhimurium* DT104 のプロファージ上にあることが報告されているが [88]、本研究において当該プロファージの菌のゲノムにおける位置を明らかにした。供試した *S. Typhimurium* U1 株には少なくとも 5 種類の intact prophage とその他に incomplete prophage 4 種類、および questionable prophage として判定された計 10 種類のプロファージが検出された。この中で、Art-DT104 は intact prophage の中の一つとして同定された。U1 株において intact prophage として同定されたものの一つは Tanaka らが報告した DT104 が共通して保持する P22-like ファージ (ST104) [102] であった。一方、*S. Worthington* 182 株においても *artAB* はプロファージ (Art-SW) 上に位置することが明らかとなり、*S. bongori* ATCC 43975 において *artAB* は incomplete prophage (Art-Sb) 上に位置していた。Art-DT104 あるいは Art-SW についてはそれぞれ由来の異なる 2 株についてのプロファージ解析を実施したが、Art-DT104 間および Art-SW 間のシーケンスは高い一致率を示し、*artAB* をコードするプロファージは DT104 間あるいは血清型 Worthington の間では極めて良く保存されているファージであった。

DNA の相同性解析から Art-DT104 (U1) と Art-SW (182) は大きさもそれぞれ 45,534 bp と 48,506 bp で近似しており、高い相同性 (77%) が見られたが、Art-Sb は 28,770 bp と 15 kb 以上小さなサイズであり、相同性のある領域は限定されていた。Art-DT104 および Art-SW の場合、いずれも *Salmonella* 属菌において報告されているプロファージ Gifty-1 [23] に相同性を示し、Gifsy-1 に *artAB* を含む領域が挿入されている構造になっていた。以上のように *artAB* はいずれの場合もプロファージ上にコードされていることが明らかになり、百日咳毒素と相同性を示す ArtAB 毒素遺伝子はコレラ毒素や大腸菌における志賀毒素をコードする遺伝子と同様にファージによる遺伝子水平伝搬により獲得されたものであることが推測された。さらに今後の研究により、同定されたプロファージが、実際に *artAB* 遺伝子を他の菌に水平伝搬することを証明する必要がある。

近年、*S. enterica* のうち 45 の異なる血清型が *artAB* 遺伝子をコードしていることが報告され [14,70]、さらには病原性大腸菌においても当該遺伝子と相同性を示す遺伝子を保有する菌の存在が報告されている [49,57]。今後これらの菌における *artAB* ホモログのゲノム上における局在と関連するプロフェージに関する解析が蓄積されることにより、当該遺伝子の由来や高病原性と考えられ、**emerging** フェージタイプとして出現した *S. Typhimurium* DT104 の起源等に関する解明が進展するものと考えられる。

PCR およびリアルタイム PCR により *artA* および *artB* は同じ転写産物に転写されていることを示す結果が得られ、両者はポリシストロン性のオペロンを構成していることが示唆された。*artAB* の上流および下流には **Antirepressor** やフェージの溶菌や頭部、尾部を合成する遺伝子などがあり (図 3A)、*artAB* と同一方向に転写されている遺伝子が下流にあることから、これらの ORF も *artAB* と共にオペロンを構成している可能性が考えられる。さらに、*artAB* の発現制御についての解明を進める上で、オペロンを構成する構造遺伝子や mRNA の転写開始点などを明らかにし、その構造を明らかにする必要がある。

5. 小括

S. Typhimurium DT104、*S. Worthington*、および *S. bongori* において百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 ArtAB の遺伝子 *artAB* は、いずれも菌の保有するプロファージ (Art-DT104、Art-SW、Art-Sb) にコードされていた。異なった菌株由来の Art-DT104 および Art-SW 間のシーケンスは 99%以上の相同性を示し、Art-DT104 と Art-SW の相同性は 77%と比較的高い相同性を示したが、Art-Sb は 2 つのプロファージに対して相同性が低く (43%)、サイズも短かく、incomplete phage として同定された。Art-DT104 および Art-SW は *Salmonella* 属菌で報告されているプロファージ Gifsy-1 に相同性を示し、Gifsy-1 に *artAB* を含む領域が挿入された構造であった。以上のことから、*artAB* はいずれの菌においてもプロファージ上にコードされており、溶原化したファージの水平伝搬により獲得されたものであることが推測された。

さらに、*artA* と *artB* はプロファージ上においてタンデムに並んで、同一方向に転写されており、同一の転写産物に転写されていることから、両者はポリシストロン性のオペロンを構成していることが示唆された。

第 II 章 *Salmonella* 属菌における *artAB* の SOS 応答誘発物質による発現誘導

1. 序文

S. Typhimurium DT104 における ArtAB 毒素の産生は MTC あるいは H₂O₂ を培地に添加して培養することにより培養上清中に分泌されることが報告されている [108]。また、*artAB* 保有菌である *S. Worthington* あるいは *S. bongori* も同様に MTC 処理により ArtAB を産生することが報告されている [99]。第 I 章において *Salmonella* 属菌の *artAB* はいずれの場合も、菌のプロファージ (Art ファージ) にコードされていることが明らかにされた。腸管出血性大腸菌 (EHEC) は病原因子として志賀毒素 1 (Stx1) と志賀毒素 2 (Stx2) を産生するが [76]、*stx1* 遺伝子と *stx2* 遺伝子は共に EHEC の染色体中に溶原化している志賀毒素転換ファージのプロファージ上に存在している [50,77,82,90,109,113,117]。このうちの Stx2 は MTC [8,52,90]、H₂O₂ [59,60]、キノロン系の抗生物質 [7,25,58,118] などの外部環境からの刺激により宿主大腸菌の RecA 蛋白を介した SOS 応答 [81] によって誘発される Stx2 転換ファージの誘導に伴って産生される。*S. Typhimurium* DT104 における *artAB* の発現も MTC や H₂O₂ により誘導的に発現することから、Stx2 と類似した発現機構が想定されるが、その詳細については不明である。また EHEC の Stx2 と同様に *Salmonella* 属菌における ArtAB がキノロン系抗生物質による産生誘導が起きるか否か、また、*S. Worthington* や *S. bongori* の ArtAB の H₂O₂ による産生誘導についても不明である。

本章においては、*Salmonella* 属菌における *artAB* の発現機構の解明を目的として、*artAB* の発現に対する各種 SOS 応答誘導物質による影響を評価するとともに、SOS 応答に関連することが知られる *recA* 遺伝子の発現動態および Art ファージの誘導に関する解析により *artAB* の発現機構の解明を試みた。

2. 材料と方法

1) 使用菌株

ArtAB 遺伝子を保有する *Salmonella* Typhimurium DT104 U1 株、*S. Worthington* 182 株、および *S. bongori* ATCC 43925 株の 3 株を実験に使用した。

2) ArtAB の産生誘導物質として使用した抗生物質と最小発育阻止濃度 (MIC) の測定方法

ArtAB の産生誘導を検証する抗生物質には、エンロフロキサシン (ERFX) (SIGMA)、ナリジクス酸 (ALDRICH)、セファゾリン (SIGMA)、トリメトプリム (SIGMA)、リファンピシン (WAKO) を用いた。生理食塩水で各種抗生物質を各濃度で 2.5 ml に調整し、シャーレ上で、ミューラーヒントンII寒天培地 22.5 ml とよく混和させて固め、マクファーランド NO. 2.5 に調整した菌液 10 μ l を塗布した。37°C、24 時間培養後に菌の発育を確認し、菌の発育が確認できなかった最小の抗生物質濃度を MIC とした (表 2)。

3) 各種物質による ArtAB の産生誘導およびウエスタンブロッティングによる ArtA の検出

菌株を Syncase broth で 37°C、120 rpm の条件で一晩振盪培養した。培養液を 20 ml の Syncase broth へ 1 : 50 の割合で加え、37°C、120 rpm で 3 時間培養した。その後試薬を添加し、さらに 16 時間培養した。使用した試薬は最終濃度 0.5 μ g/ml の MTC、1/2 発育阻止濃度 (MIC) 値量の抗生物質、3 mM H₂O₂ である。培養後、培養液 20 ml を 8,000 rpm で 30 分遠心分離し、上清を回収して孔径 0.22 μ m のポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブランフィルター (Merck Millipore) を用いてろ過を行った。濾液を Vivaspin 6 (SARTORIUS ; 膜材質 PES、分画分子量 10 K) により 1/20 量に濃縮した。得られたサンプルと等量の SDS-PAGE 試料調整用バッファー (ATTO) を等量混合し、100°C で 10 分間加熱した。15 % SDS-PAGE ゲル (コンパクトゲル; ATTO) にサ

表2 用いた抗菌剤の MIC 値

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>S. Typhimurium</i> DT104 strain U1	<i>S. Worthington</i> strain 182	<i>S. bongori</i> strain ATCC 43975
enrofloxacin	0.08	0.04	0.07
nalidixic acid	20	—	—
cefazolin	28	—	—
trimethoprim	3	—	—
rifampicin	30	—	—

サンプルを添加し、コンパクトスラブ電気泳動槽 (ATTO) を用いて 30 分間泳動した。ゲルと同じ大きさのろ紙 4 枚および PVDF メンブレン (Bio-Rad) 1 枚をブロッキングバッファー (25 mM Tris-HCl、192 mM グリシン、20% v/v メタノール) に浸して処理し、ゲルを挟み込みセミドライ式ウエスタンブロットリング装置 (Bio-Rad) を用いて定電流 2 mA/cm² で 30 分通電し、PVDF membrane (Bio-Rad) に転写した。メンブレンをブロッキングバッファー (ロシュダイアグノスティックス) で処理した後、一次抗体としてウサギ抗 ArtA 合成ペプチド (*S. Typhimurium* DT104 U1、*S. Worthington* 182、*S. bongori* ATCC 43975 由来 ArtA のアミノ酸配列において共通して存在する 14 残基 (Arg10–His23)) に対する抗体 [99] を 1% ブロッキングバッファーで 5,000 倍希釈して使用した。TBS-T (Tris Buffered Saline、5% Tween20) でメンブレンを洗浄し、二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Bio-Rad) を 100,000 倍希釈して使用した。ペルオキシダーゼ反応は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて実施し、Ez-Capture II (ATTO) と ImageSaver5 software (ATTO) を用いて化学発光を検出した。

4) Total RNA の抽出

Syncase broth を用いて 37°C で一晩振とう培養 (150 rpm) し、この培養液 0.2 ml を 10 ml の Syncase broth に接種後、同じ条件で振とう培養を行い、3 時間後に MTC (0.5 µg/ml)、抗生物質 (1/2MIC)、あるいは H₂O₂ (3 mM) を加え、さらに 3 時間振とう培養を続けた。得られた培養液 0.5 ml を用いて第 I 章に述べた方法により total RNA を抽出した。

5) Q-RT-PCR および用いたプライマー

Q-RT-PCR は第 I 章で述べた方法で *artA* および *recA* における mRNA のコピー数の定量を実施した。*recA* および *artA* の mRNA コピー数測定のための Q-RT-PCR 用のプ

プライマーおよび検量線作成用の mRNA 合成用のプライマーを表 3 に示した。

6) 定量 PCR (Q-PCR)による *artA* 遺伝子コピー数の定量

培養上清中の *artA* 遺伝子のコピー数の定量は LightCycler480 System II (ロッシュ) と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いた Q-PCR により実施した。各薬剤で 3 時間処理した後に孔径 0.22 μm のポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブランフィルター (Merck Millipore) を用いてろ過後、宿主菌由来の DNA を除去するために Turbo DNA-free kit (Ambion) を用いて、37°C で 30 分間 DNase 処理した。得られた上清を、Bonanno らの方法 [8] に従い、100°C で 10 分間加熱処理することによりファージ DNA を得た。第 I 章で用いた *artA* を標的として T7 プロモーター配列 (TAATACGACTCACTATAGGG) を付加したセンスプライマーとアンチセンスプライマーで増幅された PCR 産物を精製したものを 10 倍階段希釈し、これをリアルタイム PCR 用検量線作成用 DNA スタンダードとして用いた。PCR は GeneAmp PCR System9700 を用いて第 I 章で述べた方法で実施した。DNA 量は Eppendorf BioPhotometer D30 により測定した。DNA 1 塩基対の分子量を 660 Da とし、スタンダード DNA 1 g あたりのコピー数を算出した。リアルタイム PCR は上記 mRNA の定量と同じ条件で実施し、スタンダードとの比較によりコピー数の定量を行った。

7) 統計解析

mRNA および培養上清中の *artA* コピー数の測定においては 3 回の独立した実験を行い平均値 \pm 標準誤差 (SE) を算出した。統計解析には Student's t-test を用いた。統計学的優位性は p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

表 3 Q-RT-PCR および検量線作成用 mRNA 合成に用いたプライマー

Target gene ^a	Primer name	Sequence (5' → 3') ^b	Product size	Accession no.
Generation of Standard				
<i>artA</i> (sw)	STartAT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TTGACTCGAGACCTCCGGAT	601	LC127363
	SWartAT7R	TGCATCATCCCTGCGCACTC		
<i>artA</i> (Sb)	SbartAT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TGGACTCGAGACCTCCGGAT	605	LC127367
	SbartAR2R	TACGTGTATCATCCCTGCGC		
<i>recA</i> (ST DT104)	STrecAT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATTGTGGTCGACTCCGTAGC	603	NC_003197
	STrecAT7R	GGCGTGGCATTCTGATTACT		
<i>recA</i> (SW)	STrecAT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATTGTGGTCGACTCCGTAGC	603	CP029041
	STrecAT7R	GGCGTGGCATTCTGATTACT		
<i>recA</i> (Sb)	SbrecAT7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATTGTCGTCGACTCCGTGC	603	NC_015761
	SbrecAT7R	GGAGTAGAATCCTGATTGCT		
PCR primers				
<i>artA</i> (SW)	STartAF1	AGTTTCTACAGCCTTCCGCC	84	LC127363
	STartAR1	CCGCATCATCACTCGCTCAA		
<i>artA</i> (Sb)	SbartAF1	AGTTTCTATAGCCTTCCGCC	84	LC127367
	STartAR1	CCGCATCATCACTCGCTCAA		
<i>recA</i> (ST DT104)	STrecAF1	GGCGAAATCGGCGACTCT	123	NC_003197
	STrecAR1	CATACGGATCTGGTTGATGAAAATC		
<i>recA</i> (SW)	STrecAF1	GGCGAAATCGGCGACTCT	125	CP029041
	STrecAR1	CATACGGATCTGGTTGATGAAAATC		
<i>recA</i> (Sb)	SbrecAF1	GGCGAGATTGGCGACTCTC	123	NC_015761
	SbrecAR1	CATACGGATCTGGTTGATAAAAATC		

^a ST DT104, *S. Typhimurium* DT104; SW, *S. Worthington*; S.b, *S. bongori*.

^b Sequences corresponding to the T7 promoter are underlined.

3. 結果

1) 抗生物質、H₂O₂、MTCによる ArtAB 産生誘導

いずれの菌株も誘導物質を加えない場合、ウエスタンブロッティングによるシグナルは検出できず、ArtA の発現は認められなかった。S. Typhimurium DT104 U1 株は、キノロン系抗生物質であるナリジクス酸と ERFX、および MTC の曝露により、強いシグナルが検出され、ArtA の産生増加が確認された (図 5A, B)。一方、セファゾリン、トリメトプリム、リファンピシンでは、ArtA 産生の増加は認められなかった (図 5A)。S. Worthington 182 株と S. bongori ATCC 43975 株においても、MTC と ERFX の曝露後に培養上清中における ArtA 産生の増加が観察された (図 5B)。S. Typhimurium DT104 U1 株および S. bongori ATCC 43975 株では、H₂O₂ 曝露による ArtA 産生のわずかな増加が認められたが、S. Worthington 182 株では認められなかった。

2) ERFX、H₂O₂、MTC の artA の転写量におよぼす影響

ArtA の産生誘導を転写レベルで調べるために、ArtA の産生に影響を与える MTC、H₂O₂、ERFX を用いて、これらの物質による処理後の artA の転写量を測定した (図 6)。MTC と ERFX は、S. Typhimurium DT104 U1 株、S. Worthington 182 株、および S. bongori ATCC 43975 株において artA の転写を有意に増加させた ($p < 0.05$)。H₂O₂ は、S. Typhimurium DT104 U1 株においても artA の転写を有意に増加させたが ($p < 0.01$)、S. Worthington 182 株および S. bongori ATCC 43975 株のいずれにおいても、H₂O₂ による artA の転写量の有意な増加は認められなかった ($p = 0.40$, $p = 0.25$)。

3) Art プロファージの誘導

artAB の各物質の処理による発現誘導と溶原化しているプロファージの誘導との関連性を調べるために、刺激物質で処理後 3 時間後の培養上清中における artA 遺伝子のコピー数を調べ、ファージ粒子数を推定した (図 7)。MTC と ERFX の刺激により、

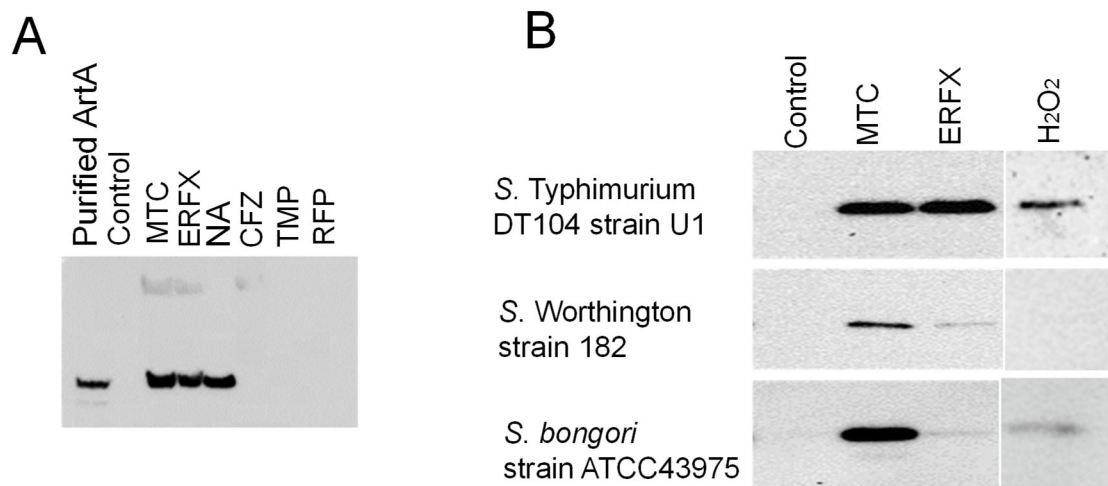


図5 各種誘導物質処理による ArtA の産生

(A) 各種抗生物質を加えて培養した *S. Typhimurium* DT104 U1 株の培養上清を濃縮し、ウサギ抗 ArtA 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりを検出した。Purified ArtA : 精製 ArtA、Control : 抗生物質非添加対照、ERFX : エンロフロキサシン、NA : ナリジクス酸、CFZ : セファゾリン、TMP : トリメトプリム。(B) *S. Typhimurium* DT104 U1 株、*S. Worthington*182 株および *S. bongori* ATCC43975 株の MTC、ERFX および H₂O₂ による ArtA の産生誘導を示す。

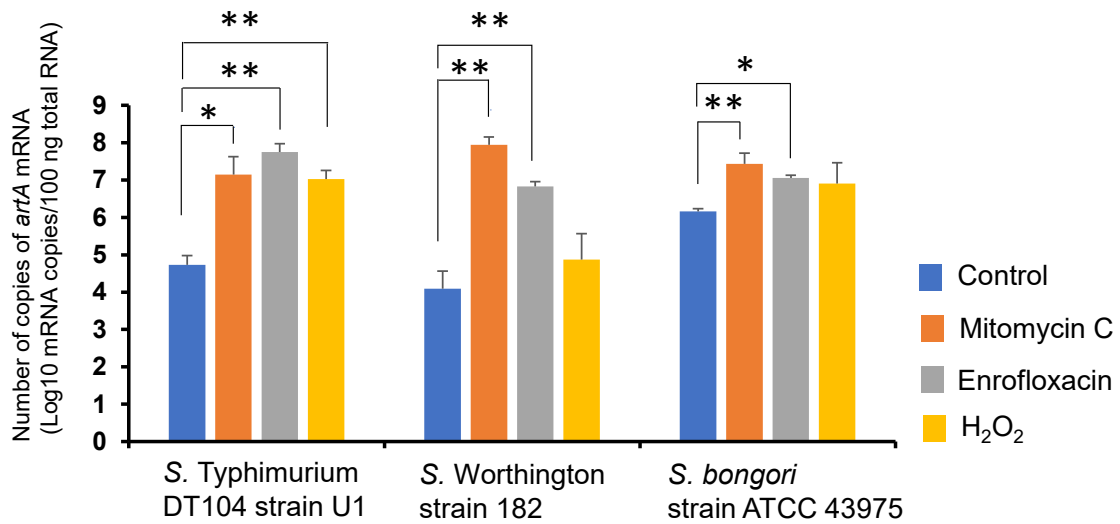


図6 *artA* の MTC、ERFX および H₂O₂ による発現誘導
 縦軸は各物質を加えた後、3時間後培養菌における total mRNA 100 ng 中の *artA* mRNA のコピー数を示す。(n=3、mean ±SE、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)

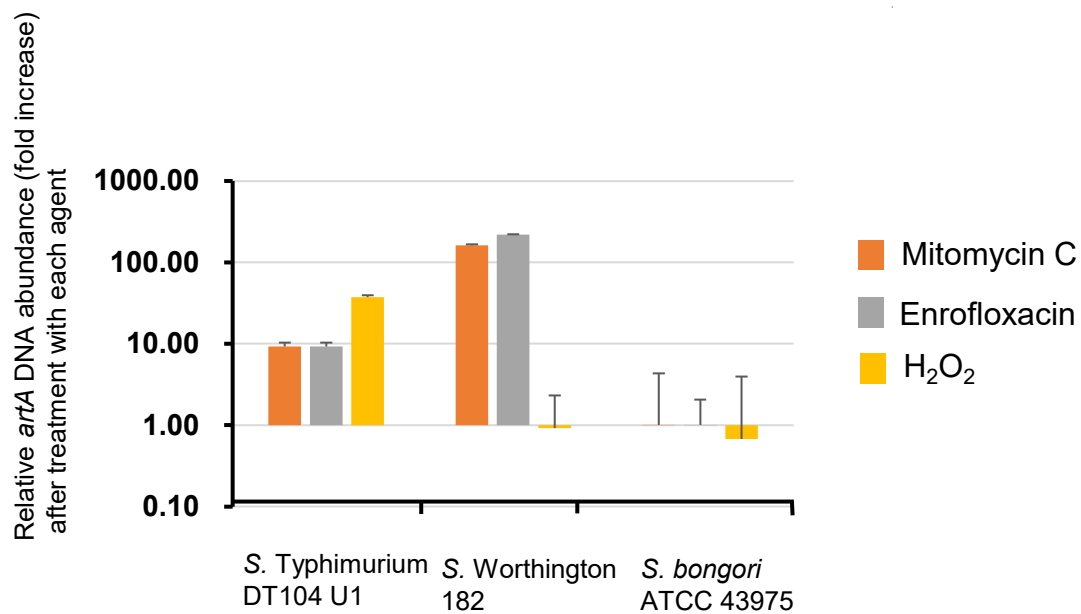


図7 MTC、ERFX、および H₂O₂ 刺激による培養上清中の *artA* 遺伝子コピー数の増加
 各試薬で処理後3時間後の培養上清1 μl 中の *artA* コピー数を測定した。グラフの縦軸の値は未刺激時のコピー数との比を示す。(n=3、mean ±SE)

S. Typhimurium DT104 U1 株と *S. Worthington* 182 株において、未刺激のコントロールに比較して有意に多くのプロファージが誘導されていた ($p < 0.05$)。 *S. Typhimurium* DT104 U1 株の H_2O_2 によるプロファージ誘導は対照と比較して 37 倍であったが、 *S. Worthington* 182 株ではプロファージ誘導は見られなかった。 *S. bongori* ATCC 43975 株ではどの物質を用いた場合においてもプロファージ数の有意な増加は認められなかった。

4) *recA* の発現に対する ERFX、 H_2O_2 、MTC の影響

S. Typhimurium DT104 U1 株および *S. Worthington* 187 株で得られた実験結果から、各種誘導物質による SOS 応答が起こり、Art プロファージを誘導し、その結果、ArtAB が高レベルで産生されることが示唆された。そこで、ERFX、 H_2O_2 、MTC の刺激による *recA* の発現動態について Q-RT-PCR を用いて解析した (図 8)。MTC と ERFX 処理では、ファージ誘導を示さなかった *S. bongori* ATCC 43975 株を含む 3 株すべてにおいて *recA* の発現を有意に増加させた ($p < 0.05$)。 *S. Typhimurium* U1 株および *S. bongori* ATCC 4375 株においては H_2O_2 刺激により *recA* の転写量の増加がみられ、 *S. Worthington* 182 株では減少していた。いずれの場合も *recA* 発現の有意な上昇は認められなかった。

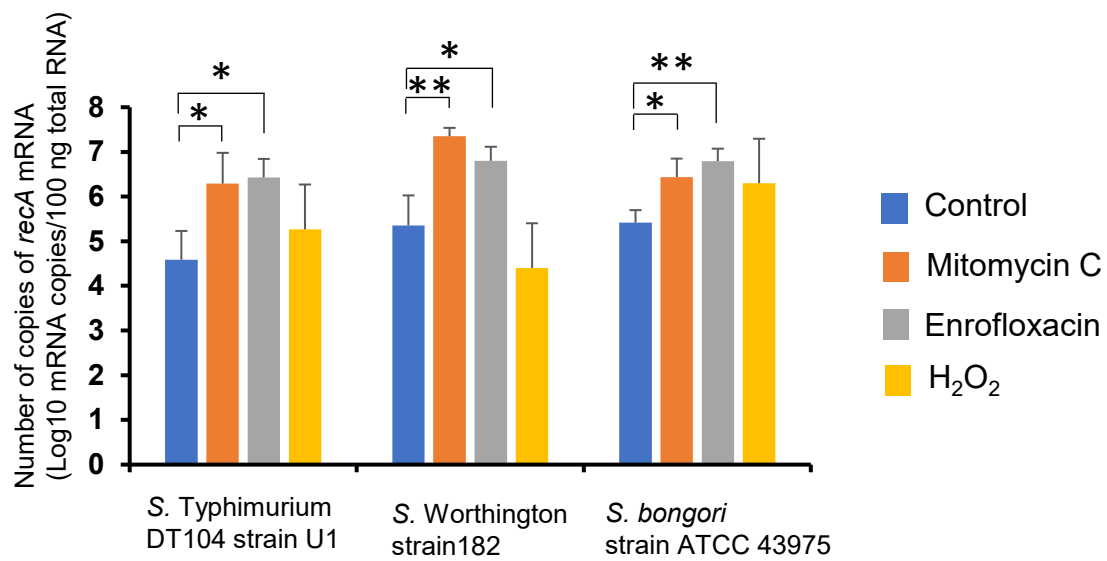


図 8 MTC、ERFX および H₂O₂ 刺激による *recA* の発現誘導

縦軸は各物質で処理後 3 時間培養後における total RNA 100 ng 中の *recA* mRNA のコピー数を示す。(n=3、mean ±SE、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)

4. 考察

本研究において、オールドキノロン系抗生物質ナリジクス酸あるいはニューキノロン系抗生物質 ERFX を 1/2MIC の濃度で処理した *S. Typhimurium* DT104 株 U1 において *ArtA* の産生が増加することを明らかにした。他の抗生物質による処理では誘導的産生は見られなかった。ERFX および MTC は *S. Typhimurium* DT104、*S. Worthington*、*S. bongori* のすべての菌株において、*artA* 遺伝子の転写量が増加した。第 I 章において得られた結果から、*artA* と *artB* は同じ転写産物に転写されており、両者はポリシストロン性のオペロンを形成していることが示唆されている。従って、キノロン系抗生物質は、大腸菌の志賀毒素遺伝子 (*stx*) において報告されているように [63,118]、*artAB* の発現を転写レベルで誘導することが明らかとなった。

第 I 章の結果から *S. Typhimurium* DT104、*S. Worthington* および *S. bongori* の *artAB* は、いずれもプロファージによりコードされていることが明らかとなり、このうち Art-Sb は不完全なプロファージであることが示された。現時点では Art ファージが溶菌を示す指示菌が見いだされていないため、本研究においては溶原ファージの誘導を培養上清中の *artA* 遺伝子のコピー数を測定することにより解析した。MTC や ERFX で処理した *S. Typhimurium* DT104 および *S. Worthington* の培養上清中における *artA* コピー数は有意に増加したことから、*artAB* をコードする Art-DT104 および Art-SW は SOS 応答誘発物質として知られる両物質によって誘導されたものと考えられる。

腸管出血性大腸菌 (EHEC) のゲノムに Shiga toxin 転換ファージが溶原化している状態では、その溶原化を維持するために *cI* リプレッサー遺伝子が転写され、その遺伝子産物である *cI* リプレッサー蛋白質が P_L プロモーターの上流域に結合してアンチターミネーターNの発現を押さえている (図 9B)。さらに *cI* リプレッサーは *cI* リプレッサー遺伝子 (*cI*) とアンチリプレッサー遺伝子 (*cro*) 間にあるオペレーター領域に結合し、*cI* の発現を活性化し、*cro* の発現を抑制することにより溶原化を維持している。しかしながら、宿主の SOS 応答が動き出すと RecA 蛋白質が活性化され、

それによって *cI* リプレッサーが分解され、宿主は溶菌過程に入っていく [13,54,107,113]。 *cI* リプレッサーが結合領域に結合できないことにより、 *cI* の転写が減少する。それにより *cro* の転写が増加し、初期アンチターミネーター *N* の転写がはじまり、 *N* 蛋白により後期アンチターミネーター *Q* 遺伝子が転写される。この結果、その遺伝子産物である *Q* 蛋白質の働きにより *Q* 遺伝子下流に位置するプロモーター (*P_R*) からの転写は下流のターミネーターでは転写が終結せずに *Shiga toxin* 遺伝子と溶菌遺伝子、頭部、尾部遺伝子を含むファージ構造遺伝子が転写され、ファージ粒子が形成される (図 9 B)。ファージゲノムは環状 DNA として劇的に増幅され、多数のファージ粒子が放出されると同時に *Stx* が放出される [71,91]。

Art ファージと *Shiga toxin* 転換ファージは相同性を示さないが、図 9 A に示すように、 *S. Typhimurium* DT104 U1 株の *artAB* は、プロファージ内では *Shiga toxin* 転換ファージにおける *stx2* と同様に、 *Q* 遺伝子と溶菌に関与する遺伝子との間に位置し、 *artAB* は *Q* 遺伝子と同一方向に転写されている。さらに、下流に位置する溶菌や頭部、尾部遺伝子も *artAB* と同一方向に転写されており、これらは共にオペロンを構成している可能性が考えられる。また、 *Q* 遺伝子上流には *cI* およびアンチリプレッサー *cro* に相同性を示す遺伝子があり、 *Shiga toxin* 転換ファージにおける遺伝子の配置と極めて良く類似している。さらに、本研究においては *MTC* および *ERFX* はすべての菌株で *recA* の転写を増加させた。このような *SOS* 反応誘導物質による *recA* の発現上昇は *Stx* 産生大腸菌でも報告されている [16,20,21]。したがって、 *Salmonella* 属菌の *ArtAB* 産生増加は、大腸菌の *Stx* 産生と同じメカニズムで、 *recA* の発現誘導を含む *SOS* 応答により、 *Art* プロファージが誘導され、それに伴って *artAB* の転写が増加することによるものである可能性が考えられた。一方、 *S. bongori* ATCC 43975 株の *artAB* は不完全なファージ上に位置しているため、 *SOS* 応答があってもファージの誘導が起こらなかったことが考えられる。しかし、 *ERFX* や *MTC* で処理した *S. bongori* ATCC 43975 株では *recA* および *artAB* の転写が増加していたことから、 *SOS* 応答に続く *artAB* の転写誘導が起こっていることも示された。

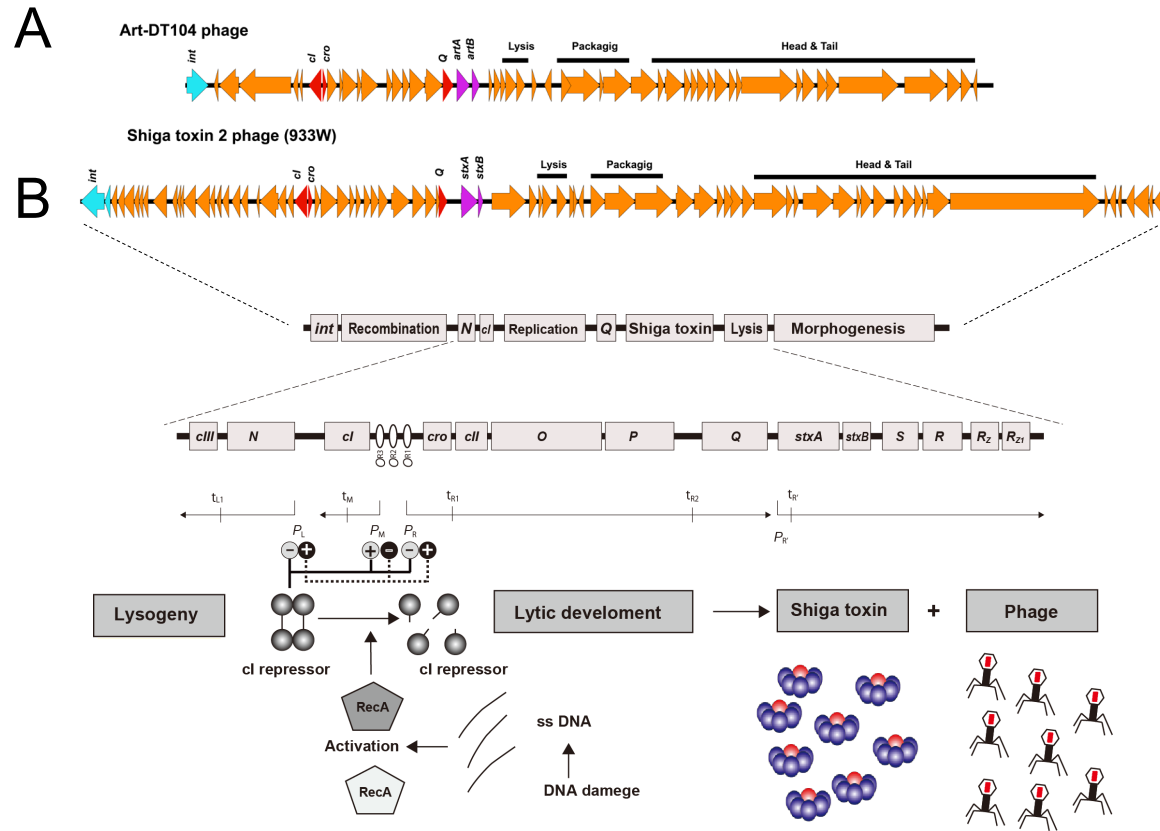


図9 Art-DT104 と shiga toxin 転換ファージのゲノムマップ

(A) Art-DT104 ファージのゲノムマップ。(B) Shiga toxin2 転換ファージ (*E. coli* O157 H7 由来 933W ; no.AF125520) [82]のゲノムマップ。2 段目のマップはファージゲノム中の機能領域を表す。3 段目はファージの溶原化および溶菌を制御する制御、DNA 複製、志賀毒素、および溶菌酵素遺伝子領域を拡大したマップを表す。4 段目は主な転写産物を図示している。矢印は転写方向を表し、プロモーターの位置 (P_L 、 P_R 、 P_M) を示した。ターミネーター (t) を縦の線で示した。*cI* リプレッサーがオペレーター (Q_{R1} 、 Q_{R2} 、 Q_{R3}) 及び *N* 遺伝子上流に結合し、 P_L および P_R プロモーター活性を抑制し、 P_M プロモーター活性を刺激する。DNA にダメージを受けると、一本鎖 DNA が生じてこれを *RecA* が認識し、活性化した *RecA* が *cI* リプレッサーを消化分解する。 P_L および P_R プロモーター活性の抑制が解除され、 P_M プロモーターを活性化しなくなる。その結果 P_L および P_R プロモーターからの転写が増加し、志賀毒素遺伝子、溶菌遺伝子、頭部、尾部遺伝子が発現する。図 B は文献 [56] を一部改変して作成した。

H₂O₂ 処理により *S. Typhimurium* DT104 の ArtAB の産生が増加することはすでに報告されている[108]。本研究では、3 mM の H₂O₂ の処理により、供試した *artAB* を保有する *Salmonella* 菌株全てにおいて *artA* の転写の増加が確認され、*S. Typhimurium* DT104 U1 株では有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。また、この条件では、*S. Typhimurium* DT104 U1 株でプロファージの誘導が認められたが、*S. Worthington* 182 と *S. bongori* ATCC 43975 の両者では見られなかった。さらに、*S. Typhimurium* DT104 U1 株および *S. bongori* ATCC 43975 株においては H₂O₂ による *recA* の転写の増加傾向が認められた。志賀毒素産生大腸菌でも、H₂O₂ 処理による Shiga toxin 転換ファージの誘導が報告されているが、その効率は MTC 処理によるものに比べて著しく低い [56,60]。H₂O₂ で処理した大腸菌では、MTC で処理した場合と比較して、ごく一部の細胞においてのみプロファージの誘導とそれに続く溶菌が起こる[59,61]。OxyR 変異体ではプロファージの誘導が著しく促進されることから、H₂O₂ などの酸化ストレスの主要な制御因子として働く転写因子 OxyR タンパク質が、このプロファージ誘導効率の低さに関与していることが示唆されている [33]。さらに、H₂O₂ で処理した *E. coli* O157:H7 と異なる血清型菌では、*stx2* 遺伝子の発現パターンが異なり、O157:H7 では発現量が増加するが、O104:H4 では増加しない [65]。本研究においても大腸菌における Stx2 の発現と同様に H₂O₂ による *artAB* の発現誘導は菌株によって著しく異なっていた。*Salmonella* 菌株間における MTC、抗生物質、H₂O₂ などの SOS 応答誘発物質による *artAB* の発現の違いは、これらの物質の SOS 応答誘発の作用機序の違いや、各菌株における *artAB* の発現誘導を抑制する何らかの要因が反映してものと考えられた。

本研究では、現在獣医療域および医療領域で一般的に使われているキノロン系抗生物質が、サルモネラ属菌における ArtAB の産生を誘導することを見出した。志賀毒素産生菌である腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症の治療における抗生物質の使用に関しては、殺菌時に志賀毒素が放出され、重症例特有の症状である溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発生を助長する可能性があるとの報告もあるが [115]、必ずしもコン

センサスを得られていない [47,80]。現在のところ、*Salmonella* による人や家畜の感染症において、抗生物質投与により重症化したとする症例報告は見あたらないが、今後、ArtAB の病原因子としての機能についてさらに解明を進めるとともに、本菌感染症に対する抗生物質の使用により ArtAB の産生が誘導されるリスクについても考慮し、その発現機構についての詳細や、低濃度のキノロン系抗生物質の菌の病原性におよぼす影響等についても実験的に明らかにする必要がある。

また、抗生物質が志賀毒素転換ファージを誘導することから、抗生物質の使用によりファージが急速に広まり EHEC のような志賀毒素産生菌が増えたとの仮説も提唱されており [106]、同様に *S. Typhimurium* DT104 が 1980 年代に新たに出現したことを考えると、キノロン系抗生物質の使用と Art ファージの拡散および本菌の出現との関連性が注目される。

5. 小括

Salmonella 属菌における ArtAB 毒素産生増加は MTC のみならずキノロン系抗生物質によっても起こり、*artAB* 遺伝子の転写レベルの増加であることを明らかとした。一方、H₂O₂によっても *S. Typhimurium* DT104 における *artAB* 転写レベルの増加がみられたが、*S. Worthington* においては H₂O₂ による発現誘導が認められず、*S. bongori* では培養上清中にわずかな ArtA が誘導的に産生され、転写レベルの上昇も検出されたが、有意な上昇ではなかった。これらのことから、H₂O₂ による *artAB* 発現誘導のレベルは菌種や血清型により異なることが明らかとなった。

MTC、ERFX および H₂O₂ 処理により *S. Typhimurium* DT104 の *recA* の発現上昇が認められ、培養上清中における *artA* のコピー数が増加したことから、これらの SOS 応答誘発物質がプロファージとしてゲノム中にある Art ファージを誘導し、これに伴って *artAB* の発現増加が起こることが示唆される。*S. Worthington* では MTC および ERFX 処理により *recA* の発現上昇とファージの誘導が認められたが、H₂O₂ 処理では認められなかった。さらに、*S. bongori* においては、SOS 反応誘発物質処理により *recA* の発現増加が起きるものの、ファージの誘導は認められない。*S. bongori* の場合 *artAB* は incomplete phage にコードされているため、SOS 応答があってもファージの誘導が起こらなかったものと推察された。

第 III 章 *Salmonella* 属菌における *artAB* の細胞内発現

1. 序文

第Ⅱ章において *Salmonella* 属菌の百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 ArtAB は、MTC やキノロン系抗生物質で菌を処理することにより産生されることを明らかにした。さらに *S. Typhimurium* DT104 においては H₂O₂によっても ArtAB の産生が増加し、それらは *artAB* の転写レベルの増加に起因することも証明された。*artAB* の発現はこれらの物質による DNA 損傷や DNA 合成停止で活性化される RecA を介した SOS 応答により引き起こされ、それによりプロフェージ誘導が伴う。*Salmonella* は細胞内寄生菌でありマクロファージ内の SCV (*Salmonella*-containing vacuole)と呼ばれる小胞に包まれて存在して増殖していることが知られている[17,44]。動物体内における *artAB* の発現については明らかにされていないが、DT104 において H₂O₂ が *artAB* の発現誘導因子となることから、マクロファージや好中球に貪食された菌が、これらの細胞内において殺菌物質である H₂O₂などの活性酸素種 (ROS) の曝露を受けることにより動物体内における発現誘導が起こることが推測される。また、H₂O₂などの活性酸素により細菌の OxyR と呼ばれる蛋白質が産生され、酸化ストレスに対応するための遺伝子発現を惹起することが知られている。OxyR はλフェージなどのプロフェージ誘導を抑制していることも報告されており[33]、これが *artAB* の発現に影響を与える可能性も考えられる。

そこで本研究においては、*artAB* の *in vivo* での発現を調べるため、DT104 をマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に貪食させ、細胞内での *artAB* 発現量を Q-RT-PCR 法により解析した。さらに、その発現機構を解明する目的で *recA* および *oxyR* の発現動態についても解析した。また、*artAB* の発現量と H₂O₂などの ROS との関連を検討するため、ジアシルグリセロール類似物質でプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し RAW264.7 細胞の ROS 産生能を増強することが知られている Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [32,101]を用いた実験や、蛍光抗体法による ArtAB の細胞内発現の観察も試みた。

2. 材料と方法

1) 菌株

artAB 保有菌として第II章で用いた *S. Typhimurium* U1 DT104、*S. Worthington* 182、*S. bongori* ATCC43975 の3株に加えて牛由来 *S. Typhimurium* 129 DT104 (*artAB*+)、*S. Typhimurium* 219 (*artAB*+)、*S. Typhimurium* KS10 (*artAB*-) [99] を用いた。

2) 細胞株

細胞内における *Salmonella* の *artAB* の発現を調べるために、細胞株としてマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞 (ATCC TIB-71) を用いた。

3) 菌の培養およびオプソニン化

Salmonella 菌株を Syncase broth を用いて、37°C 一夜振とう培養 (125 rpm) した。この培養液を 10,000 rpm、5 分間遠心した。遠心上清を除去後、10% 正常マウス血清 (富士フィルム和光純薬) 加 10% ウシ胎子血清 (Biosera) 添加 DMEM 培地 (ナカライテスク) 中で 37°C、5% CO₂、25 分間静置しオプソニン化を実施した。

4) 細胞への感染実験

RAW264.7 細胞を 100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (富士フィルム和光純薬) を含む 10% ウシ胎子血清添加 DMEM 培地で 37°C、5% CO₂、72 時間培養した。培養から 48 時間および 72 時間で培地を交換した。培養後、細胞を 24 ウェルプレートに 5 × 10⁵ cell/well で播種し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄後、培地をペニシリン/ストレプトマイシン非添加 10% ウシ胎子血清添加 DMEM 培地に交換して 18 時間培養した。0.2 µM の Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 富士フィルム和光純薬) を培地に添加する場合、菌を感染させる前に PMA を加え 1 時間インキュベートした。その後、オプソニン化済みの *S. Typhimurium* U1 DT104 を多重感染度 (MOI) 50 となるように加え、37°C、5% CO₂、1 時間インキュベートした。

PBS で 3 回洗浄後、100 µg/mL ゲンタマイシン硫酸塩（ナカライテスク）加 10%ウシ胎子血清添加 DMEM（ペニシリン/ストレプトマイシン非添加）で 37°C、5%CO₂、1 時間インキュベートして細胞外の菌を殺菌した。PBS で 3 回洗浄後、20 µg/ml ゲンタマイシン硫酸塩溶液加 10%ウシ胎子血清添加 DMEM で 37°C、5%CO₂ 下でそれぞれの感染時間（0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間）インキュベートした。

5) Total RNA の分離

感染細胞をインキュベート後、PBS で 3 回洗浄し、0.1% TritonX 加 PBS を加え、細胞を溶解した。そこへ RNA Protect Bacteria Reagent を 0.1% TritonX 加 PBS の 2 倍量加えた。軽く振とうして細胞が剥がれたらそれを回収し、5 分静置した後、遠心分離（12,000 rpm、10 分）し、遠心上清を除去した。Total RNA は RNeasy Mini Kit を用いて第 I 章で述べた方法と同様の方法で分離精製した。すなわち、リゾチーム（15 mg/ml）を含む 90 µl の TE バッファー（30 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0）と QIAGEN proteinase K を 10 µl 加えピペッティングにより混和し、10 秒間静置した。RNeasy Mini Kit の説明書に従い total RNA を回収した。Total RNA 中の DNA を除くため TURBO DNA-free Kit を用いて、キットの説明書に従って DNase 処理を実施した。

6) Q-RT-PCR による遺伝子発現の測定および用いたプライマー

Total RNA を用いた逆転写反応は第 I 章で述べた方法で実施した。Q-RT-PCR は LightCycler480 System II（Roche Diagnostics）と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR で実施したが、本章における実験では PCR による増幅後、同システムの自動解析により、Ct（threshold cycle）値を定め、16S rRNA 遺伝子の Ct 値を用いて標準化し、各遺伝子の転写量を解析する相対定量法 [84]により実施した。*artA* および *recA* については第 I 章および第 II 章に

記載したプライマーを用いて Q-RT-PCR を実施した。oxyR および cI の転写量を調べるために用いたプライマーを表 4 に示した。

7) Dihydrorhodamine (DHR)123 アッセイ

DHR 123 を用いて既報 [30,46] に従い細胞内における ROS の産生量を比較した。RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 cell/well で播種し、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含む 10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地で 37°C、5%CO₂で一晩培養した。培養後、0.2 μM の PMA を添加し、37°C、1 時間インキュベートした。続いて、PBS で 3 回洗浄し、10 μM の DHR-123 (AAT Bioquest, Inc) を 100 μl 加え、37°C、1 時間インキュベートした。その後、PBS で 3 回洗浄し、100 μL の PBS を加え、それぞれのウェル毎にプレートリーダー (VICTOR Nivo) を使用して蛍光強度を測定した。励起および蛍光フィルターはそれぞれ 480 nm、530 nm を使用した。

8) 統計解析

Q-RT-PCR による遺伝子発現量の測定及び DHR 123 アッセイは、それぞれ独立した実験を行い平均値±標準誤差 (SE) を算出した。統計解析には Student's t-test および一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Tukey-test を用いた。統計学的優位性は p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

9) 蛍光免疫染色法

蛍光免疫染色法は、8 ウェルスライド (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。RAW264.7 細胞への感染は、4) の感染実験で記載した方法で、MOI は 10 で実施した。感染後、PBS で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (WAKO)をウェルに加え室温にて 20 分間インキュベートすることで固定処理を行った。続いて、PBS で 3 回洗浄し、0.5%TritonX を加え室温にて 10 分間インキュベートすることで透過処理を

表4 Q-RT-PCR に用いたプライマー

Target gene ^a	Primer name	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)	Accession no.
<i>oxyR</i> (ST DT104)	SToxyRF1	TGAAAGAGAGCGAGGCGTTT	150	NC_003197
	SToxyRR1	AGTGGCCATCTTCCAGCATC		
<i>oxyR</i> (SW)	SToxyRF1	TGAAAGAGAGCGAGGCGTTT	150	CP029041
	SToxyRR1	AGTGGCCATCTTCCAGCATC		
<i>oxyR</i> (Sb)	SboxyRF1	GGTGAAAGAGAGCGAGGCAT	153	NC_015761
	SboxyRR1	CAGTGTCGGTCTTCCAGCAT		
<i>cI</i> (ST DT104)	STcIF1	TCAGGGCGGTGATGTTATCG	114	NC_022569
	STcIR1	CCGCGCACGTTAATCACTTT		
<i>cI</i> (SW)	SWcIF1	TCAGGGCGGTGATGTTATCG	114	CP029041
	SWcIR1	CCGCGCACGTTAATCACTTT		
16S rRNA	16S rRNA F-2	CTGCATTTCGAAACTGGCAGG	127	NC_003197
	16S rRNA R-2	AGCGTCAGTCTTTGTCCAGG		

^a ST DT104, *S. Typhimurium* DT104; SW, *S. Worthington*; S.b, *S. bongori*.

行った。透過処理したサンプルは、3%BSA および 4%ヤギ血清添加 PBS-T (0.1% Tween 20 添加 PBS) で室温にて 1 時間インキュベートすることでブロッキングを行った。インキュベート後、ウサギ抗サルモネラ O4 抗体 (デンカ生研) およびマウス抗 ArtA 抗体 [99]を PBS-T で 2,000 倍希釈して添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific) で標識された抗ウサギ IgG 抗体および Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) で標識された抗マウス IgG 抗体を PBS-T で 200 倍に希釈して添加し、室温で 1 時間インキュベートした。このとき、核染色試薬として 4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI, Lonza) (1 $\mu\text{g/ml}$) を加えた。PBS で洗浄後封入剤 (ProLong Gold; Thermo Fisher) でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon) を用いて観察した。

3. 結果

1) RAW264.7 細胞内での *artAB* の発現

RAW264.7 細胞内での *artA* 転写量を経時的に測定したところ、感染後 3 時間での発現量が感染後 6 時間までで最も高いことを確認した (図 10)。したがって、本研究では感染の 3 時間後に mRNA を抽出し、各遺伝子の発現量の解析に使用した。感染 3 時間後の *S. Typhimurium* DT104 U1 株の RAW264.7 細胞内での *artA* の発現量は、DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較して約 3.4 倍となり有意に上昇したが ($p < 0.05$)、*S. Worthington* 182 株、*S. bongori* ATCC 43975 株では有意な上昇は認められなかった (図 11A)。

次に、PMA で RAW264.7 細胞を刺激した条件下での細胞内の *artA* 発現量を解析した。RAW264.7 細胞を、PMA で刺激した場合の ROS 産生量を測定した結果、0.2 μM の PMA で有意な ROS の上昇が確認された ($p < 0.01$) (図 12)。同じ条件により PMA で刺激した RAW264.7 細胞に *Salmonella* を感染させて *artA* の発現量を調べた。この結果、*S. Typhimurium* DT104 U1 株および *S. bongori* ATCC 43975 株 *artA* の発現量は DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較してそれぞれ約 30 倍 ($p < 0.01$)、約 13.9 倍 ($p < 0.05$) となり有意に上昇したが、*S. Worthington* 182 株では有意な上昇は認められなかった (図 11 A)。

さらに、ArtAB の細胞内における局在を確認するために、*S. Typhimurium* DT104 U1 株における RAW264.7 細胞内での ArtAB 産生を経時的に蛍光免疫染色法によって観察した (図 13)。ArtAB は感染の 3 時間後では検出されなかったが、感染 8 時間後以降では菌体と同じ場所に検出された。PMA で処理した細胞内においてより強い蛍光シグナルが検出された。

2) RAW264.7 細胞内での *recA* 転写量の解析

第 II 章での結果で示されたように、*in vitro* における SOS 応答には *recA* の発現増加が伴っていた。そこで、*in vivo* における *recA* の発現についても検証した (図 11B)。

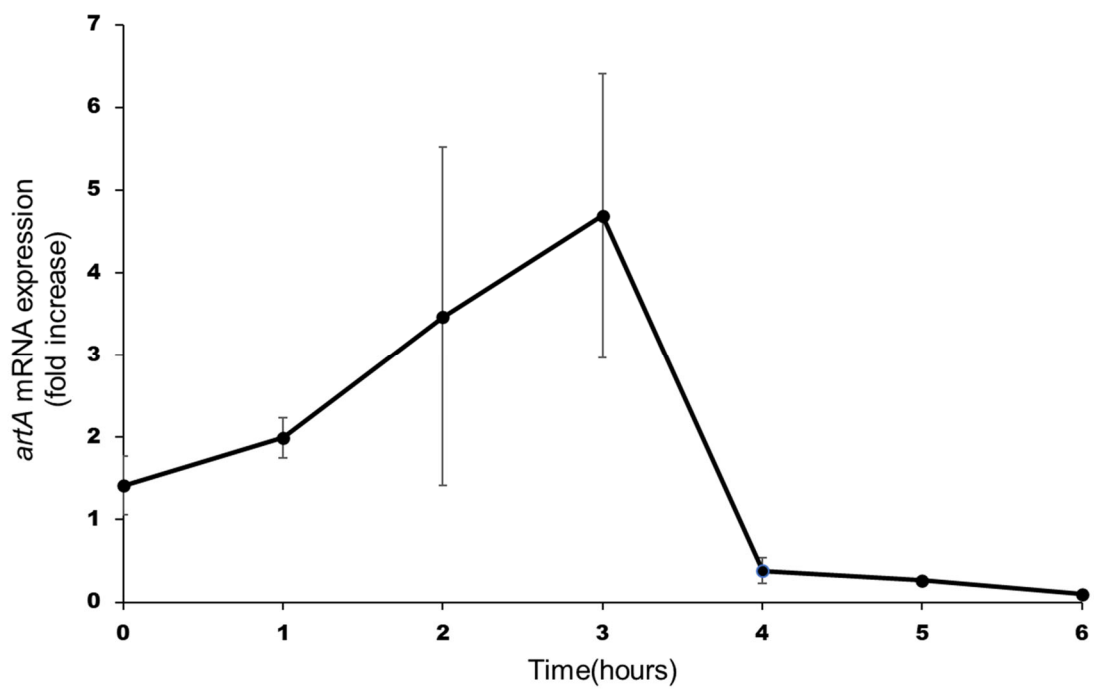


図 10 細胞内での *artA* 発現量の経時的変化

縦軸は、*artA* の 16S rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして測定した細胞内での発現量と *in vitro* の発現量との比を示す。(n=3、mean ± SE)

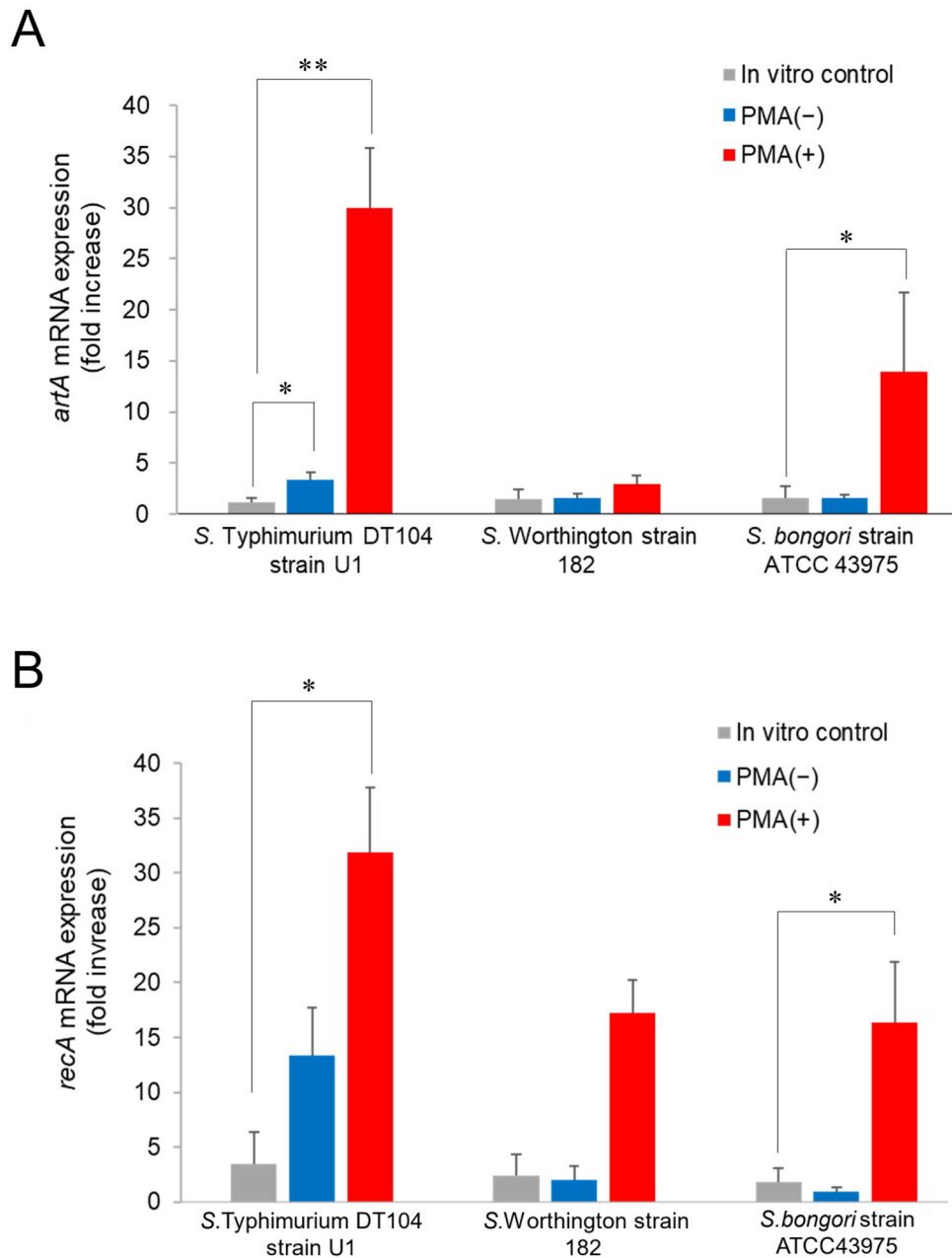


図 11 細胞内における *artA* および *recA* の発現

(A) *artA* の発現量を示す。(B) *recA* の発現量。縦軸は 16S rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして測定した細胞内での発現量と *in vitro* の発現量との比を示す。DMEM 培地における *in vitro* の各遺伝子の発現量を灰色示す。RAW264.7 細胞内における各遺伝子の無刺激の場合の発現量を青、PMA で刺激した場合の発現量を赤で示した。(n=24、mean ±SE、*: $p < 0.05$ 、 **: $p < 0.01$)

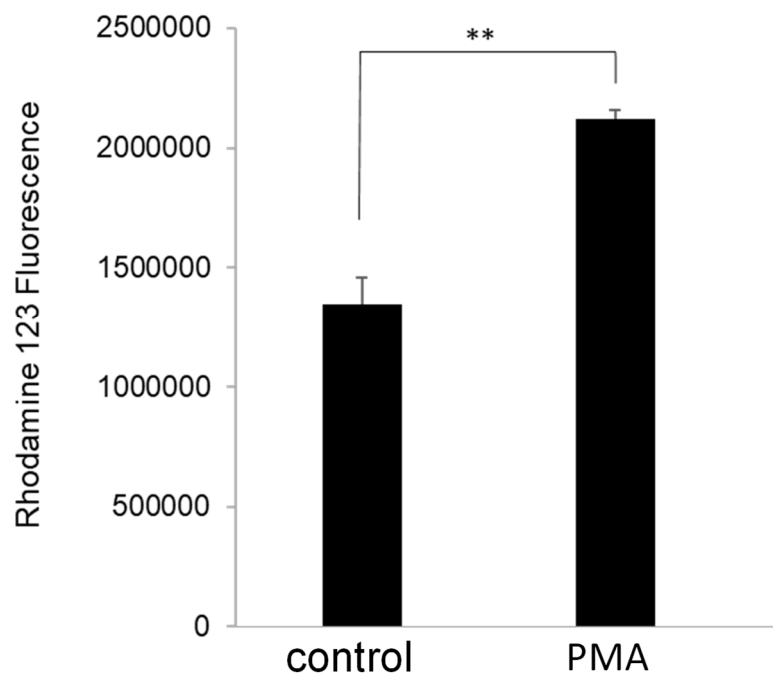


図 12 PMA で刺激した RAW264.7 細胞内の ROS 産生量
縦軸は 480 nm で励起したときの 530 nm の蛍光強度を測定した値を表す。(n=24、
mean ±SE、**: $p < 0.01$)

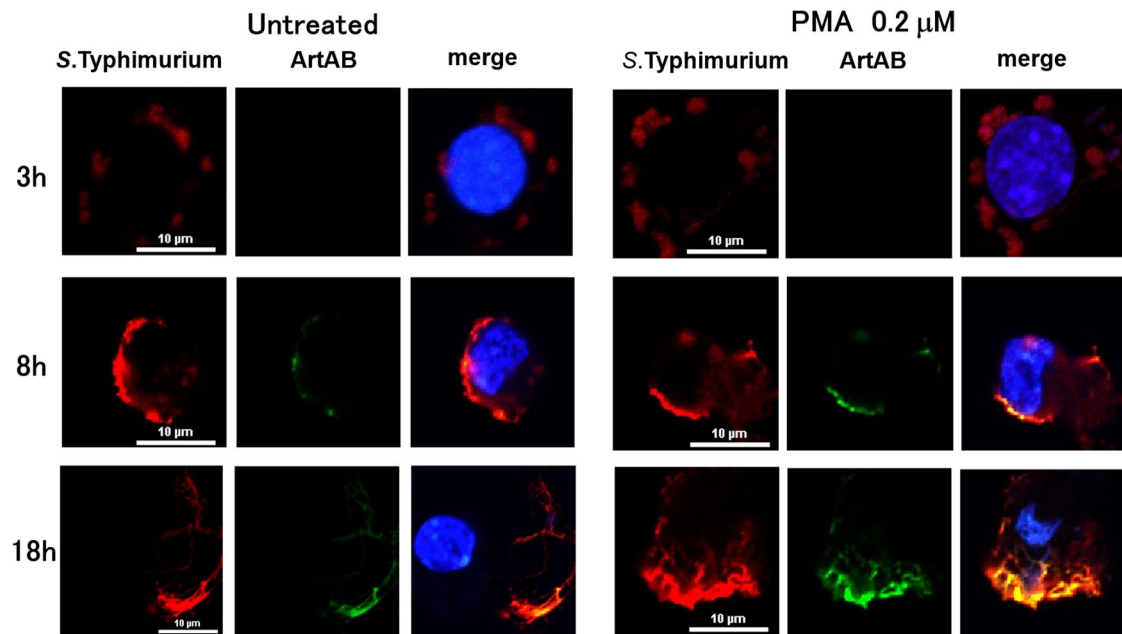


図 13 細胞内における *S.Typhimurium* DT104 U1 株の ArtAB の発現

0.2 μ M の PMA (右図) および対照として PBS (左側) で RAW264.7 細胞を処理した後、MOI10 で RAW264.7 細胞に *S. Typhimurium* DT104U 1 株を感染させ、感染後 3 h、8 h、18 h でマウス抗 ArtAB 抗体と Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (緑)、およびウサギ抗 *S.Typhimurium* 抗体と Alexa Fluor 568 標識抗ウサギ IgG 抗体 (赤) を用いて蛍光免疫染色を実施した。核は DAPI (青) で染色した。黄色は抗 ArtAB 抗体と抗 *S.Typhimurium* 抗体の共局在を示す。

S. Typhimurium DT104 U1 株の RAW264.7 細胞内での *recA* の発現量は、DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較して約 13.4 倍に上昇したが、*S. Worthington* 182 株および *S. bongori* ATCC 43975 株では上昇は認められなかった。一方、*S. Typhimurium* DT104 U1 株、および *S. bongori* ATCC 43975 株の PMA 刺激 RAW264.7 細胞内での *recA* の発現量は、DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較してそれぞれ 31.9 倍 ($p < 0.05$) および 16.4 倍 ($p < 0.01$) と有意な上昇が認められ、*S. Worthington* 182 株においても有意ではないものの増加傾向が認められた (17.3 倍、 $p = 0.05$)。

3) RAW264.7 細胞内および *in vitro* における *oxyR* 転写量の解析

食菌された細菌が酸化ストレスに暴露されるマクロファージ細胞内での *oxyR* の発現動態について検証した。この結果、*S. Worthington* 182 株 および *S. bongori* ATCC 43975 株の RAW264.7 細胞内での *oxyR* の発現量は、DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較してそれぞれ約 9.8 倍 ($p = 0.09$)、約 6.3 倍 ($p < 0.05$) となり上昇がみられたが、*S. Typhimurium* DT104 U1 株では 2.5 倍の上昇であった (図 14A)。また、*S. Worthington* 182 株および *S. bongori* ATCC 43975 株の PMA 刺激 RAW264.7 細胞内での *oxyR* の発現量は、DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較してそれぞれ約 89.2 倍 ($p < 0.01$)、約 45.7 倍 ($p < 0.01$) となり有意に上昇したが、*S. Typhimurium* DT104 ATCC 43975 株では有意な上昇は認められなかった (図 14A)。

同様に、*in vitro* において H_2O_2 で処理した時の各菌株の *oxyR* の発現についても検証した (図 14B)。*S. Worthington* 182 株を 3 mM の H_2O_2 を添加した培地で培養した場合、無添加の場合と比較して *oxyR* の発現量はそれぞれ約 4.8 倍 ($p < 0.05$) となり有意に上昇したが、*S. Typhimurium* DT104 U1 株 (1.6 倍) および *S. bongori* ATCC43975 (3.3 倍) では有意な上昇は認められなかった。その他の *S. Typhimurium* 株 (*S. Typhimurium* DT104 129 株 (*artAB*+), *S. Typhimurium* 219 株 (非 DT104, *artAB*+), *S. Typhimurium* KS10 (*artAB*-)) でも同様に、有意な上昇は認められな

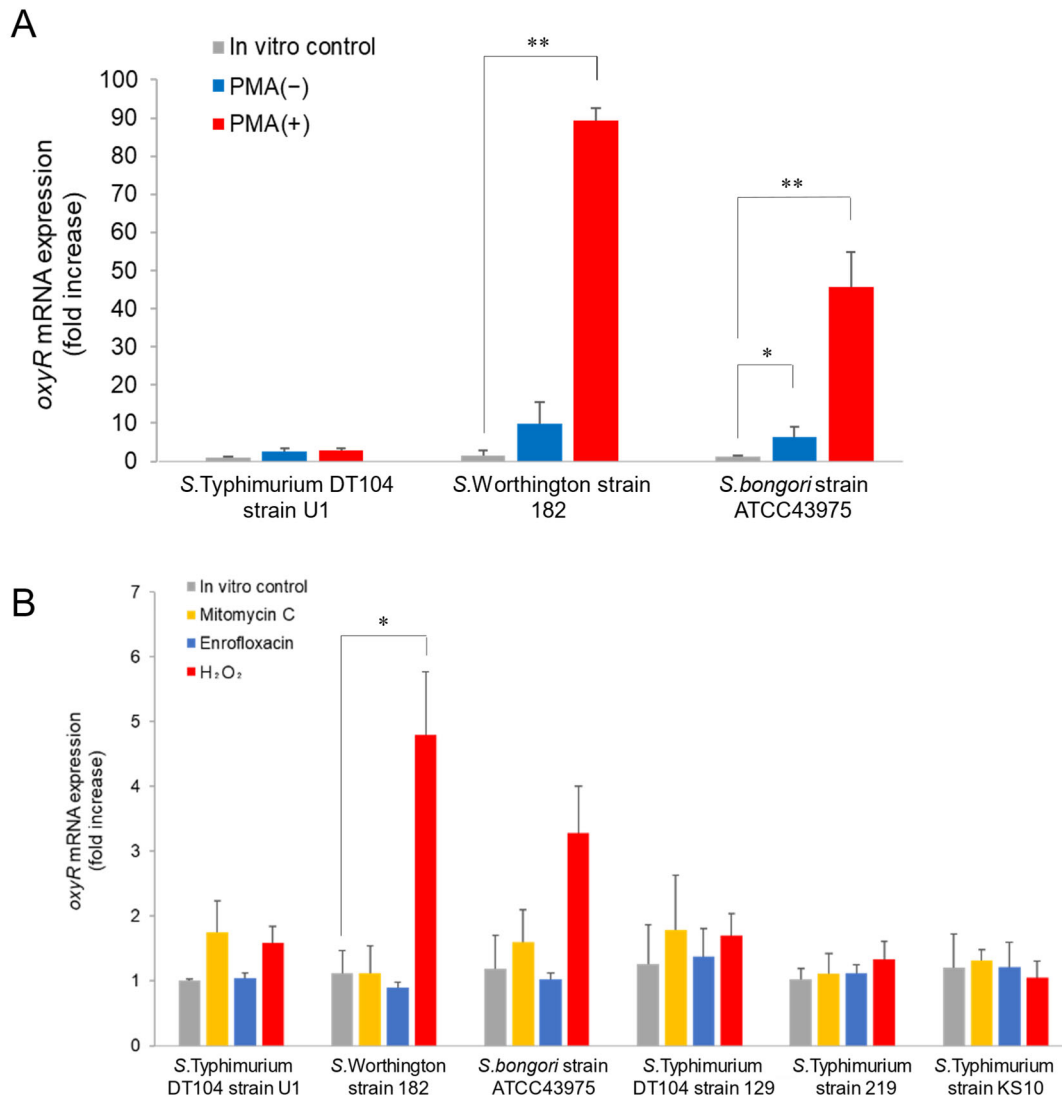


図 14 細胞内および *in vitro* での *oxyR* 発現量

(A) RAW264.7 細胞内での *oxyR* の発現量を示す。縦軸は 16S rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして測定した *oxyR* の細胞内での発現量と *in vitro* の発現量との比を示す。グレーは各菌株の DMEM 培地における *in vitro* での *oxyR* の発現量を示し、青は無刺激の細胞内、赤は PMA で刺激した細胞内の発現を示す。(n=3, mean ± SE, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) (B) 各物質で刺激後の DMEM 培地における *in vitro* での *oxyR* の発現を示す。縦軸は 16S rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして測定した *oxyR* における無処置対照群との比を示す。グレーは無処置対照群での *oxyR* の発現量、黄色は 0.5 μg/ml の MTC、青は 1/2 MIC の ERFX、赤は 3 mM の H₂O₂ で処理した場合の *oxyR* の発現量を示す。(n=3, mean ± SE, * : $p < 0.05$)

った。また、用いた *Salmonella* 属菌全ての株において、MTC および ERFX を添加した培地での培養では、無添加の場合と比較して *oxyR* の発現量の有意な上昇は認められなかった。

4) *in vitro* および RAW264.7 細胞内での *cI* 転写量の解析

細胞内および *in vitro* における各条件での *cI* の転写量を検証した (図 15)。*S. Worthington* 182 株の RAW264.7 細胞内および PMA 刺激 RAW264.7 細胞内での *cI* の発現量は、DMEM 培地における *in vitro* での発現量と比較してそれぞれ 5 倍 ($p < 0.01$)、48.8 倍 ($p < 0.01$) となり有意に上昇したが、*S. Typhimurium* DT104 U1 株では有意な上昇は認められなかった。また、*S. Worthington* 182 株を 3 mM の H_2O_2 を添加した培地で培養した場合、無添加の場合と比較して *cI* の発現量は 2.9 倍 ($p < 0.05$) となり有意に上昇したが、*S. Typhimurium* DT104 U1 株では有意な上昇は認められなかった。

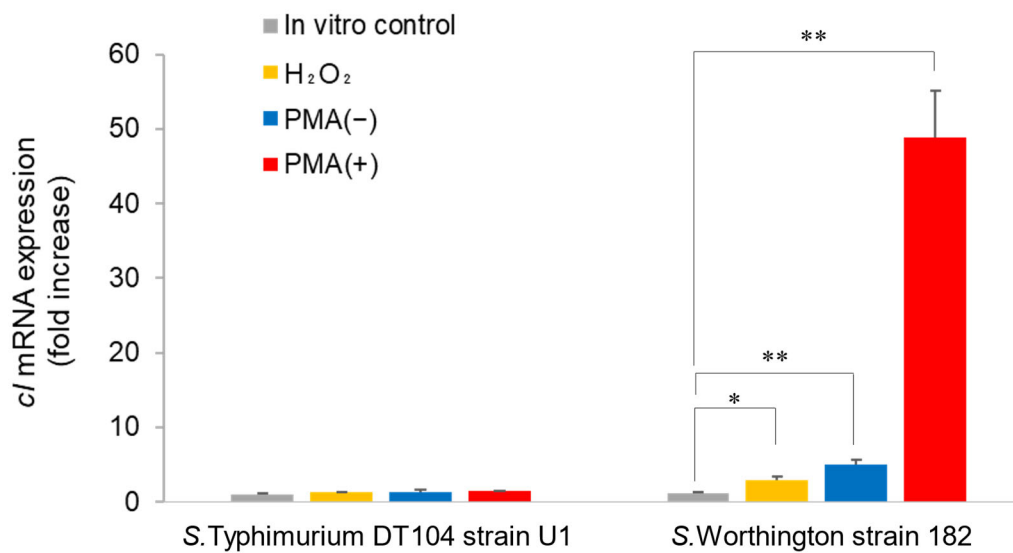


図 15 *in vitro* および細胞内での *cI* の発現

縦軸の値は 16S rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして測定した各条件下における *cI* の発現量と DMEM 培地を用いた *in vitro* での発現量との比を示す。グレーは DMEM 培地における *cI* の発現量、黄色は 3 mM の H₂O₂ で処理した場合の *in vitro* における発現量、青は無刺激の RAW264.7 細胞内、赤は PMA により刺激した細胞内における発現量を示す。(n=3、mean ± SE、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

4. 考察

本研究により、*S. Typhimurium* DT104 が RAW264.7 細胞に感染後、細胞内において *artAB* を誘導的に発現していることが明らかとなった。また、蛍光免疫染色法によって *S. Typhimurium* DT104 は細胞に感染後 3 時間以降に ArtAB を産生していることも観察された。細胞内での *artAB* 発現量の有意な上昇は、*S. Typhimurium* DT104 のみでみられ、*S. Worthington*、*S. bongori* では認められなかった。第 I 章における結果で示されたように *in vitro* でも同様に、*S. Typhimurium* DT104 では H₂O₂ 処理によって *artAB* 発現量の有意な上昇がみられたが、*S. Worthington*、*S. bongori* では有意な上昇は認められていない。マクロファージは細菌を貪食後ファゴソームに取り込み、それがリソソームと融合してファゴリソソームを形成し、脱顆粒により抗菌ペプチド、リゾチーム、ROS などを放出しファゴリソソーム内の病原菌を殺菌していることが知られている [116]。本研究では、RAW264.7 細胞において PMA が ROS 産生を増加させることが確認され、PMA で刺激した RAW264.7 細胞内において *S. Typhimurium* DT104 の *artAB* が誘導的に発現していることが示された。したがって、これらの結果は *in vitro* で観察されたように、マクロファージによって生成された H₂O₂ を含む ROS が *S. Typhimurium* DT104 における *artAB* の発現を増加させていることを示唆している。また、RAW264.7 細胞内において *S. Typhimurium* DT104 の *recA* の発現が増加していることも明らかとなった。SOS 応答関連遺伝子である *recA* と志賀毒素産生遺伝子の一つである *stx2* の発現誘導はヒトマクロファージ内での *E.coli* O157:H7 でも報告されている [83]。同様に、本研究の結果から、細胞内においても *S. Typhimurium* DT104 の *artAB* 発現が RecA を介した SOS 応答により発現していることが推察された。

本研究では、用いた *Salmonella* 属菌 3 株全で PMA により刺激した細胞内における *recA* 発現量の上昇がみられ、それに伴い *S. Typhimurium* と *S. bongori* では *artA* の有意な転写の増加が認められた。しかし、*S. Worthington* においては PMA 処理した RAW264.7 細胞内でも *artA* の有意な上昇は認められない。そこで、これら菌株間の

細胞内での *artAB* 発現量の違いに、*cI* リプレッサーおよびその調節因子として知られる OxyR 蛋白質の産生量が関与していると考えて解析を進めた。OxyR 蛋白質は細胞内の H₂O₂ などの酸化ストレスを感知し、支配下遺伝子の調節領域に結合して転写を活性化する。EHEC においては、活性化した OxyR 蛋白質は *cI* の転写を活性化し、*cI* レプレッサーの産生を増加させることが知られている[33,56] (図 16)。これがフーリーの溶原化の維持につながっており、宿主菌が OxyR 蛋白質を利用して、H₂O₂ 依存性のプロフューリー誘導を抑制し、毒素遺伝子の発現を低レベルに抑えている可能性が示唆されている[61]。この調節機構が *Salmonella* の *artAB* 発現機構にも当てはまると考え、RAW264.7 細胞内および *in vitro* での *oxyR* および *cI* の発現量を Q-RT-PCR で測定した。結果として、RAW264.7 細胞内での *oxyR* の発現量は *S. Worthington* および *S. bongori* で上昇し、PMA 刺激によってさらに増加したが、*S. Typhimurium* DT104 では有意な上昇は認められなかった。同様の結果が *in vitro* における H₂O₂ 処理でも観察された。また、その他の非 DT104 を含む *S. Typhimurium* 3 株でも H₂O₂ による *oxyR* の有意な発現上昇が認められなかったことから、*Salmonella* 属菌のうち血清型 Typhimurium が他の血清型に比べて *oxyR* の発現応答が弱いことが推察された。

同様に、*in vitro* で H₂O₂ 処理した場合や、RAW264.7 細胞内および PMA 刺激 RAW264.7 細胞内での *cI* の発現量は、*S. Worthington* では有意に増加したが *S. Typhimurium* DT104 では有意な上昇は認められなかった。*In vitro* における MTC やキノロン系抗生物質による刺激では *oxyR* の発現誘導は起こらないことが、本研究でも確かめられた。この場合、OxyR の関与がないために RecA を介した SOS 応答による *cI* リプレッサーの分解により *artAB* の発現と溶原状態にあったプロフューリーの誘導が起こる (図 16 A,B)。一方、図 16 C に示すように、*S. Typhimurium* DT104 の場合、H₂O₂ などの ROS による RecA の活性化が酸化ストレス応答による OxyR の活性を上回るために *cI* リプレッサーの分解が RecA を介して起こり、*artAB* の発現誘導が起きているものと推察される。一方、*S. Worthington* では図 16 D のように、酸化ストレス応答による OxyR の活性が SOS 応答による RecA の活性化よりも上回り、*artAB* の

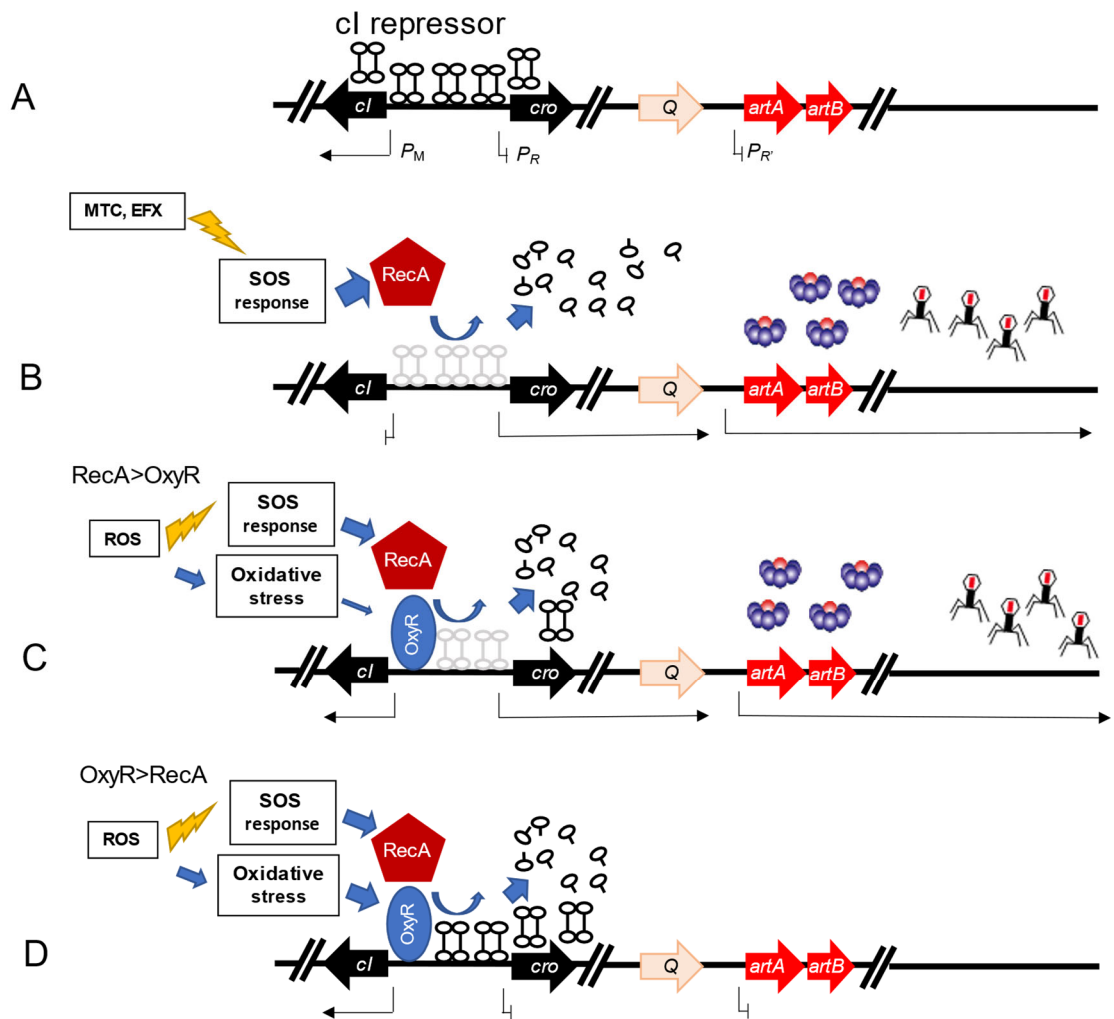


図 16 OxyR による *artAB* 発現と Art フェージ誘導の制御機構モデル

(A) *cI* リプレッサーにより溶原サイクルを維持している。(B) SOS 応答により *RecA* が活性化し、溶菌サイクルとなり *ArtAB* 毒素が産生され Art フェージの誘導が起きる。(C) ROS により SOS 応答が起こり、*RecA* が活性化されると同時に、酸化ストレスにより *OxyR* が活性化し *cl* の発現が増加するが、*RecA* の活性が上回るため毒素産生およびフェージ誘導が起きる。(D) 酸化ストレスによる *OxyR* の活性化が *RecA* よりも上回る場合、*cI* リプレッサーの産生が多くなり、溶原サイクルを維持する。*cro* : アンチリプレッサー遺伝子、*Q* : アンチターミネータ遺伝子； $P_M, P_R, P_{R'}$: 想定されるプロモーター； \longleftarrow : 想定される転写産物； \perp : 転写が抑制されている状況を表す。

発現誘導が起きない。すなわち、マクロファージ内における *S. Typhimurium* DT104 の *artAB* は ROS により誘導的に発現するが、*S. Worthington* のように *oxyR* の発現が強い菌では *cI* の発現が増加し、*cI* リプレッサーにより *artAB* の転写とプロフェージの誘導が抑制されるものと推察される。一方、*S. bongori* では PMA 刺激 RAW264.7 細胞内で *oxyR* の発現が上昇しているのにも関わらず、*artAB* の発現も上昇している。これは、第 I 章で示されたように *S. bongori* の *artAB* が不完全なプロフェージゲノム上に存在しているため、*cI* が欠如し *cI* リプレッサーの抑制が働いていないことが原因であろうと考えられる。いずれにせよ *S. bongori* における *artAB* の発現制御機構は *S. Typhimurium* DT104 および *S. Worthington* とは異なるものである可能性が考えられた。

Salmonella はマクロファージ内の低 pH や ROS などのストレス状況下で SCV (*Salmonella*-containing vacuole) [5,17,19,44] と呼ばれる食胞に包まれて、そのなかで増殖していることが知られている [38,87]。本研究結果より、*S. Typhimurium* DT104 がマクロファージ内で ROS に暴露されることで、SCV 内で *artAB* を誘導的に発現していることが推察された。興味深いことに、野崎は [75]、ArtAB がマクロファージ由来の ROS 産生量を減少させていることを報告しており、*S. Typhimurium* DT104 が SCV 内で *artAB* を発現することで殺菌機構に抵抗することにより、マクロファージ内の環境に適応している可能性も示唆されている。また、本研究により、宿主の酸化ストレス応答の強弱が *in vivo* における毒素産生能に反映しており、*S. Typhimurium* DT104 は酸化ストレス応答が弱いため細胞内における毒素産生能が高く、そのため本菌が高病原性を示している可能性が示唆された。しかし、ArtAB の病原因子としての役割は依然として不明であり、*artAB* の動物体内での発現や、ArtAB 毒素のマクロファージ等の免疫担当細胞に対する影響等についての解析を進める必要がある。また、近年 ArtAB とその機能と構造が類似する *S. Typhi* が産生する Typhoid toxin との関連性が注目され、毒素が結合する細胞側のレセプターの類似性等が明らかにされている [31,69]。*artAB* の発現機構やその産物である ArtAB の生

物活性に関する研究が進めば、サルモネラ症の防除技術や診断法の開発につながるものと考ええる。

5. 小括

RAW264.7 細胞内における *S. Typhimurium* DT104 の *artA* 発現は、*in vitro* での発現に比較して有意に上昇したが、*S. Worthington* および *S. bongori* では有意な上昇は認められなかった。菌の SOS 応答に関与する *recA* の細胞内での発現上昇は *S. Typhimurium* DT104 においてみられ、*S. Worthington* および *S. bongori* では認められなかった。しかし、PMA 刺激細胞内では 3 株全てにおいて *artA* および *recA* の転写量が増加し、*S. Typhimurium* DT104、および *S. bongori* ではいずれの遺伝子も転写量の有意な上昇が認められたが、*S. Worthington* においては *recA* 発現の上昇が認められたものの、*artA* の転写量の有意な増加は認められなかった。一方、細胞内における酸化ストレス応答制御因子である *oxyR* の転写量は *S. Worthington* および *S. bongori* において増加が認められたが、*S. Typhimurium* DT104 の場合 PMA で刺激した場合においても有意な発現の上昇は認められなかった。OxyR の作用により誘導的に発現することが知られる *cI* の発現は *S. Worthington* において有意に上昇し、*S. Typhimurium* DT104 ではそれが認められなかった。DT104 の ArtA 産生を蛍光免疫染色法によりレーザー顕微鏡下で観察した結果、細胞に感染 3 時間後以降に、菌体が局在する場所に ArtA の産生が確認された。以上のことから、マクロファージ内における DT104 の *artAB* は ROS により誘導的に発現するが、*S. Worthington* のように *oxyR* の発現応答の強い菌では *cI* リプレッサーにより *artAB* の転写が抑制されるためにその細胞内発現が弱くなるものと推察され、細菌の酸化ストレス応答の強弱が細胞内における毒素産生能に反映している可能性が示唆された。

総括

本研究では近年 *Salmonella* 属菌において新たに見いだされた百日咳毒素様ADP-リボシル化毒素 ArtAB の産生機構を解明する目的で *artAB* をコードするプロファージを同定し、SOS 反応誘発物質と *artAB* の発現誘導およびファージ誘導との関連を解析するとともに、*artAB* のマクロファージ内における発現およびその機構について検討し、以下の結果を得た。

1. *Salmonella* 属菌の *artAB* をコードするプロファージに関する解析

Salmonella 属菌のなかで *artAB* 遺伝子を保有し、その発現が確認されている *S. Typhimurium* DT104、*S. Worthington* および *S. bongori* の全ゲノム塩基配列を解析したところ、*artAB* はいずれの場合も、菌のプロファージにコードされていることが明らかとなり、これらをそれぞれ Art-DT104、Art-SW、および Art-Sb とした。異なった菌株由来の Art-DT104 および Art-SW 間のシークエンスは高い相同性を示し、同一血清型の *artAB* をコードするプロファージは極めてよく保存されていることが示された。Art-DT104 と Art-SW の相同性は 77%と比較的高い相同性を示したが、Art-Sb は 2 つのプロファージに対し低い相同性 (43%) であり、サイズも小さく、*incomplete phage* として同定された。Art-DT104 および Art-SW は *Salmonella* 属菌で報告されているプロファージ Gifsy-1 に相同性を示し、Gifsy-1 に *artAB* を含む領域が挿入された構造であった。以上のことから、*artAB* は溶原ファージの水平伝搬により獲得されたものであることが推測された。さらに、*artA* と *artB* はプロファージ上において同一の転写産物に転写されていることから、両者はポリシストロン性のオペロンを構成していることが示唆された。

2. *Salmonella* 属菌における *artAB* の SOS 応答誘発物質による発現誘導

artAB の発現誘導機構の解明を目的として、MTC、キノロン系抗菌剤、 H_2O_2 などの SOS 応答誘発物質の ArtAB 産生に及ぼす影響、*artA* および SOS 応答に関与する

ことが知られる *recA* の転写量の動態、*artAB* をコードするプロファージの誘導について検証した。*Salmonella* 属菌における ArtAB 毒素産生誘導は MTC のみならずキノロン系抗生物質によっても起こり、ArtAB の産生誘導は *artAB* 遺伝子の転写レベルでの誘導であることを明らかとした。一方、H₂O₂ 処理により *S. Typhimurium* DT104 における *artAB* の転写レベルの有意な増加が認められたが、*S. Worthington* においては H₂O₂ による発現誘導が認められず、*S. bongori* では培養上清中にわずかな ArtA が誘導的に発現し、転写レベルの上昇も検出されたが、有意な上昇は認められなかった。これらのことから、H₂O₂ による *artAB* 発現誘導のレベルは血清型や菌種により異なることが明らかとなった。

MTC、ERFX および H₂O₂ 処理により *S. Typhimurium* DT104 の *recA* の発現増加が認められ、培養上清中における *artA* のコピー数が増加したことから、これらの SOS 反応誘発物質がゲノム中にプロファージとして存在する Art ファージを誘導し、これに伴って *artAB* の誘導的発現が起こることが示唆された。*S. Worthington* では MTC および ERFX 処理により *recA* の発現上昇とファージの誘導が認められたが、H₂O₂ 処理では認められなかった。さらに、*S. bongori* においては、SOS 反応誘発物質処理により *recA* の発現誘導起きるものの、ファージの誘導は認められない。*S. bongori* の場合 *artAB* は incomplete phage にコードされているため、SOS 応答があってもファージの誘導が起こらないものと考えられた。

本研究においてキノロン系抗菌剤である ERFX が *artAB* の発現を誘導することを明らかにされたが、*Salmonella* 感染症に対する抗生物質の使用により ArtAB の産生が誘導されるリスクについても考慮し、その発現機構についての詳細や、低濃度のキノロン系抗生物質の菌の病原性におよぼす影響等についても実験的に明らかにする必要性が考えられた。

3. *Salmonella* 属菌における *artAB* の細胞内発現

artAB の *in vivo* での発現を調べるため、DT104 をマクロファージ様細胞 RAW264.7

細胞に貪食させ、細胞内での *artAB* の発現動態を解析した。さらに、その発現機構を解明する目的で *recA*、活性酸素などのストレス応答に関与する調節因子 *oxyR*、ファージの溶原化を維持する *cI* リプレッサー遺伝子の発現動態についても解析した。

S. Typhimurium DT104 の *artA* 発現量は感染後 RAW264.7 細胞内においては有意に上昇したが、*S. Worthington* および *S. bongori* では有意な上昇は認められなかった。*recA* の細胞内での発現上昇は *S. Typhimurium* DT104 においてみられ、*S. Worthington* および *S. bongori* では認められなかった。しかし、細胞内の ROS の産生を増加させる PMA で刺激した細胞内では 3 株全てにおいて *artA* および *recA* の発現が上昇した。*S. Typhimurium* DT104 および *S. bongori* では両遺伝子の発現は共に有意な上昇を示し、*S. Worthington* においては、*artA* の有意な発現の上昇は認められなかった。一方、細胞内における酸化ストレス応答制御因子である *oxyR* の発現増加は *S. Worthington* および *S. bongori* において認められたが、*S. Typhimurium* DT104 の場合、PMA で刺激した場合においても有意な発現の上昇は認められなかった。さらに、OxyR の作用により誘導的に発現する *cI* リプレッサー遺伝子の発現は *S. Worthington* において有意に上昇し、*S. Typhimurium* DT104 ではそれが認められなかった。*S. Typhimurium* DT104 の ArtA 産生を蛍光免疫染色法により観察した結果、細胞に感染 3 時間後以降に、ArtA の産生が確認された。以上のことから、マクロファージ内における *S. Typhimurium* DT104 の *artAB* は細胞内の ROS により誘導的に発現するが、*S. Worthington* のように *oxyR* の発現応答の強い菌では *cI* リプレッサーによりファージ誘導が抑制されるために *artAB* の細胞内発現が弱くなるものと推察され、細菌の酸化ストレス応答の強弱が *in vivo* における毒素産生能に反映している可能性が示唆された。

以上の研究から、プロファージ上にある *artAB* の発現誘導は SOS 誘発物質の刺激により引き起こされた SOS 応答によるファージ誘導とそれに伴う *artAB* の転写増加により起こることが示された。また、*artAB* のマクロファージ内の発現は SOS 反応誘発物質である H₂O₂ などの ROS により誘導されることも示唆された。本研究で得

られた研究成果は、ArtAB 毒素の *Salmonella* における病原性因子としての役割を解明するための基礎知見となり、*Salmonella* 症の診断、予防、治療法の開発改良にもつながることが期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、校閲および御指導、御助言を賜りました酪農学園大学獣医学群 内田郁夫教授をはじめ村松康和教授、大杉剛生教授、臼井優准教授、村田亮講師の各位に深謝いたします。

また、本研究遂行にあたりご協力くださいました農研機構動物衛生研究部門の玉村雪乃博士をはじめ、楠本正博博士、秋庭正人博士、そして本研究室の卒業生、在学生各位に心から感謝いたします。

最後に私を見守り支え続けてくれた家族に心から感謝します。

引用文献

1. Allen, C. A., Fedorka-Cray, P. J., Vazquez-Torres, A., Suyemoto, M., Altier, C., Ryder, L. R., Fang, F. C. and Libby, S. J. 2001. *Infect. Immun.* **69**: 4673-4677.
2. Anderson, E. S., Ward, L. R., Saxe, M. J. and de Sa, J. D. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.* **78**: 297-300.
3. Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y. and Wishart, D. S. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* **44**: W16-21.
4. Baharoglu, Z. and Mazel, D. 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 1126-1145.
5. Bakowski, M. A., Braun, V. and Brumell, J. H. 2008. *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**: 2022-2031.
6. Besser, T. E., Goldoft, M., Pritchett, L. C., Khakhria, R., Hancock, D. D., Rice, D. H., Gay, J. M., Johnson, W. and Gay, C. C. 2000. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol. Infect.* **124**: 193-200.
7. Bielaszewska, M., Idelevich, E. A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., Peters, G. and Karch, H. 2012. Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **56**: 3277-3282.
8. Bonanno, L., Petit, M. A., Loukiadis, E., Michel, V. and Auvray, F. 2016. Heterogeneity in induction level, infection ability, and morphology of Shiga toxin-encoding phages (Stx phages) from dairy and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 2177-2186.
9. Bouwman, C. W., Kohli, M., Killoran, A., Touchie, G. A., Kadner, R. J. and Martin, N. L. 2003. Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

- virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *J. Bacteriol.* **185**: 991-1000.
10. Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. and Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2465-2467.
 11. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. and Brussow, H. 2003. Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 238-276.
 12. Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M. and Parkhill, J. 2009. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25**: 119-120.
 13. Chakraborty, D., Clark, E., Mauro, S. A. and Koudelka, G. B. 2018. Molecular mechanisms governing "Hair-Trigger" induction of Shiga toxin-encoding prophages. *Viruses* **10**: 228.
 14. Cheng, R. A. and Wiedmann, M. 2019. The ADP-Ribosylating toxins of *Salmonella*. *Toxins* **11**: 416.
 15. Cheng, R. A., Eade, C. R. and Wiedmann, M. 2019. Embracing diversity: Differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Front. Microbiol.* **10**: 1368.
 16. Colon, M. P., Chakraborty, D., Pevzner, Y. and Koudelka, G. B. 2016. Mechanisms that determine the differential stability of Stx(+) and Stx(-) lysogens. *Toxins* **8**: 96.
 17. de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T. and Wiersinga, W. J. 2012. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* **8**: e1002933.
 18. Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G. and Lee, L.-H. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Science* **8**: 284-293.
 19. Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J. C. 2003.

- Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**: 103-118.
20. Fang, Y., Mercer, R. G., McMullen, L. M. and Ganzle, M. G. 2017. Induction of Shiga toxin-encoding prophage by abiotic environmental stress in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e01378-17.
 21. Farr, S. B. and Kogoma, T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561-585.
 22. Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Hofle, M. G. and Guzman, C. A. 2004. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3618-3623.
 23. Figueroa-Bossi, N., Coissac, E., Netter, P. and Bossi, L. 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **25**: 161-173.
 24. Finkelstein, R. A., Atthasampunna, P., Chulasamaya, M. and Charunmethee, P. 1966. Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera toxin A. *J. Immunol.* **96**: 440-449.
 25. Fogg, P. C., Saunders, J. R., McCarthy, A. J. and Allison, H. E. 2012. Cumulative effect of prophage burden on Shiga toxin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* **158**: 488-497.
 26. Fortier, L. C. and Sekulovic, O. 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* **4**: 354-365.
 27. Fowler, C. C. and Galan, J. E. 2018. Decoding a *Salmonella* Typhi regulatory network that controls typhoid toxin expression within human cells. *Cell Host Microbe*. **23**: 65-76.
 28. Fowler, C. C., Chang, S. J., Gao, X., Geiger, T., Stack, G. and Galan, J. E. 2017. Emerging insights into the biology of typhoid toxin. *Curr. Opin. Microbiol.* **35**: 70-77.

29. Gal-Mor, O., Boyle, E. C. and Grassl, G. A. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* **5**: 391.
30. Gallorini, M., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K. A., Cataldi, A., Buchalla, W., Krifka, S. and Schweikl, H. 2015. Activation of the Nrf2-regulated antioxidant cell response inhibits HEMA-induced oxidative stress and supports cell viability. *Biomaterials* **56**: 114-128.
31. Gao, X., Deng, L., Stack, G., Yu, H., Chen, X., Naito-Matsui, Y., Varki, A. and Galan, J. E. 2017. Evolution of host adaptation in the *Salmonella* typhoid toxin. *Nat. Microbiol.* **2**: 1592-1599.
32. Gieche, J., Mehlhase, J., Licht, A., Zacke, T., Sitte, N. and Grune, T. 2001. Protein oxidation and proteolysis in RAW264.7 macrophages: effects of PMA activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1538**: 321-328.
33. Glinkowska, M., Los, J. M., Szambowska, A., Czyz, A., Calkiewicz, J., Herman-Antosiewicz, A., Wrobel, B., Wegrzyn, G., Wegrzyn, A. and Los, M. 2010. Influence of the *Escherichia coli oxyR* gene function on lambda prophage maintenance. *Arch. Microbiol.* **192**: 673-683.
34. Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M. and Angulo, F. J. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.* **338**: 1333-1338.
35. Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A. and Weill, F. X. 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **161**: 26-29.
36. Haghjoo, E. and Galan, J. E. 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 4614-4619.

37. Hansen-Wester, I. and Hensel, M. 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes. Infect.* **3**: 549-559.
38. Hebrard, M., Viala, J. P., Meresse, S., Barras, F. and Aussel, L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J. Bacteriol.* **191**: 4605-4614.
39. Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P. and Molbak, K. 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 490-495.
40. Helms, M., Ethelberg, S., Molbak, K. and Group, D. T. S. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 859-867.
41. Herdman, B. P., Paton, J. C., Wang, H., Beddoe, T. and Paton, A. W. 2017. Vacuolation activity and intracellular trafficking of ArtB, the binding subunit of an AB5 toxin produced by *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect. Immun.* **85**: e00214-17.
42. Hermans, A. P., Abee, T., Zwietering, M. H. and Aarts, H. J. 2005. Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4979-4985.
43. Hiley, L., Fang, N. X., Micalizzi, G. R. and Bates, J. 2014. Distribution of Gifsy-3 and of variants of ST64B and Gifsy-1 prophages amongst *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates: evidence that combinations of prophages promote clonality. *PLoS One* **9**: e86203.
44. Hurley, D., McCusker, M. P., Fanning, S. and Martins, M. 2014. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front. Immunol.* **5**: 481.
45. Ilyas, B., Tsai, C. N. and Coombes, B. K. 2017. Evolution of *Salmonella*-host cell

- interactions through a dynamic bacterial genome. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **7**: 428.
46. Imbeault, E. and Gris, D. 2013. Assessment of oxidative metabolism. *Methods Mol. Biol.* **1031**: 51-57.
 47. 伊藤輝代. 1997. 腸管出血性大腸菌 O157 に用いる抗生物質の検討. *感染症学雑誌* **71**: 130-135.
 48. Jajere, S. M. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World* **12**: 504-521.
 49. Jobling, M. G. 2016. The chromosomal nature of LT-II enterotoxins solved: a lambdoid prophage encodes both LT-II and one of two novel pertussis-toxin-like toxin family members in type II enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Pathog. Dis.* **74**:3.
 50. Johansen, B. K., Wasteson, Y., Granum, P. E. and Brynestad, S. 2001. Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiology* **147**: 1929-1936.
 51. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. and Madden, T. L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **36**: W5-9.
 52. Kimmitt, P. T., Harwood, C. R. and Barer, M. R. 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 458-465.
 53. Kurosawa, A., Imamura, T., Tanaka, K., Tamamura, Y., Uchida, I., Kobayashi, A., Hata, E., Kanno, T., Akiba, M., Yukawa, S. and Tamura, Y. 2012. Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. *Vet. Microbiol.* **160**: 264-268.
 54. Lee, S., Lewis, D. E. A. and Adhya, S. 2018. The developmental switch in

- bacteriophage lambda: A critical role of the Cro protein. *J. Mol. Biol.* **430**: 58-68.
55. Libby, S. J., Adams, L. G., Ficht, T. A., Allen, C., Whitford, H. A., Buchmeier, N. A., Bossie, S. and Guiney, D. G. 1997. The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect. Immun.* **65**: 1786-1792.
56. Licznarska, K., Nejman-Falenczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Gasior, T., Wegrzyn, A. and Wegrzyn, G. 2016. Oxidative stress in Shiga toxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**: 3578368.
57. Littler, D. R., Ang, S. Y., Moriel, D. G., Kocan, M., Kleifeld, O., Johnson, M. D., Tran, M. T., Paton, A. W., Paton, J. C., Summers, R. J., Schembri, M. A., Rossjohn, J. and Beddoe, T. 2017. Structure-function analyses of a pertussis-like toxin from pathogenic *Escherichia coli* reveal a distinct mechanism of inhibition of trimeric G-proteins. *J. Biol. Chem.* **292**: 15143-15158.
58. Los, J. M., Los, M. and Wegrzyn, G. 2011. Bacteriophages carrying Shiga toxin genes: genomic variations, detection and potential treatment of pathogenic bacteria. *Future Microbiol.* **6**: 909-924.
59. Los, J. M., Los, M., Wegrzyn, G. and Wegrzyn, A. 2009. Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga toxins in response to different induction agents. *Microb. Pathog.* **47**: 289-298.
60. Los, J. M., Los, M., Wegrzyn, A. and Wegrzyn, G. 2010. Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**: 322-329.
61. Los, J. M., Los, M., Wegrzyn, A. and Wegrzyn, G. 2012. Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2**: 166.
62. Lou, L., Zhang, P., Piao, R. and Wang, Y. 2019. *Salmonella* pathogenicity island 1

- (SPI-1) and its complex regulatory network. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**: 270.
63. Matsushiro, A., Sato, K., Miyamoto, H., Yamamura, T. and Honda, T. 1999. Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. *J. Bacteriol.* **181**: 2257-2260.
 64. Mauro, S. A. and Koudelka, G. B. 2011. Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins* **3**: 608-625.
 65. Mei, G. Y., Tang, J., Carey, C., Bach, S. and Kostrzynska, M. 2015. The effect of oxidative stress on gene expression of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157 serotypes. *Int. J. Food. Microbiol.* **215**: 7-15.
 66. Mezal, E. H., Bae, D. and Khan, A. A. 2014. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. *Pathog. Dis.* **72**: 95-103.
 67. Miller, R. and Wiedmann, M. 2016. Dynamic Duo-The *Salmonella* cytolethal distending toxin combines ADP-ribosyltransferase and nuclease activities in a novel form of the cytolethal distending toxin. *Toxins* **8**:121.
 68. Miller, R. A. and Wiedmann, M. 2016. The cytolethal distending toxin produced by nontyphoidal *Salmonella* serotypes Javiana, Montevideo, Oranienburg, and Mississippi Induces DNA damage in a manner similar to that of serotype Typhi. *mBio* **7** : e02109-16.
 69. Miller, R. A., Betteken, M. I., Guo, X., Altier, C., Duhamel, G. E. and Wiedmann, M. 2018. The typhoid toxin produced by the nontyphoidal *Salmonella enterica* serotype Javiana is required for induction of a DNA damage response *in vitro* and systemic spread *in vivo*. *mBio* **9**: e00467-18.
 70. Moreno Switt, A. I., den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Rodriguez-Rivera, L. D., Govoni, G., Raneiri, M. L., Degoricija, L., Brown, S., Hoelzer, K., Peters, J. E., Bolchacova, E., Furtado, M. R. and Wiedmann, M. 2012. Identification and characterization of novel *Salmonella* mobile elements involved in the dissemination

- of genes linked to virulence and transmission. *PLoS One* **7**: e41247.
71. Muhldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G. T., Acheson, D. W., Tschape, H., Kane, A. V., Ritter, A., Olschlager, T. and Donohue-Rolfe, A. 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**: 495-502.
 72. 中岡祐司. 2000. 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策. *臨床獣医* **18**: 36-45.
 73. 中岡祐司. 2012. 衛生管理でサルモネラ症から牛群を守る. *臨床獣医* **30**: 15-20.
 74. 中岡祐司、立花智. 2010. 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策. *家畜診療* **57**: 279-285.
 75. 野崎千遥. 2021. *Salmonella* が産生する百日咳毒素様毒素がマクロファージ殺菌物質産生に及ぼす影響. 酪農学園大学獣医学群獣医学類 2021 年度卒業論文, 江別.
 76. O'Brien, A. D. and Holmes, R. K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* **51**: 206-220.
 77. Ogura, Y., Mondal, S. I., Islam, M. R., Mako, T., Arisawa, K., Katsura, K., Ooka, T., Gotoh, Y., Murase, K., Ohnishi, M. and Hayashi, T. 2015. The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Sci. Rep.* **5**: 16663.
 78. Overgaard, E., Morris, B., Mohammad Mousa, O., Price, E., Rodriguez, A., Cufurovic, L., Beard, R. S. and Tinker, J. K. 2021. Cellular activity of *Salmonella* Typhimurium ArtAB Toxin and Its Receptor-Binding Subunit. *Toxins* **13**: 599.
 79. Pacheco, A. R. and Sperandio, V. 2012. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front. Cell Infect Microbiol* **2**: 81.
 80. Panos, G. Z., Betsi, G. I. and Falagas, M. E. 2006. Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**: 731-742.

81. Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M. and Goodman, M. F. 2010. A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**: 171-184.
82. Plunkett, G., 3rd, Rose, D. J., Durfee, T. J. and Blattner, F. R. 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.* **181**: 1767-1778.
83. Poirier, K., Faucher, S. P., Beland, M., Brousseau, R., Gannon, V., Martin, C., Harel, J. and Daigle, F. 2008. *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infect. Immun.* **76**: 4814-4822.
84. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. and Lin, X. 2013. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinforma. Biomath.* **3**: 71-85.
85. Rodriguez-Rubio, L., Haarmann, N., Schwidder, M., Muniesa, M. and Schmidt, H. 2021. Bacteriophages of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their contribution to pathogenicity. *Pathogens* **10**.
86. Rotger, R. and Casadesús, J. 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol.* **2**:177-184.
87. Rychlik, I. and Barrow, P. A. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 1021-1040.
88. Saitoh, M., Tanaka, K., Nishimori, K., Makino, S., Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Kitano, R., Kishima, M., Sameshima, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Yokomizo, Y. and Uchida, I. 2005. The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology* **151**: 3089-3096.

89. Sameshima, T., Akiba, M., Izumiya, H., Terajima, J., Tamura, K., Watanabe, H. and Nakazawa, M. 2000. *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **53**: 15-16.
90. Schuller, S. 2011. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins* **3**: 626-639.
91. 清水 健. 2010. 腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素の発現様式と菌体外への放出機構 —志賀毒素転換ファージの構造と機能からの考察—. *日本細菌学雑誌* **65**: 297-308.
92. 品川日出夫. 1983. DNA の損傷によって誘導される SOS 応答. *化学と生物* **21**: 282-284.
93. Silva, C., Puente, J. L. and Calva, E. 2017. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathog. Dis.* **75**: 6.
94. Singh, V. 2013. *Salmonella* serovars and their host specificity. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry* **1**: 3.
95. Song, J., Gao, X. and Galan, J. E. 2013. Structure and function of the *Salmonella* Typhi chimaeric A₂B₅ typhoid toxin. *Nature* **499**: 350-354.
96. Spano, S., Ugalde, J. E. and Galan, J. E. 2008. Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe.* **3**: 30-38.
97. Sullivan, M. J., Petty, N. K. and Beatson, S. A. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**: 1009-1010.
98. Tamada, Y., Nakaoka, Y., Nishimori, K., Doi, A., Kumaki, T., Uemura, N., Tanaka, K., Makino, S. I., Sameshima, T., Akiba, M., Nakazawa, M. and Uchida, I. 2001. Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1057-1066.

99. Tamamura, Y., Tanaka, K. and Uchida, I. 2017. Characterization of pertussis-like toxin from *Salmonella* spp. that catalyzes ADP-ribosylation of G proteins. *Sci. Rep.* **7**: 2653.
100. Tamamura, Y., Uchida, I., Tanaka, K., Okazaki, H., Tezuka, S., Hanyu, H., Kataoka, N., Makino, S., Kishima, M., Kubota, T., Kanno, T., Hatama, S., Ishihara, R., Hata, E., Yamada, H., Nakaoka, Y. and Akiba, M. 2011. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 1739-1750.
101. Tanabe, T., Otani, H., Mishima, K., Ogawa, R. and Inagaki, C. 1997. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced oxyradical production in rheumatoid synovial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **73**: 347-351.
102. Tanaka, K., Nishimori, K., Makino, S., Nishimori, T., Kanno, T., Ishihara, R., Sameshima, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Yokomizo, Y. and Uchida, I. 2004. Molecular characterization of a prophage of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1807-1812.
103. Tanizawa, Y., Fujisawa, T. and Nakamura, Y. 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* **34**: 1037-1039.
104. Threlfall, E. J., Frost, J. A., Ward, L. R. and Rowe, B. 1994. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT 104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet. Rec.* **134**: 577.
105. Toshima, H., Yoshimura, A., Arikawa, K., Hidaka, A., Ogasawara, J., Hase, A., Masaki, H. and Nishikawa, Y. 2007. Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Appl Environ. Microbiol.* **73**: 7582-7588.

106. Turner, M. 2011. Phage on the rampage. *Nature*. doi.org/10.1038/news.2011.360
107. Tyler, J. S., Mills, M. J. and Friedman, D. I. 2004. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J. Bacteriol.* **186**: 7670-7679.
108. Uchida, I., Ishihara, R., Tanaka, K., Hata, E., Makino, S., Kanno, T., Hatama, S., Kishima, M., Akiba, M., Watanabe, A. and Kubota, T. 2009. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [³²P]NAD. *Microbiology* **155**: 3710-3718.
109. Unkmeir, A. and Schmidt, H. 2000. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* **68**: 4856-4864.
110. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. and Leunissen, J. A. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* **35**: W71-74.
111. Villar, R. G., Macek, M. D., Simons, S., Hayes, P. S., Goldoft, M. J., Lewis, J. H., Rowan, L. L., Hursh, D., Patnode, M. and Mead, P. S. 1999. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. *Jama* **281**: 1811-1816.
112. Wagner, P. L. and Waldor, M. K. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immun.* **70**: 3985-3993.
113. Wagner, P. L., Neely, M. N., Zhang, X., Acheson, D. W., Waldor, M. K. and Friedman, D. I. 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J. Bacteriol.* **183**: 2081-2085.
114. Waldor, M. K. and Friedman, D. I. 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 459-465.
115. Walterspiel, J. N., Morrow, A. L., Cleary, T. G. and Ashkenazi, S. 1992. Effect of

- subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular shiga-like toxin I. *Infection* **20**: 25-29.
116. Weiss, G. and Schaible, U. E. 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* **264**: 182-203.
117. Yokoyama, K., Makino, K., Kubota, Y., Watanabe, M., Kimura, S., Yutsudo, C. H., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Yoh, M., Iida, T., Ohnishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C. and Shinagawa, H. 2000. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* **258**: 127-139.
118. Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K. and Acheson, D. W. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J. Infect. Dis.* **181**: 664-670.

英文要旨

A Study on the Production Mechanism of Pertussis-like ADP-ribosylating Toxins (ArtABs) in *Salmonella* spp.

Rakuno Gakuen University, Graduate School of veterinary Medicine

Laboratory of Veterinary Bacteriology

Shou Miura

Salmonella is an intracellular pathogen that can cause bacteremia, gastroenteritis, and systemic infections in humans and animals. Numerous virulence factors contribute to *Salmonella* pathogenicity. Recently, pertussis toxin-like ADP-ribosylating toxins (ArtABs), which catalyze the ADP-ribosylation of pertussis toxin-sensitive G protein, were discovered in several *Salmonella* spp., including *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) definitive phage type 104 (DT104), *Salmonella* Worthington, and *Salmonella bongori*, and their roles in pathogenicity have attracted attention. To elucidate the production mechanism of the ArtAB toxin, this study identified the prophage encoding the ArtAB gene (*artAB*; Chapter I), analyzed the relationship between SOS-inducing substances and *artAB* expression and phage induction (Chapter 2), and investigated the expression of *artAB* in macrophages and the specific mechanism (Chapter 3).

In Chapter 1, we analyzed *artAB*-encoded prophages in *Salmonella* spp. Analysis of the whole genome sequences of DT104, *S.* Worthington, and *S.* *bongori* revealed that *artAB* is encoded by a prophage in all strains, and these were designated as Art-DT104, Art-SW, and Art-Sb, respectively. Art-DT104 and Art-SW showed relatively high homology to one another (77%), whereas Art-Sb had low homology (43%) to Art-DT104 and Art-SW, was smaller, and was identified as an incomplete phage. These results suggest that *artAB* was likely acquired by horizontal propagation of a lysogenic phage. Furthermore, *artA* and *artB* are transcribed into the same transcript in the prophage, suggesting

that they constitute a polycistronic operon.

To elucidate the mechanism of *artAB* expression induced by SOS response-inducing substances, we examined the effects of various SOS response-inducing substances on ArtAB production, the expression of *artA* and *recA*, which are involved in the SOS response, and the induction of the *artAB*-encoding prophage (Chapter 2). We found that subinhibitory concentrations of quinolone antibiotics, which are SOS-inducing agents, also induce ArtAB production in these *Salmonella* strains. Both mitomycin (MTC) and fluoroquinolone antibiotics, such as enrofloxacin, induced *artA* and *recA* transcription in DT104 and *S. Worthington*. However, in *S. bongori*, which harbors *artAB* genes on an incomplete prophage, *artA* transcription was induced by MTC and enrofloxacin, but prophage induction was not observed. Taken together, these results suggest that the SOS-response, followed by induction of *artAB* transcription, is essential for ArtAB production. H₂O₂-mediated induction of ArtAB prophage and efficient production of ArtAB were observed in DT104 but not in *S. Worthington* and *S. bongori*. Therefore, induction of *artAB* expression with H₂O₂ is strain-specific, and the mode of action of H₂O₂ as an SOS-inducing agent might be different from those of MTC and quinolone antibiotics.

There is little information on the expression of *artAB in vivo*. Therefore, in Chapter 3 we report the investigations on the expression of *artAB in vivo*; we infected macrophage-like RAW264.7 cells with DT104 and analyzed the expression of *artAB* in these cells. A significant increase in *artAB* transcription of DT104 was observed within macrophage-like RAW264.7 cells. The intracellular expression of ArtAB was also observed by immunofluorescence staining. Induced expression of *artAB* in DT104 and *S. bongori* was enhanced by treatment of RAW264.7 cells with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), which stimulates the production of reactive oxygen species (ROS); however, this induction was not observed in *S. Worthington*. Upregulation of *oxyR*, a major regulator of oxidative stress, and *cI*, a repressor of prophage induction, was observed in *S. Worthington* cells treated with PMA but not in the DT104 strain. Although the expression of *oxyR* increased, *artAB* was upregulated in *S. bongori*, which lacks the *cI* gene in the incomplete *artAB*-encoded prophage. Taken

together, these results suggest that changes in *cI* gene expression, in combination with upregulation of *oxyR* through the effects of oxidative stress, would lead to the maintenance of the prophage by an abundant cI repressor, and induced expression of *artAB* does not occur in *S. Worthington*. Therefore, strain variation in the *artAB* expression levels within macrophages could be explained by differences in the oxidative stress response of bacteria and may be reflected in its virulence.

This study revealed that the expression of *artAB* by an *artAB*-encoded prophage is induced via the SOS response pathway upon stimulation with SOS-inducing substances. This study also indicates that *artAB* expression in macrophages is induced by ROS, such as H₂O₂, which is also an SOS inducer. The results presented in this study will provide basic knowledge for elucidating the role of the ArtAB toxin as a virulence factor in *Salmonella* and will lead to the development and improvement of diagnostic, preventive, and therapeutic methods for salmonellosis.