

サルモネラ菌の外膜リモデリングと宿主応答

川崎 清史

Outermembrane Remodeling of *Salmonella typhimurium* and Host Innate Immunity

Kiyoshi KAWASAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College, Kodo, Kyotanabe City, Kyoto 610-0395, Japan

(Received July 13, 2006)

Pathogenic gram-negative bacteria, including *Salmonella typhimurium*, remodel their outer membrane to survive within host tissues and phagosomes. The remodeling includes modifications of lipid A, a membrane anchor portion of lipopolysaccharide. Lipid A modifications, such as palmitoylation, deacylation, addition of aminoarabinose, and addition of phosphoethanolamine, are beneficial for salmonellae to resist host innate immunity. Aminoarabinose attachment, phosphoethanolamine attachment, and palmitoylation of lipid A increase salmonellae resistance to cationic antimicrobial peptides. Lipid A deacylation and palmitoylation reduce its ability to activate the Toll-like receptor 4-MD-2 complex, suggesting that these modifications are beneficial for salmonellae to evade host innate immune recognition. These modifications are regulated transcriptionally by the two-component regulatory system PhoP-PhoQ, which is essential for *S. typhimurium* virulence. Lipid A modifications are also regulated posttranslationally. Aminoarabinose modification of lipid A represses deacylation of lipid A by PagL. The posttranslational regulation may be involved in *S. typhimurium* pathogenesis.

Key words—lipopolysaccharide; lipid A; PhoP-PhoQ; Toll-like receptor 4; antimicrobial peptide

1. はじめに

古くから細胞表層が微生物の病原性と深い係わりを持つことが知られている。例えば、多糖類からなる莢膜を持つ S 型肺炎双球菌の病原性は高いのに対し、莢膜を持たない R 型肺炎双球菌の病原性は低い。このことは Avery らが形質転換にこの細菌を用いた例でも有名である。また、結核菌などのマイコバクテリアは表層のミコール酸が宿主免疫系に対する抵抗性を増強する。グラム陰性細菌の細菌表層はリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) で覆われている。本稿ではこの LPS と宿主の自然免疫認識応答の係わりに焦点を当てる。そして特にサルモネラ菌の行う LPS の修飾の意義について宿主自然免疫応答との係わりを解説・考察する。

2. グラム陰性菌の細胞表層とリポポリサッカライド

グラム陰性菌の細胞膜は内膜と外膜の二重膜で形成されている。その構造の模式図を Fig. 1 に示す。リン脂質とタンパク質で構成される内膜の外側にペプチドグリカン層があり、その外側を外膜が覆っている。外膜は外側がポーリンなどのタンパク質が存在する場所以外は LPS で覆われているのに対して内側はホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質で覆われている。この非対称性は外膜の特徴の 1 つである。外膜は細菌にとって必要なものを透過させると同時に、不要なものや有害なものの侵入阻止あるいは排出を行う役割を担っている。¹⁾

LPS はグラム陰性菌に特徴的に存在する糖脂質である。²⁾ LPS の構造は O 抗原と呼ばれる多糖の繰り返し構造、コアと呼ばれる膜近くのオリゴ糖構造、そして lipid A と呼ばれる膜アンカー部分の脂質構造に分類できる。O 抗原の構造は非常に多様であり、菌株の抗原型別に利用されている。³⁾ 大腸菌では O 抗原欠損は致死ではないが、lipid A 欠損株は致死的事から lipid A が細菌の生存に

同志社女子大学薬学部 (〒610-0395 京都府京田辺市興戸)

e-mail: kkawasak@dwc.doshisha.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S5 で発表したものを中心に記述したものである。

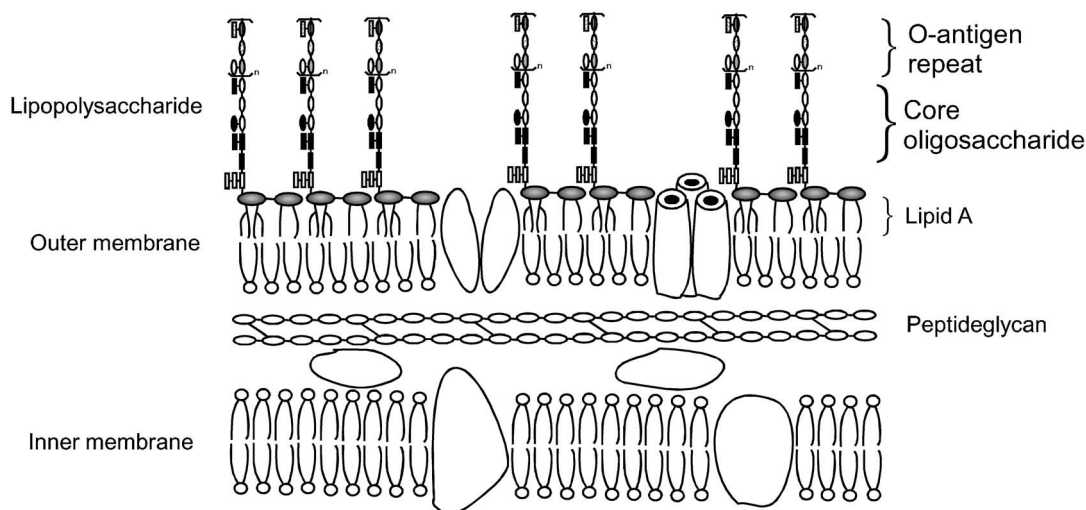


Fig. 1. Membrane Structure of Gram-negative Bacteria

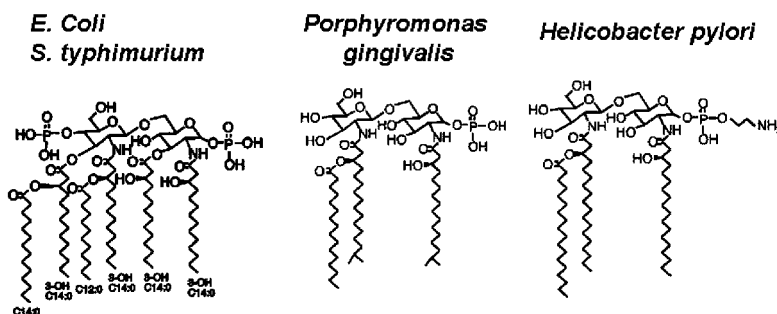


Fig. 2. Structures of Lipid A

必須であることが示されている。後述するが、lipid A はエンドトキシンの本体であり、微量で宿主の免疫系に作用し、炎症応答などを引き起こす。大腸菌 lipid A 基本骨格の生合成系を触媒する酵素は特に Raetz らによる一連の研究の結果、ほぼすべてが明らかになっている。²⁾ しかし、lipid A の構造は菌種間で異なっている。例えば近縁の大腸菌とサルモネラ菌では基本構造は同じだが、大腸菌と胃潰瘍の原因菌である *Helicobacter pylori*,⁴⁾ あるいは歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis*⁵⁾ とでは大きく異なる (Fig. 2)。しかし、*H. pylori* と *P. gingivalis* のゲノムデータベースを検索してみると、大腸菌 lipid A の基本骨格を合成するのに必要な酵素はすべてこれらの菌でも保存されていることが分かる。したがって、*H. pylori* と *P. gingivalis* の lipid A 構造はいったん大腸菌型の lipid A が合成されたのちに、*H. pylori* と *P. gingivalis* 独自の持つ酵素によって修飾を受けることにより形成され

ると考えられる。*H. pylori* と *P. gingivalis* の lipid A はエンドトキシン活性が極めて低いことが知られている。この低毒性はこれらの病原菌が宿主免疫監視を逃れて持続的感染を成立させるために必要であると考えられている。

3. サルモネラ菌 LPS 修飾と二成分制御系

サルモネラ菌では生育環境に応答して LPS が修飾を受けることが知られている。⁶⁾ この LPS 修飾に深く係わるのが二成分制御系 (two-component regulatory system) の 1 つ、PhoP-PhoQ である (Fig. 3)。⁷⁾ まず、二成分制御系 PhoP-PhoQ について概説する。二成分制御系は原核生物に多くみられるシステムであり、膜のセンサーキナーゼが刺激により活性化されると転写因子をリン酸化により活性化し、転写活性化あるいは転写抑制により刺激に応答するシステムである。PhoP-PhoQ は欠損するとマウス感染モデルに対する病原性が著しく低下することで注目された。⁸⁾ これまでに 40 以上の制御遺伝子

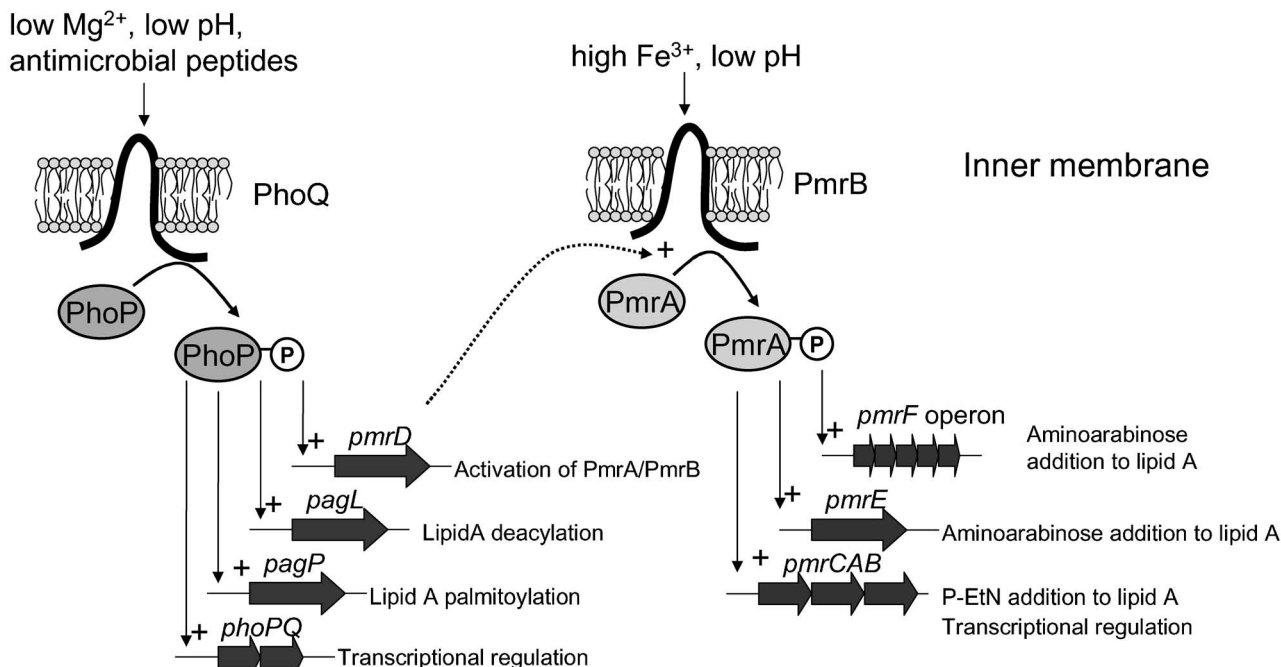


Fig. 3. PhoP-PhoQ-regulated Expression of Genes Involved in LPS Modifications

が同定されている。これらのうち転写活性化を受けるものは *pag* (PhoP-PhoQ-activated gene) と名付けられ、逆に転写抑制を受けるものは *prg* (PhoP-PhoQ-repressed gene) と名付けられている。LPS 修飾に係わる遺伝子群は PhoP-PhoQ により転写活性化を受ける遺伝子のうちで一大グループを形成している。

PhoP-PhoQ によって調節される LPS 修飾をその修飾に係わる遺伝子とともに Fig. 4 にまとめた。⁹⁾ 順に修飾をみていくと、PhoP-PhoQ 活性化により、1) O 抗原のリピート数が減少する、2) *lpxO* の働きにより脂肪酸が水酸化を受ける、¹⁰⁾ 3) 脱アシル化酵素 PagL の働きにより脱アシル化を受ける、¹¹⁾ 4) パルミチル基転移酵素 PagP の働きによりパルミチル化を受ける。^{12,13)} 以上が PhoP-PhoQ に直接制御されている修飾である。PhoP-PhoQ はさらに別の二成分制御系 PmrA-PmrB を活性化することにより PmrA-PmrB によって活性化される LPS 修飾も誘導している (Fig. 3)。それらは 5) PmrE, PmrF オペロンの働きによるリン酸基のアミノアラビノース修飾、¹⁴⁾ 6) PmrC によるリン酸基のホスホエタノールアミン修飾、¹⁵⁾ 7) CptA によるコアオリゴ糖部位のホスホエタノールアミン修飾、¹⁶⁾ である。

このような LPS 修飾はサルモネラ菌だけに存在するのではない。類似の生育環境に応答した LPS 修飾は例えばペスト菌、¹⁷⁾ 緑膿菌、¹⁸⁾ 大腸菌¹⁹⁾ でも知られている。このことは修飾の内容に差はあるが、LPS 修飾によって環境に適応する機構は細菌に普遍に存在する仕組みであることを示唆している。次に、それぞれの LPS 修飾がサルモネラの病原性に与える影響について明らかにされてきたことを述べる。

4. 抗菌ペプチド抵抗性と LPS 修飾

抗菌ペプチドは細菌から昆虫、哺乳動物に至るまで幅広い生物種で存在が認められる自然免疫系攻撃因子である。マウスへのサルモネラ菌感染においても腸内の抗菌ペプチドであるデフェンシンが生体防御に重要な働きをしていることが示されている。²⁰⁾ 抗菌ペプチドの構造は様々であるが抗菌活性に必須な共通した2つの性質を持つことが知られている。1つは陽性電荷を持ったアミノ酸が集まった領域を持つことである。もう1つは疎水性の領域を持つことである。²¹⁾

一般に細菌表面はマイナスに荷電している。LPS の lipid A 部位のリン酸基もマイナス荷電に係わっている。抗菌ペプチドの陽性電荷領域は細菌表面のマイナス荷電を標的とする。さらに抗菌ペプチドの

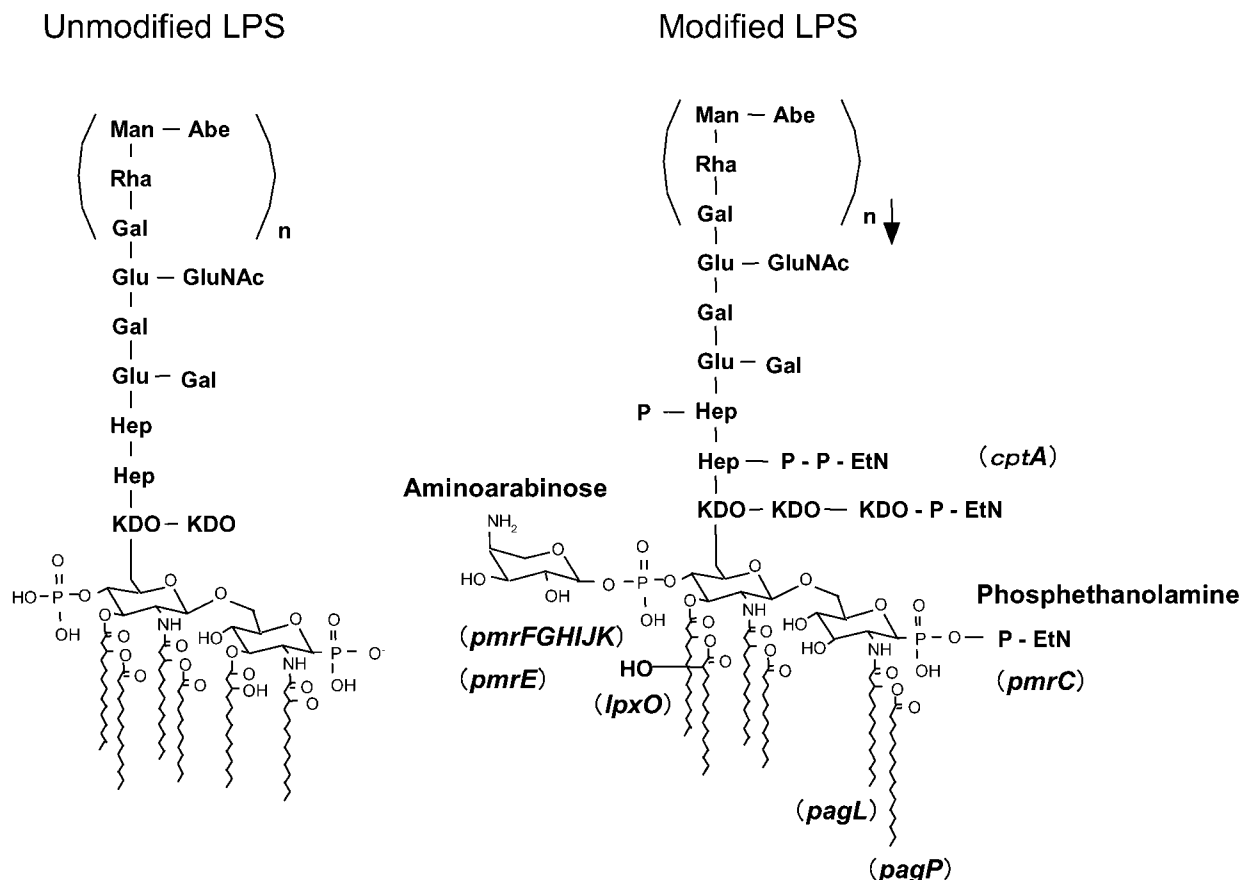


Fig. 4. PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB-regulated LPS Modifications

Numbers of O-antigen repeat, hydroxylation, 3-O-deacylation, and palmitoylation, were regulated by PhoP-PhoQ. PhoP-PhoQ activates another two-component regulatory system PmrA-PmrB. Aminoarabinose addition and phosphoethanolamine addition were regulated by PmrA-PmrB. Genes involved in the modifications were shown in parentheses.

疎水性領域は細菌表層から細菌内部へ抗菌ペプチドが侵入していくために必要である。²¹⁾ この抗菌ペプチドの作用モデルを Fig. 5 にまとめた。

サルモネラ菌の抗菌ペプチド抵抗性に関する研究はポリミキシンという細菌由来の抗菌ペプチドを利用してよく研究されている。ポリミキシンには陽性電荷を持ったアミノ酸領域と疎水性の脂肪酸がある。LPS 修飾のうち、lipid A のアミノアラビノース修飾は抗菌ペプチド抵抗性を増強する。この理由はアミノ基の陽電荷を持つアミノアラビノースが LPS に付加すると膜の荷電状態が変化するので抗菌ペプチドが膜を標的とし難くなるからだと考えられている (Fig. 5)。ちなみに前述の二成分制御系 PmrA-PmrB の Pmr はポリミキシン抵抗性 (Polymyxin resistance) に由来する。²²⁾ これらはポリミキシン耐性に係わる遺伝子とし同定された。

また、lipid A のパルミチル化によっても抗菌ペ

プチド抵抗性が増強することが知られている。¹³⁾ パルミチル化によって膜の疎水性が上昇し、その結果抗菌ペプチドが膜の中に侵入し難くなるのが原因と考えられている (Fig. 5)。

抗菌ペプチドに対する抵抗性の獲得は感染初期に大切である。サルモネラは PhoP-PhoQ により感染環境を認識・応答して適切な LPS 修飾を行うことにより抗菌ペプチド抵抗性を増強していると考えられる。

5. Toll-like Receptor 4 刺激伝達と LPS 修飾

先の *H. pylori* と *P. gingivalis* の lipid A の項でも述べたように、細菌が宿主に対して感染を成立させるためには宿主免疫系による監視から逃れることが大切だと考えられる。近年の自然免疫系の研究成果によって、Toll-like receptor (TLR) が LPS を含めた微生物成分の認識に係わることが解明された。²³⁾ ここではまず TLR による微生物成分認識に

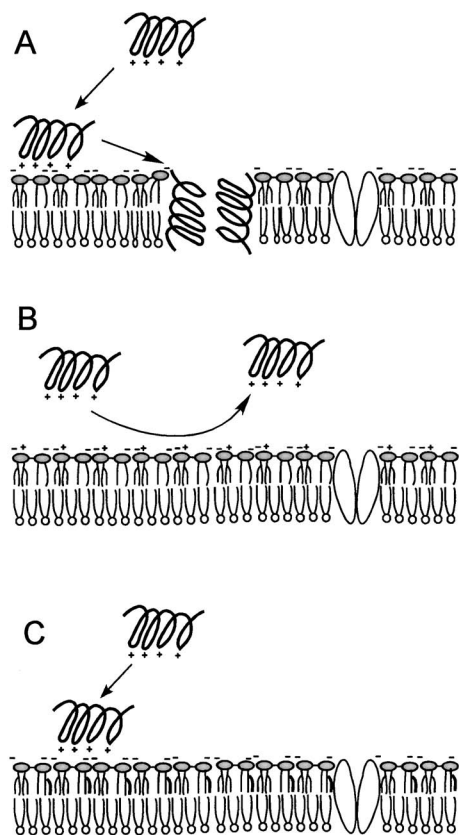


Fig. 5. Models for Interaction between Cationic Antimicrobial Peptide and Bacterial Membrane

A) Cationic region of antimicrobial peptide binds to negatively charged bacterial membrane. After binding, antimicrobial peptide penetrates into bacterial membrane using hydrophobic region. B) Alteration of bacterial membrane charge protects bacteria from attack of cationic antimicrobial peptide. C) Increase of membrane hydrophobicity by addition of fatty acid to lipid A protects penetration of antimicrobial peptide into membrane.

について概説する。

ヒトの場合、TLR1—10が同定されて研究が進められている。これら受容体はその存在部位の違いから2つのグループに分類できる。1つは細胞表面に存在するグループであり、TLR1, 2, 4, 5, 6が該当する。もう一方はファゴソームなどの細胞内に存在するグループで、TLR3, 7, 8, 9が該当する。²³⁾ これらの存在部位とリガンドについてFig. 6にまとめた。存在部位とリガンドとの係わりで興味深いことは、細胞表面に存在するTLRのリガンドは微生物表層成分であることである。宿主免疫系が監視をする対象として微生物特有に存在する表層成分を選択していると考えられる。LPSの受容体はTLR4-MD2複合体である(Fig. 6)。²⁴⁾ LPSの生物活性を担うlipid Aの構造は前述したように菌種により異なる。LPSの生物活性の差の原因はTLR4-MD-2

複合体に対するアゴニスト活性の差が原因である。^{25—27)}

Lipid Aの構造のうち脂肪酸部位は活性に大きな影響を与える。したがってサルモネラ菌の脂肪酸修飾はlipid Aの活性を調節する可能性が考えられた。そこでサルモネラ菌のlipid Aの脂肪酸修飾がTLR4-MD2複合体による認識に与える影響について解析した。サルモネラには脂肪酸修飾に係わる酵素として脱アシル化酵素PagL¹¹⁾とパルミチル化酵素PagP¹²⁾が同定されている。したがってFig. 7に示すように修飾を受けていないものも含めて4種類のlipid Aが存在し得る。そこで、PagL又はPagPあるいはPagLとPagP両方を発現させることにより修飾型lipid Aを細菌内で作らせて、その後精製を行い修飾型lipid A精製標品を得た。この精製標品の活性を測定する細胞としてLPS不応答製の細胞にTLR4とMD-2を強制発現させてLPS応答性を獲得させた細胞株を利用した。結果をFig. 8に示す。非修飾型(U-lipid A)と比べて修飾型(D-, P-, あるいはDP-lipid A)はいずれも活性が30—100倍程度低下していた。したがってPagLやPagPによる修飾によってサルモネラは宿主TLR4-MD2複合体による免疫監視から逃れ易くなることが示唆された。²⁸⁾

6. LPS修飾の制御

先に二成分制御系PhoP-PhoQについて概説した。ここではPhoP-PhoQによるLPS修飾酵素の遺伝子発現制御についてまず概説する。Figure 3にまとめたが、PhoP-PhoQは様々な環境因子によって活性化される。実験的によく利用されているのが低マグネシウム培地である。²⁹⁾ このほか低pH、抗菌ペプチドによっても活性化される。³⁰⁾ 恐らくセンサーキナーゼPhoQは膜の荷電の状態を感知して活性を調節すると考えられる。³¹⁾ PhoP-PhoQが活性化されるとLPS修飾に係わる遺伝子としてはPagLとPagPが発現誘導され、実際に*in vitro*での酵素活性が増加していることが示されている。このほかPmrDと名付けられた因子の活性化が起こりこの因子の働きで別の二成分制御系PmrA-PmrBの活性化が引き起こされる。³²⁾ すなわち、PhoP-PhoQが活性化すると別の二成分制御系PmrA-PmrBの活性化も引き起こされる。PmrA-PmrBはPhoP-PhoQ活性化とは別に培地中の鉄イオンによ

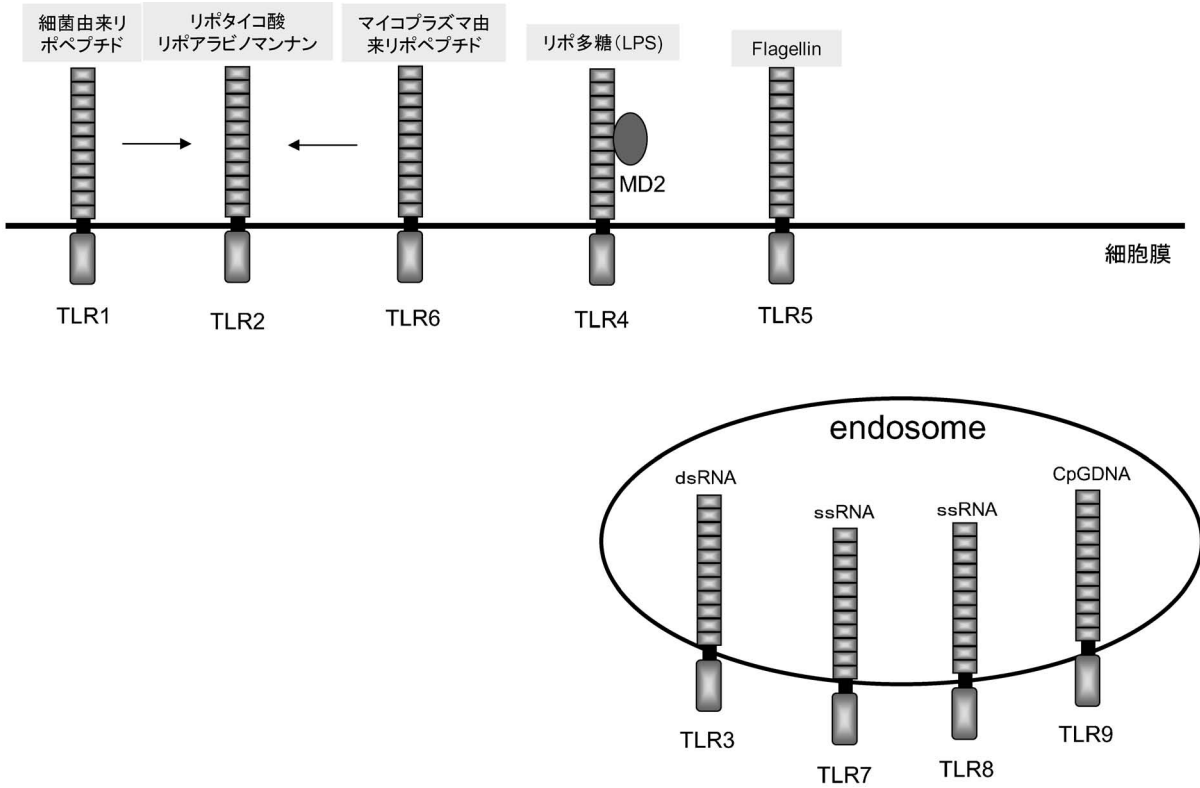


Fig. 6. Localization of Toll-like Receptors and Their Ligands

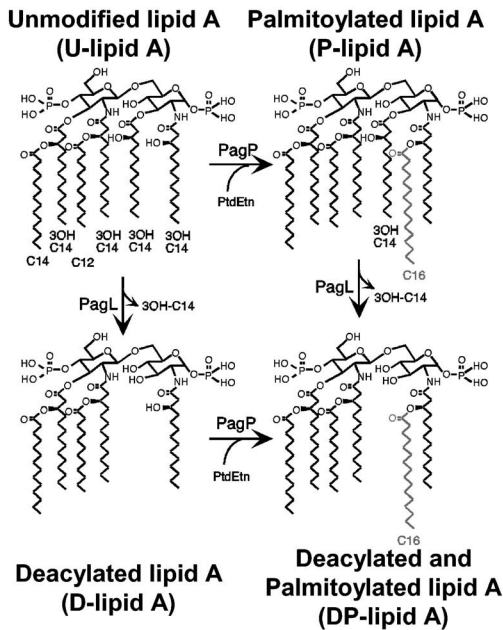


Fig. 7. Structures of *S. typhimurium* Lipid A Modified by PagL and/or PagP

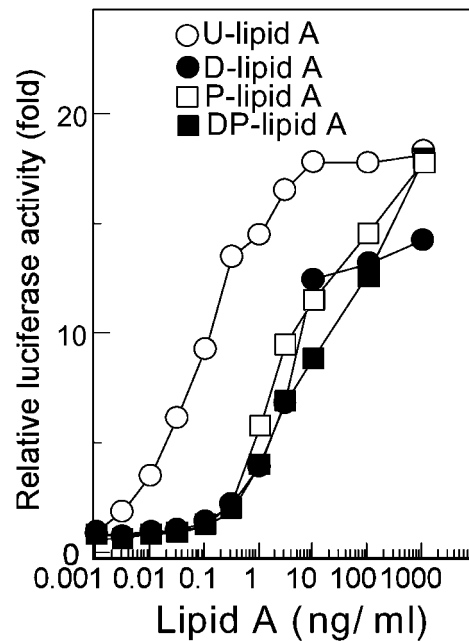


Fig. 8. 3-O-Deacylated and/or Palmitoylated Lipid A Species Show Decreased Ability to Induce NF- κ B Activation through TLR4

Structures of U-lipid A, D-lipid A, P-lipid A, or DP-lipid A were shown in Fig. 7. LPS-unresponsive Ba/F3 cell line was conferred LPS-responsiveness by expression of human TLR4 and human MD-2. NF- κ B activation was measured by luciferase reporter activation.

っても活性化される。³³⁾ PmrA-PmrB 活性化によって, lipid A のアミノアラビノース修飾に係わる遺伝子群 (*pmrE*, *pmrF* オペロン) とホスホエタノールアミン修飾に係わる遺伝子 (*pmrC*) の発現が誘導される。^{14,15)} LPS 修飾にはこのような遺伝子発現レベルでの制御が大切な役割をしている。一方で, 転写後の活性制御もなされていて, 興味深い知見が得られている。次に転写後の活性制御について例を挙げて説明する。

先述の lipid A 脱アシル化酵素 PagL は PhoP-PhoQ によって誘導される酵素であるが, PhoP-PhoQ が活性化している条件下でも野性株では PagL による脱アシル化は認められない。^{11,34)} ところが, lipid A のアミノアラビノース修飾欠損株では PhoP-PhoQ 活性化条件下で PagL による脱アシル化が起こる (Fig. 9)。³⁴⁾ 野性株とアミノアラビノース修飾欠損株とでは PagL タンパクの発現量に違いはない。この現象の意義としてアミノアラビノース欠損によって失われる機能を相補するために普段は行わない脱アシル化を行うと都合がよい。これと類似した現象が報告されている。PmrA が恒常的に活性化している変異株では lipid A の多くがアミノアラビノースで修飾をされているのに対してホスホエタノールアミンではあまり修飾されていない。この株にアミノアラビノース修飾に必須な遺伝子の欠損を導入することにより, lipid A アミノアラビノース修飾が起こらないようにすると, lipid A ホスホエタノールアミン修飾が多くみられるようになる。³⁵⁾ アミノアラビノース修飾は以前よりサルモネラの抗菌ペプチド耐性に係わることが示されてきた。^{14,36)} したがって lipid A アミノアラビノース修飾欠損株は抗菌ペプチド感受性である。ホスホエタノールアミン修飾によってもサルモネラ菌の抗菌ペプチド抵抗性が增强するので,¹⁵⁾ アミノアラビノース修飾欠損株でみられたホスホエタノールアミン修飾の増加は抗菌ペプチド抵抗性の現象を相補する働きがあると推察される。このように機能的に lipid A 修飾のバランスが取られる調節機構は全く未解明の問題である。

7. おわりに

本稿ではサルモネラ菌 LPS 修飾に着目して自然免疫応答と LPS 修飾の係わりについて, 細菌の側からの視点で概説した。宿主は感染細菌を排除する

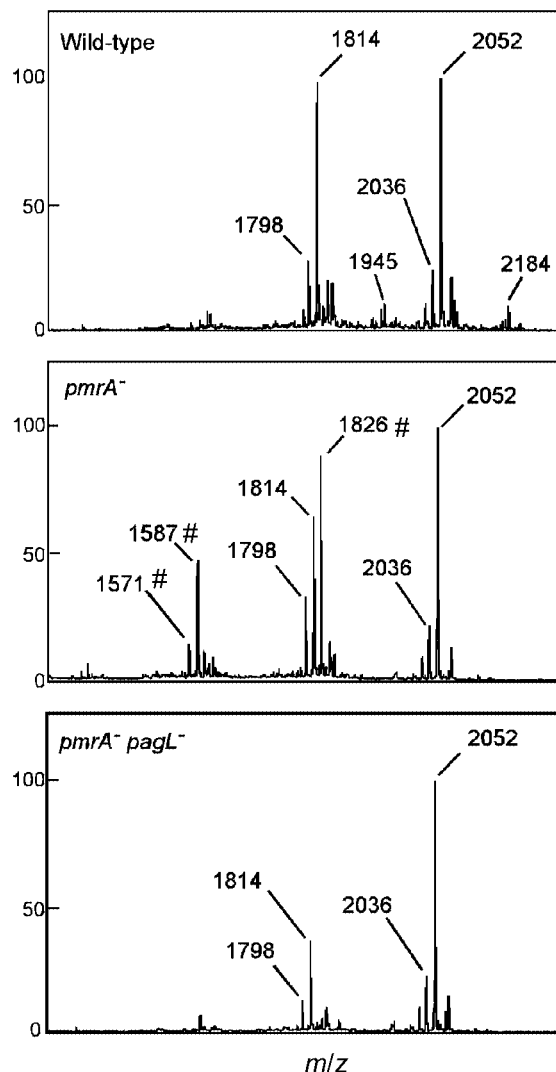


Fig. 9. Lipid A Deacylation was Observed *pmrA*-null Mutant Strain, but not in Wild-type Strain

Lipid A prepared from *S. typhimurium* wild-type, *pmrA*-null, *pmrA* and *pagL*-null strains were analyzed by MALDI-TOF MS. *m/z* values corresponding to deacylated lipid A species were indicated with sharp (#).

ために様々な機構を持っている。それに対して細菌は巧みな方法で自らの姿形を変えて宿主自然免疫から逃れる, 一種の生体防御機構を備えている。このような細菌の生体防御の関与も含めて宿主自然免疫認識応答を見直すことによりまた新しい知見が得られてくると考えている。

REFERENCES

- 1) Nikaido H., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 593–656 (2003).
- 2) Raetz C. R., Whitfield C. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 635–700 (2002).

- 3) Beutler B., Rietschel E. T., *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 169–176 (2003).
- 4) Suda Y., Ogawa T., Kashihara W., Oikawa M., Shimoyama T., Hayashi T., Tamura T., Kusumoto S., *J. Biochem. (Tokyo)*, **121**, 1129–1133 (1997).
- 5) Ogawa T., *FEBS Lett.*, **332** (1–2), 197–201 (1993).
- 6) Guo L., Lim K. B., Gunn J. S., Bainbridge B., Darveau R. P., Hackett M., Miller S. I., *Science*, **276**, 250–253 (1997).
- 7) Groisman E. A., *J. Bacteriol.*, **183**, 1835–1842 (2001).
- 8) Miller S. I., Kukral A. M., Mekalanos J. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5054–5058 (1989).
- 9) Ernst R. K., Guina T., Miller S. I., *Microbes Infect.*, **3**, 1327–1334 (2001).
- 10) Gibbons H. S., Lin S., Cotter R. J., Raetz C. R., *J. Biol. Chem.*, **275**, 32940–32949 (2000).
- 11) Trent M. S., Pabich W., Raetz C. R., Miller S. I., *J. Biol. Chem.*, **276**, 9083–9092 (2001).
- 12) Bishop R. E., Gibbons H. S., Guina T., Trent M. S., Miller S. I., Raetz C. R., *EMBO J.*, **19**, 5071–5080 (2000).
- 13) Guo L., Lim K. B., Poduje C. M., Daniel M., Gunn J. S., Hackett M., Miller S. I., *Cell*, **95**, 189–198 (1998).
- 14) Gunn J. S., Lim K. B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S. I., *Mol. Microbiol.*, **27**, 1171–1182 (1998).
- 15) Lee H., Hsu F. F., Turk J., Groisman E. A., *J. Bacteriol.*, **186**, 4124–4133 (2004).
- 16) Tamayo R., Choudhury B., Septer A., Merighi M., Carlson R., Gunn J. S., *J. Bacteriol.*, **187**, 3391–3399 (2005).
- 17) Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Lindner B., Matsuura M., *Infect. Immun.*, **70**, 4092–4098 (2002).
- 18) Ernst R. K., Yi E. C., Guo L., Lim K. B., Burns J. L., Hackett M., Miller S. I., *Science*, **286**, 1561–1565 (1999).
- 19) Zhou Z., Lin S., Cotter R. J., Raetz C. R., *J. Biol. Chem.*, **274**, 18503–18514 (1999).
- 20) Salzman N. H., Ghosh D., Huttner K. M., Paterson Y., Bevins C. L., *Nature*, **422**, 522–526 (2003).
- 21) Zasloff M., *Nature*, **415**, 389–395 (2002).
- 22) Helena Makela P., Sarvas M., Calcagno S., Lounatmaa K., *FEMS Microbiol. Lett.*, **3**, 323–326 (1978).
- 23) Kawai T., Akira S., *Curr. Opin. Immunol.*, **17**, 338–344 (2005).
- 24) Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M., *J. Exp. Med.*, **189**, 1777–1782 (1999).
- 25) Kawasaki K., Akashi S., Shimazu R., Yoshida T., Miyake K., Nishijima M., *J. Biol. Chem.*, **275**, 2251–2254 (2000).
- 26) Akashi S., Nagai Y., Ogata H., Oikawa M., Fukase K., Kusumoto S., Kawasaki K., Nishijima M., Hayashi S., Kimoto M., Miyake K., *Int. Immunol.*, **13**, 1595–1599 (2001).
- 27) Hajjar A. M., Ernst R. K., Tsai J. H., Wilson C. B., Miller S. I., *Nat. Immunol.*, **3**, 354–359 (2002).
- 28) Kawasaki K., Ernst R. K., Miller S. I., *J. Biol. Chem.*, **279**, 20044–20048 (2004).
- 29) Garcia Vescovi E., Soncini F. C., Groisman E. A., *Cell*, **84**, 165–174 (1996).
- 30) Bader M. W., Navarre W. W., Shiao W., Nikaido H., Frye J. G., McClelland M., Fang F. C., Miller S. I., *Mol. Microbiol.*, **50**, 219–230 (2003).
- 31) Bader M. W., Sanowar S., Daley M. E., Schneider A. R., Cho U., Xu W., Klevit R. E., Le Moual H., Miller S. I., *Cell*, **122**, 461–472 (2005).
- 32) Kato A., Latifi T., Groisman E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 4706–4711 (2003).
- 33) Wosten M. M., Kox L. F., Chamnongpol S., Soncini F. C., Groisman E. A., *Cell*, **103**, 113–125 (2000).
- 34) Kawasaki K., Ernst R. K., Miller S. I., *J. Bacteriol.*, **187**, 2448–2457 (2005).
- 35) Zhou Z., Ribeiro A. A., Lin S., Cotter R. J., Miller S. I., Raetz C. R., *J. Biol. Chem.*, **276**, 43111–43121 (2001).
- 36) Nummila K., Kilpelainen I., Zahringer U., Vaara M., Helander I. M., *Mol. Microbiol.*, **16**, 271–278 (1995).