

自己評価報告書

平成23年 4月25日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20390122

研究課題名 (和文) 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンファミリーの多機能性の解析とその意義

研究課題名 (英文) Analysis of multi-functions of staphylococcal enterotoxin family and their significance

研究代表者

中根 明夫 (NAKANE AKIO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30164239

研究分野：細菌学・免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：ブドウ球菌エンテロトキシン・スーパー抗原・嘔吐活性・感染・IL-17・TSST-1・SEA

1. 研究計画の概要

黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシン (SE) は現在21種類報告あり、多彩なSEは黄色ブドウ球菌の生き残りにとって必須な分子群と考えられる。本申請者らのこれまでの研究で、SEは感染において炎症誘導だけではなく、複数の機序によって感染成立に関与している可能性が示唆される。そこで、本研究ではその機序を解明する。また、まだその分子機序が明らかではないSEAの嘔吐誘導活性の分子機序についても解明する。

本研究を遂行するために、研究材料としてはSEA、SEC、TSST-1のスーパー抗原活性欠損 mutant タンパク質およびSEC、TSST-1遺伝子ノックアウト黄色ブドウ球菌を作製する。これらの材料を用いて、生体レベルおよび細胞レベル (腸管上皮細胞、マクロファージ、樹状細胞) における宿主への定着 (付着・増殖)、宿主細胞刺激におけるシグナル伝達系の解析を行い、黄色ブドウ球菌感染の成立・誘導におけるスーパー抗原毒素の役割を解明する。並行して、SEAの嘔吐誘導活性部位の同定とスーパー抗原活性との関係について明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) SEC あるいは TSST-1 遺伝子を持ち、かつ毒素を産生する菌株を用い、シャトルカセットベクターを設計・構築し、スーパー抗原毒素遺伝子をそれぞれノックアウトした isogenic mutant 株を作製した。SEC ノックアウト株はマウスにおける致死率に影響を及ぼさなかった。一方、TSST-1 遺伝子ノックアウト株では野生株の黄色ブドウ球菌に比べ致死率の低下を示した。感染マウスの臓器中生

菌数を両株で比較したが、肝臓・脾臓・腎臓における生菌数に有意差は認められず、臓器レベルの菌の増殖によりビルレンスの差が生じているわけではないことが示唆された。同様に、上皮細胞に対する菌の付着能・侵入能にも両株で差異は認められなかった。

(2) 上皮細胞を用いて黄色ブドウ球菌感染によるオートファジーの誘導について検討したところ、野生株に比べ TSST-1 遺伝子ノックアウト株感染でオートファゴソームの形成が高かった。また、遺伝子組換え TSST-1 を上皮細胞に作用させ、野生株を感染させたところ、TSST-1 処理細胞でオートファゴソームの形成が減少していた。これらの結果は、TSST-1 がオートファジーの制御に働いている可能性を示唆している。

(3) 黄色ブドウ球菌の付着分子である Clumping factor A (ClfA) の遺伝子を発現ベクター pGEX-6p-1 にクローニングし、GST fusion protein system により ClfA タンパク発現系を構築し、これらの組換えタンパクを作製した。遺伝子組換え ClfA をマウスに免疫し、黄色ブドウ球菌感染に対する防御効果とメカニズムを検討したところ、致死量の黄色ブドウ球菌感染に対し抵抗性を獲得するが、IL-17A ノックアウトマウスでは免疫による感染抵抗性は見られず、ClfA 免疫による感染抵抗性は IL-17 に依存していることが示唆された。

(4) 同様に、黄色ブドウ球菌の付着分子である fibronectin binding protein A (FnBPA) の遺伝子組換えタンパク質を作製し、そのワクチン効果を調べたところ、黄色ブドウ球菌感染に対する防御効果が示された。

(5) SEA、SEC、TSST-1 の嘔吐・下痢誘導活性

を *in vivo* で検討するため、嘔吐活性はスunksへの投与実験、下痢活性はスunksおよびウサギ腸管結紮ループ実験を行った。SEA および SEC は嘔吐活性を示したが、下痢誘導活性を示さなかった。

(6) SEA の嘔吐誘導活性とスーパー抗原活性の活性部位の異同を検討するため、スーパー抗原活性欠損 mutant SEA (mSEA) および SEA をスunksに経口あるいは腹腔内投与し、mSEA と SEA の嘔吐活性とスーパー抗原活性を比較検討したところ、SEA のこの二つの活性部位が完全に一致していないことが示唆された。

(7) SEA のヒト腸管上皮細胞および神経細胞との結合性を免疫蛍光染色から明らかとなった。さらに、SEA 刺激による神経細胞遺伝子発現の変化についてマイクロアレイを行った。現在、刺激により増減した分子とその意義を解析中である。

(8) スunksの腸管ホモジネートを用いて SEA と結合するタンパク質をプルダウン法により単離しアミノ酸末端配列を解析した。現在ホモロジーを示す候補タンパク質の絞り込みを行っている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

エンテロトキシンファミリー分子のうち、SEA の嘔吐誘導活性機序と TSST-1 の感染における役割について新知見を見いだした。

4. 今後の研究の推進方策

進展した研究のうちエンテロトキシンの黄色ブドウ球菌感染における役割の研究は、平成 23 年度基盤研究 (B) 「エンテロトキシンファミリーのプレッシャーによる黄色ブドウ球菌感染戦略の解明」として、最終年度前年度応募課題として採択されたので、新たな研究プロジェクトとして推進したい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Omoe K, Nunomura W, Kato H, Li Z-J, Igarashi O, Araake M, Sano K, Ono HK, Abe Y, Hu D-L, Nakane A, Kiyono H, Takakura Y, Shinagawa K, Uchiyama T, Imanishi KI. High affinity of interaction between superantigen and TCRV β molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4⁺ T cells. *J Biol Chem* 285: 30427-30435, 2010, 査読有
- ② Narita K, Hu D-L, Mori F, Wakabayashi K, Iwakura Y, Nakane A. Role of interleukin-17A in cell-mediated protection against

Staphylococcus aureus infection in mice immunized with the fibronectin-binding domain of clumping factor. *Infect Immun* 78: 4234-4242, 2010, 査読有

- ③ Hu D-L, Narita K, Hyodo M, Hayakawa Y, Nakane A, Karaolis DKR. c-di-GMP as vaccine adjuvant enhances protection against systemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *Vaccine* 27: 4867-4873, 2009, 査読有

- ④ Hu D-L, Omoe K, Sashinami H, Shinagawa K, Nakane A. Immunization with a nontoxic mutant of staphylococcal enterotoxin A, SEA D227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. *J Infect Dis* 199: 302-310, 2009, 査読有

- ⑤ Hu D-L, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, Nakane A. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 57(9):1106-1112, 2008, 査読有 [学会発表] (計 4 件)

- ① Narita K, Hu D-L, Nakane A. The role of IL-17A in the cell-mediated immunity induced by an immunization with clumping factor A against *Staphylococcus aureus* infection. 14th International Congress of Immunology, August 25, 2010, Kobe International Exhibition Hall, Kobe, Japan.

- ② 胡東良、成田浩司、中根明夫. C-di-GMP as a vaccine adjuvant enhances protection against *Staphylococcus aureus* infection. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、横浜パシフィコ (横浜市).

- ③ 胡東良、重茂克彦、差波拓志、品川邦弘、中根明夫. A nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A protects against enterotoxin-induced emesis. 第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 12 日、名古屋国際会議場 (名古屋市).

- ④ Hu D-L, Omoe K, Shinagawa K, Nakane A. Staphylococcal enterotoxin A induces emesis through increasing serotonin release in intestine and endogenous cannabinoid system protects against emetic response. 13th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, September 7, 2008 Cairns Convention Centre, Cairns, Australia.

[その他]

ホームページ情報 :

<http://www.bact.hirosaki-u.ac.jp/>