

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16249

研究課題名(和文)ブドウ球菌食中毒の分子レベルでの理解と霊長類嘔吐モデルによる嘔吐活性の解析

研究課題名(英文) Analysis of staphylococcal food poisoning and its emetic mechanism using a primate model

研究代表者

小野 久弥 (Ono, Hisaya)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80704569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)の嘔吐発現の分子機構の解明を目的とし、小型霊長類のコモンマーモセットを用いることで宿主側の嘔吐に関わる受容体の同定を試みた。in silicoにおいてSEAとの相互作用が観察された脱顆粒関連分子について、far western blottingではSEとの結合が見られた。しかし、培養細胞へのトランスフェクションではSEと高い親和性は見られず、SEとの相互作用および脱顆粒誘起への関与は不明であった。また、SEによる肥満細胞脱顆粒に関わる受容体およびシグナル伝達経路を解明するために、SEと相互作用する膜タンパク質の検索を行ったが同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究がさらに進展することで肥満細胞の新規機能の解明につながると考えられる。また、SE受容体の同定によりSE受容体を恒常的に発現する肥満細胞が作出される。SE刺激により脱顆粒またはルシフェラーゼ合成を行う細胞は、嘔吐モデル動物によらない嘔吐活性の評価系となるため、今後の嘔吐研究においてブレークスルーをもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism of emetic expression of staphylococcal enterotoxin (SE) and to identify the receptors involved in emesis by using the common marmoset.

In silico, we observed an interaction between SEA and a degranulation-related molecule. The protein was found to bind to SE in far western blotting. However, transfection of cultured cells did not show high affinity for SEs, and their interaction with SEs and their involvement in the induction of degranulation were unknown. To elucidate the receptors and signaling pathways involved in SE-induced mast cell degranulation, we searched for membrane proteins that interact with SE, but were unable to identify any proteins.

研究分野：細菌学

キーワード：ブドウ球菌エンテロトキシン 嘔吐型食中毒 コモンマーモセット 肥満細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) によって引き起こされる嘔吐、悪心を主徴とする食中毒である。ブドウ球菌食中毒は *S. aureus* が食品内で産生したタンパク質毒素「ブドウ球菌エンテロトキシン (SE)」により汚染された食品を経口摂取することで引き起こされる。SE はブドウ球菌食中毒の原因毒素として同定され、抗原性の違いにより現在までに SEA から SE1Z、および SE01 までの 25 種類の SE が報告されている多様性の高いタンパク質毒素である。また、SE はスーパー抗原活性を有し、毒素性ショック症候群の原因にもなる。食中毒は主に SEA で起こることが知られているが、他の毒素も多数食中毒事例より見つかри、複数の毒素が同時に産生され嘔吐を起こすと考えられている。SE による嘔吐の発現は特に霊長類でその感受性が高く、ヒトの食中毒に近似した条件で研究するためにも、霊長類を用いた研究が必須であると考えられている。申請者は嘔吐発現メカニズムを解明するために小型霊長類であるコモンマーモセットを嘔吐モデルとして確立し、SE が消化管粘膜下組織肥満細胞に特異的に結合し、肥満細胞に脱顆粒を引き起こすこと、および肥満細胞から放出されたヒスタミンが嘔吐発現を引き起こすことを明らかにした (Ono *et al.*, PLoS Pathog., 2019)。しかしながら、肥満細胞における SE の受容体および脱顆粒に至る経路など、分子レベルでの嘔吐発現機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、SE の嘔吐発現の分子機構の解明を目的とし、小型霊長類のコモンマーモセットを用いることで宿主側の嘔吐に関わる受容体の同定を行う。さらに、同定された受容体の機能解析を行うとともに、嘔吐惹起に必要な毒素側の構造を解明する。最終的に霊長類における嘔吐発症メカニズムを明らかにし、ブドウ球菌食中毒の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

【1. 腸管組織における SE 受容体の探索】

コモンマーモセット cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリッド法により SEA と強く結合する分子を検索する。さらに、コモンマーモセット腸管組織由来タンパク質を用いて免疫沈降法およびファウエスタン法による SEA と結合する分子の検索を行う。

得られた候補タンパク質について、当該遺伝子をヒト培養細胞にトランスフェクションし細胞内の分布および SE との結合能を観察する。また SE と候補タンパク質との相互作用を表面プラズモン共鳴またはマイクロスケール熱泳動により測定する。

【2. SE 受容体の機能解析とシグナル伝達機構の解析】

【1】で同定した SE と高い親和性を示す分子の生体内での分布を免疫組織化学により明らかにする。また、SE を投与した個体において毒素と受容体との共局在を確認する。

SE と反応しないマウスまたはラット肥満細胞株に受容体タンパク質およびルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションし、SE の添加により脱顆粒やルシフェラーゼによる発光を起こす細胞を作成する。

肥満細胞において SE と結合する分子のシグナル伝達経路を解析する。阻害剤を用いてリン酸化タンパク質の変化を観察する。

【3. ノックアウトコモンマーモセットの作出】

ゲノム編集技術を用いて SE 受容体をノックアウトしたノックアウトコモンマーモセットを作出する (Kishi *et al.*, Develop. Growth Differ., 2014; Kumita *et al.*, Sci. Rep., 2019)。クローニングされた SE 受容体の配列から最適な部位を選択しガイド RNA または人工

ヌクレアーゼを設計する。コモンマーモセット卵を回収し、精子を注入して受精後、ガイド RNA と Cas タンパク質を含むベクター (CRISPR-Cas9) を顕微注入する。受精卵を仮親マーモセットの胎内へ戻し妊娠・出産後、変異の導入を遺伝子、タンパク質の発現から確認する。得られたノックアウトコモンマーモセットを用いて嘔吐実験を行い、SE 受容体の欠損により嘔吐が起こらないことを確認する。

【4. SE 嘔吐活性部位の探索】

SEA と近縁かつ嘔吐活性を持たないタンパク質毒素 TSST-1 を基本骨格とし、嘔吐活性の無い SEA および嘔吐活性を導入した TSST-1 を作製する。SEA に特有のアミノ酸配列を欠失または導入したキメラタンパク質の発現プラスミドをインバース PCR 法または相同組換えにより作製し、大腸菌発現系により発現・精製する。

【2】で作製した受容体遺伝子導入肥満細胞にて、上記で作製したキメラタンパク質の受容体結合能および脱顆粒誘起能を解析する。嘔吐活性モチーフを絞り込み、SEs において受容体結合能および脱顆粒誘起能が消失するアミノ酸残基を点変異により検索する。

作製した受容体結合能および脱顆粒誘起能を欠損した毒素をコモンマーモセットに経口投与し、嘔吐反射の有無を確認する。毒素と SEs 受容体との結合および肥満細胞の脱顆粒に必須なモチーフが嘔吐発現に必要なことを確認する。

4. 研究成果

まずコモンマーモセットの腸管由来 cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリッド法により SE と親和性を示す分子の検索を行ったが、親和性を示す分子は得られなかった。つづいてコモンマーモセットの腸管組織からタンパク質を抽出し、プルダウンアッセイにより得られたタンパク質についてファーウェスタン法を用いて SE と親和性を示す分子の検索を行ったところ、SE と親和性を示す分子が複数得られた。この受容体候補タンパク質を同定するために質量分析を行ったが有力な受容体候補タンパク質は得られなかった。in silico において SEA と脱顆粒関連分子の相互作用を検討したところ、SEA と結合しうる分子が得られた。この分子について far western blotting を行ったところ、SE との結合が見られた。しかし、当該分子の培養細胞へのトランスフェクションでは SE と高い親和性は見られず、SE との相互作用および脱顆粒誘起への関与は不明であった。SE 受容体ノックアウトコモンマーモセットを作出し、標的分子を欠損した個体を用いて嘔吐メカニズムを解析する予定であったため、本研究で使用するコモンマーモセット頭数の増加に努めたが、飼育環境の変化後、コモンマーモセット頭数の増加に至らず遺伝子ノックアウトはできなかった。本研究課題の最終的な目標である霊長類における嘔吐発症メカニズムの全容解明には、SE 受容体の同定およびコモンマーモセットの安定した繁殖と解析が必須であったが、いずれも達成できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taki Yusuke, Watanabe Shinya, Sato 'o Yusuke, Tan Xin-Ee, Ono Hisaya K., Kiga Kotaro, Aiba Yoshifumi, Sasahara Teppei, Azam Aa Haeruman, Thitianapakorn Kanate, Veerananarayanan Srivani, Li Feng-Yu, Zhang Yuancheng, Kawaguchi Tomofumi, Hossain Sarah, Maniruzzaman, Hu Dong-Liang, Cui Longzhu	4. 巻 13
2. 論文標題 The Association Between Onset of Staphylococcal Non-menstrual Toxic Shock Syndrome With Inducibility of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 765317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.765317	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umeda Kaoru, Ono Hisaya K., Wada Takayuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Nakamura Hiromi, Hu Dong-Liang	4. 巻 357
2. 論文標題 High production of egc2-related staphylococcal enterotoxins caused a food poisoning outbreak	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 109366 ~ 109366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109366	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SATO 'O Yusuke, OMOE Katsuhiko, AIKAWA Yasuko, KANO Mayuko, ONO Hisaya K., HU Dong-Liang, NAKANE Akio, SUGAI Motoyuki	4. 巻 83
2. 論文標題 Investigation of <i>Staphylococcus aureus</i> positive for Staphylococcal enterotoxin S and T genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0662	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono Hisaya K., Suzuki Yasunori, Kubota Hiroaki, Asano Krisana, Takai Shinji, Nakane Akio, Hu Dong-Liang	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Staphylococcus aureus Strain 834, Isolated from a Septic Patient in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01477-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Yasunori, Ono Hisaya K., Shimojima Yukako, Kubota Hiroaki, Kato Rei, Kakuda Tsutomu, Hirose Shouhei, Hu Dong-Liang, Nakane Akio, Takai Shinji, Sadamasu Kenji	4. 巻 92
2. 論文標題 A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 103588 ~ 103588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fm.2020.103588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------