

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

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 and its significance of multifunction of staphylococcal enterotoxin family

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

研究成果の概要 (和文)：

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンファミリー分子を中心に、黄色ブドウ球菌感染・嘔吐・下痢における役割を解析し、以下の成果を得た。

- (1) TSST-1 は感染における病原因子として重要であった。
- (2) SEA, SEC, TSST-1 のうち、SEA と SEC は嘔吐活性を示すが、下痢誘導活性を示さなかった。
- (3) TSST-1 は上皮細胞におけるオートファジーの誘導を抑制した。
- (4) Recombinant ClfA 免疫マウスは、黄色ブドウ球菌感染に対し防御効果を示し、この感染抵抗性は IL-17 に依存していた。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated roles of staphylococcal enterotoxin family molecules in infection, emesis and diarrhea.

- (1) TSST-1 played an important role in pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection.
- (2) Among SEA, SEC and TSST-1, SEA and SEC showed emesis-inducing activity but none of them revealed diarrhea-inducing activity.
- (3) TSST-1 suppressed autophagy formation in epithelial cells.
- (4) Vaccination with recombinant clumping factor A induced acquired host resistance to *S. aureus* infection in mice, depending on IL-17.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

研究分野：医歯薬学

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、TSST-1、SEA、オートファジー、IL-17、黄色ブドウ球菌、感染

## 1. 研究開始当初の背景

近年、我々の研究グループを含め新型ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) が次々と発見され、現在 SEA～SEU まで報告されている。

黄色ブドウ球菌はなぜこのような多彩な SE を産生しなければならないかを考えると、SE が黄色ブドウ球菌の生き残りに必須な分子であることが窺える。例えば、MRSA 臨床分離

株の多くは SEC と毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) を産生する。本申請者らは、スーパー抗原活性を欠損させた変異 SEC と TSST-1 を作製し、これらをマウスに免疫することにより黄色ブドウ球菌感染に対する防御効果があることを明らかにした。さらに、小型嘔吐実験動物モデル (スunks) を確立し、SE の嘔吐活性と嘔吐誘導機序を明らかにしてきた

## 2. 研究の目的

本研究ではスーパー抗原活性を完全欠損した double mutant SE (dmSE) 及び dmTSST-1 を作製すると同時に、SE または TSST-1 遺伝子欠損ブドウ球菌を構築し、黄色ブドウ球菌の持続感染、特に菌の定着、宿主細胞との相互作用におけるこれらの毒素の関与とその分子機序を明らかにする。また、スunks嘔吐モデルを用い、SE 分子上の催吐および下痢活性部位と嘔吐・下痢誘導分子機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) SEA 及び TSST-1 変異タンパク質の作製：site-directed mutation 法により、SEA 及び TSST 分子上の T 細胞レセプターと MHC II と結合部位を同時に変異させ、スーパー抗原活性欠損変異タンパク質を作製した。
- (2) TSST-1 及び SEC 遺伝子欠損菌株の作製：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。
- (3) SEA の嘔吐・下痢誘導活性の検討：SEA をスunksに腹腔内投与し、嘔吐開始時間と嘔吐回数により嘔吐活性を評価した。また、スunksの腸管結紮ループ実験モデルを確立し、スunksおよびウサギ腸管結紮ループを用いて下痢誘導活性を評価した。
- (4) SEA に対する細胞レセプターの検索：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た。
- (5) オートファジーの評価：上皮細胞 HeLa229 株を TSST-1 で処理し、オートファジーマーカー (LC3)、リソソームマーカー (LAMP2, LysoTracker) の分布と発現量について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。並行して、LC3-II についてはウエスタンブロット法を用いて定量した。
- (6) Recombinant ClfA のワクチン評価：Clumping factor A (ClfA) 遺伝子を発現ベクター pGEX-6p-1 にクローニングし、組換えベクターを大腸菌導入により GST fusion protein system により ClfA タンパク発現系を構築し、組換えタンパク質を得た。Recombinant ClfA を正常及び

IL-17A ノックアウトマウスに免疫し、3 回免疫に黄色ブドウ球菌を感染させ、生存率、臓器中菌数、サイトカイン応答を評価した。

## 4. 研究成果

1. SEC および TSST-1 遺伝子ノックアウト株の病原性の比較検討：それぞれの遺伝子ノックアウト菌株をマウスに全身感染させたところ、TSST-1 遺伝子ノックアウト株は野生株より病原性が顕著に低下することが明らかとなった。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. SEA の嘔吐・下痢誘導活性の検討：変異 SEA および SEA をスunksに腹腔内投与し、嘔吐誘導活性とスーパー抗原活性を比較検討したところ、SEA の両活性の活性部位が完全一致していなかった。また、スunksの腸管結紮ループ実験モデルを確立し、スunksおよびウサギ腸管結紮ループを用いて SEA, SEC, TSST-1 の下痢誘導活性を検討した。SEA および SEC は嘔吐活性を有するが、いずれの毒素も下痢誘導活性を示さないことが明らかとなった。
  3. SEA に対する細胞レセプターの検索：SEA と結合するスunks腸管タンパク質を単離しアミノ酸末端配列を解析し、いくつかの候補タンパク質情報が得られた。
  4. 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。同様に TSST-1 自体がオートファゴソーム形成を抑制した。この結果は、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。
  5. Recombinant ClfA のワクチン効果の証明：GST fusion protein system により ClfA タンパク発現系を構築した。精製した ClfA をマウスに免疫すると、黄色ブドウ球菌感染に対し防御効果を示した。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、この感染抵抗性は IL-17 に依存していることが示唆された。
- ## 5. 主な発表論文等
- (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 8 件)

1. Li S-J, Hu D-L, Maina EK, Shinagawa K, Omoe K, Nakane A. Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *J Appl Microbiol* 110(3):729-736, 2011. 査読有り DOI:10.1111/j.1365-2672.2010.04927.x
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(10): 4234-4242, 2010. 査読有り doi:10.1128/IAI.00447-10
3. 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 $\beta$  molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Biol Chem* 285(40): 30427-30435, 2010. 査読有り doi:10.1074/jbc.M110.140871
4. Cui J-C, Zhang B-J, Lin Y-C, Wang Q-K, Qian A-D, Nakane A, Hu D-L, Tong G-Z. Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopath* 135(1-2): 64-70 2010. 査読有り doi:org/10.1016/j.vetimm.2009.11.110
5. 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(35): 4867-4873, 2009. 査読有り doi:org/10.1016/j.vaccine.2009.04.053
6. 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(3): 302-310, 2009. 査読有り doi:10.1086/596065
7. Ono H, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu D-L, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun* 76(11):4999-5005, 2008. 査読有り doi:10.1128/IAI.00045-08
8. 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. 査読有り doi:10.1099/jmm.0.2008/002790-0 [学会発表] (計 13 件)
  1. Hu D-L, Maina EK, Tomioka Y, Li SJ, Narita K, Osanai A, Shinagawa K, Omoe K, Nakane A. Staphylococcal enterotoxin A is resistant to heating and digestive enzyme treatment on the emetic activity. The 12<sup>th</sup> Meeting of Hirosaki International Forum of medical Science, Oct 29, 2010, Hirosaki.
  2. 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. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Aug 25, 2010, Kobe.
  3. Hu DL, Maina EK, Tomioka Y, Li SJ, Narita K, Osanai A, Shinagawa K, Omoe K, Nakane A. The superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzyme treatment. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Aug 25, 2010, Kobe.
  4. Ono HK, Nishizawa M, Yamamoto Y, Hu DL, Nakane A, Omoe K. Analysis of staphylococcal enterotoxin type A movement in gastrointestinal tract of house musk shrew and characterization of target cell of toxin. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Aug 25, 2010, Kobe.
  5. Narita K, Hu D-L, Nakane A. 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 29 日、横浜.
  6. Hu D-L, Narita K, Nakane A. The role of interleukin-17 in the protective effect of an immunization with clumping factor A. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 29 日、横浜.
  7. 胡 東良、重茂克彦、差波拓志、品川邦汎、中根明夫. 無毒変異体ブドウ球菌エンテロトキシンAの免疫による嘔吐予防効果. 第56回トキシンシンポジウム、2009年8月26日、長良川.
  8. 胡 東良、重茂克彦、差波拓志、品川邦汎、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.
  9. 胡 東良、重茂克彦、差波拓志、品川邦

- 汎、中根明夫. Vaccination with nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A, D227A, protects against enterotoxin- induced emesis in house musk shrews. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月9日、神戸.
10. 成田浩司、胡 東良、中根明夫. クランピングファクターA による免疫は IL-17 産生を促進し黄色ブドウ球菌感染防御効果を示す. 第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1 日、京都.
11. 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 the emetic response. 13th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Sep. 7, 2008 Carens, Australia.
12. 胡 東良、重茂克彦、品川邦汎、中根明夫. ブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐誘導とその制御機序. 第2回細菌学・若手コロッセウム、2008年8月3日、湘南.
13. 成田浩司、胡 東良、重茂克彦、品川邦汎、中根明夫. 黄色ブドウ球菌接着因子による感染予防効果第73回 JSICR・第19回日本生体防御学会・第45回補体シンポジウム合同学会、2008年7月10日、札幌.

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

胡 東良 (HU DONG-LIANG)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10333733

### (3) 連携研究者

成田 浩司 (NARITA KOUJI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30419220