

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560061

研究課題名(和文)ポリフェノールによる細菌誘発性食中毒および皮膚炎抑制メカニズムの網羅的解析

研究課題名(英文)Analysis of inhibitory mechanisms of polyphenols on bacterial induced food poisoning and dermatitis

研究代表者

島村 裕子 (SHIMAMURA, YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：60452025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウ球菌毒素(SEA)とポリフェノールにおける相互作用および毒素活性抑制能の作用機序を検討した。その結果、リンゴ由来プロアントシアニジン(AP)およびEGCGは、SEAの毒素活性発現部位と相互作用することが示唆された。また、APおよびEGCGは、脾臓細胞においてSEAが誘導する細胞増殖およびIFN- γ 産生を抑制した。さらに、SEAと相互作用するポリフェノール類は、バイオフィーム関連遺伝子の発現およびSEA遺伝子伝播を抑制した。今後は、SEAとポリフェノールの相互作用が毒素活性発現に及ぼす影響の詳細について明らかにするとともに、SEA遺伝子伝播のメカニズムについても検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of interaction between staphylococcal enterotoxin A (SEA) and polyphenols and inhibitory effect on them SEA toxin activity was examined. As a result, apple proanthocyanidins (AP) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibited the binding affinity of the anti-peptide antibodies to SEA active sites. AP and EGCG inactivated the cell proliferation and IFN- γ production induced by SEA in spleen cells. In addition, some polyphenols inhibited the biofilm formation and biofilm-related gene (icaD) expression. These polyphenols inhibited SEA gene transfer from SEA producing strains to SEA non-producing strains. In further experiments, the influence of interaction between SEA and polyphenols on toxin activity expression, and inhibitory mechanisms on the SEA gene transfer will be clarified.

研究分野：食品衛生学、微生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌 ブドウ球菌エンテロトキシンA ポリフェノール カテキン 遺伝子伝播

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は、毒素型食中毒起因菌であるとともに、本菌が産生する菌体外分泌タンパク質 (protein A; SpA) がケラチノサイトを刺激して IL-18 を誘導し、アトピー性皮膚炎 (AD) を発症させることが報告されている (Terada *et al.*, 2006)。毒素や SpA を産生する黄色ブドウ球菌を除去することは有効であるが、抗菌物質の使用は、常在細菌叢を乱し、やがては耐性獲得を誘導するという問題点があり、抗菌物質によらないブドウ球菌誘発性食中毒および AD の制御法が求められている。

2. 研究の目的

これまでの研究で、黄色ブドウ球菌の産生する毒素 (staphylococcal enterotoxin A; SEA) および SpA と植物食品由来のポリフェノールが相互作用する可能性を見出した。その成果を踏まえて、本研究では、黄色ブドウ球菌誘発性食中毒および AD の制御法を開発することを目的に、黄色ブドウ球菌の産生する SEA と相互作用するポリフェノール類における毒素活性抑制効果および抗アレルギー効果について検討することを目的とした。

さらに、これまでの研究で、ある特定の 2 種の黄色ブドウ球菌株のコロニーが偶然接触した際に、SEA 産生株が溶菌し、SEA 非産生株に SEA 遺伝子が伝播するという知見を見出している。また、いくつかのポリフェノール類では、SEA 遺伝子の発現を抑制したことから、本研究では、ポリフェノール類が SEA 遺伝子の伝播を抑制するか検討した。さらに、SEA 遺伝子の水平伝播については未だにわずかな知見しか得られていないことから、SEA 遺伝子伝播のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. ポリフェノール類と SEA との相互作用

市販の抗-SEA 抗体を用いた Western blot 法を用いて、SEA に対するポリフェノール類の相互作用を検討した。また、SEA 分子上のアミノ酸配列に従い、4 種の合成ペプチド (A-2、A-3、A-6 および A-10) を合成し、これらに対する抗ペプチド抗体 (抗-SEA ペプチド抗体) を作製して、ポリフェノール類が嘔吐活性およびスーパー抗原活性発現部位と相互作用するか調べた。

3-2. SEA 誘導性の IFN- γ 測定による毒素活性阻害能の検討

SEA で刺激したマウス脾臓細胞の増殖および誘導される IFN- γ 産生に対する抑制効果 (ELISA およびリアルタイム RT-PCR 法) を測定し、ポリフェノール類による毒素活性阻害能を検討した。

3-3. 生体内モデル溶液中における SEA との相互作用

市販の抗-SEA 抗体を用いた Western blot 法を用いて、アップルフェノン SH (AP; プロアントシアニジン (98.0 \pm 2.0% 含有) アサヒフードアンドヘルスケア株式会社) および (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) の SEA との相互作用に対する pH の影響 (pH4.0、6.0、6.8 および 8.0) を調べた。また、生体内モデル溶液中における SEA と EGCG の相互作用について検討した。緩衝液 (pH2.4 または 4.0) に SEA (終濃度 5.0 μ g/mL)、ペプシン (終濃度 0.4%)、EGCG (終濃度 3 mM) を加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした (胃内モデル混合溶液)。インキュベート後の胃内モデル混合溶液を pH6.0 に調整した後、パンクレアチン (終濃度 0.25%)、胆汁溶液 (終濃度 0.4%) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。上清を市販の抗-SEA 抗体を用いた Western blot 法に供した。

3-4. EGCG と SEA のドッキング解析

EGCG は、SEA の毒素活性発現部位と結合している可能性が示唆されたことから、ドッキングシミュレーションによる EGCG と SEA のドッキング解析を行った。

3-5. SEA 遺伝子伝播に対するポリフェノール類の抑制効果

SEA 産生株として *Staphylococcus aureus* No.29 (EM^r、SEA⁺、溶菌株:ドナー)、SEA 非産生株として *S. aureus* No.77 (KM^r、SEA⁻、非溶菌株: アクセプター) を供試菌株として用い、抗菌活性を示さない濃度以下で全ての試験に供した。カテキン類 4 試料 ((-)-epicatechin (EC)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-epigallocatechin (EGC)、EGCG) およびそれらを主成分とする既存食品添加物 3 試料 (テアビゴ、ピュアフェノン 50W およびポリフェノン) のバイオフィーム形成抑制能およびバイオフィーム形成関連遺伝子 (*icaD*) の発現抑制能について、クリスタルバイオレット染色法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、SEA 遺伝子伝播に対する抑制能を Western blot 法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。

3-6. SEA 産生株の溶菌および遺伝子伝播メカニズムの解明

SEA 産生株の溶菌メカニズムを明らかにするために、リアルタイム RT-PCR を用いて透析共培養 12 および 16 時間目の No.29 株の自己溶菌関連遺伝子の発現量を測定した。また、SEA 遺伝子伝播の解明に向け、次世代シーケンサーを用いて、既知の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* NCTC 8325; accession number NC_007795) の参照ゲノム塩基配列をもとに、No.29 株、No.77 株および No.77-L22 株のゲノムリシーケンシングを行い、変異 (一塩基多形: SNP) 解析および SEA 遺伝子の挿入位置解析を行った。

4. 研究成果

4-1. ポリフェノール類と SEA との相互作用

市販の抗-SEA 抗体を用いた Western blot 法を用いて、SEA に対するポリフェノール類の相互作用を検討した結果、AP およびカテキン類において、SEA と相互作用することが示唆された。そこで、相互作用の強かった AP および EGCG を以下の試験に供した。4 種の抗-SEA ペプチド抗体を用いて、AP および EGCG が毒素活性発現部位と相互作用するか調べた。その結果、AP および EGCG はいずれも、A-6 (アミノ酸配列 81-100) との相互作用が認められ、また、EGCG においては、A-2 および A-3 (アミノ酸配列 21-50) においても相互作用することが示唆された (Fig. 1)。

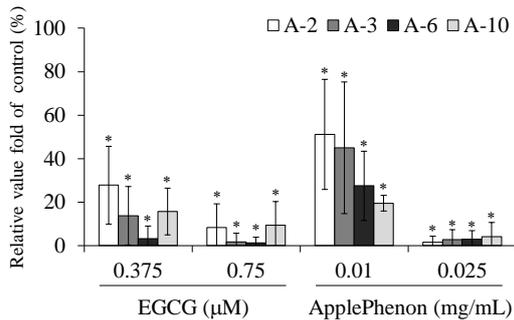


Fig. 1: SEA の毒素活性発現部位とポリフェノールの相互作用

* $p < 0.05$ vs Control

4-2. SEA と相互作用するポリフェノール類における毒素活性阻害能の検討

AP および EGCG は、SEA が誘発するマウス脾臓細胞の増殖および IFN- γ 産生を有意に抑制した (Fig. 2)。SEs の嘔吐活性とスーパー抗原活性には関連性があることが報告されており、AP および EGCG は、スーパー抗原活性だけでなく、嘔吐活性抑制能も有する可能性が示唆された。

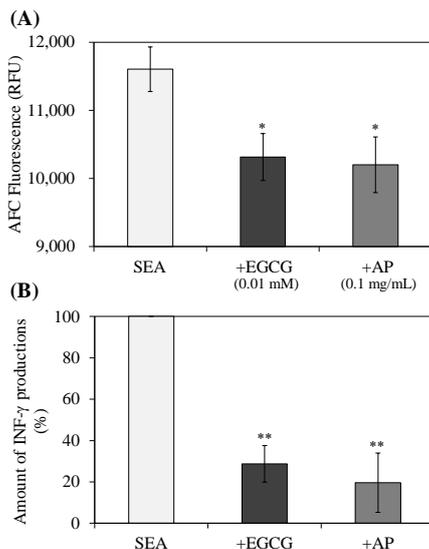


Fig. 2: (A) SEA 誘発性マウス脾臓細胞の増殖抑制効果, (B) SEA 誘発性 IFN- γ 産生抑制効果

AP: ApplePhenon, * $p < 0.05$ vs Control, ** $p < 0.01$ vs Control

4-3. 生体内モデル溶液中における SEA との相互作用

AP および EGCG の SEA との相互作用に対する pH の影響 (pH4.0, 6.0, 6.8 および 8.0) を調べたところ、AP は、全ての pH 条件下で SEA との相互作用を維持していたが、pH8.0 では、相互作用が若干低下する傾向が認められた。一方、EGCG は、全ての pH 条件下で SEA との相互作用を維持していた (Fig. 3 (A), (B))。さらに、人工の胃腸管の消化液モデル溶液中での AP および EGCG と SEA の相互作用について検討を行った。その結果、生体内における SEA と AP の相互作用は、可逆性を示す傾向が認められた。一方、EGCG においては、SEA の標的受容体が存在する腸管モデル溶液中においても、その相互作用を維持できることが示唆され (Fig. 3 (C))、AP と EGCG では胃腸管内における SEA との相互作用のメカニズムが異なる可能性が示唆された。

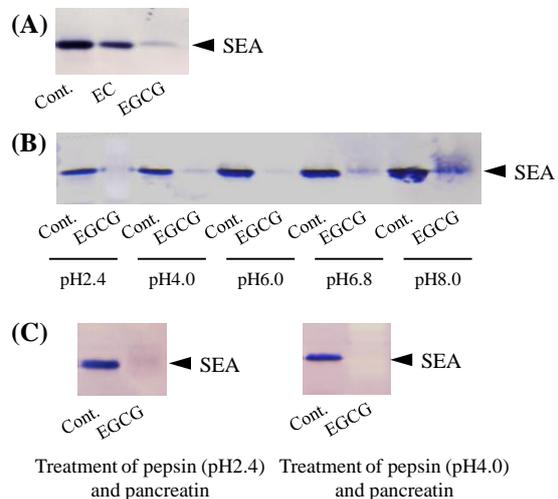


Fig. 3: (A) リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) 中における SEA と EGCG の相互作用, (B) 各種 pH 中における SEA と EGCG の相互作用, (C) 生体内モデル溶液中における SEA と EGCG の相互作用

4-4. EGCG と SEA のドッキング解析

EGCG およびそのメチル化体であるメチル化カテキン (EGCG3"Me、EGCG4"Me) を用いて、SEA との結合親和性について検討したところ、ガロイル基 3 位の水酸基が SEA との結合親和性に関与しており、EGCG が SEA の毒素活性発現部位と結合している可能性が示唆された。そこで、ドッキングシミュレーションによる EGCG と SEA のドッキング解析を行った。その結果、A-2、A-3 および A-6 領域のアミノ酸が EGCG と相互作用しており、特に、SEA の Y91 と EGCG の 3"位の水酸基が水素結合を形成する結果が得られた (Fig. 4)。したがって、EGCG の 3"位の水酸基にメチル基を導入した EGCG3"Me では、水素結合が無くなり、相互作用が弱くなることが推察された。MHC クラス II 分子の HLA-DR1 α サブユニットの K39 アミノ酸残基

がSEAのY92およびY108と2カ所で水素結合を形成することが報告されている (Krupka *et al.*, 2002) ことから、SEAのY91とEGCGが結合することで、SEAとHLA-DR1 α サブユニットとの結合を阻害できる可能性が示唆された。

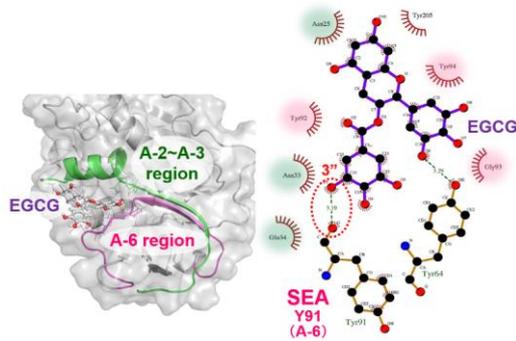


Fig. 4: EGCGとSEAのドッキング解析

4-5. SEA 遺伝子伝播に対するポリフェノール類の抑制効果

茶カテキン類4試料およびそれらを主成分とする既存食品添加物3試料のバイオフィーム形成およびバイオフィーム形成関連遺伝子 (*icaD*) 発現の抑制能について調べたところ、いずれの試料もバイオフィームの形成およびバイオフィーム形成関連遺伝子の発現を抑制した (Fig. 5)。また、いずれの試料もSEA産生およびSEA遺伝子発現を抑制した。抗菌活性を示さない低濃度 (3 mM) の茶カテキン類に、黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子伝播およびバイオフィーム形成の抑制効果が認められたことから、毒素型食中毒防止策として茶カテキン類が利用できる可能性が示唆された。

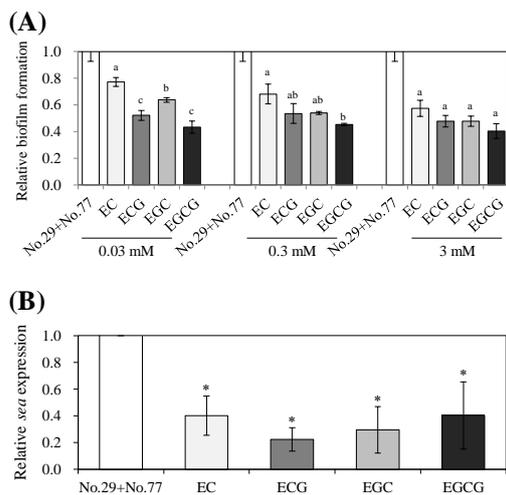


Fig. 5: (A) カテキン類のバイオフィーム形成抑制効果, (B) カテキン類のバイオフィーム形成関連遺伝子 (*icaD*) の発現抑制効果

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$ (異なるアルファベット間で有意差あり), * $p < 0.05$ vs Control

4-6. SEA 産生株の溶菌メカニズムの解明

リアルタイム RT-PCR を用いて、透析共培養中 (Fig. 6) のSEA産生株 (No.29株) の自

己溶菌関連遺伝子の発現量を測定したところ、共培養 12 時間後では、endolysin である *lytM*、*atl* および holin-like protein である *lrgA* の発現量が有意に増加した (Fig. 7)。これらの結果より、No.77 株の菌体外産生物質により、No.29 株の endolysin および holin が活性化され、自己溶菌が誘発されていることが示唆された。参照ゲノム配列に対するマッピングにより、No.29 株 (SEA 遺伝子ドナー株)、No.77 株 (SEA 遺伝子アクセプター株) および No.77-L22 株 (SEA 遺伝子伝播株) の SNP 解析を行ったところ、No.29 株と No.77 株で SNP の分布パターンは異なっており、No.29 株由来のSEAファージがNo.77株に導入されたことにより、1,103 個の SNP が追加されたことが明らかになった。また、No.77-L22 株のSEA遺伝子の挿入位置は、2,037,774 塩基から2,038,315 塩基の間であった。

今後、SEAとポリフェノール類の相互作用メカニズムおよびSEA遺伝子伝播に関わる遺伝子群を同定し、SEA遺伝子伝播機序を明らかにすることで毒素型食中毒およびADの有効な予防・治療法の開発が期待される。

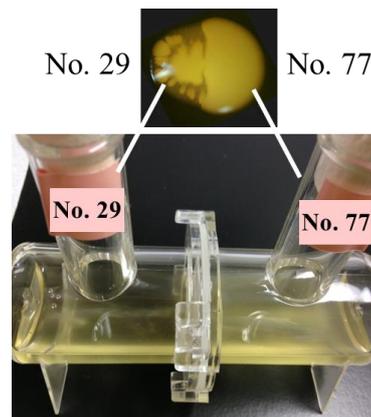


Fig. 6: 溶菌コロニーと二槽式透析培養器による透析共培養

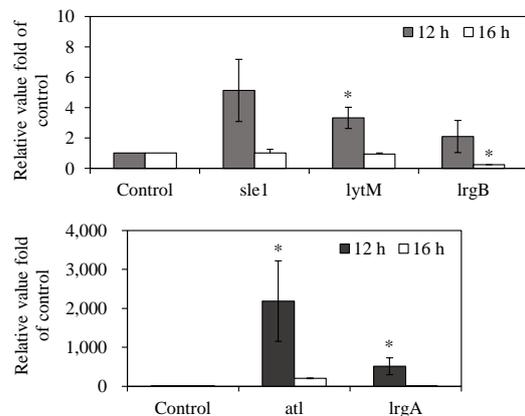


Fig. 7: 自己溶菌関連遺伝子の発現量の測定

sle1; N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, *lytM*; peptidoglycan hydrolase, *lrgB*; antiholin-like protein (negative regulator of autolysis), *atl*; N-acetylmuramyl-L-alanine amidase and endo- β -N-acetylglucosaminidase, *lrgA*; holin-like protein.

* $p < 0.05$ vs Control

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 4 件)

- ① Shimamura Y, Aoki N, Sugiyama Y, Tanaka T, Murata M, Masuda S: Plant-derived polyphenols interact with staphylococcal enterotoxin A and inhibit toxin activity, *PLOS ONE*, **11(6)**: e0157082 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0157082.
- ② Shimamura Y, Iio M, Urahira T, Masuda S: Inhibitory effects of Japanese horseradish (*Wasabia japonica*) on the formation and genotoxicity of a potent carcinogen, acrylamide, *J. Sci. Food Agric.*, [Epub ahead of print] (2016). DOI: 10.1002/jsfa.8055.
- ③ Shimamura Y, Shinke M, Hiraishi M, Tsuchiya Y, Masuda S: The application of alkaline and acidic electrolyzed water in the sterilization of chicken breasts and beef liver, *Food Sci. Nutr.*, **4(3)**: 431-440 (2015). DOI: 10.1002/fsn3.305.
- ④ Shimamura Y, Aoki N, Sugiyama Y, Nakayama T, Masuda S: Screening of tea extract and theaflavins for inhibitory effects on the biological activity and production of staphylococcal enterotoxin A, *J. Food Sci.*, **79(11)**: M2294-M2300 (2014). DOI: 10.1111/1750-3841.12566.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 内海 未央, 平井 央子, 島村 裕子, 伊藤 圭祐, 石井 剛志, 増田 修一: 黄色ブドウ球菌の毒素活性に対するカテキン類の制御機構の解明, 第 71 回日本栄養・食糧学会大会, 2017 年 5 月 20 日 (沖縄)
- ② Utsumi M, Hirai C, Shimamura Y, Masuda S: Inhibitory effect of catechins on toxin activity of staphylococcal enterotoxin A. The 3rd International Conference on Pharma and Food, November 16-18, 2016 (Shizuoka, Japan)
- ③ 島村 裕子: ポリフェノール類による毒素型食中毒抑制メカニズムの解明, (公財) 日本農芸化学会中部支部第 178 回例会若手シンポジウム, 2016 年 11 月 26 日 (静岡)
- ④ 折原 杏奈, 尾崎 順哉, 島村 裕子, 三好 規之, 増田 修一: ブドウ球菌毒素エンテロトキシン A 遺伝子の伝播機序の解明, 第 71 回日本栄養・食糧学会中部支部大会, 2016 年 11 月 19 日 (岐阜)
- ⑤ 内海 未央, 平井 央子, 島村 裕子, 増田 修一: ブドウ球菌エンテロトキシン A の毒素活性に対するカテキン類の阻害効果の比較, 第 32 回茶学術研究会講演会・第 13 回 日本カテキン学会年次学術大会 合同大会 2016, 2016 年 10 月 28 日

(静岡)

- ⑥ 島村 裕子, 平井 央子, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 開発 邦宏, 増田 修一: 食中毒菌の毒素活性に対する EGCG の抑制効果と作用メカニズムの解明, 第 31 回茶学術研究会, 2016 年 3 月 14 日 (静岡)
- ⑦ 島村 裕子: 食中毒菌の毒素産生および活性に対する緑茶ポリフェノール類の抑制効果, 第 12 回日本カテキン学会年次学術大会, 2015 年 12 月 5 日 (福岡)
- ⑧ 尾崎 順哉, 島村 裕子, 柴田 昌治, 増田 修一: 茶カテキン類による黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子伝播抑制メカニズムの解明, 第 12 回日本カテキン学会年次学術大会 2015 年 12 月 5 日 (福岡)
- ⑨ 平井 央子, 島村 裕子, 杉山 由華, 増田 修一: 食中毒菌の毒素活性に対する EGCG とその誘導体の抑制効果および作用機序の解明, 第 12 回日本カテキン学会年次学術大会 2015 年 12 月 5 日 (福岡)
- ⑩ Hirai C, Shimamura Y, Sugiyama Y, Masuda S: Plant-derived polyphenols inhibit toxin activities of staphylococcal enterotoxin, The 20 th shizuoka forum on health and longevity, October 30-31, 2015 (Shizuoka, Japan)
- ⑪ Hirai C, Shimamura Y, Sugiyama Y, Masuda S: The mechanism of inhibitory effect of plant-derived polyphenols on staphylococcal enterotoxin A activities, 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), May 14-18, 2015 (Yokohama, Japan)
- ⑫ 尾崎 順哉, 島村 裕子, 柴田 昌治, 増田 修一: ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子伝播の作用機序およびポリフェノール成分によるその制御機構の解明, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 29 日 (岡山)
- ⑬ 尾崎 順哉, 島村 裕子, 柴田 昌治, 増田 修一: 茶カテキン類による食中毒菌の毒素遺伝子伝播およびバイオフィルム形成の抑制効果, 第 30 回茶学術研究会, 2015 年 3 月 17 日 (静岡)
- ⑭ 平井 央子, 島村 裕子, 杉山 由華, 増田 修一: 食中毒菌の毒素活性および産生に対するポリフェノール系既存食品添加物の抑制効果とその作用機序の解明, 第 16 回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 2015 年 3 月 7 日 (静岡)
- ⑮ Hirai C, Shimamura Y, Sugiyama Y, Masuda S: Development of novel control method for preventing food-poisoning using food additives derived from polyphenols. The 2nd International Conference on Pharma and Food, Shizuoka, Japan, November 6-7, 2014 (Shizuoka, Japan)
- ⑯ 尾崎 順哉, 島村 裕子, 柴田 昌治, 増田 修一: カテキン類による抗菌活性とブドウ球菌毒素遺伝子伝播の抑制効果の関係, 第 11 回日本カテキン学会年次

- 学術大会, 2014年11月22日(東京)
- ⑰ 平井 央子, 島村 裕子, 杉山 由華, 増田 修一: 食中毒菌の毒素産生および活性に対する EGCG の抑制効果とその作用機序の解明, 第 11 回日本カテキン学会年次学術大会, 2014年11月22日(東京)
- ⑱ 平井 央子, 島村 裕子, 杉山 由華, 増田 修一: 食中毒菌の毒素産生および活性に対するポリフェノール系既存食品添加物の抑制効果, 日本食品科学工学会第 61 回大会, 2014年8月29日(福岡)
- ⑲ 尾崎 順哉, 島村 裕子, 柴田 昌治, 増田 修一: ブドウ球菌毒素遺伝子の伝播機序の解明および伝播抑制成分の探索, 日本食品科学工学会第 61 回大会, 2014年8月29日(福岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/foodhygn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 裕子 (SHIMAMURA YUKO)
静岡県立大学 食品栄養科学部・助教
研究者番号: 6 0 4 5 2 0 2 5

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

増田 修一 (MASUDA SHUICHI)
静岡県立大学 食品栄養科学部・准教授
研究者番号: 4 0 3 3 6 6 5 7

柳田 顕郎 (YANAGIDA AKIO)
東京薬科大学 薬学部・教授
研究者番号: 4 0 3 1 8 1 9 2

中山 勉 (NAKAYAMA TSUTOMU)
日本獣医生命科学大学 応用生命科学部・教授
研究者番号: 5 0 1 5 0 1 9 9

伊藤 創平 (ITO SOHEI)
静岡県立大学 食品栄養科学部・准教授
研究者番号: 7 0 3 7 2 8 3 6

(4) 研究協力者
なし