

平成21年 6月25日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19380173
 研究課題名（和文）ゲノムバイオロジーを基盤とした黄色ブドウ球菌の病原性進化の解析と危害評価
 研究課題名（英文） Genomics based analysis of pathogenicity evolution of *Staphylococcal aureus*
 研究代表者
 品川邦汎（SHINAGAWA KUNIHIRO）
 岩手大学・農学部・教授
 研究者番号：60133906

研究成果の概要：

Staphylococci のゲノム配列情報を解析し、ヒト食中毒原因毒素であるエンテロトキシン (SEs) 遺伝子群を保有する可動性遺伝因子を検出・分類する LA-PCR/RFLP 法を確立した。霊長類モデルを用いて新規な SE 様毒素群 SE1s の嘔吐活性を解析し、何れも霊長類に対して嘔吐活性を有することを明らかにした。さらに、2 種類の新型 SEs についてその生物活性を詳細に解析し、SES および SET と命名した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：獣医公衆衛生、食中毒、食品衛生学

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は種々の外毒素を産生し、ヒトの食中毒や毒素性ショック症候群、化膿性疾患、院内感染を引き起こすと共に、種々の動物の感染症の原因としても重要視されており、精力的な研究が国内外で進められている。本菌の遺伝学的背景を明らかにするため、全ゲノム塩基配列決定が行われており、2006年10月現在、8株のヒト由来黄色ブドウ球菌

と1株のウシ由来黄色ブドウ球菌ゲノムの完全な配列が公開されている (1)。今後、このゲノム配列情報を基盤とした本菌の表現型・病原性の解明が急務となっている。申請者らは、ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるエンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins; SEs) を対象に研究を進めている。SEs はヒトに対し嘔吐活性を示し、食中毒を引き起こすと共に、スーパー抗原活性

を有し、毒素性ショック症候群の原因毒素でもある。従来、SEは抗原性の異なる5種類(SEA-SEE)が知られていたが、申請者らの研究グループおよびいくつかの海外の研究グループにより、近年多数のSE遺伝子の存在が報告され、SEsは極めて多様性が高い毒素群であることが明らかになりつつある。2004年に、国際ブドウ球菌命名委員会からSEsの命名規約が勧告され、霊長類実験モデルで嘔吐活性を示した物のみをSEと称し、霊長類モデルで嘔吐活性を示さないもの、あるいは霊長類モデルで嘔吐活性を確認されていない物についてはstaphylococcal enterotoxin-like toxin (SE1)と称することとなった(2)。現在、SEsおよびSE1sはSEA-SEIVの19種(SEFは欠番)が報告されている。新型SEsおよびSE1sの食中毒、毒素性ショック症候群との関わりや、黄色ブドウ球菌の病原性への関わりを明らかにすることは、公衆衛生上および食品安全確保上極めて重要である。

一般的に細菌の病原性に関する遺伝子は、pathogenicity island (PI)としてゲノム上にまとまって存在する場合が多いことが明らかになり、特にブドウ球菌においては多様なSE遺伝子が複数のPIやプロファージ、プラスミド等の可動性遺伝因子上に存在することが明らかにされてきている。申請者らの研究グループは、これまでに、これらSEs関連可動性遺伝因子の菌株間での水平移動により、ブドウ球菌菌株のSE遺伝子型の多様性がもたらされていることを明らかにしてきた(3)。可動性遺伝因子の水平移動によるSEs遺伝子群の伝播は、ブドウ球菌の病原体としての進化に大きく関わっていると考えられる。バイオインフォマティクスを駆使したゲノム配列情報解析(dryな研究)と実験室におけるラボワーク(wetな研究)を両輪として、SEs関連可動性遺伝因子の多様性の解明と、それぞれの可動性遺伝因子の詳細なキャラクタライズ、さらに可動性遺伝因子上のSEおよびSE1遺伝子群の発現を解析することにより、可動性遺伝因子と黄色ブドウ球菌の病原性との関連性を明らかにしていくことが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ブドウ球菌エンテロトキシン(SEs)ファミリー遺伝子群をコードする可動性遺伝因子の多型性を明らかにし、これらが保有するSEs遺伝子群および全体的な遺伝子構造からゲノムバイオロジーの時代にふさわしい分類法を確立することである。さらに、各可動性遺伝因子にコードされているSEsおよびSE1sが実際に毒素タンパク質として発現・産生されているかを定量的に解析し、また、SEsおよびSE1sの生物活性を評価することにより、各可動性遺伝因子の黄色ブドウ球菌の食中毒原性ならびに病原性への寄与を明らかにすることを目的とする。この一連の研究により、黄色ブドウ球菌の病原体としての進化の一端を明らかにすると共にブドウ球菌食中毒およびブドウ球菌感染症の病因論をより深く理解し、食の安全・安心確保に資することができると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ブドウ球菌エンテロトキシンファミリー遺伝子群をコードする可動性遺伝因子の多型性解析と分類法の確立

2007年の時点で報告されていた10株の黄色ブドウ球菌全ゲノム塩基配列情報を解析し、可動性遺伝因子pathogenicity islands (SaPI)のゲノム上の挿入部位を同定した。さらに、挿入部位近傍の保存された領域を絞りこみ、それぞれの部位に挿入されたSaPI全域を増幅するPCRプライマーを設計・合成した。これらのプライマーセットを用い、SaPI全域を増幅するLA-PCRを確立するとともに、増幅産物を制限酵素で消化することによりSaPIを同定するRFLP(restriction fragment length polymorphism)法を確立した。この手法(SaPI scanning/RFLP)を用い、SEB遺伝子を保有する新規SaPIを検索した。(2) 各種材料由来黄色ブドウ球菌のSEsおよびSE1s産生能の定量的解析

これまでに作成したSEs/SE1sに対する特異抗体を用い、Sandwich ELISAによるSEs/SE1s定量法を確立した。この検出法を用い、食中毒由来株のin vitroでの毒素産生総量を解析した。

(3) SEIs の嘔吐活性評価

霊長類モデルを用いて未だ嘔吐活性の有無が明らかにされていない新規な SE 様毒素群、staphylococcal enterotoxin-like toxins, SEIs (SE1K, SE1L, SE1M, SE1N, SE1O, SE1P, SE1Q, SE1R) の嘔吐活性を解析した。カンタイルにこれらの毒素を経口投与し、連続 5 時間観察して嘔吐の有無を確認した。

(4) プラスミド上に存在する新型 SEs の同定と生物活性の解析

細菌細胞中にゲノムとは独立して存在する可動性遺伝因子であるプラスミドによってコードされる 2 つの SE 様遺伝子を同定し、そのスーパー抗原活性 (マイトージェン活性、Vb 特異性、MHC class II 要求性) を詳細に検討するとともに、霊長類モデルによる嘔吐活性評価を行った。

4. 研究成果

(1) ブドウ球菌エンテロトキシンファミリー遺伝子群をコードする可動性遺伝因子の多型性解析と分類法の確立

黄色ブドウ球菌ゲノムの解析により、SaPI の挿入部位と各 SaPI がコードする SEs/SEIs 遺伝子を同定した (図 1)。各部位に挿入された SaPI の増幅を試みたところ、いずれのプ

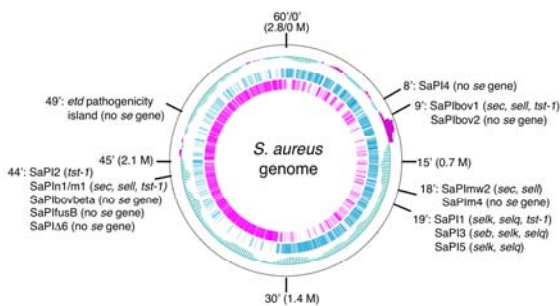


図1 Integration site of SaPIs and their related se genes

ライマーセットにおいても陽性対照株で 15kbp 以上の産物の増幅が見られることが確認された。なお、SaPI が挿入されていない株では本来のゲノムに応じた小さな断片が増幅されてくることから、PCR の成否と挿入断片が無いことが確認可能であった。増幅され

た PCR 断片の RFLP 分析では、同一部位に挿入された SaPI 間でパターンがことなるものがあることから、同一部位に挿入される SaPI にも多様性が見られることが推測された。本法を用い、SEB 遺伝子を保有する SaPI を検索したところ、SaPI3 挿入部位 (ゲノム 19' に位置)、SaPI_{hmw2} 挿入部位 (ゲノム 18' に位置)、および SaPI2 挿入部位 (ゲノム 44' に位置) に挿入される複数の SaPI が存在することが明らかになった。これらのうち、SaPI3 挿入部位に存在する新規 SaPI である SaPI_{ivm60} の塩基配列を決定したところ、従来から知られている SaPI3 (SEB 遺伝子、SE1K 遺伝子、SE1Q 遺伝子を保有) とことなり、SEB 遺伝子のみを保有することが明らかになった。さらに、同部位に挿入される SaPI には、

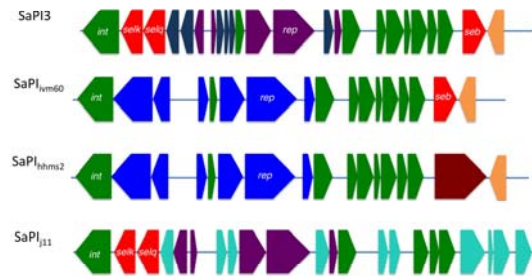


図2 SaPI_{ivm60}, SaPI_{hhms2}, SaPI_{j11}の模式図

SaPI_{ivm60} とほぼ同一の構造ながら SEB 遺伝子を保有しないもの (SaPI_{hhms2})、また、SE1K および SE1Q 遺伝子のみを保有するもの

(SaPI_{j11}) が存在することが明らかになった。これらの結果は、SEs/SEIs を保有する SaPI が予想以上に多様性を有することを示す結果であり、黄色ブドウ球菌の病原性進化を理解する上で重要な成果である。今後、本研究で確立した SaPI scanning を活用し、黄色ブドウ球菌集団が維持している SaPI のレパートリーを把握し、さらに特定の疾病との関連を解析することにより、菌株の病原性に基づいた黄色ブドウ球菌の分類を進めていく。

(2) 各種材料由来黄色ブドウ球菌の SEs および SEIs 産生能の定量的解析

SEs/SEIs を定量する Sandwich ELISA を確立し、食中毒由来株 48 株の in vitro における SE 産生量の評価・比較を行った。新型 SEH、

SE1J、SE1K、SE1P、SE1Q、SE1R) 産生量は0.2～0.8 $\mu\text{g/ml}$ であり、個々の菌株における新型SEs 総産生量は、食中毒に最も高い頻度で関与するとされるSEAの産生量と同等であった。また、SEG、SEI、SE1M、SE1N、SE1Oは遺伝子が genomic island 上にクラスターを形成して存在する毒素群で、これらの総産生量は約30～100 ng/ml と推定された。他のSEsに比べ産生量は極めて少ないものの、これらの遺伝子のみを保有する黄色ブドウ球菌による食中毒事例が報告されている。これらのことから新型SEsは食中毒に関与すると考えられ、今後、食品中における産生量や、食中毒原因食品中のSE総量を明らかにし、新型SEsの食中毒原性についてより詳細に解明していく必要がある。また、今回開発したSEs/SE1s検出系は、食中毒事件の解明等にも有用である。

(3) SE1sの嘔吐活性評価

被検カニクイザル11頭のSEAおよびSEBに対する感受性を確認したところ、SEA 10 $\mu\text{g/kg}$ 投与で10頭中5頭、100 $\mu\text{g/kg}$ 投与では7頭中6頭が嘔吐を示した。また、SEB 100 $\mu\text{g/kg}$ 投与では4頭中4頭が嘔吐したことから、何れのカニクイザルもSEAおよびSEBに対する感受性を有することが明らかになった。これらのカニクイザルを用いてSE1sの嘔吐実験を行った。SE1K投与では6頭中2頭、SE1Lでは6頭中1頭、SE1Mでは7頭中1頭、SE1Nでは6頭中2頭、SE1Oでは8頭中1頭、SE1Pでは6頭中3頭、SE1Qでは6頭中2頭、SE1Rでは6頭中2頭が嘔吐を示した。潜伏期1～5時間で、ほとんどが投与後2～3時間の間に嘔吐を示した。SE1sに対する反応の個体差が何に起因するか、現在のところ不明であるが、これらの毒素は霊長類に対して嘔吐活性を示し、食中毒原因毒素として機能する可能性が示唆された。霊長類モデルで多数のSE1sの嘔吐活性を解析したデータは本研究が唯一であり、SE1sの食中毒原性を考える上で、極めて重要である。

(4) プラスミド上に存在する新型SEsの同定と生物活性の解析

食中毒由来株Fukuoka 5株の保有するプラスミドpF5を解析している途中で発見した二つのSE様遺伝子、SESとSETの生物活性を詳細に検討した。SESはMHC class II分子存在

下でT cell receptor $\text{V}\beta$ 9および16を保有するT cellを特異的に活性化するスーパー抗原活性を有し、さらにカニクイザルに経口投与すると5時間以内に嘔吐を引き起こす、典型的なブドウ球菌エンテロトキシンであった。しかしながら、SETはMHC class II存在下でT cellを活性化するものの、その $\text{V}\beta$ 特異性は明瞭ではなく、また、カニクイザルへの経口投与で投与後24時間以降に遅発性に嘔吐を引き起こしたことから、従来から知られているブドウ球菌エンテロトキシンと類似する構造を有するが、その活性は典型的なSEsとは異なるものであることを明らかにした。

以上のように、本研究においては、ブドウ球菌が保有する多様なSEs/SE1s遺伝子は実際に蛋白質として産生され、またそのほとんどは霊長類に対し嘔吐活性を示すことを明らかにした。これらの結果は、新規に報告されたSEs/SE1sが食中毒原性を有することを強く支持するものである。さらに、これらの多様なSEs/SE1s遺伝子は可動性遺伝子上に存在し、菌株間を水平移動することにより黄色ブドウ球菌の病原性進化に大きく関わっていると推測されている。本研究で明らかにしたように、これらの可動性遺伝子も多様性を保持しており、どのような可動性遺伝子をどのような組み合わせで保有しているかによって菌株の病原性(個性)が決定されていると考えられる。今後、本研究で確立したSaPI scanning/RFLPを活用し、さらに大規模塩基配列決定手法と組み合わせることにより、黄色ブドウ球菌の病原性決定の機構解明と、病原性に基づいた分類が可能になると考えられる。

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 1件)

- ① Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.-L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect. Immun. (査読あり) **76** : 4999-5005, 2008.

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 重茂克彦、見須秀基、斎藤 恵、温井健司、小野久弥、胡 東良、中根明夫、品川邦汎。ブドウ球菌エンテロトキシン B 関連可動性遺伝因子の多様性。第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月、神戸市。
- ② Omoie, K., Misu, H., Saito, M., Nukui, T., Hu, D.-L., Nakane, A. and Shinagawa, K. New SEB-encoding *Staphylococcus aureus* pathogenicity island. 13th International Symposium on *Staphylococci* and Staphylococcal Infections, Sept. 2008, Cairns.
- ③ 重茂克彦。ブドウ球菌エンテロトキシンファミリーの多様性。第 53 回ブドウ球菌研究会シンポジウム、2008 年 9 月、東京。
- ④ 小野久弥、重茂克彦、今西健一、胡 東良、加藤秀人、中根明夫、内山竹彦、品川邦汎。新規エンテロトキシン SES および SET の生物活性。第 55 回毒素シンポジウム、2008 年 7 月、山中湖町。
- ⑤ 稲垣華絵、重茂克彦、小野久弥、胡 東良、中根明夫、品川邦汎。ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) の高感度検出法の確立と黄色ブドウ球菌株における SEs 産生量評価。第 62 回日本細菌学会東北支部会、2008 年 6 月、十和田市。
- ⑥ 重茂克彦、今西健一、胡 東良、加藤秀人、中根明夫、内山竹彦、品川邦汎。霊長類モデルによるブドウ球菌エンテロトキシン群嘔吐活性の解析。第 81 回日本細菌学会総会、2008 年 3 月、京都市。
- ⑦ 重茂克彦、近藤祐子、今西健一、胡 東良、斎藤直之、加藤秀人、中根明夫、内山竹彦、品川邦汎。新型ブドウ球菌エンテロトキシン群嘔吐活性の霊長類モデルによる解析。第 54 回毒素シンポジウム、2007 年 9 月、大阪府。
- ⑧ 小野久弥、重茂克彦、今西健一、岩壁佳宏、胡 東良、加藤秀人、斎藤直之、中根明夫、内山竹彦、品川邦汎。ブドウ球菌エンテロトキシン保有プラスミドにコードされる新規エンテロトキシン。第 144 回日本獣医学会学術集会、2007 年 8 月、江別市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

品川邦汎 (SHINAGAWA KUNIHIRO)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：60133906

(2) 研究分担者

重茂克彦 (OMOE KATSUHIKO)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：60224309