

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590141

研究課題名（和文）サルモネラの乾燥耐性獲得機構に関する研究

研究課題名（英文）STUDY ON THE MECHANISMS UNDERLYING ACQUISITION OF DRY-RESISTANCE BY SALMONELLA

研究代表者

天野 富美夫 (AMANO FUMIO)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90142132

研究成果の概要（和文）：

サルモネラの乾燥耐性の獲得に関与する宿主要因として、SEp22 が重要であることを *sep22* 遺伝子の導入と発現実験によって示した。また、環境要因として栄養因子が重要であることを明らかにし、M9 最少培地中のリン酸塩とグルコースが必須であること、さらに、カサミノ酸分画に含まれる成分が乾燥耐性獲得能および SEp22 の発現誘導に効果があることを示した。さらに、乾燥のサイクルを繰り返すと、SEp22 の発現と乾燥耐性が上昇した。

研究成果の概要（英文）：

Mechanisms of dry-resistance by *Salmonella* Enteritidis (SE) were studied. Transfection of *sep22*-gene to *sep22*-deleted mutant cells recovered expression of SEp22 mRNA and the protein, together with ability to gain dry-resistance, showing that SEp22 is an essential factor for acquisition of dry-resistance. Analysis of nutrients in M9 medium necessary for SE to acquire dry-resistance revealed that both phosphate ion and glucose were essential. Besides, certain fractions separated from ingredients of casamino acid, common to LB medium, were shown to induce both SEp22 and acquisition of dry-resistance. Taken together, this study showed that SEp22 is an essential factor for SE to acquire dry-resistance, and nutritional factors, such as phosphate ion, glucose, and some ingredients in LB medium or casamino acid, are also involved in acquisition of dry-resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：サルモネラ・乾燥耐性・DPS(SEp22)・ストレス応答・病原因子

1. 研究開始当初の背景

(1) サルモネラはわが国の細菌性食中毒の主要な起 因 菌 で、とくに *Salmonella* Enteritidis (SE)は、1980 年代後半以降、養鶏場を中心にその分布する範囲を拡大し、土壌や河川水、塵埃などの自然環境だけではなく、人々の住む住環境にも広がった。それに伴い、SE による食中毒は、鶏卵・鶏肉にとどまらず、野菜をはじめ、種々の食品の汚染によってもたらされるようになった。この急速な SE の分布ならびに食品汚染の背景として、サルモネラ的环境中におけるストレス耐性、とりわけ乾燥耐性が考えられる。

(2) サルモネラの乾燥耐性に関する研究は、従来、国内外を通じて疫学調査に関する研究が大部分で、それ以外の基礎的な研究はなされて来なかった。そのため、経験的に、サルモネラが大腸菌等の他のグラム陰性菌に比べて一般に乾燥に抵抗性を示すことが知られている以外に、この乾燥耐性に関する基礎的な研究はない。したがって、本研究が目的とする乾燥耐性獲得に関する遺伝学的、生化学的あるいは分子生物学的な研究はなく、未知のままである。

(3) 応募者は、従来、環境中の微生物の病原性に関する研究を行い、「病原微生物と環境微生物の接点」に焦点を当ててきた。その結果、偶然、SE の病原性環境分離株よりサルモネラの新規病原性関連因子、SEp22 を見出した。これは、分子量約 18.7kDa のタンパク質で大腸菌 Dps と相同性が高く、12 量体を形成して鉄(Fe²⁺)を取込むフェリチン様の機能を持ち、その発現が σ 38 による転写レベルでの調節を受け、過酸化水素(H₂O₂)によって誘導

されることを明らかにした。さらに、サルモネラ 環境抵抗性に関する研究中、偶然に、SEp22 高発現株は乾燥耐性を示し、低発現株は感受性を示すことを見出した。この結果は、SE の乾燥耐性に関与する遺伝子を明らかにした最初の知見であり、本研究はこれをさらに発展させるものである。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえ、遺伝学的、生化学的、および分子生物学的な研究を進展させ、サルモネラの乾燥耐性獲得機構を明らかにする。とくに、乾燥耐性獲得における環境要因としての栄養因子、ならびに、宿主要因としての SEp22 の関与に焦点を当てて研究を行う。さらに、本研究を通じて環境中の SE の乾燥耐性発現に関連した食中毒の発生に対する予防法を検討し、あらたな対策を探ることも併せて目的とする。

3. 研究の方法

(1) SE の乾燥耐性獲得における *sep22* 遺伝子の関与の解析： 従来の研究では、SEp22 発現量と乾燥耐性獲得能には正の相関があることを見出した。両者の関係を解明するため、*sep22* 遺伝子欠損変異株に *sep22* 遺伝子を導入し、発現させて SEp22 タンパク質を生合成させ、乾燥耐性獲得能の回復を調べた。この実験のため、平成 21 年度の備品として購入した遺伝子導入装置を活用した。さらに、数多くの環境分離株の SEp22 発現を調べ、乾燥耐性獲得能との関係を定量的に解析した。

(2) SE の乾燥耐性獲得に必要な栄養因子の解明： 従来の研究では、生理食塩水に LB 培地等の栄養因子を添加することによって乾燥耐性が獲得されることを見出した。本研

究ではさらに、SE の乾燥耐性獲得に有効な塩濃度、栄養因子の種類、特異性等を明らかにするため、生理食塩水よりも M9 最少培地を基本とした検討を行った。さらに、LB 培地中の栄養因子を分画し、より詳細な検討を行った。

(3) 乾燥耐性を獲得した SE の病原性に関する検討： 従来の研究から、SEp22 は SE のマウスに対する致死毒性発現に重要な役割を果たすことが示された。本研究では、SE の病原性の環境分離株 (SEp22 高発現株) を用いて、環境中で乾燥耐性を獲得した菌が乾燥耐性の過程を経ない菌に対してより強い病原性を示すか否かを調べ、環境中における病原性菌株の濃縮の可能性を検討することにした。

4. 研究成果

(1) SE の乾燥耐性獲得における *sep22* 遺伝子の関与： 遺伝子導入装置を用いて、*sep22* 遺伝子欠損変異株に pBR322 あるいは pBAD をベクターとして *sep22* 遺伝子を導入して得た復帰変異株が、ともに SEp22 の mRNA 及びタンパク質を発現し、乾燥耐性の獲得能も復帰することを明らかにした。

(2) SEp22 以外の乾燥耐性獲得に関与する因子： SEp22 以外の病原因子として、新たに SEp22 の発現に連動する SEp25 を見出し、これが大腸菌の *OsmY* と相同であることを明らかにした。SEp25 はサルモネラの乾燥耐性獲得において、SEp22 と連動すること、さらに SEp25 の発現は SEp22 以外の調節因子による制御を受けることを示した。

(3) 乾燥耐性獲得における栄養因子の役割：

① SE が乾燥耐性を獲得するために必要な栄養因子を解析した結果、M9 最少培地に添加することが要求されたグルコースは、乾燥から

の復帰直前に添加すれば、乾燥前に菌液に添加した場合とほぼ同様の効果が得られることを見出した。この結果から、グルコースの役割は、菌の内部で代謝されてエネルギーになるというよりはむしろ、浸透圧変化に対する保護作用を持つことによるのではないかと推察される。

② SE の乾燥耐性獲得に必要な栄養因子の作用機構に関し、LB 培地中の成分の検討に加え、新たに、LB 培地と類似の成分を含むカサミノ酸の成分を解析し、SE に乾燥耐性獲得能を賦与するか否かを検討した。その結果、カサミノ酸の HPLC による分画の一部は乾燥耐性獲得能を賦与し、SEp22 発現誘導を起こす活性成分の分画と同一であった。しかし、乾燥耐性獲得を亢進する活性は、SEp22 を誘導しない別の分画にも回収されたことから、サルモネラの乾燥耐性の誘導は、SEp22 の発現以外の経路によっても起こる可能性が示唆された。

(4) 乾燥耐性獲得を通じたサルモネラ病原性株の濃縮：

① SE の環境分離株 50 株を解析し、それぞれの菌株の SEp22 発現量と乾燥耐性獲得能の関係を定量的に解析した。その結果、SEp22 の発現量と乾燥耐性獲得能には高い相関性があり、一定レベル以上の SEp22 を発現する菌株は乾燥耐性を示すことが明らかになった。

② SEp22 の低発現株の 1 つである、SECl#16-1 株を用い、この菌株を増殖後に乾燥し、再び増殖させる過程を繰り返した。その結果、SEp22 の発現が数倍まで上昇し、それに伴って乾燥耐性を増強することを見出した。この結果は、環境中では乾燥ストレスがサルモネラの病原因子 SEp22 を濃縮し、生残性を増強することを示唆するので、食中毒

の統御には環境中のサルモネラに乾燥抵抗性を賦与しない工夫が必要である。

③マウスに対する病原性が、上記②で得られた、SECl#16-1株を10回、乾燥をくり返して得られた菌株において上昇するか否かを試験した。予備実験の段階であるが、これまでのところ、マウスの致死毒性を明らかに上昇させるまでには至っていない。これは恐らく、SEp22発現量の上昇が元の数倍にとどまっているため、マウスに病原性を示す強毒株が示すSEp22のレベル(弱毒株の20倍以上)には届かないことによる可能性が示唆される。

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7件)

1. Tamura, A., Yamasaki, M., Okutani, A., Igimi, S., Saito, N., Ekawa, T., Ohta, H., Katayama, Y., and Amano, F. Dry-resistance of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Enteritidis is regulated by both SEp22, a novel pathogenicity-related factor of *Salmonella*, and nutrients. *Microbes Environ.* **24** (2009) 121-127.

(査読有)

2. Tamura, A., Nishio, E., Fujimori, K., Igimi, S., and Amano, F. Lactoferrin inhibits the acquisition of dry-resistance of *Salmonella* spp. *Biosci. Microflora* **28** (2009) 81-88. (査読有)

3. Minami, N., Yasuda, T., Ishii, Y., Fujimori, K., and Amano, F. Regulatory role of cardiolipin in the activity of an ATP-dependent protease, Lon, from *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **149** (2011) 519-527. (査読有)

4. Pinto AF, Todorovic S, Hildebrandt P, Yamazaki M, Amano F, Igimi S, Romão CV, Teixeira M. Desulforubrythrin from *Campylobacter jejuni*, a novel multidomain

protein. *J Biol Inorg Chem.* **16** (2011) 501-10.

(査読有)

5. 天野富美夫, 齋藤典子, 工藤(原)由起子, 熊谷進 サルモネラの調理器具材への付着および洗剤による洗浄効果の評価法に関する研究 *Bacterial Adherence & Biofilm Vol.* **24**, (2010)93-98. (査読無)

6. 天野富美夫, 北村香南子, 藤森功, 齋藤典子 サルモネラ(*Salmonella Welteveden*)の培養で見出された凝集・付着性の特徴 *Bacterial Adherence & Biofilm Vol.* **25**, (2011)47-52. (査読無)

7. Amano, F. SEp22, *Salmonella* Dps, a key molecule bearing both pathogenicity and resistance to environmental stresses in *Salmonella*. *J. Health Sci.* **57** (2011) 1-14.

(査読有)

[学会発表] (計11件)

1. 天野富美夫, VBNC サルモネラの誘導に関与する遺伝子と環境中の調節因子、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸

2. 小林亮太、田村愛、山崎学、藤森功、天野富美夫、サルモネラの乾燥耐性獲得に必要な栄養因子の研究、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸

3. 小林亮太、田村愛、藤森功、天野富美夫、サルモネラの乾燥耐性に影響を及ぼす栄養因子の研究、フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月、東京

4. 天野富美夫, 齋藤典子, 工藤(原)由起子, 熊谷進, サルモネラの調理器具への付着および洗剤による洗浄効果の評価法に関する研究、第24回 *Bacterial Adherence & Biofilm* 学術集会、2010年7月、東京

5. 天野富美夫, 北村香南子, 田村愛, 藤森功, 齋藤典子, サルモネラ(*Salmonella Welteveden*)において観察された凝集性の解析、第25回 *Bacterial Adherence &*

Biofilm 学術集会、2011年7月、東京

6. Fumio Amano, Ai Tamura, Ryota Kobayashi, Kazuya Kitahata, Ko Fujimori, Manabu Yamasaki, Shizunobu Igimi, Noriko Saito, Dry-resistance of *Salmonella Enterica* subsp. *Enterica* Serovar Enteritidis is regulated by both SEp22, a novel pathogenicity-related factor of *Salmonella*, and nutrients, XIIIth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011年9月、札幌市
7. 森重雄太、藤森功、天野富美夫、VNC 状態にある *Salmonella* のピルビン酸処理による復帰機構の検討、第 84 回 日本生化学会大会、2011年9月、京都市
8. 南 徳子、植松 礼奈、岡田 玲子、北畑 和也、田村 愛、山崎 学、藤森 功、天野 富美夫、サルモネラの病原性関連因子 SEp22 と SEp25 の発現における関連性、第 84 回日本生化学会大会、2011年9月、京都市
9. 小林 亮太、田村 愛、藤森 功、天野 富美夫、サルモネラの乾燥耐性に影響を及ぼす栄養因子の研究：第 84 回日本生化学会大会 2011年9月、京都市
10. 植松礼奈、岡田玲子、北畑和也、藤森功、山崎学、天野富美夫、サルモネラ新規病原関連因子 SEp25 の発現調節に関する研究 — SEp22 と SEp25 の協調的発現調節機構 —、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011年10月、神戸市
11. Noriko Minami, Tatsuji Yasuda, Yoshiyuki Ishii, Ko Fujimori, Fumio Amano, Regulatory role of cardiolipin in the activity of an ATP-dependent protease, Lon, from *Escherichia coli*, 9th International Conference on AAA Proteins, 2011年11月、熊本市

〔図書〕(計5件)

1. 天野富美夫、「第4章 食品の微生物などによる汚染と健康被害」、In 『食品衛生学 「食の安全の科学」(改訂第2版)』(那須正夫、和田啓爾、編)、pp.99-145 (2011)4月、南江堂(東京)
2. 天野富美夫、「第3章 食中毒 SBO19, SBO20」、In 『スタンダード薬学シリーズ 5 「健康と環境」第2版』(日本薬学会編)、pp.90-110 (2012)1月、東京化学同人(東京)
3. 天野富美夫、「第8章 バイオハザードと遺伝子組換え実験」、In 『21世紀の考える薬学微生物学 第3版』(池澤宏郎 編)、pp. 473-495 (2011)8月、廣川書店(東京)
4. 天野富美夫、「疾病予防と健康管理」、In 『衛生薬学新論(改訂2版)』(山田英之、成松鎮雄、新井洋由、編)、(2012)南山堂(東京)、印刷中。
5. 天野富美夫、「第4章 疾病予防と健康管理 —感染症とその対策—」、「第6章 食品衛生学 —食品による健康障害、食品成分の変質、食品に由来する疾病の各論「食中毒」—」 In 『第5版 衛生薬学 —環境と健康—』(平塚明、姫野誠一郎、永沼章、編)(2012)丸善(東京)、印刷中。

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/seitaibougyo.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
天野 富美夫 (AMANO FUMIO)

研究者番号 : 90142132