

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 5 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590475

研究課題名（和文） ブドウ球菌エンテロトキシンの催吐シグナル受容体とその分子伝達機構の解明

研究課題名（英文） Studies on emesis-inducing signal receptor and molecular transfer mechanism of staphylococcal enterotoxin

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ブドウ球菌エンテロトキシシ（SE）は嘔吐誘導活性を示す一方、スーパー抗原活性を有することが知られている。しかし、SEによる食中毒の詳細メカニズムや毒素レセプターについては、まだ明らかにされていない。本研究では、我々はこれまで確立した小型嘔吐動物モデル・スunksを用いSEAの催吐シグナル受容体と分子伝達メカニズムを検討した。その結果、SEAはスunksに経口投与および腸管ループ投与実験において、本毒素は強い嘔吐活性を示したが、下痢活性を有さないことを明らかにした。また、スunksに事前にvanilloid受容体のアンタゴニストを投与することにより、SEAによる嘔吐を抑制したことを見出した。これらの結果から、vanilloid受容体、小腸の5-HTの産生と放出はSEAによる嘔吐反応に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Staphylococcal enterotoxins (SEs) are superantigenic toxins and involved in human diseases including food poisoning and toxic shock syndrome. However, the role and mechanism in clinical symptoms of food poisoning remains poorly understood. In this study, house musk shrews were used to study the role and mechanism of SEs in food poisoning. Oral administration of SEA into shrews elicited a strong emetic response but no diarrhoeagenic symptom. SEA was injected into the intestinal loops of the animals did not induce exudation of fluid and consequent dilation of the intestinal segments. These results indicate that SEA has a strong superantigenic and emetic activity, but no diarrhoeagenic activity. We further investigated SEA receptor and emetic signal pathway in house musk shrews. Our results showed that pretreatment with a vanilloid receptor antagonist, capsazepine, significantly inhibited SEA-induced vomiting responses in the animals and the effect was shown in a dose-dependent manner. Immunofluorescence analysis showed that intestine of house musk shrew express vanilloid receptor and SEA co-localized with the cells expressing vanilloid receptor. These results suggest that vanilloid receptor could play an important role in SEA-induced emetic response and this finding might be useful in prevention and treatment of staphylococcal food poisoning.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：病原性，エンテロトキシン

1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)は、代表的なスーパー抗原毒素である一方、重要な食中毒原因毒素である。しかし、SEの催吐メカニズムについては、適切な嘔吐モデルがなかったため、ほとんど知られていない。本研究者は、これまで、小型催吐実験動物モデル（スンス）を開発したとともに、SEAによる嘔吐誘導はセロトニンが重要であることを見出した。

さらに近年、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が次々と発見され、現在SEA~SEXまで報告されている。本研究者も新型スーパー抗原毒素SER, SESとSETを発見した。これまで、SEのスーパー抗原活性については数多くの研究が行われてきたが、SEの催吐シグナル受容体とその嘔吐シグナル伝達機序は、また明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究目的は、近年我々が開発した小型催吐実験動物モデル・スンスを用い、SEAの催吐活性、下痢活性およびスーパー抗原活性を比較検討する。また、site-directed mutationおよびdeleted mutation法によりSEA分子上のアミノ酸を変異し、変異したSEA (mSEA)を作製することにより、SEA分子上の催吐活性部位、SEAと結合する細胞レセプターおよびSEAの催吐シグナル伝達分子メカニズムを検討することである。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌発現系によりSEA及び各種mSEAの作製と大量精製；(2) mSEAとSEAの物理・化学処理及び消化酵素に対する抵抗性の比較検討：SEAおよびスーパー抗原活性が欠損させたmSEAは、ペプシン、トリプシンなどの消化酵素や加熱・pHなどの理化学処理に対する反応性と抵抗性の変化を調べ、SEAの分子構造とその生物活性と関係を検討した；(3) 嘔吐動物モデル・スンスに対するmSEAとrSEAの催吐活性の比較検討：mSEA及びSEAをそれぞれスンスに経口及び腹腔内投与し、スンスの嘔吐反応の有無、嘔吐回数、潜伏時間などを観察・記録した。mSEAとSEAの嘔吐活性とスーパー抗原活性を比較検討した；(4) SEA催吐シグナル受容体の検索、解析及び同定：Vanillioid受容体やセロトニン(5-HT)受容体アンタゴニスト、5-HT合成阻害剤、お

よび周囲迷走神経阻害剤(5,7-DHT)によるSEAの嘔吐活性に対する影響を調べた。さらにVanillioid受容体の発現は免疫組織染色により調べた。

4. 研究成果

大腸菌発現系によりSEA及び各種mSEAの作製と大量精製し。スーパー抗原活性を確認した(Fig. 1)。嘔吐動物モデル・スンスに

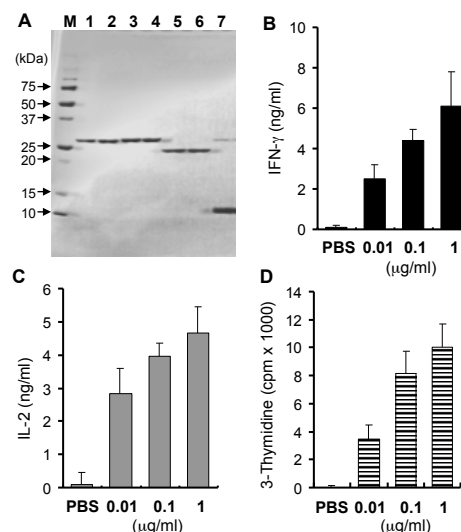


Fig. 1 Biological and superantigenic activities of recombinant toxins in the spleen cells of mice and house musk shrews. (A) SDS-PAGE analysis of SEA, SEC, TSST-1 and LT proteins. M, molecular marker; Lanes 1 and 2, SEA; Lanes 3 and 4, SEC; Lanes 5 and 6, TSST-1; lane 7, LT. One microgram of protein was added per lane. Gel was stained with coomassie brilliant blue R-250. (B and C) Production of IFN- γ and IL-2 in the cultures of mouse spleen cells stimulated with SEA. The data are means \pm standard deviations based on samples obtained from five mice and each mouse sample was done in triplicate. (D) Proliferation of house musk shrew spleen cells induced by SEA. Cultures were incubated with SEA for 48 h and pulse-labeled with [3 H]thymidine for 24 h. The data are means \pm standard deviations based on samples obtained from five animals.

に対するSEA, SECおよびTSST-1の嘔吐活性と下痢活性を検討した結果、SEAとSECは嘔吐活性を示したが、下痢活性が認められなかった(Table 1)。また、スンス(Fig. 2)およびウサギ(Fig. 3)腸管ループ実験では、SEAをループに直接投与しても下痢活性が認

Table 1. Emetic and diarrheagenic responses of house musk shrews induced by oral administration with SEA, SEC and TSST-1

Toxin	Administration (μ g/kg)	No. of shrews		Latency (min)	No. of vomiting episodes	Diarrhea
		Tested	Vomiting (%)			
SEA	100	6	5 (83.3)	85.2 \pm 12.0	7.4 \pm 2.7	-
	500	5	5 (100.0)	84.4 \pm 15.5	8.8 \pm 3.1	-
SEC	100	5	1 (20.0)	83	2	-
	500	5	2 (40.0)	87.0 \pm 11.0	5.0 \pm 2.8	-
TSST-1	100	4	0	-	-	-
	500	5	0	-	-	-

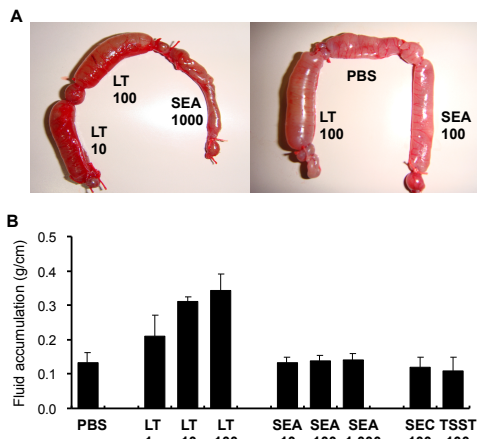


Fig. 2 Fluid accumulation in house musk shrew intestine loops at 8 h after SEA administration. (A) Gross appearance of loop sections. The data shown are representative of six repetitions. (B) The quantitative response of the intestine loops (weight/length ratio) after PBS, LT, SEA, SEC or TSST-1 administration. The data are means \pm standard deviations based on samples from five to six animals.

められなかった。さらに、Vanilloid 受容体および 5-HT₃ 受容体アンタゴニスト、5-HT 合成阻害剤の前投与は、SEA によるスunks の嘔吐を抑制した。SEA による腸管、脳、脳幹の神経伝達物の変化を HPLC により測定し

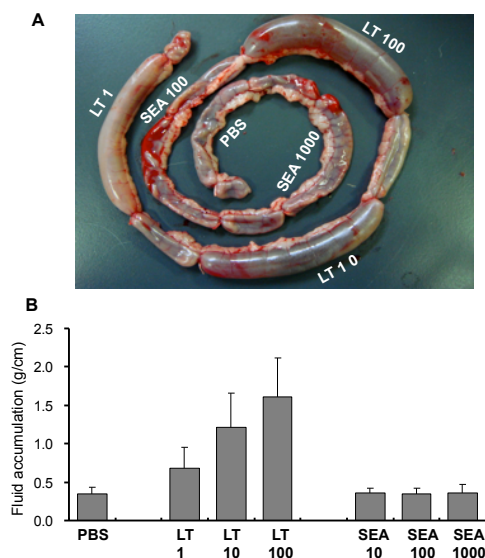


Fig. 3 Fluid accumulation in rabbit intestine loops at 8 h after SEA administration. (A) Gross appearance of loop sections. The data shown are representative of five repetitions. (B) The quantitative response of the intestine loops (weight/length ratio) after administration with different concentrations of LT or SEA. The data are means \pm standard deviations based on samples from five animals.

た結果、SEA 刺激により小腸の 5-HT の産生または放出を促進した。5, 7-DHT 投与と迷走神経切断も SEA による嘔吐を抑制した。免疫組織染色により小腸粘膜と腸筋層間神経叢には 5-HT の産生と Vanilloid 受容体の発現を確認した。さらに、SEA 陽性細胞と Vanilloid 受容体陽性細胞が一致であることを観察された (Fig. 4)。これらの結果により、小腸の 5-HT の産生と放出および迷走神経求心性ニ

ューロンの 5-HT₃ 受容体は SEA による嘔吐反応に重要であること、また Vanilloid 受容体は嘔吐誘導において重要な役割を果たしていると考えられる。

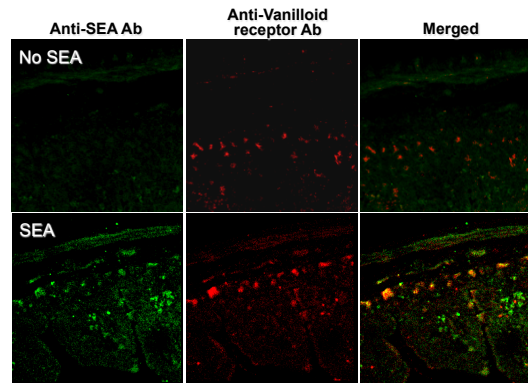


Fig. 4 SEA colocalized in vanilloid receptor expressing cells in intestine.

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 13 件)

1. Mina, E. K., Hu, D.-L., Omoe, K., Tsuji, T. and Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin A has potent superantigenic and emetic activities but not diarrheagenic activity. *Int. J. Med. Microbil.* 査読有, 302(3): 88-95. 2012.
2. Ono, H., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Shinagawa, K. and Omoe, K. Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 査読有, 64(1): 392-402. 2012.
3. Hu, D.-L., Maina, E. K., Omoe, K. Inoue, F., Yasujima, M. and Nakane, A. Superantigenic toxin coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tohoku J. Exp. Med.* 査読有, 225:161-169. 2011.
4. Li, S.-J., Hu, D.-L., Maina, E. K., Shinagawa, K., Omoe, K. and Nakane, A. The superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 査読有, 110: 729-736. 2011.
5. Omoe, K., Nunomora, W., Kato, H., Li, Z.-J., Igarashi, O., Araaki, M., Sano, K., Ono, H., Abe, Y., Hu, D.-L., Nakane, A., Kiyono, H., Takakuwa, Y., Shinagawa, K., Uchiyama, T., Imanishi,

- K. High affinity of interaction between superantigen and TCR V β molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive CD4⁺ T cells. *J. Bio. Chem.* 査読有, 285(40): 30427-30435. 2010.
6. Narita, K., Hu, D.-L., Mori, F., Wkabayashi, K., Iwakura, Y. and Nakane, A. Role of interleukin-17A in cell-mediated protection against *Staphylococcus aureus* infection in mice immunized with fibrinogen-binding domain of clumping factor A. *Infect. Immun.* 査読有, 78(10): 4999-5005. 2010.
 7. Cui, J.-C., Zhang, B.-J., Lin, Y.-C., Wang, Q.-K., Qian, A.-D., Nakane, A., Hu, D.-L. and Tong, G.-Z. Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis. *Vet. Immun. Immunopath.* 査読有, 135 (5): 64-70. 2010.
 8. Narita, K., Hu, D.-L., Nakane, A. The role of interleukin-17 in the protective effect of immunization with clumping factor A against *Staphylococcus aureus* infection. *Hirosaki Med. J.* 査読有, 60 (S): 238-244. 2010.
 9. Zhang, B.-J., Cui, J.-C., Zhang, X., Qian, A.-D., Tong, G.-Z., Hu, D.-L., Nakane, A. and Wang Q.-K. Immunization with glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mouse model. *Chn. J. Prev. Vet. Med. (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)* 査読有, 31(7): 557-562. 2009.
 10. 中根明夫, 胡 東良. ブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐誘導活性. 化学療法の領域. 25 (5): 779-788. 2009.
 11. Zhang, B.-J., Cui, J.-C., Zhang, X., Qian, A.-D., Tong, G.-Z., Hu, D.-L., Nakane, A. and Wang Q.-K. Development and evaluation of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis model. *Chn. J. Prev. Vet. Med. (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)* 査読有, 31(5): 365-369. 2009.
 12. Hu, D.-L., Omoe, K., Shinagawa, K. and Nakane, A. Immunization with nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A, D227A, protects against enterotoxin -induced emesis in house musk shrews. *J. Infect. Dis.* 査読有, 199(3): 302-310. 2009.
 13. Hu, D.-L., Narita, K., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Nakane, A. and Karaolis, D. K. c-di-GMP as a vaccine adjuvant protects against systemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *Vaccine* 査読有, 27: 4867-4873. 2009.
- [学会発表] (計 33 件)
1. 胡 東良, Maina, E.K., 重茂克彦, 中根明夫. Vanilloid receptor plays an important role in staphylococcal enterotoxin A-induced emesis. 第85回日本細菌学会, 長崎. 2012. 3. 26-29..
 2. Maina, E.K., Hu, D.-L., Omoe, K., Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin A has strong superantigenic and emetic activity but does not diarrheagenic activity. 第85回日本細菌学会, 長崎. 2012. 3. 26-29.
 3. Hu, D.-L., Li, S.-J., Maina, E.K., Omoe, K., Nakane, A. Toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes on the superantigenic activity. 第34回日本分子生物学会. 横浜. 2011. 12. 13-16.
 4. 小野久弥, 廣瀬昌平, 山本欣郎, 胡 東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンAの消化管における標的細胞は肥満細胞である. 第56回日本ブドウ球菌研究会. 高知. 2011. 9. 23-24.
 5. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡 東良, 中根明夫, 重茂克彦. *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands 解析法の確立とそれを用いた多様性解析. 第56回日本ブドウ球菌研究会. 高知. 2011. 9. 23-24.
 6. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡 東良, 中根明夫, 重茂克彦. 食中毒事例分離黄色ブドウ球菌におけるゲノム構成の解明. 第152回日本獣医学会学術集会. 大阪. 2011年9月19日.
 7. Hu, D.-L., Li, S.-J., Maina, E.K., Omoe, K., Nakane, A. Superantigenic activity

- of toxic shock syndrome toxin-1 is relatively resistant to heating and digestive enzymes compared with staphylococcal enterotoxin A. IUMS, Sapporo, Japan. Sep. 6-10, 2011.
8. Maina, E. K., Hu, D.-L., Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin A induces emetic but not diarrhoea response during *Staphylococcus aureus* food poisoning. IUMS, Sapporo, Japan. Sep. 6-10, 2011.
9. Sato, A., Nagasako, Y., Yamamoto, Y., Sato, Y., Ono, H. K., Hu, D.-L., Nakane, A., Omoe, K. temperature dependent regulation of enterotoxin gene cluster related staphylococcal enterotoxins production. IUMS, Sapporo, Japan. Sep. 6-10, 2011.
10. 廣瀬昌平, 小野久弥, 山本欣郎, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンAの粘膜上皮バリア通過機構の解明. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形. 2011. 8. 18-19.
11. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. 食中毒原性黄色ブドウ球菌における特有のゲノム構成. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形. 2011. 8. 18-19.
12. 佐藤明彦, 長廻ゆりあ, 山本裕紀, 小野久弥, 佐藤祐介, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンおよびエンテロトキシン様毒素産生に対する温度の影響. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形. 2011. 8. 18-19.
13. Maina, E. K., Hu, D.-L., Omoe, K., Nakane, A. Staphylococcal enterotoxin A has strong superantigenic and emetic activity but does not diarrheagenic activity. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形. 2011. 8. 18-19.
14. 胡東良, Edward K Maina, 重茂克彦, 中根明夫. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のSCC*mec*とスーパー抗原遺伝子の関連性. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形. 2011. 8. 18-19.
15. 小野久弥, 広瀬昌平, 山本欣郎, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンAの標的細胞は肥満細胞である. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 神戸. 2010. 12. 7-10.
16. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンB遺伝子関連新規 *Staphylococcus aureus* pathogenicity islandの同定. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 神戸. 2010. 12. 7-10.
17. Hu, D.-L., Maina, E. K., Tomioka, Y., Li, S.-J., Narita, K., Osanai, A., Shinagawa, K., Omoe, K. and Nakane, A. The superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzyme treatment. 14th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Bath, United Kingdom. 6-9 Sep. 2010.
18. Narita, K., Hu, D.-L., and Nakane, A. The role of IL-17A in the cell-mediated immunity induced by an immunization with clumping factor A against *Staphylococcus aureus* infection. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. 22-27 Aug. 2010.
19. 小野久弥, 西澤雅人, 山本欣郎, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシンAの消化管における動態と標的細胞の同定. 第64回日本細菌学会東北支部総会, 仙台. 2010. 8. 19-20.
20. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡東良, 中根明夫, 重茂克彦. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB遺伝子を保有する新規 *Staphylococcus aureus* pathogenicity islandの解析. 第64回日本細菌学会東北支部総会, 仙台. 2010. 8. 19-20.
21. 胡東良, Edward K Maina, 富岡義裕,

- 李 勝軍, 成田浩司, 長内理大, 品川邦汎, 重茂克彦, 中根明夫. 毒素性ショック症候群毒素のスーパー抗原活性は熱及びタンパク分解酵素に対し強い抵抗性を示す. 第64回日本細菌学会東北支部総会, 仙台. 2010. 8. 19-20.
22. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡 東良, 中根明夫, 重茂克彦. ブドウ球菌エンテロトキシン B 遺伝子を保有する新規 *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands の解析. 第83回日本細菌学会総会, 横浜. 2010. 3. 27-29.
23. 小野久弥, 重茂克彦, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎. ブドウ球菌エンテロトキシン A の消化管における動態と標的細胞の解析. 第83回日本細菌学会総会, 横浜. 2010. 3. 27-29.
24. 胡 東良, 成田浩司, 中根明夫, David K. R. Karaolis. c-di-GMPはアジュバントとして黄色ブドウ球菌感染に対するワクチン効果を増強する. 第83回日本細菌学会総会, 横浜. 2010. 3. 27-29.
25. Hu, D.-L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K., Nakane, A. Vaccination with a nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A, D227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. The 10th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. Yokohama, Japan. 2010. 3. 26.
26. 小野久弥, 重茂克彦, 山本欣郎, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎. ブドウ球菌エンテロトキシン A の消化管における動態. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜. 2009. 12. 9-12.
27. Hu, D.-L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K., Nakane, A. Vaccination with nontoxic mutant staphylococcal enterotoxin A, D227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. 第39回日本免疫学会総会. 大阪. 2009. 12. 02-04.
28. 胡 東良, 中根明夫. 食品安全危害の新たな特徴と動物源性食品安全研究戦略. 中国農業科学院動物源性食品安全研究センター設立式典並びに動物源性食品安全研究国際シンポジウム. 特別講演. 上海. 2009. 11. 6-10.
29. 小野久弥, 重茂克彦, 山本欣郎, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎. ブドウ球菌エンテロトキシン A の腸管内動態の解析. 第148回日本獣医学会学術集会. 鳥取. 2009. 9. 25-27.
30. 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 の免疫による嘔吐抑制効果. 第56回日本毒素シンポジウム, 岐阜. 2009. 8. 26-28.
31. 長廻ゆりあ, 重茂克彦, 稲垣華絵, 山本裕紀, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎. 新型ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) の食品中における産生量評価. 第63回日本細菌学会東北支部総会, 盛岡. 2009. 8. 20-21.
32. 富岡義裕, 胡 東良, Edward Kithela Maina, 成田浩司, 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は熱及びタンパク分解酵素に強い抵抗性を示す. 第63回日本細菌学会東北支部総会, 盛岡. 2009. 8. 20-21.
33. 胡 東良, 成田浩司, 中根明夫, David K. R. Karaolis. c-di-GMPはアジュバントとして黄色ブドウ球菌感染に対するワクチン効果を増強する. 第63回日本細菌学会東北支部総会, 盛岡. 2009. 8. 20-21.
6. 研究組織
(1)研究代表者
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
- (2)研究分担者
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