

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 4日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790408

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌が産生する表皮細胞分化抑制因子 EDIN に関する研究

研究課題名（英文）Research on Epidermal Cell Differentiation Inhibitor EDIN producing *Staphylococcus aureus*

研究代表者

久恒 順三（HISATSUNE JUNZO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40513180

研究成果の概要（和文）：黄色ブドウ球菌が産生する ET 及び EDIN を組換え体で精製後、実験動物マウス並びに培養細胞を用いて生物活性を確認した。次に、これらの毒素のマウス表皮から全身への拡散性を検討するため、皮膚組織を用いてトランスウェルにて解析した。その結果、いずれの条件下でも ET の下層への拡散性が認められた。これは皮膚組織を装着する時に、皮膚がずれて隙間が出来て上下の培養液の区分けが出来ていなかったことが原因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Biological activity was checked for recombinant ETs and EDINs producing by *staphylococcus aureus*, using the ICR mouse and the cultured cell.

Next, in order to examine the diffusibility from the mouse skin of these toxins to the whole body, it analyzed by trans-well using skin structure.

As a result, the diffusibility to the lower layer of ET was accepted also under which conditions. What the skin shifted, the crevice was made and division of up-and-down culture solution had not carried out when this equipped with skin structure was considered to be the cause.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細菌毒素

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：EDIN、表皮剥脱、ADP リボシル化、Dsg1、組織移行

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトに種々の化膿性疾患、肺炎、腸炎、食中毒などの疾患を引き起こす原因菌であり、主要な院内感染菌の一つとしてもよく知られている。また、本菌はヒトに常在する菌でもあり、主に鼻腔、皮膚、腸管など

に常在する。本菌は *staphylococcus* 属の一つであり、その他のブドウ球菌属には表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) や腐性ブドウ球菌 (*S. saprophyticus*) などがあるが、ヒトへの病原性では黄色ブドウ球菌が最も強い。黄色ブドウ球菌感染症の特徴は、本菌が非常に多様な疾患を引き起こすことで

ある。本菌は、フルンケル、癰（よう）、伝染性膿痂疹、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群（staphylococcus scalded skin syndrome: SSSS）などの皮膚疾患、毒素性ショック症候群、軟組織感染症、肺炎などの呼吸器感染症、腸炎、骨髄炎、敗血症、心内膜炎などの原因菌である。また病院では、薬剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染症が時として深刻な問題となっている。本来、MRSAは院内感染菌として抵抗力の弱い易感染性の宿主への感染が問題視されているが、近年、市中由来のMRSA感染症が頻発している。市中型MRSAは、多くの場合は皮膚や軟組織感染症を起こすが、時として敗血症、毒素性ショック症候群、壊死性肺炎などの重篤な感染症を引き起こす。

伝染性膿痂疹（impetigo）は表在性細菌感染症で、病変が皮膚局所に限局する疾患である。主に幼児、小児の疾患で保育園、幼稚園などで接触感染により感染が拡大するので「とびひ」と呼ばれている。膿痂疹は水疱形成し、それが破れた後に生じる糜爛を主症状とする。本菌による水疱形成は、菌が産生する表皮剥脱毒素（Exfoliative toxin, ET）によって引き起こされる。ETは血清学的にETA、ETB、そして、ETDの3種類が報告されている。impetigoはETA産生株が最も強毒性を示す。これに対して、水疱性膿痂疹の重篤化した疾患であるSSSSでは、ETA産生株よりもETB産生株の方が強毒株が多く分離されている。

一方、SSSSと診断された患者の皮膚病変から分離された *S. aureus* の菌体外産物のマウス培養表皮細胞に対する影響を調べる過程で、*S. aureus* 培養上清中に表皮細胞の *in vitro* で Ca^{2+} による形態的分化を抑制する活性が見出され、表皮細胞分化抑制因子（Epidermal cell Differentiation Inhibitor, EDIN）と名付けられた（*Cell Struct. Funct.*, 1987, 12, 395-399）。EDINは血清学的にEDIN-A、EDIN-B、そして、EDIN-Cの3種類が知られ、それぞれのアミノ酸レベルで約60%の相同性をもつ。加えて、SSSS由来のETB産生株で、EDIN-Cがほぼ100%産生されることが既にわかっている。EDINの分子細胞レベルでの作用機構は詳細に研究されている。EDINの作用機構はモノADPリボシルトランスフェラーゼ活性を有する。これは補酵素であるNADを基質として加水分解した後に、ADPリボシル基を標的蛋白質に転移する酵素活性である（*J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 21297-21299）。EDINの標的蛋白質はボツリヌス菌が産生するC3酵素と同様に、動物細胞が持つ低分子量G

蛋白質Rhoファミリーに属するRhoA、RhoB、RhoCなどで、そのRhoのAsp41をADPリボシル化修飾する。EDINによってADPリボシル化修飾されたRhoは、不活化され、その生理的機能である細胞骨格、細胞周期、細胞運動、遺伝子発現、付着、食作用やアポトーシスなどの機能が影響される。

現在、EDINやC3酵素などの細菌由来ADPリボシル化毒素は、分子生物学的な研究において、実験のツールとして汎用されている。しかしながら、細菌感染症において、これらの酵素が病原性発現にどのような役割を担っているのかについては多くの疑問が残されている。

2. 研究の目的

本研究において、黄色ブドウ球菌感染症、特に、SSSSなどの皮膚感染症の病原発現におけるEDINの役割を解析する。最近、興味深い事に、EDINがマウスの大動脈内皮細胞に一過性の無数の小孔を開きさせ、黄色ブドウ球菌が通り抜け可能な孔を誘導していることが報告された（*J. Cell. Biol.*, 2006）。新生児に多い見られるSSSSは、体の広範囲に紅斑や水疱、そして、皮膚の剥脱が認められるが、本菌は咽頭、鼻腔や臍帯等の部位に感染する。SSSSの水疱形成は本菌から産生したETが血中に出て起こる毒素血症によって発症する。したがって、EDINの内皮細胞の微小孔の開口作用によって、ETの血中移行性に影響を及ぼしている可能性が十分に考えられる。加えて、EDIN遺伝子は本菌ゲノムの Pathogenicity Island (PI) 上に存在し、近傍にET遺伝子がありクラスターを形成していることからEDINとETが関係している事が示唆される（*Infect. Immun.*, 2001, 69, 7760-7771）（*Infect. Immun.*, 2002, 70, 5835-5845）。したがって、本研究では、新生児における水疱性膿痂疹の重篤化したブドウ球菌性熱傷様症候群の病原発現機序において、ETによる水疱形成の増悪化にEDINがどのような機序で関わっているのかといった課題に焦点を絞って解析する。

この研究により、水疱性膿痂疹が黄色ブドウ球菌から産生されたETがどのようにして皮下組織や血管内への移行に全身に広がっていき、重篤化してブドウ球菌性熱傷様症候群にまで進展するのかについての課題の分子基盤となる事が期待される。

3. 研究の方法

1) ETの表皮剥脱活性におけるEDIN投与による影響：

EDIN及びETの精製蛋白質を得る為に黄色ブドウ球菌から既知の方法により取

得する。または、大腸菌を用いてそれぞれの組換え体を大量精製することで得る。

マウス動物実験を行う為、ヘアレスマウスを用いて、精製EDINを前投与して一定時間後にETを投与し、その表皮剥脱活性をニコルスキー現象により評価する。また、EDINの表皮細胞分化抑制活性がETの表皮剥脱活性にどのように影響を及ぼすのかについても解析する。

作業が効率的に進められるように、申請者が所属する研究室の大学院生に協力してもらう。

2) バイオイメージングを用いたETの全身移行性の解析：

マウスを用いた動物実験において、EDIN前投与によるETの全身への拡散性を解析する為、蛍光標識したEDIN、または、ETを作製する。作製した蛍光標識EDINが表皮細胞分化抑制活性、ADPリボシルトランスフェラーゼ活性を保持していることを確認する。そして、蛍光標識ETが表皮剥脱活性を保持していることを確認する。蛍光標識したETをマウスに投与し、インフラレッド *in vivo* イメージングシステムを用いて投与部のETの拡散性をリアルタイムで観察する。次に、蛍光標識したEDINをマウスに前投与し、同様にイメージングシステムによりEDINの局在を可視化し、一定時間後に蛍光標識ETを投与し、ETの全身への拡散性をEDIN未投与時と比較して影響されるかどうかを検討する。当年度においては、蛍光標識EDIN及びETの作製、それぞれの作製タンパク質の活性確認、マウスへの投与条件に検討で大部分を費やすものと予想される。

3) EDIN-A と EDIN-C の構造解析による予測：

EDINは血清学的にEDIN-A、EDIN-B、そして、EDIN-Cが報告されている。EDIN-Bは既に立体構造が明らかにされ (*J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 45924-45930)、EDIN-AやEDIN-Cとは異なり RhoA 以外に RhoE 及び Rnd3 を ADP リボシル化修飾することが明らかとなっている (*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 9537-9542)。一方、EDIN-AとEDIN-Cはまだ立体構造が明らかにされておらず、ターゲット分子である低分子量GTP結合タンパク質に対する基質認識の比較解析が十分に結論付けられていない。そこで、EDIN-AとEDIN-CのX線結晶解析により立体構造の決定を行う。

ETの表皮剥脱活性におけるEDIN投与による影響：まず最初に、EDIN及びETの精製蛋白質を得る為に黄色ブドウ球菌から既知

の方法により取得する。または、大腸菌を用いてそれぞれの組換え体を大量精製することで得る。

マウス動物実験を行うために、ヘアレスマウスを用いて、精製EDINを前投与して一定時間後にETを投与し、その表皮剥脱活性をニコルスキー現象により評価する。また、EDINの表皮細胞分化抑制活性がETの表皮剥脱活性にどのように影響を及ぼすのかについても解析する。

4. 研究成果

黄色ブドウ球菌感染症、特に、ブドウ球菌性熱傷様症候群 (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome: SSSS) の患者から分離される多くの黄色ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素 (exfoliative toxin: ET)、並びに、表皮細胞分化抑制因子 (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor: EDIN) の皮膚疾患病態形成との関わりを解析する為に、申請書の計画に基づいて、EDIN 及び ET を 6X His 標識した組換えタンパク質として大腸菌 BL21 株で大量発現させ、Ni-NTA 樹脂を用いて精製した。その結果、両者とも 1 L 培養液から約 2 mg の精製タンパク質を得る事が出来た。次に、精製 ET を生後 2 日目の新生児 ICR マウスの腹腔内に投与した。投与 2 時間後、全身の表皮剥脱が認められ、精製 ET の生物活性を確認できた。一方、精製した EDIN の活性について、ヒト表皮ケラチノサイト HaCaT 細胞、または、HeLa 細胞を用いて、EDIN による低分子量 GTPase である RhoA の ADP リボシル化を測定した。その結果、精製 EDIN の添加量に依存して ADP リボシル化 RhoA が増大していた。また、新生児マウスを用いて、精製 EDIN 投与により表皮組織の過形成を確認できた。次に、ET をマウスに投与した時に全身に拡散するのに EDIN が影響しているか否かを検討した。新生児マウスから皮膚組織を剥離し、上層ウェルに装着して、上層と下層に培養液で浸したトランスウェルを作製した。上層ウェルの培養液に精製 EDIN を添加、または、未添加で細胞を一定時間前処理し、その後、ET を添加して時間経過毎に下層の培養液を回収した。移行してきた精製 ET をウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、いずれの時間においても ET のバンドが検出され、下層の培養液に移行していた。これは皮膚組織を装着する時に、皮膚がずれて隙間が出来て上下の培養液の区分けが出来ていなかったことが原因と考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久恒 順三 (HISATSUNE JUNZO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40513180

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：