

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790467

研究課題名(和文) 毒素性ショック症候群毒素-1の新規機能による黄色ブドウ球菌細胞内寄生メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of intracellular persistence of Staphylococcus aureus by novel function of toxic shock syndrome toxin-1

研究代表者

浅野 クリスナ (Asano, Krisana)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70598622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌の上皮内感染メカニズムにおける毒素性ショック症候群毒素-1(TSST-1)の機能について解析を行なった結果、TSST-1はオートファジー誘導下の培養上皮細胞でオートファゴソーム蓄積を減少させた。この抑制効果より、TSST-1はオートファジー抑制活性を持つことが示唆された。さらにこの効果はスーパー抗原活性に依存しないことを示す結果が得られた。一方、TSST-1産生菌と非産生菌の比較では、培養上皮細胞感染での細胞内菌数と細胞毒性がTSST-1産生菌で減少した。これらのことよりTSST-1は黄色ブドウ球菌の上皮細胞内寄生に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effect of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) on Staphylococcus aureus infection in the epithelial cells was investigated. TSST-1 did not alter the adhesion and invasion into the epithelial cells, HeLa 229, HEK293 and 407. However, TSST-1 reduced the accumulation of autophagosomes in nutrient starved cells or rapamycin-treated cells, suggesting that TSST-1 suppresses autophagy. In addition, this suppression did not require superantigenic activity and might be involved in the autophagosome formation process rather than autophagosome degradation. From day 5 after infection, intracellular bacterial number and cytotoxicity of TSST-1-producing *S. aureus* were decreased in comparison to non-producing strain, suggesting that TSST-1 may promote intracellular persistence of *S. aureus* in the epithelial cells.

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：黄色ブドウ球菌 TSST-1 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

Staphylococcus aureus (黄色ブドウ球菌) は、表層感染から、生命を脅かす深部感染まで、ヒトの様々な感染症の要因となる病原菌である。この細菌は TSST-1 を含むスーパー抗原を分泌し、重篤な毒素性ショックを引き起こす細胞外病原因子として考えられて来た。しかし近年、内皮細胞及び上皮細胞を含む様々な非免疫性貪食細胞内に侵入し、生存し得ることを強く支持する報告がなされている。研究代表者が所属する研究グループでは、TSST-1 に対する抗体が、黄色ブドウ球菌の全身感染を防御する結果を得た。また、研究代表者は TSST-1 欠損黄色ブドウ球菌株を作製し、マウス感染モデルにおいて病原性の減弱を示す結果を得た。TSST-1 は、内皮細胞及び上皮細胞の、未同定の細胞表層分子に強く結合し、細胞内に移行することが報告されている。これらの結果より、TSST-1 が、内皮細胞及び上皮細胞を含む非免疫性細胞において、黄色ブドウ球菌感染を促進する役割を持つ可能性が考えられるが、これまでこの点に着目した研究は行なわれていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、培養内皮細胞株、培養上皮細胞株、及びマウス感染モデルを用いて、TSST-1 の黄色ブドウ球菌細胞内感染における役割を分子レベルで明らかにすることを目的とした。特に本研究では、当該細菌の細胞内寄生メカニズムについて、毒素性ショック症候群毒素-1 (TSST-1) の関与に注目した。TSST-1 欠損黄色ブドウ球菌株及びスーパー抗原欠損型 TSST-1 をツールとして、内皮細胞及び上皮細胞への感染機構を解明し、マウスを用いた TSST-1 の黄色ブドウ球菌感染における役割について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 細菌株と培養条件

黄色ブドウ球菌株は、834 株 (野生型 TSST-1 産生臨床株)、*tst* 株 (834 株の TSST-1 欠損変異株)、RN4220 (TSST-1 非産生、非病原株)、RN+TSST-1 (RN4220 の TSST-1 過剰発現株) を用いた。これらを、tryptic soy broth あるいは tryptic soy agar (TSA) にて 37、16 時間培養した。その後菌体を回収し、phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁後、分光光度計 (波長 550 nm) で濃度を調整した。

(2) 宿主細胞株と培養条件

HeLa229 (ヒト子宮頸癌細胞株) は 10% ウシ胎児血清 (FBS) および 0.03% の L-glutamine と 1× non-essential amino acids を添加した Eagle's minimal essential medium (MEM) にて培養した。HEK293 (ヒト腎臓上皮細胞株) は 10% FBS および 0.03% の L-glutamine を添加した Dulbecco's modified Eagle medium にて培養した。407 (ヒト小腸上皮細胞株) は、10% FBS, 0.03% of L-glutamine を添加した

RPMI1640 培地にて培養した。全ての細胞株は、37、5% CO₂ の条件で培養した。

(3) HeLa 299、HEK293、および 407 cells を 24 穴マルチウェルプレートに 2 × 10⁵ cells/well の濃度で播種し、野生型黄色ブドウ球菌株あるいは *tst* を、10 あるいは 100 の感染多重度で添加し、菌の接着、侵入の解析、細胞内菌数の解析、細胞毒性の解析を行なった。菌の接着については、接着しなかった菌体を PBS による洗浄で除いた後に解析を行なった。菌の侵入の解析については、菌の添加 45 分後に、100 µg/ml lysostaphin 処理で細胞外の菌を除いた後、直ちに細胞内の菌体を回収した。感染した細胞を PBS で洗浄後、0.5% 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) で破壊した。これを TSA アガープレートに播種し、細胞内菌数を計測した。細胞毒性の解析では、colorimetric assay (WST-1 based) により感染細胞の生存率を分析した。

(4) オートファジー誘導と免疫染色

HeLa229 あるいは GFP-LC3 発現 HeLa 229 のオートファジー誘導は、細胞を Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRB; 118.5 mM NaCl, 4.47 mM KCl, 1.18 mM KH₂PO₄, 23.4 mM NaHCO₃, 6 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.18 mM MgSO₄, and 6 mg/l phenol red, pH 7.6) あるいはこれに 1 µM rapamycin を加えた buffer に 0-6h インキュベートすることにより行なった。オートファジーにおける TSST-1 およびスーパー抗原の効果を見るため、10 µg/ml の遺伝子組換え型 TSST-1 (rTSST-1)、スーパー抗原活性欠損の遺伝子組換え型 TSST-1 (mTSST-1)、および黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を上記に添加した。さらに、上記オートファジー誘導後野生型黄色ブドウ球菌株あるいは *tst* を感染させた。また、lysosomal protease inhibitor (E64d および pepstatin) を添加し、lysosomal turnover を抑制した実験も行なった。

免疫染色のため、宿主細胞を 4% paraformaldehyde で固定後、PBS で洗浄し、50 µg/ml digitonin で破壊した。50 mM NH₄Cl でクエンチングを行なった後、2% (v/v) normal goat serum / PBS によるブロッキングを行なった。ライソゾームは anti-lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) 抗体およびローダミン結合抗ウサギ IgG で染色し、一方オートファゴゾームは anti-LC3 抗体と FITC 結合抗ウサギ IgG で染色した。この後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察では、細胞を 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde / 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) で固定後、1% osmium tetroxide in 0.1 M PB (pH 7.4) により後固定を行なった。脱水後、標本を Epon 812 に包埋した。超薄切片を作製し、

酢酸ウランおよびクエン酸鉛による電子染色を行なった後、透過型電子顕微鏡 JEM 1250 で観察した。

ウェスタンブロットングについては、HeLa229 細胞を lysis buffer (2% triton X-100 in PBS containing complete protease inhibitor cocktail) で破壊した後、12.5% polyacrylamide gel で分離し、PVDF 膜に転写した。

(5)黄色ブドウ球菌によるマウスの感染実験

C57BL/6 マウスは SPF 環境で飼育し、実験は弘前大学の動物実験ガイドラインに従って行なった。6-10 週齢の雌について、 5×10^7 CFU の黄色ブドウ球菌野生型株あるいは *tst* 株を静脈内に投与した。その後、生存率および臓器中の菌数を分析した。

4. 研究成果

(1) TSST-1 は黄色ブドウ球菌の上皮細胞への付着と侵入に影響しない

rTSST-1 添加および無添加の条件で野生株と *tst* の付着と侵入を解析した結果、違いは認められず、TSST-1 は黄色ブドウ球菌の上皮細胞への付着と侵入に対して影響しないことが判った(Fig. 1-2)。

(2) rTSST-1 は飢餓条件で誘導した HeLa 229 のオートファゴソーム蓄積を抑制する

高栄養条件(MEM)では、rTSST-1 はオートファゴソーム蓄積に対して効果を示さなかった。一方、オートファジーが誘導される飢餓条件(KRB)では、GFP-LC3 の蛍光スポットで示されるオートファゴソームの量が 10 μ g/ml の rTSST-1 添加により抑制された。同様の結果は、オートファゴソームを LC3 の免疫染色で観察した場合や、TEM 観察、およびウェスタンブロットングでも確認された(Fig. 3)。

(3) rTSST-1 はライソソームの融合およびオートファゴソームの分解を促進しない

オートファジー誘導後の各時点における観察、LAMP1 による免疫染色、lysosomal protease inhibitor の添加実験の結果、TSST-1 はオートファゴソーム分解を促進するのではなく、その形成を抑制することが示唆された(Fig. 4)。

(4) TSST-1 によるオートファジー抑制はスーパー抗原活性に依存しない

rTSST-1 と mTSST-1 は、同等のオートファジー抑制活性を示した。一方、SEA, SEB および SEC はオートファジー誘導細胞で LC3-II の蓄積を抑制しなかった。これらの結果から、オートファジー抑制活性は TSST-1 に特異的で、かつスーパー抗原活性に依存しないと考えられた(Fig. 5)。

(5) TSST-1 はオートファゴソーム、細胞内菌数、細胞に対する菌の細胞毒性を減少させる

TSST-1 を生産する野生株の HeLa229 細胞への感染では、*tst* の感染に比べ、オートファゴソームの量および細胞内菌数について減少がみられた。さらに、RN4220 と RN4220+TSST-1 の HeLa229 細胞への感染では、後者の方が細胞の生存率が高かった。これらより、TSST-1 は、オートファゴソームでの菌の分裂を減少させ、宿主の細胞死を抑えることにより、黄色ブドウ球菌の細胞内寄生に寄与している可能性がある(Fig. 6)。

(6) TSST-1 は黄色ブドウ球菌感染マウス臓器の菌数には効果を示さない

マウスの感染モデルでは、野生株は *tst* に比べ強い病原性を示す。しかし、感染5日目では、脾臓、肝臓、腎臓での菌数について、野生株と *tst* で有意な差はみられなかった。よって、in vivo において TSST-1 が黄色ブドウ球菌感染を促進するか、あるいは TSST-1 のスーパー抗原活性が免疫細胞との相互作用により菌の病原性を増強するかは、まだ明らかではない(Fig. 7)。

今後は、TSST-1 産生黄色ブドウ球菌によるマウスの致死がオートファジー抑制と菌の感染促進によるものかについて検証する。また、スーパー抗原活性欠損 TSST-1 を持つ黄色ブドウ球菌株を作製し、TSST-1 と感染メカニズムについて更に研究を進める予定である。

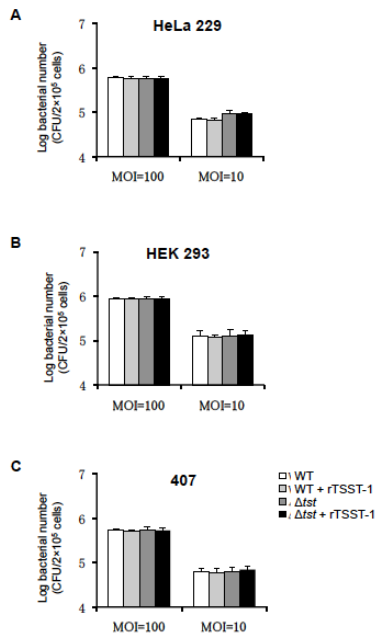


Figure 1. TSST-1 does not promote adhesion of *S. aureus* to the epithelial cells. (A) HeLa 229, (B) HEK293 and (C) 407 cells were seeded in 24-well plates with 2×10^5 cells/well and incubated with *S. aureus* WT or *tst* at MOI of 10 or 100 supplemented with or without 10 μ g/ml rTSST-1. After incubation for 15 min, non-adherent bacterial cells were removed by washing with PBS. The bacterial cells were collected in PBS containing 0.5% CHAPS and enumerated by plate counts on TSA plates.

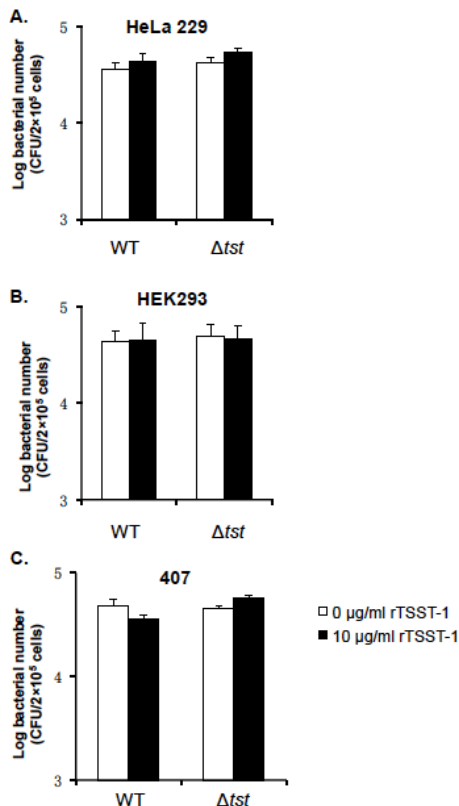


Figure 2. TSST-1 does not promote invasion of *S. aureus* into the epithelial cells. (A) HeLa 229, (B) HEK293 and (C) 407 cells were seeded on 24-well plates with 2×10^5 cells/well and incubated with *S. aureus* WT or *tst* at MOI of 100 with or without 10 μ g/ml rTSST-1. After incubation for 45 min, the extracellular bacteria were eliminated with 100 μ g/ml lysostaphin and the number of intracellular bacteria was determined at 0 h of infection. The bacterial cells were collected in PBS containing 0.5% CHAPS and enumerated by plate counts on TSA plates.

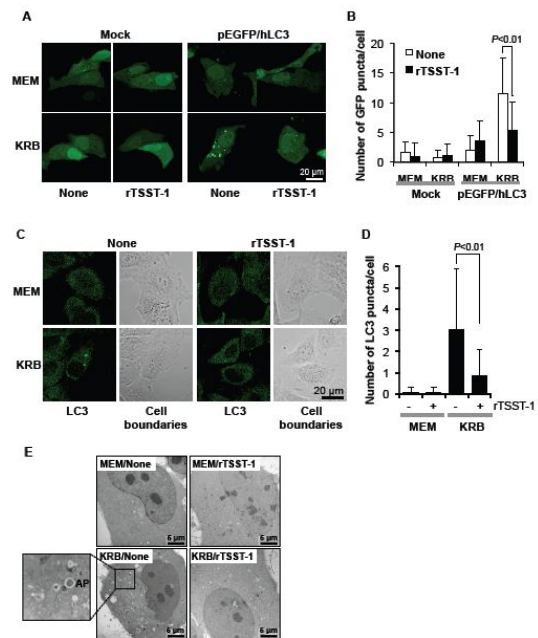


Figure 3. rTSST-1 suppresses autophagy in nutrient-starved HeLa 229 cells. (A-B) HeLa 229 cells were transfected with pEGFP-hLC3 or pEGFP-C2 (Mock control). Effect of TSST-1 was observed in nutrient-rich (MEM) and nutrient-starvation (KRB) condition by addition of 10 μ g/ml rTSST-1. At 6 h, GFP-LC3 puncta were observed under confocal microscope (A). GFP-LC3 puncta were counted from 100 cells of 3 independent-experiments (B). (C-D) Suppression of autophagy by rTSST-1 is observed by immunostaining and electron microscopy. Autophagy in HeLa 229 cells was observed in nutrient-rich (MEM) or nutrient-starvation (KRB) condition containing lysosomal protease inhibitors with or without the addition of 10 μ g/ml rTSST-1. At 4 h, the cells were fixed and washed. (C) Autophagosomes were stained with anti-LC3 antibody and rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG, and then observed under confocal microscope. (D) LC3 puncta were counted from 100 cells of 3 independent-experiments. (E) Autophagosomes was observed under electron microscope. AP indicates autophagosome-like vacuole.

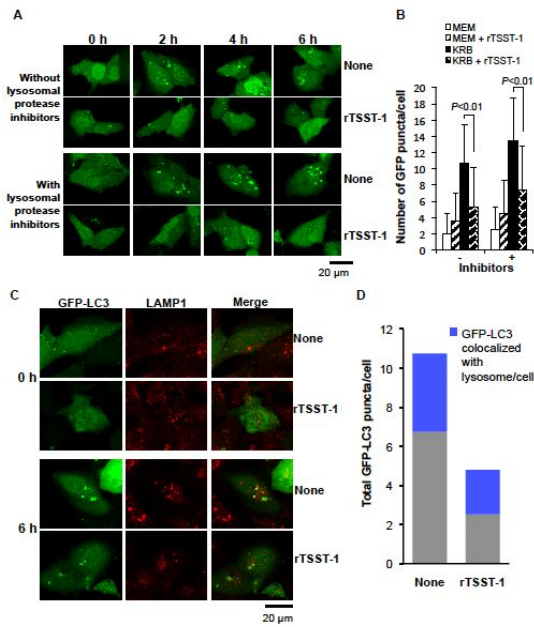


Figure 4. TSST-1 suppresses autophagosome formation rather than enhances autophagosome degradation. HeLa 229 cells were transfected with pEGFP/hLC3 and autophagy was induced under nutrient-starvation with or without the addition of 10 μ g/ml rTSST-1. (A-B). Lysosomal protease inhibitors were added to the reaction mixtures. At the indicating time, the autophagosomal accumulation in the cells was observed by GFP puncta under confocal microscope (A). GFP-LC3 puncta at 4 h were counted from 100 cells of 2 independent-experiments (B). Lysosomal protease inhibitors failed to restore autophagosomes in TSST-1-treated cell. (C-D) At indicating time, lysosomes were immunostained with LAMP1, lysosomes and GFP-LC3 puncta were observed under confocal microscope (A). GFP-LC3 puncta and overlapping between GFP-LC3 and lysosomes were counted from 100 cells of 2 independent-experiments (B). rTSST-1 does not enhance autophagosome and lysosome fusion.

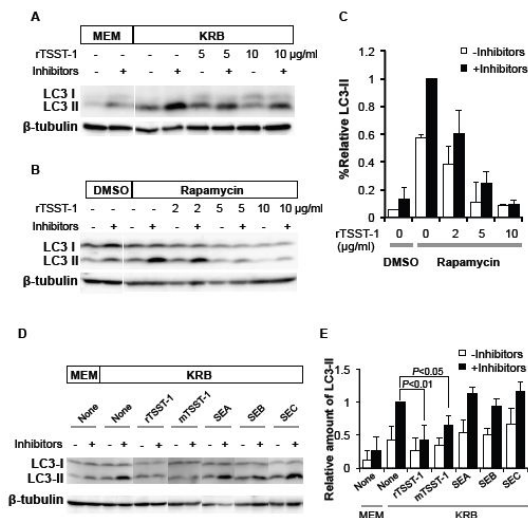


Figure 5. Suppression of autophagy by TSST-1 does not depend on superantigenic activity. Autophagy in HeLa 229 cells was induced by nutrient-starvation (KRB) (A, D and E) or rapamycin (B and C) with or without the addition of lysosomal protease inhibitors and rTSST-1, mTSST-1, SEA, SEB or SEC. Cells in MEM or DMSO were used as controls. At 4 h of induction, LC3-II was detected by Western blotting (A, B and D). (C and E) The intensity of LC3-II band was quantified by normalizing with the intensity of α -tubulin band. The amount of LC3-II was calculated relatively to that from autophagic induction condition with lysosomal protease inhibitors, which set to 1.

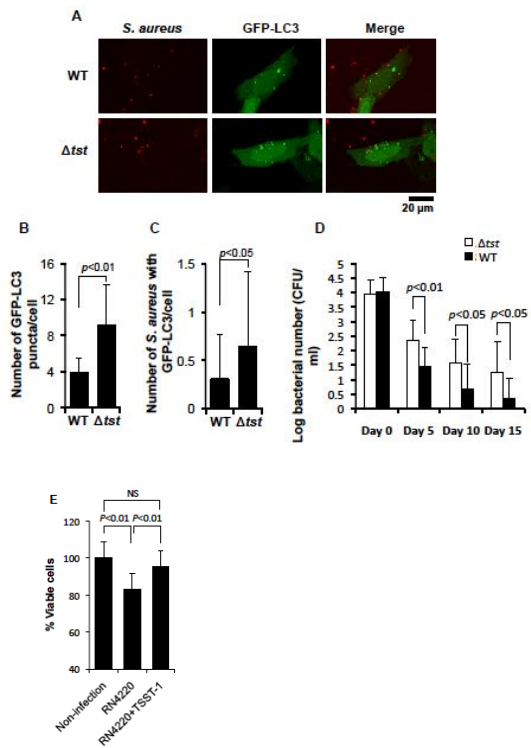


Figure 6. TSST-1 reduces autophagosomes, intracellular *S. aureus* number and cytotoxicity of *S. aureus*-infected cells. HeLa 229 cells were transfected with pEGFP-hLC3 plasmid and infected with WT or *tst*. (A-C) At 6 h of infection, *S. aureus* cells were immunostained. (A) GFP-LC3 and *S. aureus* cells were observed under confocal microscope. (B) GFP-LC3 puncta and (C) colocalization of *S. aureus* with GFP-LC3 were analyzed from at least 100 cells of 3 independent-experiments. (D) Bacterial number of *S. aureus* in the HeLa 229 cells. (E) Viability of *S. aureus*-infected HeLa 229 cells on day 4 after infection.

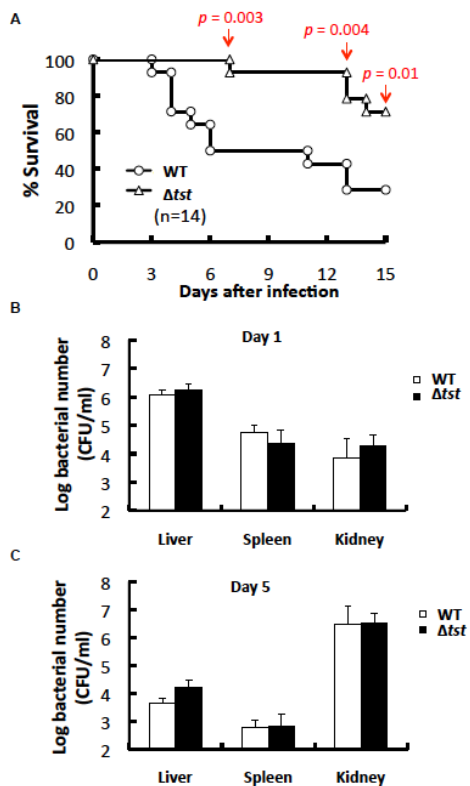


Figure 7. TSST-1 has no effect on bacterial numbers in the organs of *S. aureus*-infected mice. Mice were infected with 5×10^7 CFU of *S. aureus* WT or *tst* intravenously. (A) Survival of mice was observed and (B) bacterial numbers in the organs were determined on day 1, and 5 after infection.

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. Asano K, Yoshimura S, Nakane A. Alteration of intestinal microbiota in mice orally administered with salmon cartilage proteoglycan, a prophylactic agent. PLoS ONE. 8: e75008, 2013. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0075008.

2. Osanai A, Li SJ, Asano K, Sashinami H, Hu DL, Nakane A. Fibronectin-binding protein, FbpA, is the adhesin responsible for pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection. Microbiol Immunol. 57: 253-262, 2013. 査読あり
doi: 10.1111/1348-0421.12030.

3. Sashinami H, Asano K, Yoshimura S, Mori F, Wakabayashi K, Nakane A. Salmon proteoglycan suppresses progression of mouse experimental autoimmune

encephalomyelitis via regulation of Th17 and Foxp3(+) regulatory T cells. Life Sci. 91: 1263-1269, 2012. 査読あり
doi: 10.1016/j.lfs.2012.09.022.

4. Maina EK, Hu DL, Asano K, Nakane A. Inhibition of emetic and superantigenic activities of staphylococcal enterotoxin A by synthetic peptides. Peptides. 38: 1-7, 2012. 査読あり
doi: 10.1016/j.peptides.2012.08.013.

〔学会発表〕(計4件)

1. Asano K and Nakane A. A novel function of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 in suppression of autophagy. 第86回日本細菌学会総会、平成25年3月26-28日(千葉)

2. Asano K and Nakane A. Autophagic suppressing activity of staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin-1. 第67回日本細菌学会東北支部総会、平成25年8月30-31日(宮城)

3. Asano K and Nakane A. Superantigenic-independent activity of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 in suppression of autophagy. 第42回日本免疫学会学術集会、平成25年12月11-12月13日(千葉)

4. Asano K and Nakane A. Autophagy suppression by Toxic Shock Syndrome Toxin-1 in superantigenic activity-independent manner. 第87回日本細菌学会総会、平成26年3月26-28日(東京)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bact.hirosaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 クリスナ (ASANO KRISANA)

弘前大学 医学(系)研究科(研究院)

研究者番号: 70598622