

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590165

研究課題名(和文) サルモネラ新規病原性関連因子SEp22の発現を誘導する栄養因子に関する研究

研究課題名(英文) STUDY ON THE NUTRITION FACTORS INVOLVED IN INDUCTION OF THE EXPRESSION OF A NOVEL PATHOGENICITY-RELATED FACTOR, SEp22, IN 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はサルモネラの新規病原性関連因子SEp22(DPS)の発現における栄養因子による調節に焦点を当て、カサミノ酸中のポリペプチド、さらにはカゼインのトリプシン分解物中のポリペプチドの活性を指標に精製を試みた。評価系には微量測定が可能な乾燥耐性獲得実験系とRT-PCRによるSEp22mRNAの定量系を用いた。その結果、特定の水溶性画分にSEp22発現誘導活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Expression of a novel pathogenicity-related factor, SEp22, Salmonella DPS, is regulated by both environmental stresses and nutrition. The nutrient factors in LB medium or casamino acid were shown to play key roles on SEp22 expression, but the precise mechanisms and the components of the factors have been remaining uncertain. In this study, we tried to purify the responsible molecule in casamino acid as well as tryptic digests of casein. Separation of the casamino acid and tryptic digest of casein by HPLC was performed, and the resultant fractions were assayed in the dry-resistant assay where SEp22 has critical role for the acquisition of dry-resistance, and the liquid culture assay together with RT-PCR analysis of SEp22 mRNA expression. The results suggest that certain hydrophilic fractions of HPLC have the ability to induce SEp22 expression, either from casamino acid or the tryptic digest of casein. The candidate dipeptide containing Val-Lys sequence is now under the further analysis.

研究分野：医歯薬学(薬学・環境系薬学)

キーワード：サルモネラ DPS(SEp22) 病原因子 栄養因子 乾燥耐性 発現制御

1. 研究開始当初の背景

サルモネラ・エンテリティディス

(*Salmonella* Enteritidis; 以下、SE)はわが国の細菌性食中毒の主な起因菌で、細菌性食中毒の中では比較的重症例が多く、その統御が課題である。われわれはSEの環境分離株からサルモネラの新規病原性関連因子、SEp22(*Salmonella* DPS)を見出し、その機能及び発現機構を研究してきた。SEp22は、鉄イオンの結合活性、DNA結合活性を持つ12量体で、酸化ストレス抵抗性を担う。われわれの研究から、SEp22は乾燥耐性獲得にも重要な役割を果たし、病原性だけでなく環境抵抗性の発現に関与することが示された。ペットや家畜、ならびに土壌や水系などの自然環境におけるサルモネラの分布と食材の汚染は、食中毒の統御の面からも大きな課題である。このように、SEp22はサルモネラの病原性と環境抵抗性の発現に関与する因子であり、その発現調節機構ならびに調節因子を明らかにすることは、サルモネラの食中毒を含めた感染制御にとって重要である。

2. 研究の目的

本研究では、これまで不明であったSEp22(*Salmonella* Dps)の発現調節機構のうち、栄養因子による調節に焦点を当てる。とくに、栄養飢餓によるSEp22の誘導ではなく、逆に富栄養な培地中の成分に注目し、われわれが新たに見出したカサミノ酸成分中の特定のポリペプチドならびにLB培地中の成分によるSEp22の誘導活性を明らかにする。さらに、その解析を通じて、細菌の生残ならびに病原性の発現に深くかかわる当該栄養因子の性質を明らかにするとともに、細菌の応答機構を生化学的に解明することを目的とする。さらにこの研究成果を、サルモネラ食中毒の統御はもとより、病原性細菌の増殖ならびに生残の調節を通じた、新たな微生物統御への応用に活かすこととする。

3. 研究の方法

(1) SEp22発現の評価系の確立: SEp22の発現を定量的かつ高感度に評価するため、二つの実験系を用いて改良を加えた。一つは、サルモネラの乾燥耐性獲得にSEp22が必須となる条件を用い、栄養因子の添加によって鋭敏にサルモネラのコロニー形成が上昇するように菌の密度を 1×10^6 CFU/10 μ Lとし、乾燥に用いる培地を10% M9(グルコース不含)添加生理食塩水に変更して最適化した。これによって、最終濃度0.04-4 μ g/mLの範囲で、カサミノ酸の用量依存的に、栄養因子依存性サルモネラ乾燥耐性獲得を評価することが出来た。

もう一つは、栄養因子を添加したM9培地で培養した菌からmRNAを抽出し、RT-PCRによってsep22遺伝子の発現を定量的に解析した。本研究費で購入したRT-PCR装置(Eco Real-Time PCR System)を活用した。

(2) SEp22の誘導活性を持つ栄養因子の精製:

カサミノ酸には、SEp22タンパク質の発現を誘導し、またサルモネラの乾燥耐性獲得を助ける栄養因子が存在する。そこで、まず、カサミノ酸を分画し、SEp22誘導因子の精製を行った。HPLCによるカサミノ酸の分画をトリフルオロ酢酸で行うと失活が著しいため、酢酸、及びギ酸に変更し、失活作用が低いことが分かった。

次に、LB培地に含まれるカゼインのトリプシン消化物に焦点を移した。カサミノ酸は激しい条件で酸処理等を行うので、ペプチド以外のタンパク質分解物が含まれている可能性がある。そこで、カゼインのトリプシン処理の条件を様々に変化させ、トリプシン消化によって得られるペプチドをHPLCにかけて分取した。それらを、カサミノ酸と同様の分画条件を用いて分離し、乾燥耐性獲得実験系で評価した。

4. 研究成果

(1) サルモネラの乾燥に伴うSEp22mRNA発現の誘導: 乾燥開始30分後には、LB存在

下で急激な sep22 遺伝子の発現が誘導され、4 時間まで経時的に SEp22mRNA が増加した。一方、LB 非存在下では、乾燥の過程における sep22 遺伝子の発現は観察されず、非常に低いレベルの発現に留まった。

(2) SEp22 の誘導活性を持つ栄養因子の精製:

種々のHPLCを用いてカサミノ酸を分画し、SEp22誘導因子の精製を行った。その結果、ある条件下で良好な活性が得られ、そのピーク分画をLC/MS/MS分析した結果、候補としてVal-LysまたはLys-Valを含む分子量226程度のペプチドの可能性が示された。

Val-LysまたはLys-Valを含む配列を持つジペプチドを化学合成して活性を調べた結果、サルモネラの乾燥耐性獲得誘導する評価系では活性が認められなかった。そこで、新たな活性画分を得るため、異なるカラム条件を用いてカサミノ酸を分画している(継続中)。

SEp22mRNAの発現を定量する実験系において、これらのジペプチドを添加して培養し、菌体からのRNA抽出を行って検討している(継続中)。カサミノ酸はカゼイン由来であり、カゼインの一次構造にはVal-Lysの配列が存在したので、その周辺のアミノ酸の構造を含むペプチドの生物活性を評価する準備を行っている。

カサミノ酸ではなく、LB培地に含まれるカゼインのトリプシン消化物をHPLCで分離し、乾燥耐性獲得実験系で評価した。その結果、カサミノ酸よりも高い活性が水溶性画分に出現した。また、この画分をLC/MS/MS分析した結果、Val-Lysを含む配列が候補として出現した。

一方、の活性のピーク周辺をSEp22mRNAの発現誘導系で分析した結果、乾燥耐性獲得のピークよりも1~2分画、遅い溶出位置に活性の最大値が認められた。

以上の結果より、乾燥耐性獲得の評価系においては、カサミノ酸由来の栄養因子にも、またカゼインのトリプシン消化物にも、Val-Lysを含む配列が関係している可能性が示唆された。一方、SEp22mRNAの発現誘導系で

は、これとは異なる位置に栄養因子の活性のピークが現れたことから、Val-Lysを含む配列とは別の因子がSEp22の発現誘導に關与する可能性があることが示唆された。

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4件)

Morishige, Y., Fujimori, K., and Amano, F. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella*. Biol. Pharm. Bull.(2015) in press. (査読有)

. Morishige, Y., Fujimori, K., Mino, Y., and Amano, F. Induction of Viable but Non culturable(VBNC) state in *Salmonella* cultured in M9 Minimal Medium containing high glucose. Biol. Pharm. Bull. 37 (2014) 1617-1625. (査読有)

. Sugiyama, N., Minami, N., Ishii, Y., and Amano, F. Inhibition of Lon protease by bacterial lipopolisaccharide (LPS) though inhibition of ATPase. Adv. Biosci. Biotechnol., 4 (2013) 590-598. (査読有)

. Morishige, Y., Fujimori, K., and Amano, F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella*. Microbes & Environ. 28 (2013) 180-186. (査読有)

[学会発表](計12件)

伊都 安紀子、森重 雄太、天野 富美夫、*Salmonella* Enteritidis の乾燥耐性獲得に關与する栄養因子の役割、第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015 年 3 月

Yuta Morishige, Ko Fujimori, and Fumio Amano, Quantitative analysis of VBNC *Salmonella* metabolism using multicolor flow cytometry, IUMS (International Union of Microbiology Societies) July 27 - August 1, 2014 (Montreal, Canada)

望月文奈、青柳久美、石塚理香子、安田 誠、

福内友子、山岡法子、馬渡健一、金子希代子、天野富美夫、中込和哉、サルモネラの乾燥耐性獲得作用をもつペプチドの分離、バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2014)、東京、2014年8月

森重雄太、藤森功、天野富美夫、マルチカラーフローサイトメトリーを用いた VBNC *Salmonella* の代謝活性の定量的解析法、第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月

南徳子、森重雄太、藤森功、天野富美夫、サルモネラの乾燥耐性獲得における栄養因子及び SEp22 の寄与、第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月

森重雄太、天野富美夫、High glucose induces viable but non-culturable *Salmonella* during prolonged culture in M9 medium、第86回日本生化学会大会、横浜、2013年12月

南徳子、森重雄太、藤森功、天野富美夫、サルモネラの乾燥ストレス耐性獲得機構に寄与する因子に関する研究、第86回日本生化学会大会、横浜、2013年12月

大仲彩加、小池敦資、藤森功、中込和哉、天野富美夫、*Salmonella* Enteritidis の乾燥耐性獲得に及ぼすカザミノ酸中の栄養因子の研究、第63回日本薬学会近畿支部大会、京田辺、2013年10月

天野富美夫、北村香南子、藤森功、齊藤典子、サルモネラ (*Salmonella* Weltevreden) の接着・付着に及ぼすキチンの影響、第27回 Bacterial Adhesion & Biofilm 学術集会東京 2013年7月

森重雄太、藤森功、天野富美夫、VBNC (Viable But Non-Culturable) 状態にある *Salmonella* のピルビン酸による復帰機構の解明、第86回日本細菌学会総会、2013年3月

北村香南子、天野富美夫、サルモネラ (*Salmonella* Weltevreden) の接着・付着制御による食中毒統御、第86回日本細菌学会総会、2013年3月

植松玲奈、南徳子、山崎学、天野富美夫、サルモネラの新規病原関連因子 SEp22 および SEp25 の発現調節における関連性、第86回日

本細菌学会総会、2013年3月

〔図書〕(計4件)

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)、pp. 55-85, 198-237 (2013)丸善(東京)

天野富美夫、「疾病の予防と対策」、In 「衛生薬学 (第3版)」(石井秀実、杉浦隆之、編)、pp. 239-307 (2013) 朝倉書店(東京)

天野富美夫、[第3章 食中毒]、In 「スタンダード薬学シリーズ第5巻健康と環境 (第2版)」(永沼章、井出速雄、鍛冶利幸、編)、pp.90-110 (2012)、東京化学同人(東京)

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)、pp. 53-145 (2012) 南山堂(東京)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushi/tu/seitaibougyo.html>

6. 研究組織

(1) 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