

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590516

研究課題名(和文)ブドウ球菌エンテロトキシンの新たな機能 - 神経毒作用とその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) New biological activity of staphylococcal enterotoxin: Elucidation of neurotoxic effects and its mechanism

研究代表者

胡 東良 (HU, DONG-LIANG)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：10333733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで小型嘔吐動物モデル・スンクスを用い、ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)の催吐活性とそのメカニズムを検討してきた。本研究では、SEの新たな機能 神経毒作用について検討した。SEはスンクス実験において、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、神経細胞受容体のアンタゴニストを投与することによりスンクスの嘔吐を抑制した。さらに、毒素と神経培養細胞との結合性、細胞内5-HT等の産生と放出を検討した。SEは神経細胞に毒性を示さなかったが、神経細胞に結合し、細胞シグナル伝達物質を刺激し、神経細胞内シグナル調節機能を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcal enterotoxin (SE) is an important bacterial toxin that involved in human diseases including food poisoning and toxic shock syndrome. We have been studied the emetic activity and its mechanism of SE, used a small vomiting animal model, house musk shrews. In this study, a new feature-neurotoxic effects of SE were studied. In house musk shrews experiments, SE showed vomiting activity, but it does not have the diarrhea activity. The vomiting of house musk shrews was also inhibited by administering antagonists of nerve cell receptors. In addition, we examined the binding of the toxin and the nerve cells in culture, the release with the production of such 5-HT in the cells. SE did not show toxicity in nerve cells, but it binds to neuronal cells, stimulates cellular signal transduction material, and revealing the SE has neuronal intracellular signal regulatory functions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エンテロトキシン ブドウ球菌 病原性

1. 研究開始当初の背景

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 (SE) が次々と発見され、現在 21 種類まで報告されている。しかし、SE による食中毒メカニズム、特に催吐シグナル受容体とシグナル伝達機序は、また明らかにされていない。本研究者のこれまでの研究で、小型嘔吐実験動物モデル (スunks) を確立し、SEA 分子上の嘔吐活性部位の解明及び SEA による食中毒に対する遺伝子組換えワクチンを開発した。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。本毒素による食中毒は世界各国で細菌性食中毒の第 2 位または第 3 位を占めている。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。

2. 研究の目的

本研究者は SE がスーパー抗原活性と腸管毒性のみならず、神経細胞に直接作用し、催吐シグナル誘導と神経毒性を有する可能性を示すデータを得ている。そこで、本研究では SEA の神経細胞における催吐シグナル受容体を検索し、SEA の神経毒作用とその分子メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

SEA の新たな機能——神経毒作用とその分子メカニズムを解明するために、まずは SEA 及び SEA 分子上の嘔吐活性部位を欠損させた複数変異毒素 mSEA を作製・精製した。これら SEA と mSEA を用いて、開発した嘔吐動物モデル・スunks 及び神経培養細胞における SEA の神経毒性、嘔吐誘導活性及び毒素の細胞受容体を解析した。さらに、SEA 刺激による神経毒作用とその分子メカニズムを動物生体内、培養細胞及びシグナル分子レベルにおいて解析した。

4. 研究成果

(1) 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。(2) 嘔吐動物モデル・スunks に対する SEA 催吐活性と下痢活性を検討した結果、SEA は催吐活性を示したが、下痢活性が認められなかった。(3) 神経細胞の 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 の嘔吐を抑制することを明らかにした。SEA 刺激により小腸の 5-HT の産生・放出を促進することを確認した。(4) SEA と結合する神経細胞から結合タンパクを精製し、受容体タンパクを解析し、受容体の生化学・生物学的特性を検討したが、複数の分子が関与していることを示唆された。(5) 神経細胞に各濃度の SEA または mSEA を添加し、経時的に細胞をサンプリングし、mRNA を精製し、RT-PCR、Western blot および Immunoprecipitation 法

を用いて、細胞内シグナル伝達分子の発現について検討した、また、細胞内シグナル伝達の刺激剤と阻害剤をそれぞれ添加・処理し、Ca²⁺を介した伝達経路が重要であることが示唆された。(6) SEA と神経細胞との結合実験では、PC12 および ENStem-A の 2 種類細胞を用いて調べた。SEA は神経細胞と結合することを in vitro でも観察された。また、SEA は神経細胞に直接的に外観的な毒性変化を引き起こさないが、神経細胞のシグナル伝達に調製機能を有することを明らかにした。

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 14 件)

1. Narita, K., Hu, D.-L., Asano, K. and Nakane, A. Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin-1 induces IL-17-dependent protection against *Staphylococcus aureus* infection. *FEMS Pathog. Dis.* 査読有, 73(4): 1-10. 2015.
2. Hu, D.-L. and Nakane, A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur. J. Pharm.* 査読有, 722(1): 95-107. 2014.
3. Sato'o, Y., Omoe, K., Naito, I., Ono, H. K., Nakane, A. Sugai, M., Yamagishi, N. and Hu, D.-L. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 査読有, 52(7): 2637-2640. 2014.
4. Hu, D.-L. *Staphylococcus aureus* infection and food poisoning. *J. Clin. Lab. Med.* 査読無, 58(7): 855-861. 2014.
5. Suzuki, Y., Omoe, K., Hu, D.-L., Sato'o, Y., Ono, H., Monma, C., Arai, T.; et al. Molecular epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolates originating from food poisoning outbreaks that occurred in Tokyo, Japan. *Microbiol. Immunol.* 査読有, 58(10): 570-580. 2014.
6. Hu, D.-L. Biological versatility and molecular diversity of staphylococcal enterotoxins. *J. Tohoku Soc. Microbiol.* 査読無, 35: 4-11. 2014.
7. Omoe, K., Hu, D.-L., Ono, H. K., Shimizu, S., Takahashi-Omoe, H., et al. Emetic potential of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect. Immun.* 査読有, 81(10): 3627-3631. 2013.
8. Feng, M.-H., Cui, J.-C., Nakane, A. and Hu, D.-L. Vaccination with plasmid DNA encoding a mutant toxic shock

- syndrome toxin 1 ameliorate toxin-induced lethal shock in mice. *Tohoku J. Exp. Med.* 査読有, 231(9): 1-8. 2013.
9. Cui, J.-C., Guo, H.-Y., Zhang, X.-L., He, Y.-B., Hu, D.-L. and Hu, W.-Z. Comprehensive analysis of staphylococcal superantigenic toxin genes in human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Northeast Agri. Univ.* 査読有, 44(8): 81-86. 2013
 10. Sato, Y., Omoe, K., Ono, H. K., Nakane, A. and Hu, D.-L. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Microbiol. Immunol.* 査読有, 57(2): 91-99. 2013.
 11. Mina, E. K., Hu, D.-L., Omoe, K. and Nakane, A. Inhibition of emetic and superantigenic activities of staphylococcal enterotoxin A by synthetic peptides. *Peptides* 査読有, 38: 1-7. 2012.
 12. Hu, D.-L., Omoe, K. and Nakane, A. Staphylococcal food poisoning. *Antibiotics & Chemotherapy* 査読無, 28(6): 1277-1286. 2012.
 13. Abe, Y., Hu, D.-L., Omoe, K., Fukuda, I. and Nakane, A. Comparative prevalence of antibiotic resistance, staphylococcal cassette chromosome mec and superantigenic toxin genes in coagulase-negative *Staphylococci*. *Hirosaki Med. J.* 査読有, 63: 143-153. 2012.
 14. 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. Microbiol.* 査読有, 302(3): 88-95. 2012.

[学会発表] (計 29 件)

1. Ono, H. K., Omoe, K., Hirose, S., Hu, D.-L., et al. Emetic potential of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins in cynomolgus monkey and house musk shrew. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM). March 24-25, 2014. Tower Hall Funabori, Tokyo Japan.
2. 胡 東良, 小野久弥, 諫山遵志, 大森英明, 岡村雅史, 中根明夫. 新規ブドウ球菌エンテロトキシンの分子疫学解析と食中毒へのリスク評価. 第107回日本食品衛生学会学術講演会. タワーホール船堀, 東京.

2014. 5. 15-16.

3. Hu, D.-L., Okamura, M., Ono, H. K. et al. Elucidation of biological characteristics and emetic activities of newly identified staphylococcal enterotoxins. International Symposium on Microbiology (IUMS). Jul. 21- Aug. 1, 2014. Montreal Convention Center, Montreal, Canada.
4. 胡 東良, 樋爪裕美, 岡田玲奈, 岡村雅史, 佐藤祐介, 小野久弥, 他. 臨床および食中毒由来黄色ブドウ球菌のスーパー抗原毒素遺伝子とその発現の比較検討. 第68回日本細菌学会東北支部総会. 東北大学, 仙台. 2014. 8. 22-23.
5. 岡田玲奈, 樋爪裕美, 岡村雅史, 小野久弥, 今西健一, 中根明夫, 胡 東良. 新型ブドウ球菌エンテロトキシンQの免疫学的検査法の確立と毒素産生能の解析. 第157回日本獣医学会. 北海道大学, 札幌. 2014. 9. 9-12.
6. 樋爪裕美, 岡田玲奈, 岡村雅史, 佐藤祐介, 小野久弥, 菅井基行, 中根明夫, 胡 東良. 臨床および食中毒由来黄色ブドウ球菌のスーパー抗原毒素遺伝子とその発現の比較検討. 第157回日本獣医学会. 北海道大学, 札幌. 2014. 9. 9-12.
7. Hu, D.-L. The occurrence and control strategies of zoonotic diseases in globalization. International Symposium on Chinese Veterinary Education 110 years. Sep. 11-16, 2014. Jilin University, Changchun, China.
8. 胡 東良, 岡村雅史, 岡田玲奈, 樋爪裕美, 他. 新型ブドウ球菌エンテロトキシンQの毒素産生能の解析. 第35回日本食品微生物学会学術総会. 大阪府立大学, 大阪. 2014. 9. 18-19.
9. 胡 東良. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシンファミリーとその生物学的多機能性. 平成24年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 大阪国際交流センター, 大阪. 2013. 2. 9-11. (シンポジウム講演)
10. 胡 東良, 小野久弥, 中根明夫. 食中毒, 毒素性ショックおよび感染におけるブド

- ウ球菌エンテロトキシンの多機能性. 第86回日本細菌学会. 幕張メッセ国際会議場, 千葉. 2013. 3. 18-20.
11. Hu, D.-L. Elucidation of biological multifunctionality of staphylococcal enterotoxins in food poisoning and infection. 第155回日本獣医学会学術集会, 東京大学, 東京. 2013. 3. 28-30. (国際シンポジウム講演)
12. 胡 東良. 全球化時代下食品安全危害の新特徴及其防控研究战略. 吉林農業大学食品科技学院. 学術講演. 吉林農業大学, 長春, 中国. 2013. 8. 14.
13. Imanishi, K., Omoe, K., Ono, H.K., Kato, H., Hu, D.-L. et al. Emetic potentia od newly identified staphylococcal superantigens. 15th International Congress of Immunology. Aug. 22-27. 2013. International Center, Milano, Italy.
14. 諫山遵志, 大森英明, 小野久弥, 中根明夫, 岡村雅史, 胡 東良. 新型ブドウ球菌エンテロトキシンの生物学的特徴と嘔吐誘導活性の解析. 第156回日本獣医学会. 岐阜大学, 岐阜. 2013. 9. 20-22.
15. 大森英明, 諫山遵志, 小野久弥, 中根明夫, 岡村雅史, 胡 東良. ブドウ球菌エンテロトキシンA分子上の生物活性部位の解析. 第156回日本獣医学会. 岐阜大学, 岐阜. 2013. 9. 20-22.
16. 胡 東良, 小野久弥, 諫山遵志, 大森英明, 他. 新型ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素の生物活性と嘔吐活性. 第58回日本ブドウ球菌研究会. 東京薬科大学, 八王子. 2013. 9. 27-28.
17. 胡 東良, 小野久弥, 今西健一, 諫山遵志, 大森英明, 他. 新規ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素が食中毒を引き起こすか. 第34回日本食品微生物学会. タワーホール船堀, 東京. 2013. 10. 3-4.
18. 胡 東良, 小野久弥, 諫山遵志, 大森英明, 岡村雅史, 中根明夫. 新型ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素の生物学的特徴と嘔吐誘導活性. 第106回日本食品衛生学会. 沖縄コンベンションセンター, 沖縄・宜野湾. 2013. 11. 21-23.
19. Hu, D.-L., Maina, E.K., Omoe, K., Nakane, A. Vanilloid receptor plays an important role in staphylococcal enterotoxin A-induced emesis. 第85回日本細菌学会, 長崎ブリックホール, 長崎. 2012. 3. 26-29. (ワークショップ講演)
20. Maina, E.K., Hu, D.-L., Omoe, K., Nakane, A. Identification of active regions of emesis-inducing activity of staphylococcal enterotoxin A. 第85回日本細菌学会, 長崎ブリックホール, 長崎. 2012. 3. 26-29.
21. 成田浩司, 胡 東良, 浅野クリスナ, 中根明夫. Protective immunity induced by an immunization with mutant TSST-1 against *S. aureus* infection. 第85回日本細菌学会, 長崎ブリックホール, 長崎. 2012. 3. 26-29.
22. 胡 東良. 食品媒介感染症のリスク分析とリスク管理. 大連民族学院生命科学院特別講演, 大連民族学院, 大連. 中国. 2012. 7. 28-31. (招待講演)
23. 胡 東良. グローバル化時代におけるヒトと動物の共通感染症の発生とその制御戦略. 揚州大学動物科学技術学院特別講演, 揚州大学, 揚州. 中国. 2012. 8. 2-7. (招待講演)
24. 成田浩司, 胡 東良, 浅野クリスナ, 中根明夫. 無毒変異TSST-1免疫に誘導されたIL-17バイスタンダー効果による黄色ブドウ球菌感染防御機構. 第66回日本細菌学会東北支部総会. 東北大学, 仙台. 2012. 8. 23-24.
25. 小野久弥, 廣瀬 昌平, 柴田真理, 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による嘔吐の投与経路による比較解析. 第66回日本細菌学会東北支部総会. 東北大学, 仙台. 2012. 8. 23-24.
26. Maina, E.K., Hu, D.-L., Omoe, K., Asano, K., Nakane, A. Inhibitory effect of synthetic peptides on superantigenic and emetic activities of staphylococcal enterotoxin A. 第66回日本細菌学会東北

- 支部総会. 東北大学, 仙台. 2012. 8. 23-24.
27. Hu, D.-L., Maina, E.K., Omoe, K., Nakane, A. Relationship of superantigenic toxin and SCCmec genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 15th International Symposium on *Staphylococci* and Staphylococcal Infections (ISSSI). 26-30 Aug. 2012. Universite Claude Bernard Lyon, Lyon, France.
28. 胡 東良, Maina, E.K., 重茂克彦, 中根明夫. ブドウ球菌エンテロトキシンはスーパー抗原と催吐活性を有するが下痢活性を有しない. 第154回日本獣医学会. 岩手大学, 盛岡. 2012. 9. 14-16.
29. 胡 東良, 重茂克彦, 中根明夫. 黄色ブドウ球菌スーパー抗原毒素の分子多様性と生物多機能性. 第57回日本ブドウ球菌研究会. 広島大学東京オフィス, 東京. 2012. 9. 21-22. (シンポジウム)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

胡 東良 (HU DONG-LIANG)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号：10333733