

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460517

研究課題名(和文) 毒素性ショック症候群毒素-1による黄色ブドウ球菌オートファジー回避機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of autophagy evasion mechanism of *Staphylococcus aureus* by toxic shock syndrome toxin-1

研究代表者

浅野 クリスナ (Asano, Krisana)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：70598622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌感染の宿主細胞侵入メカニズムに関して、我々は毒素性ショック症候群毒素-1(TSST-1)によるオートファジー抑制を見出した。本研究ではそのメカニズムをさらに追求した。In vitroではTSST-1が宿主細胞内でSeptin familyタンパク質の一つと相互作用してオートファジー調節機能を修飾し、オートファゴソーム形成抑制を通して宿主細胞内菌数の減少に働くことが分かった。またin vivoでの解析のため、スーパー抗原活性欠損TSST-1を導入した黄色ブドウ球菌を開発した。今後はマウス遺伝子改変モデルを用いた上記メカニズムの解析をさらに進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Regarding the intracellular survival of *S. aureus*, we reported that toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) suppresses autophagy in a superantigenic activity-independent manner. In this study, we further analyzed autophagy suppressing mechanism by TSST-1. In vitro study revealed that TSST-1 interacts with one of Septin family proteins in the host cells. Interaction of TSST-1 promotes function of this target protein to regulate the autophagy, which then leads to suppression of autophagosome formation and decrease of the bacterial number in the host cells. For in vivo analysis, *S. aureus* harboring superantigen activity-deficient mutant of TSST-1 (mTSST-1) was constructed. Autophagy - suppressing activity of this *S. aureus* strain was confirmed. We plan to analyze the mechanism using the mouse genetic modification model in the future.

研究分野：細菌学

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

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、表層感染から、生命に危機を及ぼす深部感染まで、ヒトの様々な感染症の要因となる病原菌である。本菌は従来、細胞外病原体として捉えられてきたが、内皮細胞や上皮細胞といった非貪食性細胞に内在化し生存することが明らかとなってきた。加えて、黄色ブドウ球菌は慢性感染において数週間細胞内に潜伏することも報告されている。しかし、本菌の細胞内環境への適応やオートファジー回避のメカニズムは不明である。毒素性ショック症候群毒素-1 (TSST-1) は黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原である。TSST-1 は、スーパー抗原活性に加え、黄色ブドウ球菌の感染を促進することが示された。申請者らの最近の研究において、TSST-1 は、本菌の HeLa 229 細胞への接着や侵入は促進しないが、オートファゴソーム形成を抑制することが明らかになった。また、TSST-1 を産生する黄色ブドウ菌株が感染宿主のオートファジーを抑制することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題では、遺伝子組換え型 TSST-1 (rTSST-1) を用いて、本毒素の HeLa 229 細胞におけるオートファジー抑制分子メカニズムを解明することを目的とした。さらに、黄色ブドウ球菌のオートファジー回避動態について非病原性菌株 (*S. aureus* RN4220) とその TSST-1 発現株 (RNtst)、およびスーパー抗原活性欠損 TSST-1 を持つ黄色ブドウ球菌株 (RNmtst) を用いた解析を行い、これらの戦略により本菌の寄生性の促進への TSST-1 の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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 1x non-essential amino acids を添加した Eagle's minimal essential medium (MEM) にて 37 °C、5% CO₂ の条件で培養した。

(2) rTSST-1 と標的タンパク質の相互作用の解析

TSST-1 の標的タンパク質を Far-Western プロットにより検出した。HeLa 細胞の全タンパク質に対して二次元ゲル電気泳動を行った後 PVDF 膜に転写し、TSST-1 と共にインキュベートした。結合した TSST-1 を抗 TSST-1 抗体で検出した。さらに TSST-1 結合タンパク質を液体クロマトグラフィー/質量分析/質量分析により分析し、同定した。TSST-1 と標的タンパク質との相互作用を、プルダウンアッセイによって確認した。

(3) GFP-TSST-1 結合タンパク質遺伝子の解析

TSST-1 結合タンパク質の遺伝子を pEGFP-C2 プラスミドに挿入し、次いで Lipofectamine 2000 を用いて HeLa 229 細胞に導入した。24 時間後、緑色蛍光を共焦点顕微鏡下で確認した。遺伝子サイレンシングは RNA 干渉によって行った。標的遺伝子に対する siRNA を Hi-PerFect トランスフェクション試薬により HeLa 229 細胞に導入した。

(4) TSST-1 によるオートファジー誘導/抑制の解析

HeLa229 あるいは GFP-TSST-1 結合タンパク質発現 HeLa 229 のオートファジー誘導は、1 μM Torin-1 を加えた buffer でインキュベートすることにより行なった。TSST-1 によるオートファジー抑制は、GFP-TSST-1 結合タンパク質発現 HeLa 229 cells を 10 μg/ml の TSST-1 で処理することにより行なった。また、Bafilomycin A の添加により lysosome 代謝を抑制した実験も行なった。

オートファジーの誘導および抑制は免疫染色により確認した。宿主細胞を 4% paraformaldehyde で固定後、PBS で洗浄後透過処理を行った。続いて、オートファゴソームは抗 LC3 抗体、TSST-1 結合タンパク質はその抗体を処理後 Alexa Fluoro 568 結合抗ウサギ IgG で蛍光染色した。この後、蛍光顕微鏡 (BZX-700, Keyence) で観察した。

(5) 細菌株と培養条件

黄色ブドウ球菌株は RN4220 (TSST-1 非産生、非病原株) と 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 °C、16 時間培養した。その後菌体を回収し、PBS に懸濁後、濃度を調整した。

動物実験におけるスーパー抗原活性を回避するために、スーパー抗原活性欠損 TSST-1 (mTSST-1) を構築し、RN4220 株に導入した (RNmtst)。RNmtst は上記のように培養して回収した。培養上清中の mTSST-1 発現をウェスタンブロットングにより確認した。mTSST-1 のスーパー抗原活性の欠損は、IFN-γ 測定によって確認した。マウス脾臓細胞を調製し、RNmtst、RN4220 または RNtst からの培養上清で処理した。Brain heart infusion 培地を対照として使用した。培養 72 時間後、培養上清を回収し、IFN-γ を ELISA によって測定した。

(6) HeLa 229 細胞への黄色ブドウ球菌感染

HeLa 229 細胞に MOI100 で YFP 標識黄色ブドウ球菌 RN4220、RNtst または RNmtst を感染させた。45 分間のインキュベーション後、リゾスタフィンで細胞外細菌を除去した。感染の 4 時間または 24 時間で、細胞内細菌細胞の計数、または免疫染色を上述のように行なった。

4. 研究成果

(1) HeLa 229 細胞における TSST-1 と標的タンパク質の相互作用

HeLa 229 細胞全タンパク質の Far-Western プロットでは、TSST-1 は約 50kDa、pI8.0 のタンパク質との相互作用が認められた。LC-MS / MS による分析は、TSST-1 が Septin family タンパク質の 1 つと相互作用していることを示した (論文投稿中)。TSST-1 と Septin との相互作用は、プルダウンアッセイによって証明された。GFP-Septin 発現 HeLa 229 細胞における TSST-1 の免疫染色は、TSST-1 が HeLa 229 細胞に入り、Septin 付近に局在することを示していた。

(2) Septin とオートファジーの相互作用

TSST-1 と Septin との相互作用は、Septin が TSST-1 によるオートファジー抑制に関連する可能性があることを示唆している。GFP-Septin 発現細胞における LC3 の免疫染色では、オートファゴソーム周囲に Septin が局在していた。結果として Septin がオートファジー制御に関わることが示唆された。

(3) TSST-1 は、Septin のオートファジー制御機能を促進する

TSST-1 の Septin 発現に対する効果をさらに解析した。TSST-1 処理を行った HeLa 229 細胞では、Septin 発現レベルは上昇しなかった。次に、GFP-Septin 発現 HeLa 229 細胞の免疫染色を行ったところ、TSST-1 は Septin の分布に影響を与えなかった一方、オートファゴソーム蓄積を抑制した。さらに、オートファゴソームを取り囲む Septin の局在がみられ、TSST-1 によるオートファジー抑制に従って低下した。Septin サイレンシング HeLa 229 細胞では、TSST-1 によるオートファジー抑制はキャンセルされた。これらの結果は、TSST-1 によるオートファジー抑制が Septin によって媒介されることを示した。これらより、TSST-1 は Septin の発現には影響せず、Septin のオートファジー調節機能を促進することが示唆された (論文投稿中)。

(4) 黄色ブドウ球菌はオートファゴソームに局在し、宿主細胞内菌数およびオートファゴソームは TSST-1 の存在下で減少する

黄色ブドウ球菌感染に対する TSST-1 の効果を解析するために、HeLa 229 細胞を YFP 標識 RN4220 および RNtst に感染させた。黄色ブドウ球菌 RN4220 感染細胞では、オートファジーが誘導されたが、TSST-1 の存在下ではオートファゴソームが抑制された (図 1A)。RN4220 および RNtst はいずれも、オートファゴソームに局在していた (図 1A および B)。TSA プレート上での計測では、HeLa 229 細胞における RNtst の細菌数は control と比較し

て減少した (図 1C)。これらの結果により、黄色ブドウ球菌がオートファゴソーム中で生存することが示唆された。

(5) mTSST-1 のオートファジー抑制活性の検証

黄色ブドウ球菌が TSST-1 産生によりオートファジーを抑制する理由をさらに解明するため、マウスモデルを用いた in vivo の実験を行なった。TSST-1 のスーパー抗原活性を回避するために作製した RNmtst について培養上清中の mTSST-1 の発現をウェスタンブロットングにより確認した (図 2A)。さらに RNmtst の培養上清は IFN- γ 産生を誘導せず、発現した mTSST-1 は超抗原活性を欠いていることが分かった。RNmtst の HeLa 細胞への感染後、対照と比較してオートファジーが抑制され (図 2B)、mTSST-1 はオートファジー抑制活性を維持していることを確認した。RNmtst の細菌数は、control の RN4220 と比較して減少した (図 2C)。

今後は、マウス遺伝子改変モデルを用いて、TSST-1 のオートファジー調節や黄色ブドウ球菌皮膚感染における役割の解明をさらに進める予定である。

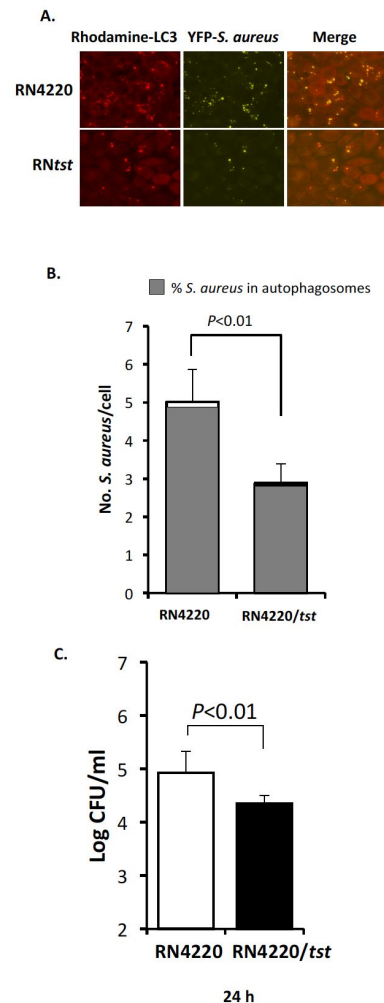


Fig.1. *S. aureus* RN4220 localized with autophagosomes and number of autophagosomes and bacterial cells decrease in the presence of TSST-1. YFP-labeling *S. aureus* RN4220 and RNtst were used to infect into HeLa 229 cells. (A) At 4 h after infection, immunostating of LC3 was performed. Although autophagosomes were suppressed by TSST-1, both bacterial strains were localized in autophagosomes. (B) Number of *S. aureus* per cell and percentage of *S. aureus* in autophagosomes was randomly quantified from 100 cells. (C) Intracellular number of *S. aureus* was quantified on TSA agar plates at 24 h after infection.

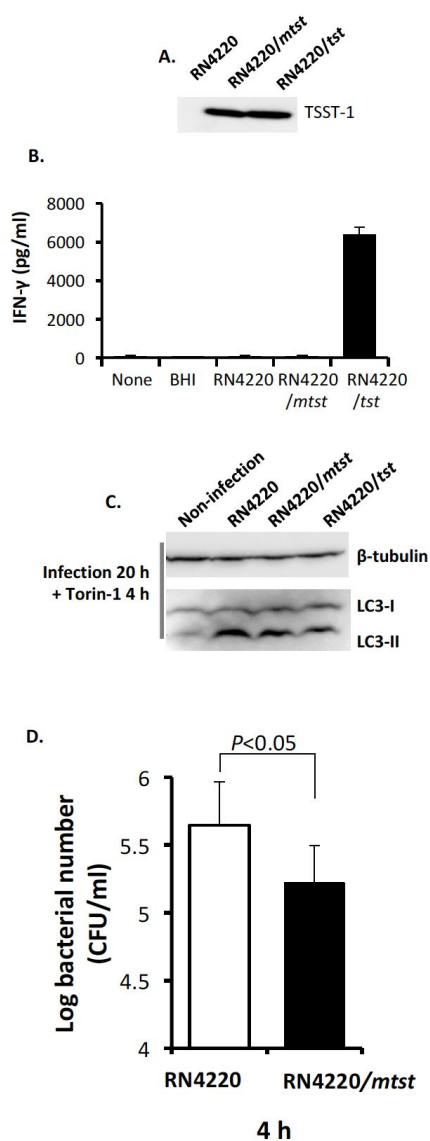


Fig.2. mTSST-1 expressed from *S. aureus* RNmtst lacks superantigenic activity. It reduces autophagosomes and bacterial number in *S. aureus*-infected cells. (A) mTSST-1 expressing *S. aureus* 4220 (RNmtst)

was constructed. The expression of toxin was confirmed by Western blotting. (B) Deficiency of superantigenic activity from culture supernatant of RNmtst was confirmed by IFN- γ determination. Mouse spleen cells were prepared and treated with cultured supernatant from *S. aureus* strains. BHI medium and non-treatment were used as controls. At 72 h after incubation, culture supernatants of spleen cells were collected and IFN- γ was determined by ELISA. (C) Autophagy suppressing activity of mTSST-1 from *S. aureus* RNmtst infection was confirmed by Western blotting. (D) Effect of mTSST-1 on intracellular bacterial number was confirmed by counting on TSA agar plates.

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12件)

1. Narita K, Asano K, Nakane A. IL-17A plays an important role in protection induced by vaccination with fibronectin-binding domain of fibronectin-binding protein A against *Staphylococcus aureus* infection. Med Microbiol Immunol. 206: 225-234, 2017. 査読あり
doi: 10.1007/s00430-017-0499-9.

2. Asano K, Nakane A. Interplay between autophagy and pathogenic bacteria: Toxins secreted by *Staphylococcus aureus* and their impact on autophagy. Hirosaki Med J. 67: 115-128, 2017. 査読あり

3. Hirose S, Asano K, Nakane A. Attenuation of obesity-induced inflammation in mice orally administered with salmon cartilage proteoglycan, a prophylactic agent. Biochem Biophys Res Commun. 484: 480-485, 2017. 査読あり
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.056.

4. Ono HK, Hirose S, Naito I, Sato'o Y, Asano K, Hu DL, Omoe K, Nakane A. The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew. Microbiol Immunol. 61: 12-16, 2017. 査読あり
doi: 10.1111/1348-0421.12460.

5. Asano K, Sashinami H, Osanai A, Hirose S, Ono HK, Narita K, Hu DL, Nakane A. Passive immunization with anti-ActA and

anti-listeriolysin O antibodies protects against *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Sci Rep.* 6: 39628, 2016. 査読あり
doi: 10.1038/srep39628.

6. Hirose S, Ono HK, Omoe K, Hu DL, Asano K, Yamamoto Y, Nakane A. Goblet cells are involved in translocation of staphylococcal enterotoxin A in the intestinal tissue of house musk shrew (*Suncus murinus*). *J Appl Microbiol.* 120: 781-789, 2016. 査読あり
doi: 10.1111/jam.13029.

7. Ono HK, Sato'o Y, Narita K, Naito I, Hirose S, Hisatsune J, Asano K, Hu DL, Omoe K, Sugai M, Nakane A. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Appl Environ Microbiol.* 81: 7034-7040, 2015. 査読あり
doi: 10.1128/AEM.01873-15.

8. Asano K, Yoshimura S, Nakane A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells attenuate staphylococcal enterotoxin A-induced toxic shock. *Infect Immun.* 83: 3490-6, 2015. 査読あり
doi: 10.1128/IAI.00730-15.

9. Narita K, Hu DL, Asano K, Nakane A. Vaccination with non-toxic mutant toxic shock syndrome toxin-1 induces IL-17-dependent protection against *Staphylococcus aureus* infection. *Pathog Dis.* 73: ftt023, 2015. 査読あり
doi: 10.1093/femspd/ftv023.

10. Asano K, Asano Y, Ono HK, Nakane A. Suppression of starvation-induced autophagy by recombinant toxic shock syndrome toxin-1 in epithelial cells. *PLoS One.* 9: e113018, 2014. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0113018.

11. Yoshimura S, Asano K, Nakane A. Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by salmon proteoglycan. *Biomed Res Int.* 2014: 406453, 2014. 査読あり
doi: 10.1155/2014/406453.

[学会発表](計 13 件)

1. Asano K, Nakane A. Role of toxic shock syndrome toxin-1 on cervical and skin infections of *Staphylococcus aureus*. 第 89 回日本細菌学会総会、平成 29 年 3 月 19 日-21 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

2. Asano K, Narita K, Nakane A. Passive immunization of anti-ActA and anti-listeriolysin O antibodies provides the protective effect against *Listeria monocytogenes* infection. 第 45 回日本免疫学会学術集会、平成 28 年 12 月 5 日-7 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

3. Asano K, Nakane A. Toxic shock syndrome toxin-1 contributes to *Staphylococcus aureus* infection mediated by autophagy suppression, International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections - ISSSI 2016, 平成 28 年 8 月 30 日-9 月 2 日、Nine Tree Conventional Center (Seoul, Korea)

4. Asano K, Sashinami H, Osanai A, Hirose S, Ono HK, Narita K, Hu DL, Nakane A. Protection of *Listeria monocytogenes* infection by anti-ActA and anti-listeriolysin O antibodies. 第 70 回日本細菌学会東北支部総会、平成 28 年 8 月 18 日-19 日、北里大学獣医学部 (青森県・和田市)

5. Asano K, Nakane A. Manipulation of autophagy by toxic shock syndrome toxin 1 contributes to *Staphylococcus aureus* infection. The 13th Korea - Japan International Symposium on Microbiology (XIII-KJISM)、平成 28 年 5 月 12 日-13 日、The-K Hotel Gyeongju (Gyeongbuk, Korea)

6. Asano K, Sashinami H, Osanai A, Hirose S, Ono HK, Natira K, Hu DL, Nakane A. Protective effect against *Listeria monocytogenes* infection by excessively passive immunization. 第 89 回日本細菌学会総会、平成 28 年 3 月 23 日-25 日、大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)

7. Asano K, Nakane A. Role of toxic shock syndrome toxin 1 on autophagy and intracellular replication of *Staphylococcus aureus*. 第 44 回日本免疫学会学術集会 国立京都国際会館、平成 27 年 11 月 18 日-20 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

8. Asano K, Nakane A. Interplay between host autophagy and toxic shock syndrome toxin-1 for intracellular survival of *Staphylococcus aureus*. 第 69 回日本細菌学会東北支部総会、平成 27 年 8 月 21 日、郡山ビッグアイ (福島県・郡山市)

9. Asano K, Nakane A. Autophagy

suppressing activity of TSST-1 promotes *Staphylococcus aureus* infection. 第88回日本細菌学会総会、平成27年3月26日-28日、長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）

10. Asano K, Nakane A. Salmon cartilage proteoglycan alters intestinal microbial community and attenuates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. 第43回日本免疫学会学術集会平成26年12月10日-12日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

11. Asano K, Nakane A. Adipose tissue-derived stem cells attenuate staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock. 弘前国際移植シンポジウム2014、平成26年10月31日、弘前大学医学部コミュニケーションセンター（青森県・弘前市）

12. Asano K, Nakane A. Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 on autophagy and *Staphylococcus aureus* persistence. International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections - ISSSI、平成26年8月26日-29日、Palmer House Hilton Hotel（Chicago, USA）

13. Asano K, Nakane A. オートファジー抑制および黄色ブドウ球菌の上皮細胞感染における毒素性ショック症候群毒素-1の関与。JADCI/JSHDR 2014 日本比較免疫学会第26回学術集会 第25回日本生体防御学会学術総会、平成26年7月9日-11日、東北大学（宮城県・仙台市）

〔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)

・講師

研究者番号：70598622

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中根 明夫 (NAKANE AKIO)

弘前大学 医学(系)研究科(研究院)

・教授

研究者番号：30164239