

共同研究者

増田 修一
(静岡県立大学 食品栄養科学部 教授)

略 歴

- 2002年 3月 学習院女子大学
国際文化交流学部日本文化学科
卒業
- 2004年 3月 お茶の水女子大学大学院
人間文化研究科博士前期課程
ライフサイエンス専攻 修了
- 2007年 3月 お茶の水女子大学大学院
人間文化研究科博士後期課程
人間環境科学専攻 修了
- 2008年 5月 お茶の水女子大学
人間文化創成科学研究科研究院
研究員
- 2009年 3月 お茶の水女子大学
生活環境教育研究センター
研究機関研究員
- 2011年 4月 静岡県立大学大学院
食品栄養環境科学研究院、
同大学
食品栄養科学部(兼務) 助教
現在に至る

スーパー抗原性細菌毒素と相互作用するポリフェノールの 毒素誘発性疾患に対する抑制機構の解明

ブドウ球菌エンテロトキシン A (staphylococcal enterotoxin A; SEA) は、黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原毒素であり、食中毒や毒素性ショック症候群等の重要な病原因子である。これまでに、我々は、いくつかのポリフェノールに SEA の産生および毒素活性阻害活性があることを見出している。そこで、これまでの成果を踏まえ、本研究では、SEA と相互作用を示すポリフェノール類のうち、カテキン類に着目し、SEA とカテキン類との相互作用・結合様式および SEA の毒素活性に対するポリフェノールの影響の解明を目的に研究を行った。

Western blot 解析の結果、カテキン類の SEA に対する相互作用強度は、EGCG > ECG > EGC の順であり、EGCG および ECG は 4ヶ所すべての毒素活性発現部位と相互作用した。Biacore、NMR および IR により、EGCG と SEA との相互作用が認められたことから、ITC を用いて、その相互作用様式を検討した。その結果、SEA と EGCG の相互作用により、発熱反応を生じ、EGCG は、SEA の複数の結合サイトと疎水的相互作用することが示唆された。さらに、ドッキングシミュレーション解析の結果、EGCG のガロイル基と EGC の A 環は、SEA の毒素活性発現部位の A-6 領域の Y91 と相互作用することが予測された。マイクロアレイ解析の結果、マウス脾臓細胞への SEA の暴露により、Th1 細胞の応答を顕著に誘導することが明らかとなった。それに対して、EGCG は、SEA により発現が

誘導された炎症のメディエーターやネクロシス関連炎症遺伝子の発現量をダウンレギュレートさせた。これらの結果より、EGCGは、SEAによって誘導されたTh1細胞の応答および免疫バランスの変動に対して負のフィードバック調節作用を有する可能性が示唆された。

1. 研究背景および目的

黄色ブドウ球菌は、食品中で増殖する際に、タンパク質毒素である staphylococcal enterotoxin (SEs) を産生し、ブドウ球菌食中毒を引き起こす。SEsの中でも、ブドウ球菌食中毒の8割以上が staphylococcal enterotoxin A (SEA) によるものであり、SEAは、嘔吐活性だけでなくスーパー抗原活性を有し、大量のサイトカイン放出により毒素性ショック症候群を引き起こす。スーパー抗原は、免疫系に過剰な刺激を与えて、T細胞を異常に増殖させ、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性鼻副鼻腔炎の発症または難治化に関与することが知られており¹⁾、適切な疾病制御のための対策が必要とされている。これら疾病の誘導メカニズムとしてスーパー抗原は、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) クラス II 分子に結合し、T細胞レセプター (TCR) を介してT細胞を活性化し、それに伴い大量のサイトカインが産生される。したがって、SEAのスーパー抗原活性を抑制することで、これらの疾病を軽減できることが期待される。一方、ポリフェノールは、その構造の多様性ゆえに生体内でさまざまな生理機能を示すことが知られており、その疎水性とフェノール性水酸基の水素結合性などの構造的要因から、タンパク質と相互作用しやすいことが報告されている。

これまでに、我々は、*in vitro*の系において、いくつかのポリフェノール類が黄色ブドウ球菌の産生する毒素SEAと相互作用することにより、SEAが誘発するマウス脾臓細胞の異常増殖を抑制することを明らかにしている²⁾。しかし、実際の生体内においても、その相互作用を維持できるのか等、その詳細については未だ不明な点が多い。スーパー抗原性細菌毒素が誘導する各種疾病の予防や治療に、ポリフェノール類を有効に活かすためには、SEAとポリフェノール類の相互作用について、その結合様式や生体内での相互作用・結合の安定性を明らかにし、また、宿主にどのような作用機序で影響を及ぼしているのか、その全体像を把握する必要がある。

そこで、これまでの成果を踏まえ、本研究では、SEAと相互作用を示すポリフェノール類のうち、カテキン類に着目し、両者の相互作用・結合様式の解明を目的に研究を行った。さらに、SEAの毒素活性に対するポリフェノールの影響を明らかにするために、マウス脾臓細胞を用いた *ex vivo* の系における遺伝子発現の網羅的解析を行い、SEAが誘発する各種疾病の予防や治療にポリフェノール類を有効に活用するための新たな科学的知見を見出すことを目的とした。

2. 研究方法

試料

黄色ブドウ球菌の毒素 staphylococcal enterotoxin A (SEA) 分子と結合するポリフェノールとして、(-)-epicatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG) および (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) を選抜した。メチル化カテキン (methylated

EGCG ((-)-3''-Me-EGCG and (-)-4''-Me-EGCG)) は、静岡県立大学薬学部の菅敏幸先生より供与を受けた。

抗-SEA 毒素活性発現部位ペプチド抗体の作製

SEA 分子上のアミノ酸配列に従い4種の合成ペプチド(A-2、A-3、A-6、A-10; 各々SEAの毒素活性発現部位の21-40、35-50、81-100、161-180番目のアミノ酸配列をもとに作成)を合成し、これらに対する抗ペプチド抗体を作製した。

毒素活性発現部位に対する結合親和性の検討

SEA 希釈液(終濃度5 μ g/mL)にカテキン類(終濃度3mM)を加え、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした後、遠心分離(4,000 \times g、5min)した。反応液中のSEA量を抗-SEAポリクローナル抗体および作製した4つの抗-SEAペプチド抗体を用いたWestern blot法にて定量した。

SEAとの相互作用に及ぼすpHおよびタンパク質の影響

Mcilvaine Bufferを用いてpH 2.4、4.0、6.0、6.8および8.0の緩衝液を調製した。SEA(終濃度5 μ g/mL)に各pHのMcilvaine Bufferを9倍容の割合で混合した。また、SEAとの結合に対するタンパク質の影響を調べるために、SEA(終濃度5 μ g/mL)に、ウシ血清アルブミン(BSA)を終濃度50、500、5000 μ g/mLとなるように混合した。各混合液に、EGCGを終濃度が3.0mMとなるように加え、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした後、遠心分離(4,000 \times g、5min)した。反応液中のSEA量を抗-SEAポリクローナル抗体を用いたWestern blot法にて定量した。

Biacoreを用いたSEAとEGCGとの分子間相互作用

リガンドとして、SEA (Toxin technology)をBorate 8.5 (GE Healthcare)により、500 μ g/mLに希釈し、アミンカップリング法を用いて、Sensor Chip CM5 (GE Healthcare)に固定化した。アナライトとして、EGCG (300mM)および比較対象としてEC (30mM)をランニング緩衝液を用いて、7.5、10、25、50、75、100 μ Mに調製した。調製した各アナライトをSEA固定化フローセルとリファレンスセルに添加し、SEAとの特異的結合を確認した。分析は、Binding analysisを用いて、流速20 μ L/min、結合時間3分、解離時間10分で行った。

NMR解析を用いたSEAとEGCGの相互作用

測定試料として、SEA (25 μ g/mL)、EGCG (15mM)、EGCG (15mM) + SEA (25 μ g/mL)を用いた。試料は、いずれも重水素化したPBSに希釈した。測定試料540 μ LとDSS-d6標準液(500mg/L重水溶液)60 μ LをNMRチューブに移し、よく混合した。1回目の測定を0hとして、測定後37 $^{\circ}$ Cで2~4時間インキュベートし、経時的に測定を行った。

IRスペクトル解析を用いたSEAとEGCGの相互作用

NMR解析で測定したEGCGを凍結乾燥した。また、SEA + EGCGの試料は、上清を除き沈殿物を凍結乾燥して測定試料とした。フーリエ変換赤外分光光度計(FT/IR-550; 日本分光株式会社)を用いて、測定範囲600~4000 cm^{-1} 、積算回数20回とし、KBr錠剤法でIRスペクトルを測定した。

等温滴定型カロリメトリ解析を用いたSEAとEGCGの相互作用

試料は、サンプル側シリンジ側共に phosphate buffered saline (pH 7.40) を用いて調製した。15mM EGCG をシリンジ側の溶液とし、25 μ g/mL SEA をサンプルセル側の溶液として用いた。装置は、MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Instruments Ltd.)、解析は、MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software を使用した。

SEAとEGCGおよびEGCとのドッキングシミュレーション解析

SEA (PDB ID: 1ESF) の結晶構造は、RCSB PDB からダウンロードした。SEA のドメイン A の構造をドッキングシミュレーションの対象とした。EGC または EGCG のリガンドパラメータは、ZINC database³⁾ から mol2 ファイルをダウンロードした。ドッキングシミュレーション解析には、SwissDock software⁴⁾ を用いた。SwissDock で算出される deltaG score と、実験結果に基づいて、SEA と EGCG および EGC との結合サイトを推測した。

マイクロアレイによる遺伝子発現プロフィール解析

マウス脾臓細胞 (1×10^6 cell/mL) に SEA (終濃度 50ng/mL) または SEA + EGCG (終濃度 3mM) を加えた後、37°C、5% CO₂ 下で 16 時間インキュベートした。細胞を回収し、RNeasy mini Kit (Qiagen) を用いて、Total RNA を調製した。マイクロアレイ解析には、繊維型 DNA チップ ジェノパール[®] (INIM 自然免疫チップ (マウス); 三菱ケミカル株式会社) を用いた。なお、本実験は、静岡県立大学法人静岡県立大学における動物実験の指針 (承認番号 175160) に従い実施した。

統計解析

データは control と各サンプル添加群の平均値および標準偏差を算出し、分散分析 (ANOVA) を行った後、Tukey-Kramer 法により多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

3. 研究成果および考察

毒素活性発現部位に対する結合親和性の検討

毒素活性発現部位に特異的に結合する 4 種類の異なる抗ペプチド抗体を作製し、Western blot 解析により、EGCG が嘔吐活性およびスーパー抗原活性発現部位に結合するか調べた。等モル濃度 (3mM) で比較したところ、構造にガロイル基を有する EGCG および EGC は、いずれの毒素活性発現部位と相互作用した (図 1)。これらの結果より、構造内にガロイル基を有するカテキンは、SEA の MHC クラス II 分子結合サイトとの結合を阻害している可能性が示唆された。茶葉中に含まれる茶ポリフェノールの約 15% は、4 種のカテキンから構成され、その組成は、EGCG が約 60%、EGC が約 20%、ECG が約 14%、EC が約 6% であることが報告されている⁵⁾。また、本研究で使用した 3mM のカテキン類を 100mL あたりに換算すると、EC で 87mg、EGC で 92mg、ECG で 133mg、EGCG で 138mg であり、市販のペットボルの緑茶飲料 (60 ~ 257mg/100mL) の総カテキン濃度とほぼ同程度である。これらの結果より、我々が普段常飲している緑茶の濃度において、SEA と相互作用することが可能であると考えられた。

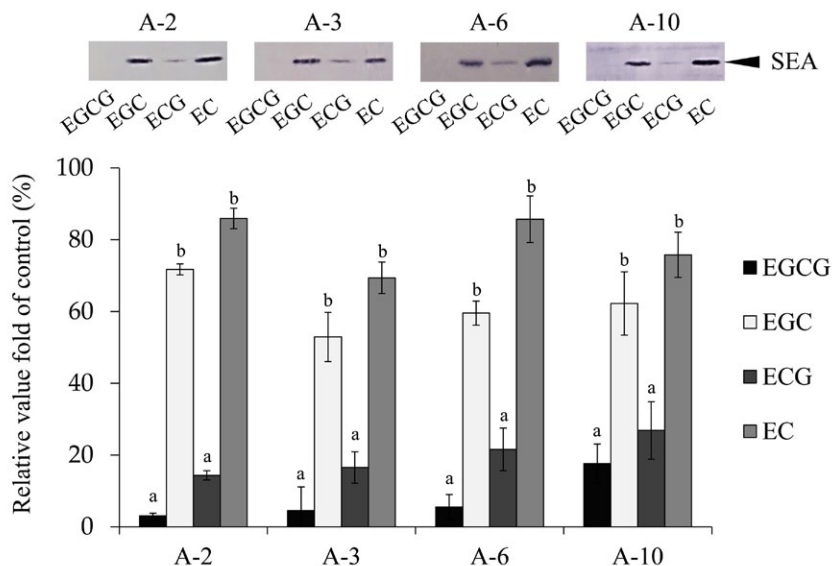


図1：ブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) 活性部位とカテキン類の相互作用

SEA (最終濃度 $5.0 \mu\text{g/mL}$) と各カテキン類 (最終濃度 3.0mM) を MilliQ 水に溶解し、 37°C で 24 時間インキュベートした。遠心分離後の上清を抗-SEA ペプチド抗体を用いた Western blot 法にて定量した。異なるアルファベット間で有意差があることを示す (Tukey-Kramer 検定、 $p < 0.05$)。

SEA との相互作用に及ぼす pH の影響

カテキン類を用いて、SEA との相互作用に対する pH の影響について検討した。その結果、EGCG は、すべての pH 条件下で SEA との相互作用を維持していた (図2)。カテキン類は、酸性溶媒中では安定であるが、中性から弱アルカリ性では酸化分解を受けることから、EGCG は、構造が変化しても SEA との相互作用を維持できる可能性が示唆された。

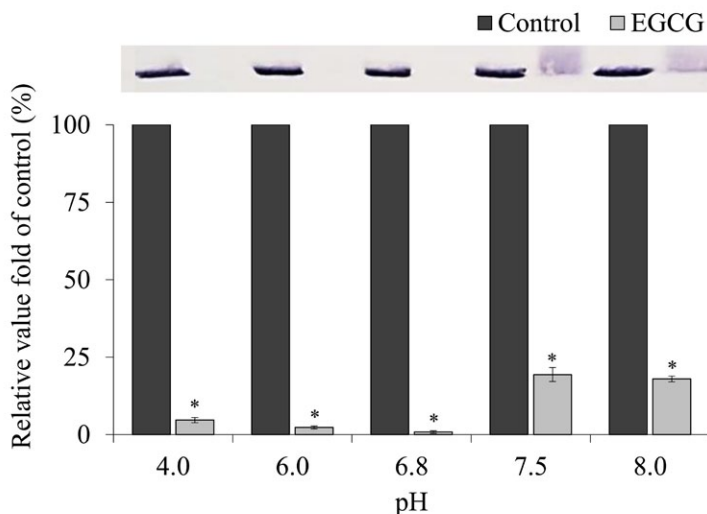


図2：ブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) と EGCG との相互作用におよぼす pH の影響

SEA (最終濃度 $5.0 \mu\text{g/mL}$) および EGCG (最終濃度 3.0mM) を McIlvaine 緩衝液 (pH4.0~8.0) に溶解し、 37°C で 24 時間インキュベートした。遠心分離後の上清を抗-SEA 抗体を用いた Western blot 法にて定量した。

* represents $p < 0.01$ compared to the control.

SEAとの相互作用に及ぼすタンパク質の影響

BSA 共存下におけるEGCGとSEAの相互作用について、Western blot解析を用いて検討した。その結果、SEAとBSAの質量濃度比が1:100まではSEAのバンドが検出されず、EGCGとSEAの相互作用は維持されていた(図3)。これらの結果より、SEAとEGCGは、腸管から吸収された後、血清アルブミンとの共存下においてもその相互作用を維持できる可能性が示唆された。

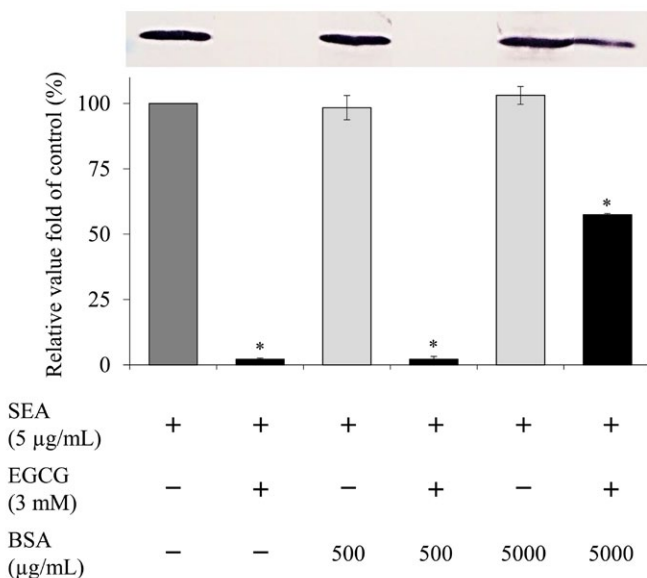


図3: ブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) とEGCGとの相互作用におよぼすタンパク質の影響

SEA (最終濃度 5.0 µg/mL)、EGCG (最終濃度 3.0 mM) およびウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA 最終濃度 50, 500, 5000 µg/mL) を MilliQ 水に溶解し、37°C で 24 時間インキュベートした。遠心分離後の上清を抗-SEA 抗体を用いた Western blot 法にて定量した。* represents $p < 0.01$ compared to the control.

Biacore を用いた SEA と EGCG との分子間相互作用

EC は、いずれの濃度においても Blank と差が認められなかったが、EGCG は、50 µM 以上で濃度依存的に SEA と相互作用した(図4)。また、本実験で用いた結合時間は 3 分間であることから、SEA と EGCG は、短時間で相互作用することが推察された。

NMR 解析を用いた SEA と EGCG の相互作用

Biacore は、膜にタンパク質を固定するため、溶液条件とはその相互作用状態が異なる可能性があることから、¹H-NMR 解析を用いて SEA と EGCG との相互作用を検討した。その結果、各インキュベーション時間における EGCG と SEA + EGCG の化学シフトに大きな変化は見られなかった。EGCG と SEA を混合した際に凝集して沈殿が生じたことから、¹H-NMR では上清に残った EGCG のみが検出された可能性が推察された。

IR スペクトル解析を用いた SEA と EGCG の相互作用

NMR 解析で測定した EGCG と SEA + EGCG の沈殿を用いて IR スペクトル解析を行った。EGCG と SEA + EGCG の沈殿物の IR スペクトルから差スペクトルを求めた結果、1600 cm⁻¹ 付近の吸収波長に差が見られたことから(図5)、SEA と EGCG の相互作用により、エネルギー状態が変化した可能性が示唆された。

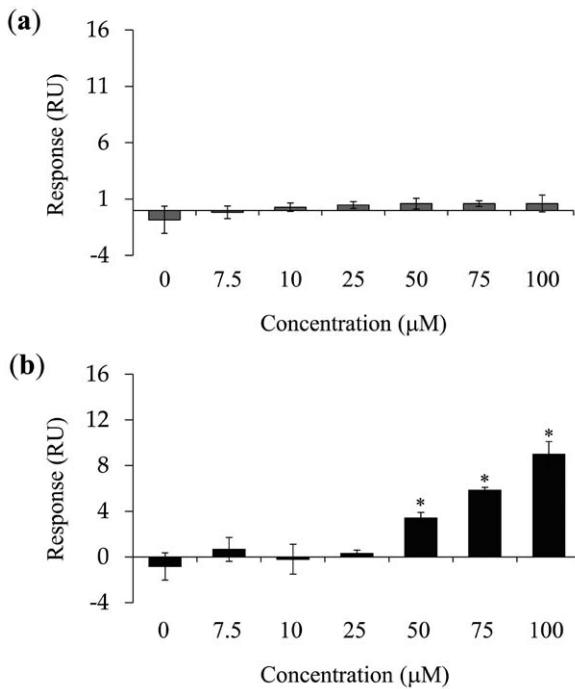


図4: Biacoreを用いたブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA)とカテキン類との分子間相互作用解析

(a) SEAとECとの相互作用、(b) SEAとEGCGとの相互作用。リガンド(SEA)をSensor Chip CM5に固定化し、アナライト(カテキン類)の分子間相互作用を測定した。ランニングバッファーを陰性対照として使用した。
* represents $p < 0.05$ compared to the control.

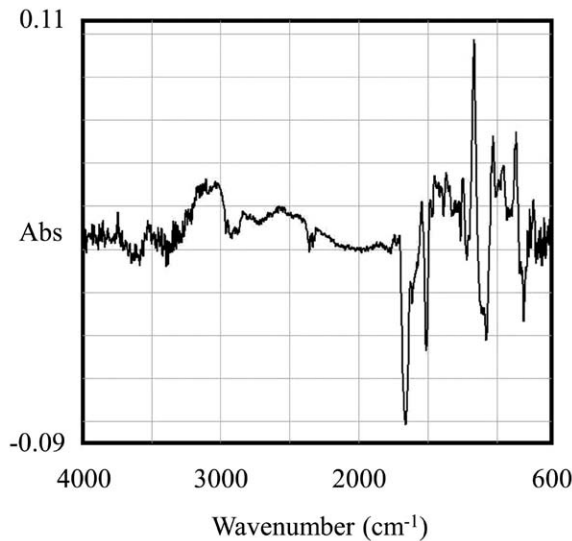


図5: IRスペクトル解析を用いたSEAとEGCGの相互作用解析
EGCGとSEA+EGCGの沈殿物のIRスペクトルから差スペクトルを求めた。

ITC解析を用いたSEAとEGCGの相互作用

ITCを用いてSEAとEGCGの相互作用を検討した。 ΔH と $-T\Delta S$ のパターンから、相互作用様式はエントロピー駆動型であり(表1)、サーモグラムにおいて負の方向(発熱反応)のピークが確認された(図6)。また、EGCGを滴下するに従い、発熱量が増大し、その後、減少したことから、EGCGとSEAの相互作用は、複数の結合サイトにおける疎水的相互作用であることが示唆された。一方、滴定プロットの結果より、ECの滴下前後で発熱反応が生じていないことから、ECとSEAは相互作用していないことが示唆された。

表 1 : SEA と EC および SEA と EGCG 間相互作用の熱力学的パラメーター

Sample		ΔH	ΔS	ΔG	$-T\Delta S$
Cell	Syringe	(J/mol)	(J/mol/deg)	(kJ/mol)	(kJ/mol)
SEA	EC	-61.9	-162.2	-11.7	50.3
	EGCG	5.41	140.9	-38.3	-43.7

ΔH : Enthalpy change, ΔS : Entropy change, ΔG : Gibbs free energy change, T : Absolute temperature.

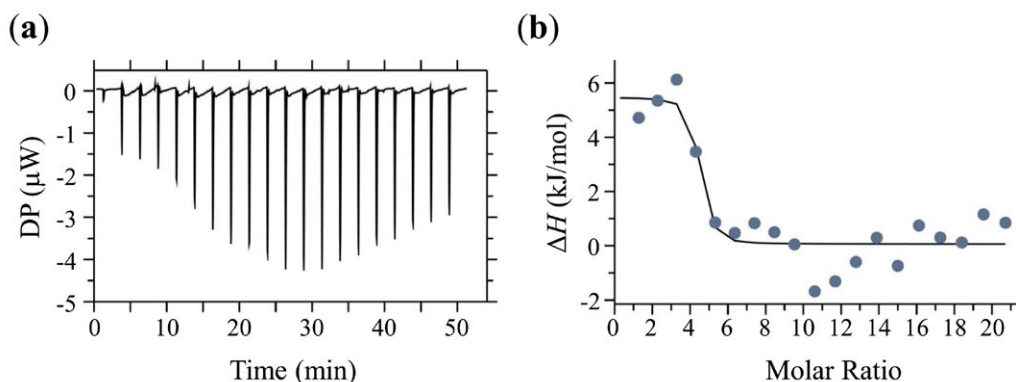


図 6 : 等温滴定型カロリメトリー解析を用いた SEA と EGCG の相互作用解析

(a) 20 μ M SEA に 2.0 mM EGCG を滴定したときのサーモグラム、(b) 各滴定の発生熱量をセル中のリガンド (EGCG) と標的分子 (SEA) のモル比に対してプロットすることにより得られた結合等温線。

SEA と EGCG および EGC とのドッキングシミュレーション解析

ドッキングシミュレーション解析により、EGCG のガロイル基と EGC の A 環は、SEA の毒素活性発現部位の A-6 領域の Y91 と相互作用することが示唆された (図 7)。そこで、EGCG のメチル化体であるメチル化カテキン (EGCG3'' Me、EGCG4'' Me) と SEA との結合親和性について Western blot 解析を用いて検討したところ、EGCG4'' Me では、EGCG と同様に SEA のバンドが減弱したのに対して、EGCG3'' Me では、SEA のバンド強度に変化が認められなかった (図 8)。これらの結果より、ガロイル基の 3'' 位の水酸基が SEA との結合親和性に関与していること、また、構造にガロイル基と A 環が共に存在する場合は、ガロイル基が選択的に SEA と相互作用すると推察された。

マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析

SEA を暴露させた培養細胞において、発現が変動した遺伝子群を図 9 に示した。50 ng/mL の SEA の暴露では、Toll 様受容体経路を介して、IL-12 の p40 サブユニット (IL-12p40) 遺伝子 (IL12b) が特異的に発現誘導 (1.72 倍) された。また、RIG-I 様受容体経路の ISG15 (1.00 倍)、IRF3 (1.56 倍)、Th1 サイトカインの IFN- γ (3.02 倍) および IFN 誘導遺伝子によってコードされる ZBP1 (Z-DNA binding protein 1; 別名 DAI) (2.42 倍) の発現が上昇した。一方、Toll 様受容体経路における I 型インターフェロンである IFN- α および IFN- λ 3 (IL28b) は、SEA を暴露させた脾臓細胞において、それぞれ発現が -1.70 倍、-9.93 倍減少した。また、I 型インターフェロンにより ISG15 の発現が上昇しており、サイトカインによる障害に対し、防御的に働いている可能性が推察された。

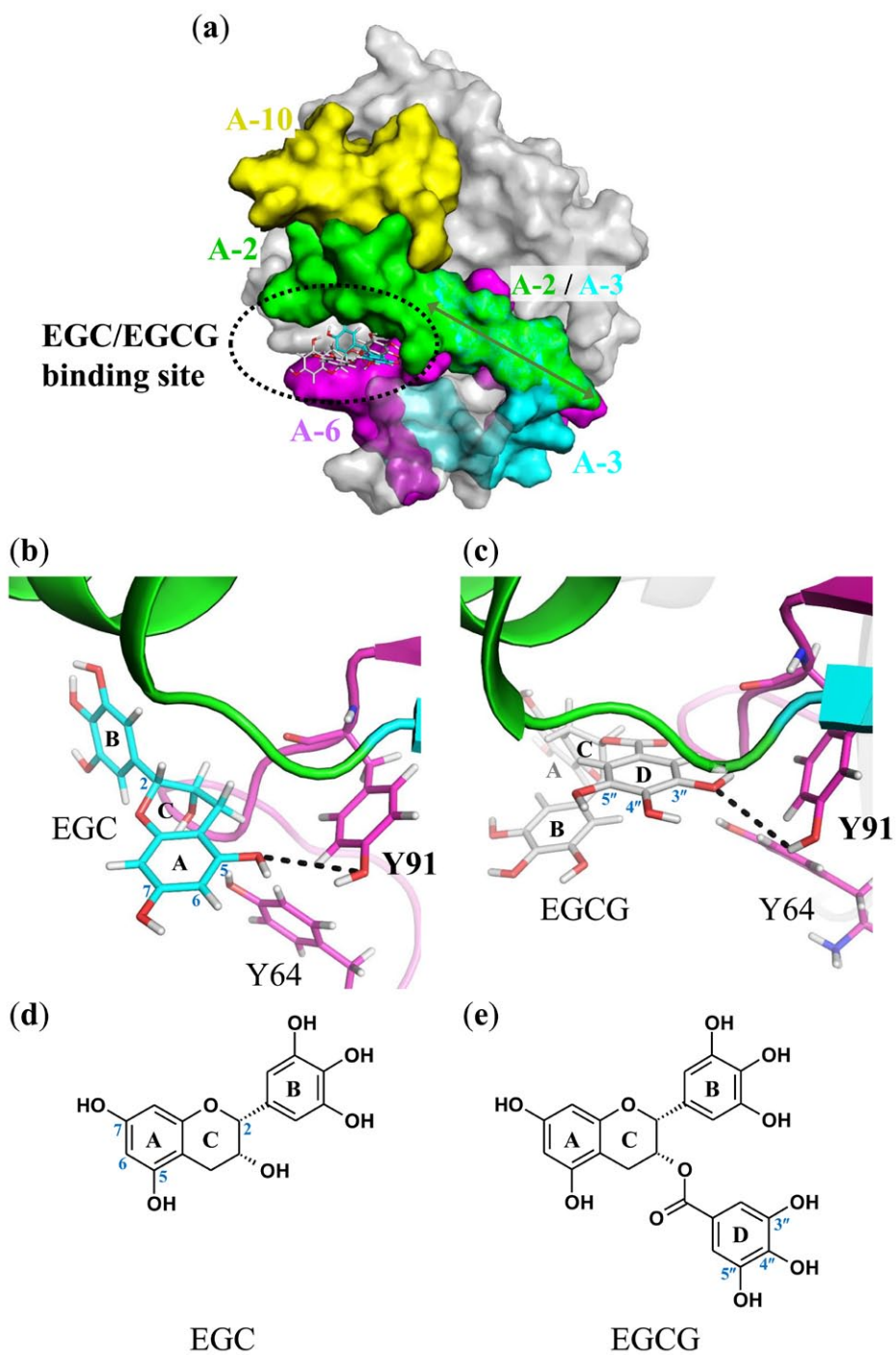


図7：SEAとEGCGおよびEGCとのドッキングシミュレーション解析

- (a) SEA上のEGCまたはEGCGの結合部位。(アミノ酸残基21~40)、A-3(アミノ酸残基35~50)、A-6(アミノ酸残基81~100)、A-10(アミノ酸残基161~180)。
 (b) SEAの毒素活性部位(A-6)とEGCのドッキングシミュレーション。
 (c) SEAの毒素活性部位(A-6)とEGCGのドッキングシミュレーション。
 (d) EGCの構造。
 (e) EGCGの構造。

これらのことから、本研究で用いた濃度のSEAでは、Th1細胞の応答を顕著に誘導することが示唆された。それに対して、EGCGは、SEAにより発現が誘導された炎症のメディエーターやネクローシス関連炎症遺伝子の発現量をダウンレギュレートさせた。これらの結果より、EGCGは、SEAによって誘導されたTh1細胞の応答および免疫バランスの変動に対して負のフィードバック調節作用を有する可能性が示唆された。また、SEAの暴露により、JAK/STATシグナル経路が活性化され、STATの発現が上昇すると予想されたが、本研究では、JAK/STATシグナルを負に制御するCISおよびSOCSの発現が上昇した。今後、SEAとgp130の結合や、それに伴うSTAT3の発現に対するEGCGの作用メカニズムについて、更なる解析が必要である。

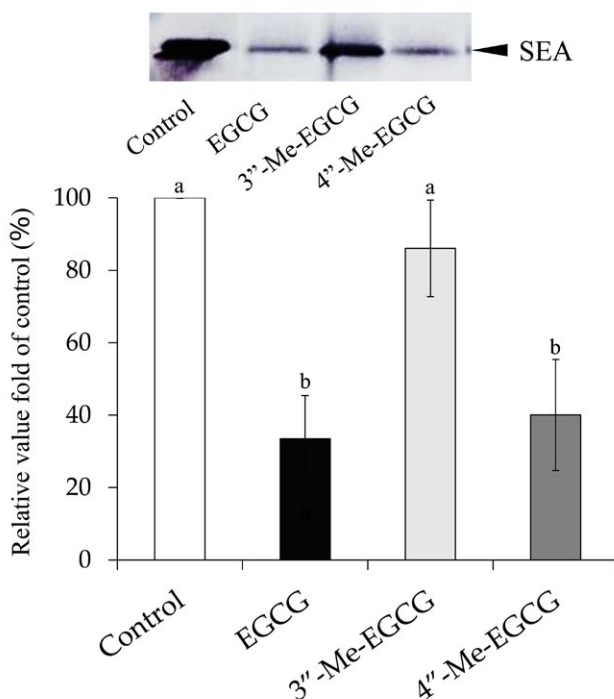


図8：ブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) とメチル化カテキン類の相互作用

SEA (最終濃度 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とEGCGまたはメチル化カテキン類 (最終濃度 3.0mM) をMilliQ水に溶解し、37 $^{\circ}\text{C}$ で24時間インキュベートした。遠心分離後の上清を抗-SEA抗体を用いたWestern blot法にて定量した。異なるアルファベット間で有意差があることを示す (Tukey-Kramer 検定、 $p < 0.05$)。

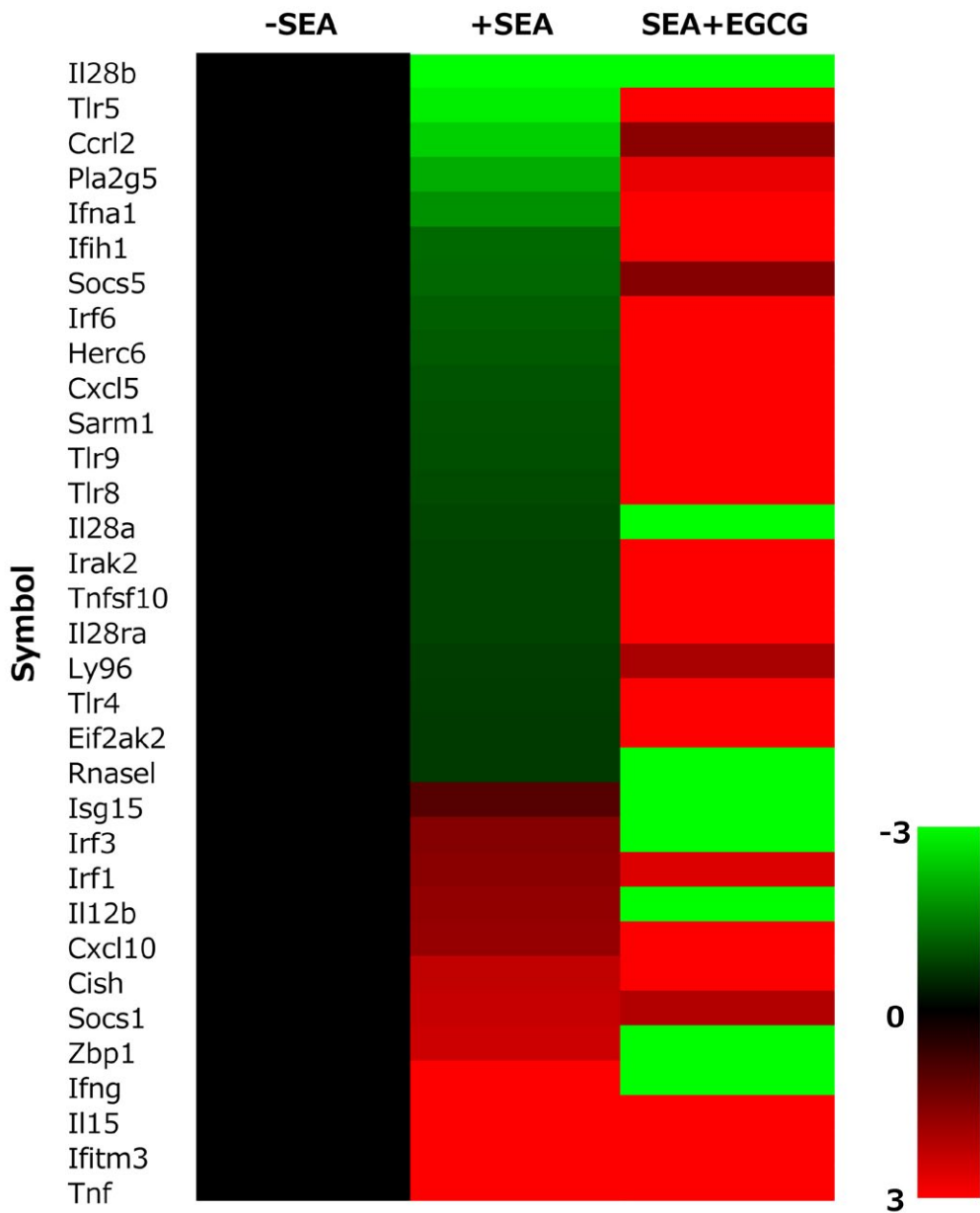


図9: マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析

SEAによって変動した遺伝子およびSEA誘導性遺伝子に対するEGCGの効果について、発現比をヒートマップで表した。緑は発現比が小さいことを、赤は発現比が大きいことを示す。

4. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りましたアサヒグループ学術振興財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

5. 引用文献

- 1) Banke E, Rödström K, Ekelund M, Dalla-Riva J, Lagerstedt JO, Nilsson S, Degerman E, Lindkvist-Petersson K, and Nilson B.: Superantigen activates the gp130 receptor on adipocytes resulting in altered adipocyte metabolism. *Metabolism*. **63(6)**: 831–840 (2014).
- 2) Shimamura Y, Aoki N, Sugiyama Y, Tanaka T, Murata M, and Masuda S.: Plant-derived polyphenols interact with staphylococcal enterotoxin A and inhibit toxin activity. *PLOS ONE*. **11(6)**: e0157082 (2016).
- 3) Grosdidier A, Zoete V, and Michielin O.: SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic acids Res*. **39(suppl_2)**: W270–W277 (2011).
- 4) Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, and Coleman RG. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.*; **52(7)**: 1757–1768 (2012).
- 5) Reygaert WC.: Green tea catechins: Their use in treating and preventing infectious diseases. *BioMed Res Int*. **2018**: 1-9 (2018).