

食中毒菌由来膜小胞の放出および毒性発現に対する食品成分の影響

静岡県立大学 食品栄養環境科学研究院
島村 裕子

1. 研究の目的と背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、食品中で増殖する際に毒素を産生し、毒素型食中毒を引き起こす¹。近年、*S. aureus* は、直径 20 ~ 220 nm の球状の膜構造体である膜小胞 (membrane vesicles) に毒素などの病原因子を内包して分泌することが明らかにされている²。膜小胞に内包された毒素は、宿主の標的細胞へ濃縮された状態で到達することが予想される。しかし、食環境中における膜小胞の挙動は不明な点が多く、膜小胞中に病原因子が内包されるメカニズムは明らかになっていない。*S. aureus* の増殖や病原因子発現を変動させる食品含有成分は、膜小胞中の病原因子の量および質的变化を誘導する可能性が考えられる。先行研究において、*S. aureus* が産生する毒素である staphylococcal enterotoxin A (SEA) と結合する植物由来成分の探索を行い、いくつかのポリフェノールに毒素産生、または毒素活性を阻害する効果があることを見出している^{3,4}。また、経皮感作による卵アレルギーの発症に *S. aureus* が関連していることが示唆されている⁵。

そこで、本研究では、ポリフェノールや鶏卵由来タンパク質などの食品含有成分共存下で *S. aureus* を培養し、膜小胞の放出や膜小胞に内包される毒素などの病原因子およびその病原性の量および質的变化について解析した。本研究の成果より、将来的には、*S. aureus* の膜小胞の放出や膜小胞への病原因子の内包を介した毒素型食中毒の新たな制御策を見出すことを目指す。

2. 研究の方法

2-1. 試料

食品含有成分のうち、ポリフェノールとして、緑茶に含まれる (-)-epigallocatechin gallate (純度 99.0%, 以下 EGCG; 富士フィルム和光純薬株式会社), リンゴに含まれる proanthocyanidin (アップルフェノン, 以下 AP; ニッカウキスキー株式会社), 柑橘類の果皮に含まれる nobiletin (NOL), また、鶏卵由来タンパク質として、卵白に含まれる ovalbumin (重量パーセント ≥100%, OVA; 富士フィルム和光純薬株式会社) を試験に供した。AP の組成は、単量体 (エピカテキンまたはカテキン, 分子量 288) 12.4 %, 二量体 (プロシアニジン B1

または B2, 分子量 576) 11.1 %, 三量体 (分子量 864) 12.3 %, 四量体 (分子量 1152) 8.7 %, 五量体 (分子量 1440) 5.9 %, 六量体以上 (分子量 1728 以上) 25.8 % であった。NOL は、静岡県立大学薬学部の管敏幸先生より供与を受けた。

2-2. *S. aureus* 由来膜小胞の調製

食品含有成分を添加した brain heart infusion (BHI) 培地で *S. aureus* C-29 (ヒト分離株⁶) を培養した。得られた培養上清を遠心式限外ろ過フィルターユニット (Amicon Ultra; メルクミリポア) を用いて 100 kDa でカットオフした後、超遠心分離 (150,000 × *g*, 3 h) して膜小胞 (沈殿画分) を分離した。

2-3. 膜小胞に内包される病原因子の病原性の変化

膜小胞に内包される病原因子の量および質的变化を評価するとともに、得られた膜小胞を表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞) またはラット好塩基性白血球細胞 (RBL-2H3 細胞) に添加して、炎症誘導能の変動を評価した。さらに、各膜小胞中の内包成分を nano-LC-MS/MS を用いて解析した。

3. 研究内容

3-1. *S. aureus* (菌体) の性状に対する食品含有成分の影響

S. aureus 菌体の遺伝子発現と膜小胞の性状との関係を明らかにするために、食品含有成分を添加した BHI 培地で *S. aureus* C-29 を培養し、SEA 産生量および病原因子関連遺伝子 (*icaA* および *hly*) 発現量について解析した。

3-2. *S. aureus* 由来膜小胞の性状に対する食品含有成分の影響

SEA 産生量および病原因子関連遺伝子発現量を変動させた濃度で食品含有成分を添加した培地で *S. aureus* を培養し、膜小胞を調製した。膜小胞の性状として、粒子径 (動的光散乱法), SEA 内包量 (Western blot) について調べた。EGCG, AP および NOL を添加して調製した膜小胞については、HaCaT 細胞に暴露し、膜小胞が誘導する炎症関連遺伝子 (IL-1 β および IL-6) の発現量の変動について調べた。また、RBL-2H3 細胞に OVA を添加して

調製した膜小胞を暴露し、アレルギー関連遺伝子 (HDC, FcεR1α, TNF-α および IL-4) の発現量の変動について検討した。さらに、各膜小胞の内包タンパク質の変化について SDS-PAGE および nano-LC-MS/MS を用いて解析した。

4. 研究の実施経過・考察

4-1. *S. aureus* の性状に対する食品含有成分の影響

食品含有成分を添加した BHI 培地で *S. aureus* を培養し、SEA 産生量および病原因子関連遺伝子発現量について解析した。その結果、EGCG, AP および NOL は、SEA 産生 (Figure 1) および病原因子関連遺伝子発現 (Figure 2) を有意に減少させたが、OVA は増加させた。そこで、以降の実験では、菌体の性状に変化が認められた濃度 (EGCG および NOL: 0.3 mM, AP: 0.3 mg/mL および OVA: 15 mM) で *S. aureus* を培養し、膜小胞を調製することとした。

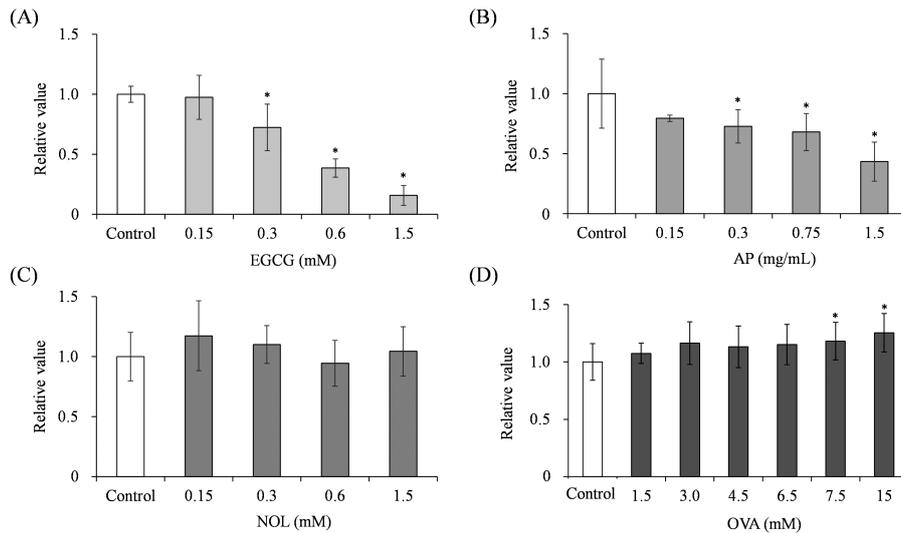


Figure 1. Effect of food components on staphylococcal enterotoxin A (SEA) production by *Staphylococcus aureus*.

(A) EGCG, (B) AP, (C) NOL, (D) OVA.

Values are relative to SEA production of control (0 mM or 0 mg/mL food components). Error bars show standard error. * $p < 0.05$ vs Control (n=3)

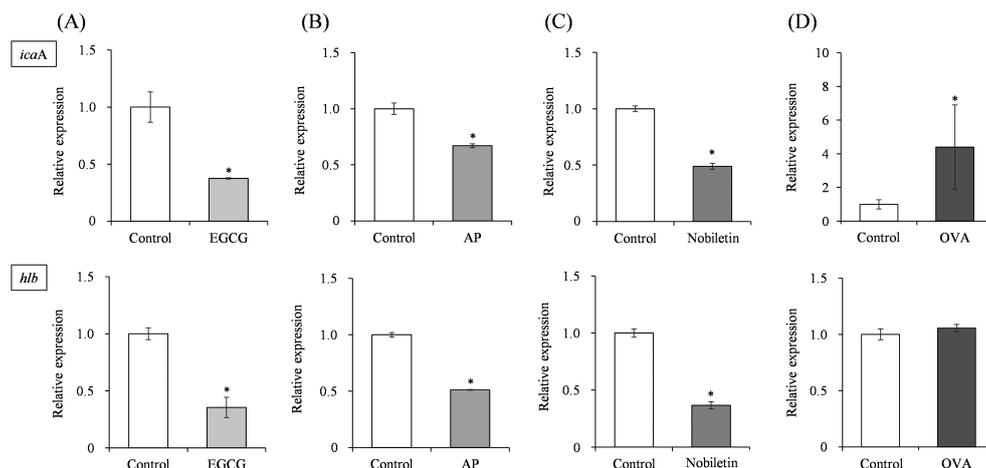


Figure 2. Effect of food components on the expression of virulence factors of *Staphylococcus aureus*.

Upper: the expression of *icaA*, lower: the expression of *hly*.

(A) EGCG (0.3 mM), (B) AP (0.3 mg/mL), (C) NOL (0.3 mM), (D) OVA (15 mM).

Values are relative to mRNA expression of control (0 mM or 0 mg/mL food components). Error bars show standard error. * $p < 0.05$ vs Control (n=3)

4-2. *S. aureus* 由来膜小胞の性状に対する食品含有成分の影響

異なる増殖段階（培養6, 17および24時間）の *S. aureus* の培養上清より膜小胞を調製したところ、培養17時間で調製した膜小胞で最も安定性が高いことが示唆された (data not shown). そこで、以降の実験では、培養17時間後の上清から膜小胞を調製することとした。 *S. aureus* 由来膜小胞の粒子径に対する各試料の影響を調べ

たところ、OVA を添加して調製した膜小胞では粒子径が増大したが、その他の試では粒子径分布に変化は認められなかった (Figure 3). 膜小胞のSEA含有量を調べたところ、EGCG, APおよびNOLでは有意に減少し、OVAでは増加した (Figure 4) ことから、菌体のSEA産生量 (Figure 1) と膜小胞中のSEA内包量は相関しないことが示唆された。

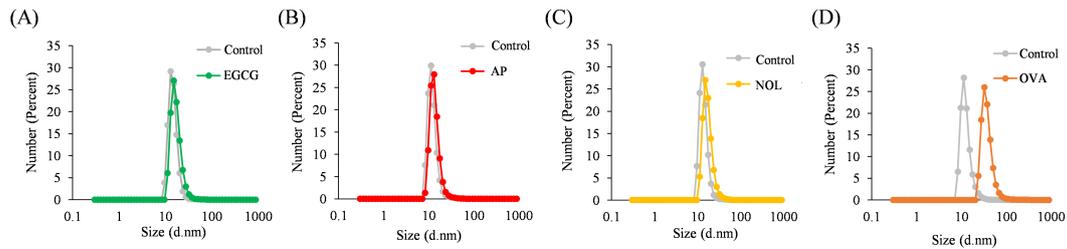


Figure 3. Effect of food components on the particle size of membrane vesicles from *Staphylococcus aureus*.

(A) EGCG (0.3 mM), (B) AP (0.3 mg/mL), (C) NOL (0.3 mM), (D) OVA (15 mM). Control: 0 mM or 0 mg/mL food components.

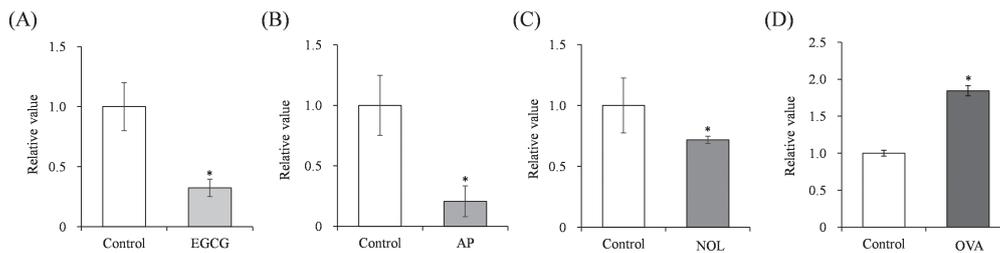


Figure 4. Effect of food components on the amount of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in the membrane vesicles (MVs) derived from *Staphylococcus aureus*.

(A) EGCG (0.3 mM), (B) AP (0.3 mg/mL), (C) NOL (0.3 mM), (D) OVA (15 mM). Values are relative to SEA content of control MVs (0 mM or 0 mg/mL food components). Error bars show standard error. * $p < 0.05$ vs Control (n=3)

4-3. *S. aureus* 由来膜小胞の炎症誘導能に対する食品含有成分の影響

HaCaT細胞に各膜小胞を暴露したところ、EGCGおよびAPでは、膜小胞により発現が誘導されたIL-1 β およびTNF- α , NOLではIL-8の発現を有意に抑制した (Figure 5). また、OVAを含む培地で培養して得られた膜小胞をRBL-2H3細胞に暴露したところ、アレルギー関連遺伝子であるHDC, Fc β R1 α およびTNF- α の発現量の増加が認められたが、IL-4の発現量に変動は認められなかった (Figure 6).

4-4. *S. aureus* 由来膜小胞中のタンパク質内包量に対する食品含有成分の影響

膜小胞中のタンパク質内包量に対する影響を調べたと

ころ、EGCG, APまたはNOL存在下で調製した膜小胞では、複数の内包タンパク質のバンドが減弱し、OVAではタンパク質のバンドが増強した (Figure 7). 各膜小胞中で内包量が減少または増加したタンパク質について、nano-LC-MS/MSを用いて解析した。EGCGおよびAP存在下で培養した *S. aureus* 由来膜小胞で減弱したタンパク質として、血液凝固作用を有する病原因子の一つであるスタフィロコアグラーゼ (staphylocoagulase)^{7,8} およびスタフィロキナーゼ活性を増強させる酵素であるエノラーゼ (enolase)⁹ が同定された。エノラーゼは、 *S. aureus* の細胞壁表面に発現し、宿主のプラスミノーゲンの受容体として機能することで、スタフィロキナーゼ活性を増強させ、 *S. aureus* の宿主細胞への付着を促進させることが報告されている⁹。これらの結果は、膜小

胞が *S. aureus* の宿主への感染を支持しており, EGCG および AP は, 間接的に *S. aureus* による感染を抑制できる可能性が示唆された. また, AP および NOL の存在下で培養した *S. aureus* 由来膜小胞で減弱したタンパク質として, バイオフィーム形成時に発現量が増加することが報告されているアルコールデヒドロゲナーゼ (alcohol dehydrogenase) および L-乳酸デヒドロゲナーゼ (L-lactate dehydrogenase), が同定された. OVA 存在下で培養した *S. aureus* 由来膜小胞で増強したタンパク

質として, オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (ornithine carbamoyltransferase), アルコールデヒドロゲナーゼ (alcohol dehydrogenase) および L-乳酸デヒドロゲナーゼ (L-lactate dehydrogenase), が同定された. 膜小胞は, 自身がバイオフィームの骨格であるマトリックスとして機能すると考えられており¹⁰, AP および NOL の添加は, バイオフィーム形成の抑制につながる可能性が示唆された.

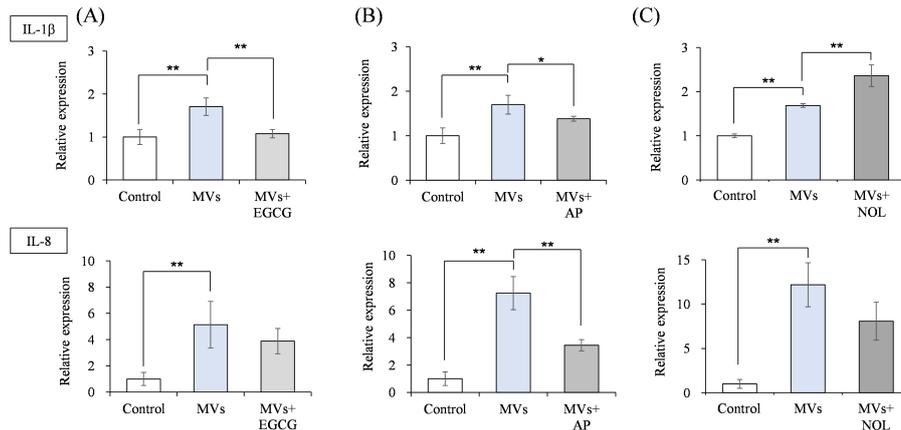


Figure 5. Effect of food components on the expression of inflammation-related genes in membrane vesicles (MVs) derived from *Staphylococcus aureus*.

(A) EGCG (0.3 mM), (B) AP (0.3 mg/mL), (C) NOL (0.3 mM).

Values are relative to mRNA expression of control (PBS). MVs: 0 mM or 0 mg/mL food components. Error bars show standard error. * $p < 0.05$ vs MVs ($n=3$), ** $p < 0.01$ vs Control or MVs ($n=3$)

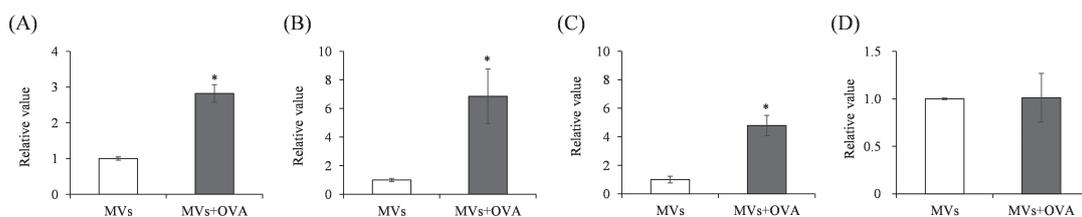


Figure 6. Effect of OVA on allergy-related gene expression in membrane vesicles (MVs) derived from *Staphylococcus aureus*.

(A) HDC, (B) $Fc\epsilon R1\alpha$, (C) $TNF-\alpha$, (D) IL-4.

Values are relative to mRNA expression of MVs single exposure. Error bars show standard error. * $p < 0.05$ vs MVs ($n=3$)

5. 研究から得た結論

本研究では, *S. aureus* 由来膜小胞の性状および炎症誘導に対する食品含有成分の影響について解析し, EGCG, AP および NOL は *S. aureus* 由来膜小胞の病原性を抑制し, OVA は病原性を増強させることを明らかにした. これらの結果より, EGCG, AP および NOL などのポリフェノールは, *S. aureus* 由来膜小胞中の炎症に関わる物質の

内包量を減少させる可能性が示唆された. 本研究の成果および今後の更なる研究により, ブドウ球菌食中毒に関与する *S. aureus* 由来膜小胞の性状に変化を及ぼす要因を見出すことにより, 新しい制御メカニズムによる食中毒制御法の開発が期待される.

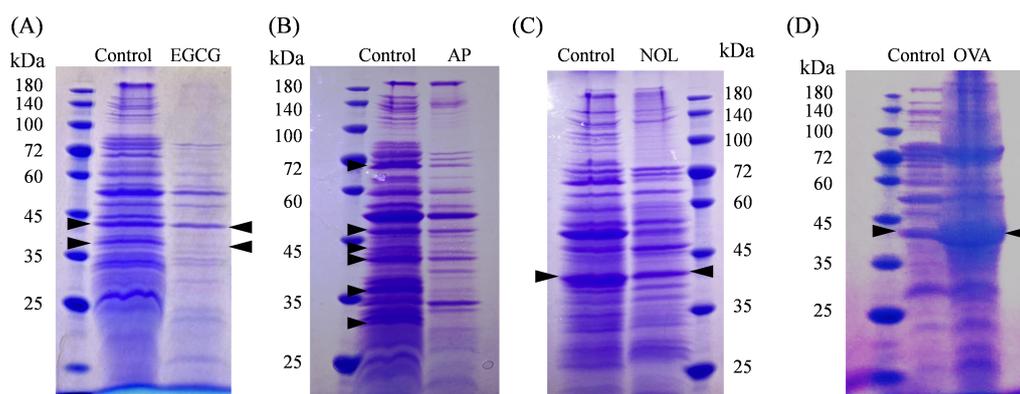


Figure 7. Effects of food components on cargo proteins of membrane vesicles (MV) derived from *Staphylococcus aureus*.

(A) EGCG (0.3 mM), (B) AP (0.3 mg/mL), (C) NOL (0.3 mM), (D) OVA (15 mM). Control: MVs prepared in medium without added food components. The arrows indicate the expression of upregulated protein bands. This protein bands were excised and identified using nano LC-MS/MS analysis.

6. 残された問題、今後の課題

OVA を添加して調製した膜小胞では、SEA 内包量が増加したことから、膜小胞中に SEA を選択的に内包している可能性が示唆された。膜小胞に高濃度の SEA が含まれている場合、少量の食品でも摂取すると食中毒を引き起こす可能性がある。今後、膜小胞への病原性因子の選択的取り込みに影響を与える未知の因子やその作用機序について解明する必要がある。また、本研究では、膜小胞を培養上清の量で補正したが、膜小胞の数では補正しなかったことから、膜小胞の炎症誘導抑制能の違いは、膜小胞の数が異なることが原因である可能性がある。さらに、膜小胞中の炎症誘導に関与する分子を確認するための更なる研究が必要である。

7. 謝辞

本研究は、2020 年度（公財）東洋食品研究所研究助成を受けて実施しました。御支援を賜りました（公財）東洋食品研究所ならびに関係の皆様は厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- Suzuki, Y.: Current studies of staphylococcal food poisoning. *Food Hyg. Saf. Sci.* 2019, **60**(3), p. 27-37. doi: 10.3358/shokueishi.60.27
- Nomura, N.; Toyofuku, M.: Bacterial membrane vesicle and its diversity. *Drug Deliv. Syst.* 2021, **36**(2), p. 138-142. doi: 10.2745/dds.36.138
- Shimamura, Y. *et al.* Plant-derived polyphenols interact with staphylococcal enterotoxin A and inhibit toxin activity. *PLoS ONE*, 2016, **11**(6), p. e0157082. doi: 10.1371/journal.pone.0157082
- Shimamura, Y. *et al.* Screening of tea extract and theaflavins for inhibitory effects on the biological activity and production of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Sci.* 2014, **79**(11), p. M2294-M2300. doi: 10.1111/1750-3841.12566
- Olympia, Tsilochristou, M.D. *et al.* Association of *Staphylococcus aureus* colonization with food allergy occurs independently of eczema severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019, **144**(2), p. 494-503. doi: 10.1016/j.jaci.2019.04.025
- Shimamura, Y.; Kidokoro, S.; Murata, M.: Survey and properties of *Staphylococcus aureus* isolated from Japanese-style desserts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006, **70**(7), p. 1571-1577. doi: 10.1271/bbb.50617
- Sthanikam, Y. *et al.* Cloning and characterization of L-lactate dehydrogenase gene of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, 2013, **24**, p. 43-48. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.09.003
- Toyofuku, M. *et al.* Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016, **80**(1), 7-12. doi: 10.1080/09168451.2015.1058701
- Sergio, M.G. *et al.* Proteomic comparison of biofilm vs. planktonic *Staphylococcus epidermidis* cells suggests key metabolic differences between these conditions. *Res. Microbiol.* 2021, **172**(2), 103796. doi: 10.1016/j.resmic.2020.103796

- 10 Carneiro, Celia, R.W. *et al.* Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 2004, **6**(6), 604-608. doi: 10.1016/j.micinf.2004.02.003