

黄色ブドウ球菌食中毒における  
分子疫学解析と可動性遺伝因子の  
特性に関する研究

2015 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(岩手大学)

鈴木 康規

## 目次

緒言	1
図	8
第一章 東京都で発生した食中毒事例由来黄色ブドウ球菌分離株 の分子疫学解析	
序論	11
材料及び方法	
1. 黄色ブドウ球菌株と使用培地	12
2. コアグララーゼ型別	13
3. Multiplex PCR 法を用いた SE/SEIs 遺伝子の型別と可 動性遺伝子のタイプの推測	13
4. 黄色ブドウ球菌 Genomic DNA の精製	15
5. Multi locus sequence typing	17
6. SaPI scanning	20
7. 分子系統解析	22
8. Sandwich ELISA を用いた SEA タンパク質の定量	23
結果	
1. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株の MLST 解析	25
2. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株のコアグララーゼ型と	

Clonal complex との関係性	26
3. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株の SE/SEIs 遺伝子型と Clonal complex との関係性	26
4. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株が保有する SaPI の同定 と Clonal complex との関係性	27
5. CC81 に属する <i>sea</i> 遺伝子陽性黄色ブドウ球菌株の SEA 産生量	29
考察	29
表	35
図	42
第二章 ブドウ球菌エンテロトキシンを保有する新規 SaPI の同定と その特性	
序論	51
材料及び方法	
1. 黄色ブドウ球菌株と使用培地	52
2. 大腸菌株と使用培地	53
3. 使用したプラスミドの概要	53
4. 黄色ブドウ球菌 Genomic DNA の精製	54
5. SaPI scanning	54

6.	Southern blotting を用いた LA-PCR 増幅産物中の SEs 遺伝子の検出	
	A. pKOB, pKOC 及び pKOL プラスミドの大量精製	54
	B. <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sel</i> 遺伝子断片の精製	56
	C. <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sel</i> プローブの標識	57
	D. Southern blotting	58
7.	新規 SaPI 配列の同定	62
8.	Sandwich ELISA を用いた SE タンパク質の定量	62
9.	Rep の発現と精製	
	A. Rep 発現用プラスミドの構築	63
	B. 組換え Rep の発現及び精製	66
	C. rRep の純度の確認	69
10.	ゲルシフトアッセイ	
	A. <i>ori</i> site 配列プローブの作製	73
	B. ゲルシフトアッセイ	74
11.	蛍光ヘリカーゼアッセイ	75
12.	統計学的解析	77

## 結果

1.	<i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sel</i> 遺伝子が存在する GI の同定	77
2.	<i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sel</i> 遺伝子保有新規 SaPI 配列の同定	79
3.	新規 SaPI と既知 SaPI が保有する <i>sel</i> 配列の比較	80
4.	新規 SaPI における <i>rep-ori</i> site 領域の比較	81
5.	新規 SaPI を保有する黄色ブドウ球菌株の SEs 産生量	82
6.	rRep の精製と <i>ori</i> site への特異的結合	82

7. rRep のヘリカーゼ活性	84
考察	84
表	91
図	105
第三章 SE/SEIs 関連プラスミドの食中毒事例への関与と変異型 <i>sed</i> 遺伝子の同定	
序論	115
材料及び方法	
1. 黄色ブドウ球菌株と使用培地	116
2. 大腸菌株と使用培地	117
3. 使用したプラスミドの概要	117
4. 黄色ブドウ球菌プラスミドの精製	118
5. 黄色ブドウ球菌プラスミドの制限酵素断片長多型 解析	119
6. Sandwich ELISA を用いた SE/SEI タンパク質の定量	120
7. <i>sed</i> , <i>selj</i> 及び <i>ser</i> 遺伝子を含む <i>EcoRI</i> 断片のシーク エンス解析	121
8. 黄色ブドウ球菌からの総 RNA の精製	122
9. 逆転写反応	124

10. スタンダードプラスミドの作製	125
11. 定量的リアルタイム RT-PCR	125
12. 統計学的解析	127
結果	
1. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株が保有するプラスミド の同定	127
2. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株における SE/SEIs の産 生量	128
3. <i>sed</i> 配列が存在する <i>EcoRI</i> 断片のクローニングとシ ーケンス解析	129
4. 定量的リアルタイム RT-PCR による <i>sed</i> 及び変異型 <i>sed</i> 遺伝子発現の検出	130
考察	130
表	136
図	139
総括	144
謝辞	148
参考文献	149

## 略語一覧

att 配列 : attachment 配列

BHI : Brain heart infusion

BLAST : Basic local alignment search tool

BSA : Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)

CC : Clonal complex

CoaT : Coagulase type (コアグララーゼ型)

dsDNA : double-stranded DNA (二重鎖 DNA)

*E. coli* : *Escherichia coli* (大腸菌)

*egc* : enterotoxin gene cluster

EtBr : Ethidium bromide (臭化エチジウム)

*ftsZ* : Cell division protein gene

GI : Genomic island

HRP : Horseradish peroxidase (西洋ワサビペルオキシダーゼ)

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

IS : Insertion sequence

LA-PCR : Long and accurate polymerase chain reaction

LB : Luria-Bertani

MHC : Major histocompatibility complex (主要組織適合遺伝子複合体)

MLST : Multi locus sequence typing

mSED : Mutant staphylococcal enterotoxin D (変異型 SED)

*msed* : Mutant staphylococcal enterotoxin D gene (変異型 SED 遺伝子)

MSEY : Mannitol salt agar with egg yolk (卵黄加マンニット食塩)

NCBI : National Center for Biotechnology Information (国立生物工学)

情報センター)

ORF : Open reading frame

*ori* site : Replication origin (複製開始点)

PBS : Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PBST : Phosphate buffered saline with Tween 20 (Tween 20 添加リン酸緩衝生理食塩水)

Rep : Replication initiator protein (複製開始タンパク質)

*rep* : Replication initiator protein gene (複製開始タンパク質遺伝子)

RFLP : Restriction fragment length polymorphism (制限酵素断片長多型)

*rpoB* : RNA polymerase beta subunit gene

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

rRep : recombinant replication initiator protein (組換え複製開始タンパク質)

SAG : Superantigen (スーパー抗原性毒素)

SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis  
(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

SE : Staphylococcal enterotoxin (ブドウ球菌エンテロトキシン)

SEI : Staphylococcal enterotoxin-like toxin (ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素)

slv : Single locus variant

*sodA* : Superoxide dismutase gene

ST : Sequence type



TBS : Tris buffered saline (トリス緩衝生理食塩水)

TBST : Tris buffered saline with Tween 20 (Tween 20 添加トリス緩衝生理食塩水)

TET バッファー : Tris-EDTA-Triton X-100 バッファー

TSB : Tryptic soy broth

## 緒言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* ; *S. aureus*) は哺乳動物や鳥類などの温血動物に広く分布する常在菌であると同時に、食中毒、毒素性ショック症候群、ブドウ球菌性皮膚剥脱症候群といった毒素原性疾患を引き起こす病原菌として重要視されている。ブドウ球菌食中毒は、本菌の産生するブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxins ; SEs) の摂取により引き起こされる毒素型食中毒の一つである。SEs は耐熱性が高く、既に食品中に SEs が産生されている場合、殺菌処理や加熱調理で菌を死滅させても SEs は残存し食中毒の原因となり得る。また、SEs はトリプシンやペプシンといった種々のタンパク質分解酵素に対して抵抗性を示すため、体内の消化酵素で分解されにくい特性を持つ [5, 67]。本食中毒は、平均 3 時間の潜伏時間の後に発症する。主症状は悪心及び嘔吐であり、場合により下痢を伴う [29, 73]。通常その症状は一過性に消失し予後は良好とされるが、場合によっては脱水症状や血圧の低下、脈拍微弱などを伴ってショックや虚脱に陥ることもあるため、救急搬送を必要とするなど適切な治療が必要である。厚生労働省の食中毒統計によると、日本では年間約 50 件のブドウ球菌食中毒が発生している ( [http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoushokuhin/syokuchu/](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/) )。そのうち、東京都における事例は全体のおよそ 10% を占め、年間 5 件前後の報告がなされている ( <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/tyuudoku/> )。本食中毒事例は、食品製造・販売段階での食品の衛生的な取扱い及び適

切な保存管理により近年減少傾向にあるが、2000年に関西地方において加工乳に混在したSEsを原因とする大規模食中毒事例（患者数13,420名以上）が発生する[4]など、*S. aureus*は公衆衛生上常に注意を払わなければならない食中毒起因菌の一つであり、同菌の制御、特にその毒素産生の制御は、食の安全を確保する上で重要視される。

ブドウ球菌食中毒は広く世界中で発生しており、これまでに様々な手法によって、本食中毒に関与する*S. aureus*株の疫学的特性が調べられてきた[17, 25, 68, 69, 77, 79]。コアグララーゼ型別法は、日本における*S. aureus*株の疫学解析においてよく用いられる手法である。本型別法は*S. aureus*が産生するコアグララーゼの抗原性の差異に基づく手法であり[68, 77]、特定のコアグララーゼ型を持つ*S. aureus*株が食中毒事例から優勢に分離されることが知られている[62, 68]。Shimizuら[68]は、コアグララーゼ型別は原因菌の特定や伝播などを推定する疫学解析を行う上で有用であると報告している。

2001年に2種類の*S. aureus*株の全ゲノム塩基配列が決定され[38]、*S. aureus*ゲノムには可動性遺伝子の挿入やvariable遺伝子の存在等、多くの可変領域を含むことが明らかとなった。そして、それらの可変領域を対象とした分子生物学的な手法が*S. aureus*の疫学解析に応用されている[25]。Multi locus sequence typing (MLST)法は分子疫学解析手法の一つであり、本法に基づくクローン解析が*S. aureus*を含めた様々な菌種で広く用いられている[27, 37, 60, 63, 83]。MLST法では、最初に複数のハウスキーピング遺伝子を対象とし、その塩基配列の差異の解析を行う。その後、それぞれの塩基配

列を既に登録されているデータベースと比較しパターン化することでタイピングを行うことができる [21]。ハウスキーピング遺伝子は細菌の生存に関わる遺伝子である。本遺伝子に変異が起きた細菌の多くは、死滅するか集団の中で淘汰されてしまう。そのため本遺伝子の進化速度（一定時間あたりの変異発生頻度）は、病原遺伝子など変異の起こりやすい遺伝子と比較して緩やかである。このように、ハウスキーピング遺伝子は長い時間をかけて変異の積み重ねが起こり多様性を生じることから、その塩基配列の差異が細菌の進化時間を反映していると考えられるため、MLST法で得られたデータは菌株の分子疫学解析のみならず分子系統学解析においても利用される [23, 27, 37, 60, 63]。 *S. aureus* 株を対象とした MLST 解析は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症分離株や環境由来分離株で広く実施されている [27, 37, 60, 63, 65]。しかし、ブドウ球菌食中毒分離株の報告は限定的であり、その分子疫学的特性や分子系統学的な背景に関しては未だ不明な点が多い [79]。

1930年、Dackら [18]により、ブドウ球菌食中毒は *S. aureus* の産生する菌体外毒素により引き起こされることが証明され、「エンテロトキシン」と命名された本毒素の研究が始まった。1971年までに、抗原性の異なる5種類の型（古典的 SEs；SEA～SEE）が存在することが報告され [6, 7, 15, 16]、食中毒検査の分野においては、長らく血清学的手法を用いてこれらの毒素の分類がなされてきた。しかし、分子生物学的解析手法の進展により、1994年以降古典的 SEs 以外にも嘔吐活性を持つ新型 SEs、および SEs と構造が類似するエンテロトキシン様毒素（Staphylococcal enterotoxin-like toxin；SEI）が次々と報告されている。SE/SEIs は、現在までに SEA～SEE, SEG

～SEIX の 23 種類が同定され，多種の分子種より構成される毒素群であることが明らかになっている [2, 28, 29, 53, 55, 57, 72, 80]。なお，これらの新型 SE/SEIs は，International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen の命名規約により，霊長類動物への経口投与実験により嘔吐が認められたものを”SE”，嘔吐実験未実施もしくは嘔吐活性陰性のものを”SEI”と表記すると定められている [40]。

多くの SEs は，嘔吐活性に加えスーパー抗原活性を有する [2, 20, 24, 57]。スーパー抗原活性による毒素性ショック症候群の発症メカニズムはよく解析されている。すなわち，SEs が Major histocompatibility complex (MHC) class II と T cell receptor に同時に結合（架橋）することで，多数の T 細胞を活性化する。その結果，抗原非依存的に T 細胞からの過度のサイトカイン放出を誘起し，発疹，血圧低下，播種性血管内凝固，多臓器不全などの致命的な病態を引き起こす毒素性ショック症候群を発症する [1, 34]。一方で，SEs のヒトにおける嘔吐発症メカニズムの分子基盤は十分に明らかにされていない。SEs は消化管の粘膜下組織に存在する肥満細胞のセロトニン脱顆粒を誘起し，上行性の腹腔交感神経および迷走神経を刺激することで嘔吐を引き起こすと考えられている [34, 58]。5 種類の古典的 SEs が何れもヒトの食中毒の原因となることは明らかであるが [5, 20]，新型 SE/SEIs は，その嘔吐活性の有無や強弱，*S. aureus* による産生の有無や産生量の多寡といった点で研究段階であるものも多く，食中毒への関与は未だ不明な点が多い。

*S. aureus* は様々な可動性遺伝因子やその断片を持つことが報告されており，その種類として，プロファージ，プラスミド，Insertion

sequence (IS), Staphylococcal cassette chromosome, the highly variable genomic region vSa $\beta$ , *Staphylococcus aureus* pathogenicity island (SaPI) などが知られている [2, 42, 44]。14-17 kb の大きさの配列を持つ SaPI は、ゲノム上の 6 か所の挿入可能領域 (8', 9', 18', 19', 44' 及び 49' 領域 ; 図 1) のいずれかに挿入されている可動性遺伝因子であり、プロファージの様に宿主のクロモソーム内で安定的に存在 (溶原化) している [44, 51]。1998 年に初めて SaPI の報告がなされてから、現在まで 20 種類以上の SaPI が同定されている [2, 39, 41, 51, 64]。SaPI の持つ一般的な遺伝子構造を図 2 に示した。SaPI の両端には挿入部位特異的な繰り返し配列 (att 配列) が存在し、自身の伝播に関与する複数の遺伝子が保存された基本構造を持つ [44, 51]。また、病原遺伝子 (SEs 遺伝子等) や薬剤耐性遺伝子がアクセサリー遺伝子として基本遺伝子の間に存在する場合がある [50, 51]。

伝播を担う遺伝子が機能することにより溶原化している SaPI の他の *S. aureus* 株への伝播が効率的に行われる [51, 75, 76]。SaPI 伝播様式の概略を図 3 に示した。SaPI 伝播の誘導には特定の Helper phage が関与する。例えば、DNA 損傷に伴う SOS 応答により宿主のゲノム内で溶原化している Helper phage が誘導されることが、SaPI 伝播を開始させる一因となる。宿主のゲノム内に存在する SaPI 配列は、integrase や excisionase の働きにより切り出される。切り出された SaPI 配列は複製され数百コピーが直鎖状に連なった鎖状体 (コンカテマー) を形成する。このコンカテマーは terminase 複合体により個々の SaPI 配列に切断される。最終的に、個々の SaPI 配列が Helper phage を構成する外殻タンパク質に取り込まれ、ファージ様粒子として宿主外に放出される。

“複製”は、SaPIの伝播における重要な過程のひとつである。SaPIには一つの複製単位が存在し、複製単位特異的な複製開始タンパク質（Replication initiator protein；Rep）と複製開始点（Replication origin；ori site）を持つことが知られている [13, 51, 74, 75, 76]。Repは二重鎖DNAを一本鎖に変換させるヘリカーゼ活性を持つタンパク質である [51, 74, 76]。ori siteは300 bp程度の配列であり、通常 rep 遺伝子の3'側近傍に位置する。同部位は80 bp程度のATに富んだ配列（AT-rich領域）を、6 bp前後の同方向反復配列と逆方向反復配列からなるイテロン配列が挟む構造を持つ [74]。Repタンパク質がイテロン配列に結合し、ヘリカーゼ活性を通してAT-rich領域のDNA二重鎖を一本鎖にすることでSaPIsの複製が開始されると考えられている [51]。

多くのSE/SEIs遺伝子は、可動性遺伝因子上に存在することが報告されている [2, 28, 44]。このことは、SE/SEIs遺伝子が*S. aureus*株間で水平伝播し得ることを示している。それゆえ、可動性遺伝因子の伝播が食中毒原性の獲得に深く関与することが示唆され [42, 44, 49]、様々な可動性遺伝因子を同定しその特性を解析することが、*S. aureus*の病原体としての起病性と分子遺伝学的特性を考察する上で非常に有益であると考えられる。すなわち、病原性*S. aureus*の分子進化を考察することが可能になる。

本研究では、食の安全を確保する上で重要視されるブドウ球菌食中毒について、その分離*S. aureus*株の疫学解析による情報が本食中毒の発生状況調査や発生防止に有用であると考え、各種の疫学手法を組み合わせて用いることによりブドウ球菌食中毒を誘発しやすい*S. aureus*の遺伝学的特性の解明することを試みた。また、可動性遺

伝因子の同定およびその特性に関する情報が *S. aureus* の食中毒病原体としての起病性を考察する上で有益であると考え、ブドウ球菌食中毒発生に関与する可動性遺伝因子の分子遺伝学的特性を検討した。

第一章では、1994年から2012年に東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株の分子疫学上の特性を明らかにし、その特性とコアグラマーゼ型、SE/SEIs 遺伝子型及び可動性遺伝因子の保有パターンとの間に緊密な関係があることを明らかにした。

第二章では、第一章の結果からその存在が推測された、新規 SaPI 配列を4種類同定した。また、それらの食中毒起病性及び伝播能力に関する特性を解析し、全ての新規 SaPI が食中毒起病性を保持する一方で、新規 SaPI の1つが、SaPI 伝播の一過程である“複製”に関する能力を欠如していることを明らかにした。

第三章では、ブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株が持つ SE/SEIs 保有プラスミドの食中毒への関与を検討した。また、解析対象とした一部の *S. aureus* 株が、SED 配列の C 末端部分を欠失する変異型 SED を保有することを明らかにするとともに、同変異型 SED の食中毒原因毒素としての可能性を検討した。



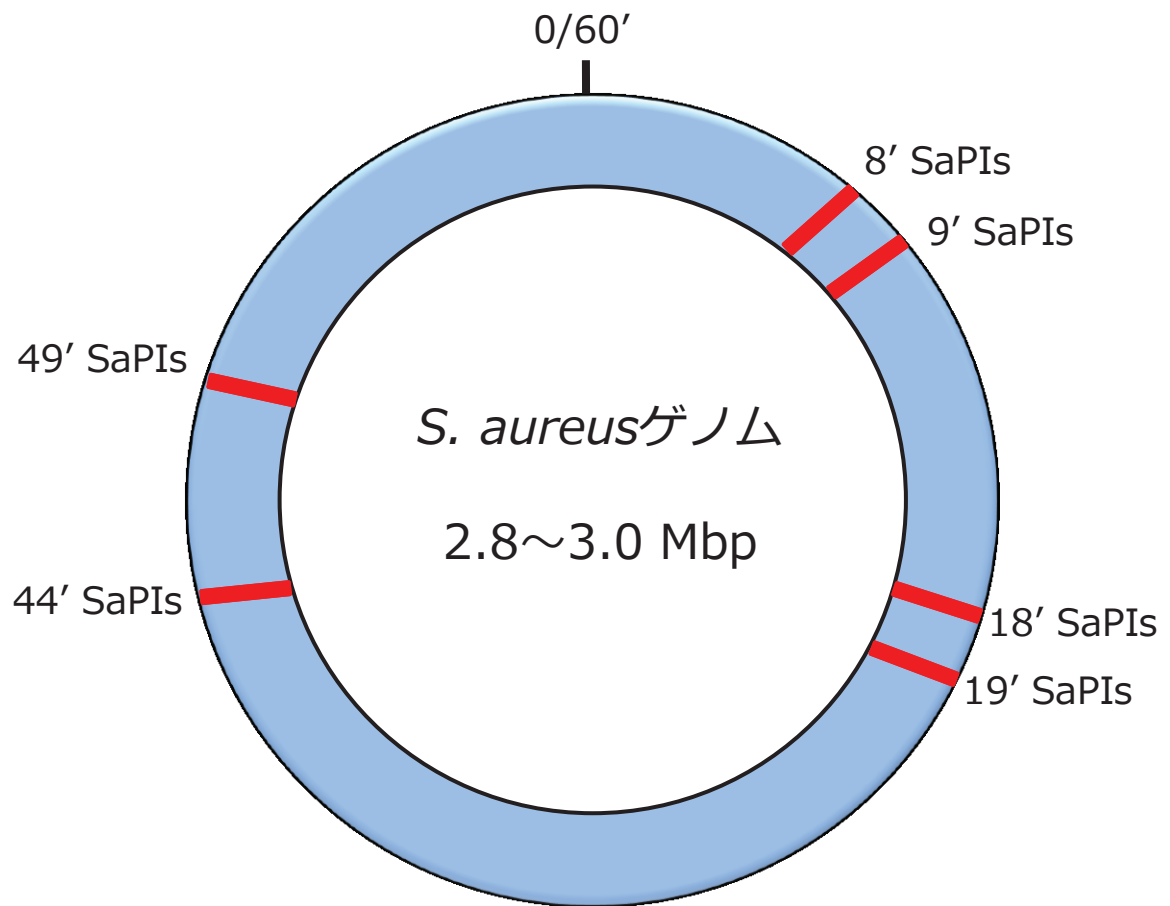


図 1. *S. aureus*ゲノム上における*Staphylococcus aureus* pathogenicity island (SaPI) の挿入可能領域の位置

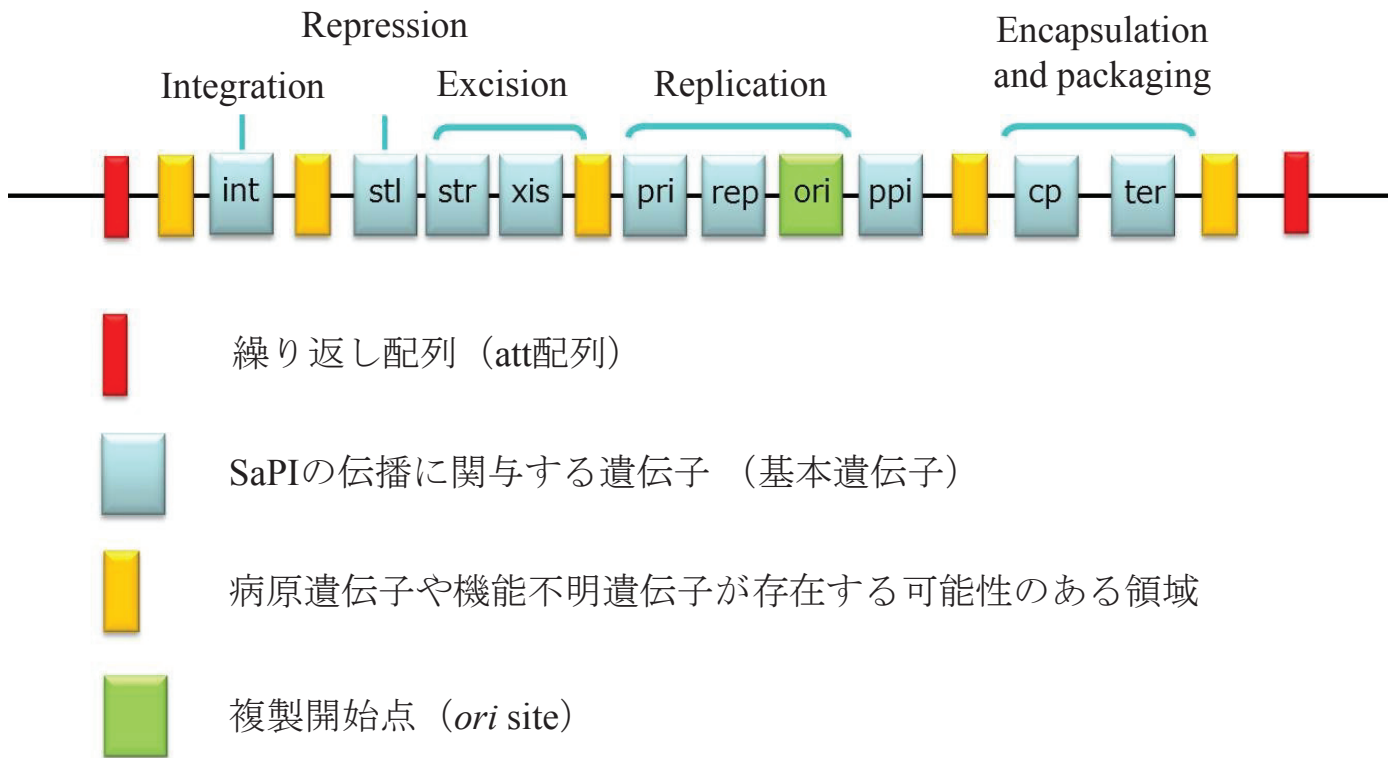


図 2. SaPIの基本構造

病原遺伝子や機能不明遺伝子が存在する可能性のある領域は、既報SaPI [51, 64] が持つ遺伝子の構造から推測した。各遺伝子の略語は以下の通りである。*int* : integrase ; *stl* : master repressor ; *str* : regulatory protein ; *xis* : excisionase ; *pri* : primase ; *rep* : replication initiator ; *ppi* : phage interference ; *cp* : packaging genes ; *ter* : terminase small subunit

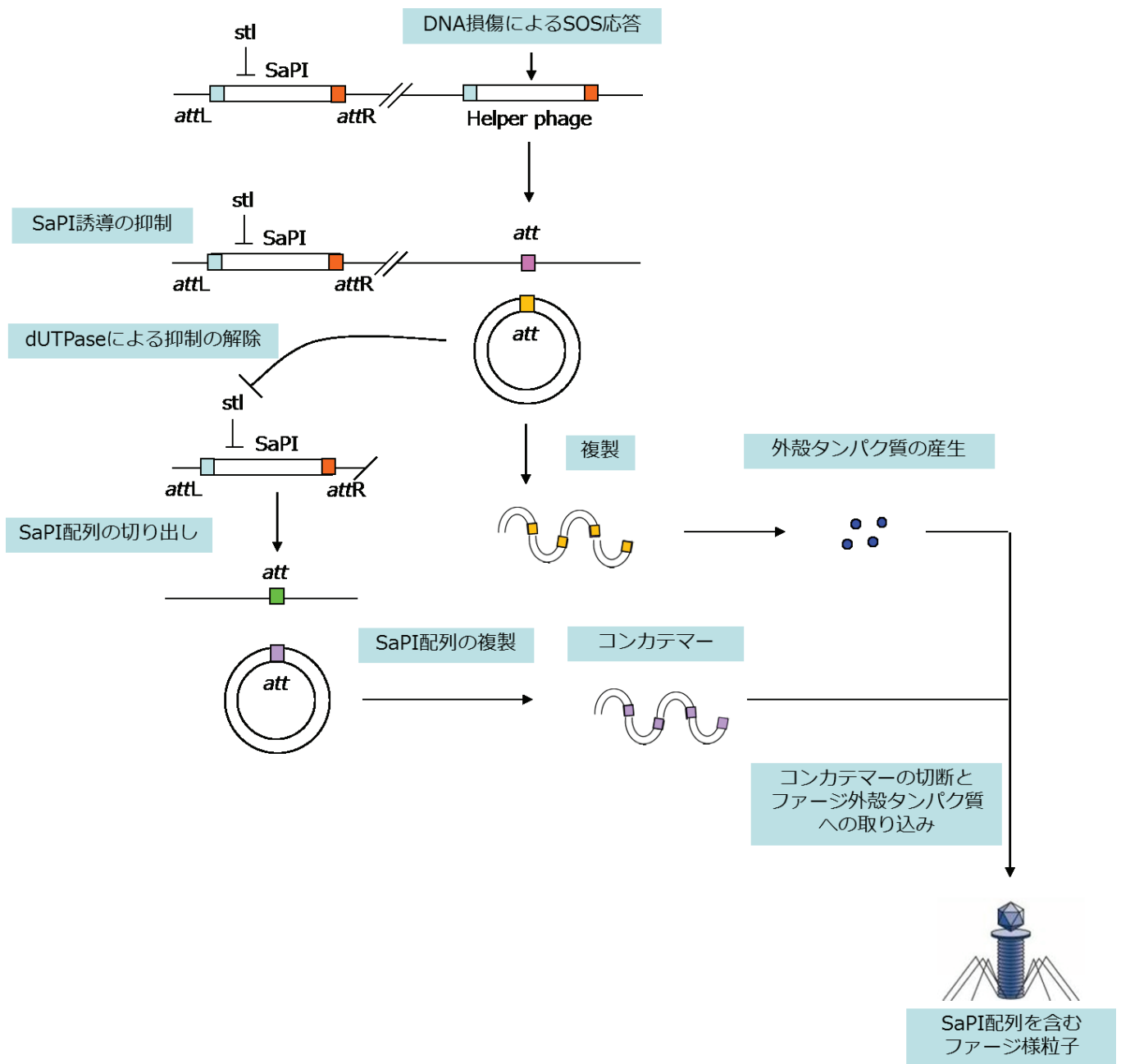


図 3. SaPI伝播様式の概略

DNA損傷に伴うSOS応答によって溶原化しているHelper phageの誘導が起こり、SaPI伝播を開始させる。Helper phage由来のdUTPaseによって、SaPI誘導の抑制が解除され、SaPI配列はintegraseやexcisionaseの働きにより切り出される。切り出されたSaPI配列は複製され数百コピーが直鎖状に連なった鎖状体（コンカテマー）を形成する。このコンカテマーはterminase複合体により個々のSaPI配列に切断される。個々のSaPI配列がHelper phageを構成するファージ外殻タンパク質に取り込まれ、ファージ様粒子として宿主外に放出される。Novickら [51] の図を引用し一部改変した。

# 第一章 東京都で発生した食中毒事例由来黄色ブドウ球菌 分離株の分子疫学解析

## 序論

ブドウ球菌食中毒は広く世界中で発生しており，これまでに様々な手法によって，本食中毒に関与する *S. aureus* 株の疫学的特性が調べられてきた [17, 25, 68, 69, 77, 79]。日本では，コアグララーゼ型別法が *S. aureus* 株の疫学解析において汎用されており，特定のコアグララーゼ型を持つ *S. aureus* 株が食中毒事例から優勢に分離されることが知られている [62, 68]。しかし，食中毒由来 *S. aureus* 株を対象とし，MLST 法などの分子疫学解析を行った報告は限定的であり，*S. aureus* 株における分子疫学上の特性と食中毒発生の関連性は明らかでない。

近年，可動性遺伝因子の一つである SaPI を効率的かつ詳細に解析する SaPI scanning 法が開発され，SaPI の同定に利用されている [64]。本法は，比較的広域のゲノム配列を解析の対象とするため，各菌株レベルでのタイピングにも用いることができ，*S. aureus* 株の分子疫学解析への応用が期待されている [64]。

本章では，東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株を用い，それらの疫学的特性を網羅的に解析した。各事例由来 *S. aureus* 株の分子疫学的特性に関して MLST 法を用いて明らかにした。続いて，MLST 法を基にした分子系統とコアグララーゼ型，保有 SE/SEIs 遺伝子型及び保有 SaPI における関係性を，抗コアグララーゼ血清を用いた血清学的手法，Multiplex PCR 法，SaPI scanning 法を組み合わせ

ることで明らかにし、食中毒を誘発しやすい *S. aureus* の遺伝学的特性を理解することを目的とした。

## 材料及び方法

### 1. 黄色ブドウ球菌株と使用培地

本研究では、1994年から2012年に東京都で発生したブドウ球菌食中毒83事例から分離された203株の *S. aureus* を使用した。これらの株は、ブドウ球菌食中毒事例の患者糞便由来、患者嘔吐物由来、推定原因食品由来及び事例施設の調理器具もしくは調理従業員の手指の拭き取り検体由来である。後述する SE/SEIs 遺伝子型とコアグラマーゼ型が、患者検体由来分離株と推定原因食品由来（もしくは拭き取り検体由来）分離株で一致したものを、各ブドウ球菌食中毒事例の原因菌株とした。

*S. aureus* 株の保存にはカジトン半流動培地を用いた。組成は以下の通りである。

カジトン半流動培地（1 L スケール）

- |   |                                                    |      |
|---|----------------------------------------------------|------|
| ① | Bacto Casitone (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) | 10 g |
| ② | Bacto agar (Becton Dickinson)                      | 5 g  |
| ③ | NaCl (和光純薬, 大阪, 日本)                                | 5 g  |

pH7.4 に調整後、MilliQ 水で 1 L にメスアップし、121°C 15 分間オートクレーブした。

また、*S. aureus* の培養には卵黄加マンニット食塩 (Mannitol salt

agar with egg yolk : MSEY) 寒天培地 (栄研化学, 東京, 日本), Tryptic soy broth (TSB : Becton Dickinson) 及び Brain heart infusion (BHI) broth (Becton Dickinson) を用いた。各培地の調製は添付の説明書に従って行った。

## 2. コアグララーゼ型別

供試 *S. aureus* 203 株のコアグララーゼ型別は, ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清キット (デンカ生研, 東京, 日本) を用い, 添付の説明書を一部改変して行った。すなわち, カジトン半流動培地に保存されている菌株を, MSEY 寒天培地を用いて 2 回継代した。正常ウサギ血漿 (デンカ生研) を 5% (w/v) になるように添加した BHI broth に単一コロニーを接種し, 37°C で一晩静置培養した。培養液を 3,000 rpm, 30 分遠心分離して上清を採取し, 100  $\mu$ L ずつ試験管に分注した。各免疫血清 (I 型-VIII 型) を 100  $\mu$ L ずつ加え, 攪拌後 37°C で 1 時間培養した。続いて 10% 正常ウサギ血漿溶液を 200  $\mu$ L ずつ加え, 攪拌後 37°C で保温した。各試験管内の血漿の凝固の有無を継時的に観察し, 凝固を阻止した血清型をコアグララーゼ型とした。

## 3. Multiplex PCR 法を用いた SE/SEIs 遺伝子の型別と可動性遺伝因子のタイプの推測

供試 *S. aureus* 203 株の保有 SE/SEIs 遺伝子型は Omoe ら [54] 及び Hu ら [33] が報告した Multiplex PCR 法を一部改変して決定された。すなわち, カジトン半流動培地に保存されている菌株を, MSEY

寒天培地を用いて 2 回継代した。滅菌爪楊枝を用いて単一コロニーを釣菌し, 5  $\mu\text{L}$  の Lyse-N-Go PCR Reagent (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) に懸濁し, 下記の処理条件で Genomic DNA を溶出させた。

①	65°C	30 秒
②	8°C	30 秒
③	65°C	1 分 30 秒
④	97°C	3 分
⑤	8°C	1 分
⑥	65°C	3 分
⑦	97°C	1 分
⑧	65°C	1 分
⑨	80°C	保温

処理終了後, 45  $\mu\text{L}$  の Multiplex PCR 反応溶液を直接チューブに加え, PCR 反応を行った。使用したプライマーセットを表 1 に示す。Multiplex PCR には QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を使用した。Multiplex PCR 反応溶液及び反応条件は以下の通りである。

#### Multiplex PCR 反応液組成 (45 $\mu\text{L}$ スケール)

①	2 $\times$ Multiplex PCR Master Mix	25 $\mu\text{L}$
②	Primer set (set1, set2, set3 もしくは set4)	5 $\mu\text{L}$
③	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	15 $\mu\text{L}$

## 反応条件

①	95°C	15 分	}	35 サイクル
②	94°C	30 秒		
③	57°C	1 分 30 秒		
④	72°C	1 分 30 秒		
⑤	72°C	10 分		

反応物を，4% アガロースゲル（Agarose S；ニッポンジーン，東京，日本）で電気泳動した。0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  臭化エチジウム（Ethidium bromide；EtBr）溶液（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA）にアガロースゲルを浸漬し DNA を染色した。ゲル撮影装置 AE-6933FXES（ATTO，東京，日本）を用いて紫外線照射し，バンドを検出した。

各 SE/SEIs 遺伝子が存在する可動性遺伝因子のタイプに関する報告 [2] に基づき，本実験で得られた SE/SEIs 遺伝子型の結果から，供試 *S. aureus* 株が持つ SE/SEIs 遺伝子が存在する可動性遺伝因子のタイプを推測した。

## 4. 黄色ブドウ球菌 Genomic DNA の精製

菌株の Genomic DNA の精製を QIAamp DNA Mini kit（QIAGEN）を用い，添付の説明書を一部改変して行った。すなわち，5 mL の BHI broth に単一のコロニーを接種し，37°C で一晩振盪培養した。培養液を 3,000 rpm，10 分遠心分離し上清を取り除いた。回収した菌体を，lysostaphin（和光純薬）を終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加した



Tris-EDTA-Triton X-100 (TET) バッファーで懸濁し、37°Cで1時間加温し細胞壁を破壊した。細胞壁破壊菌液に25 µLのproteinase Kと200 µLのBuffer ALを加えよく懸濁し、56°Cで1時間加温した。次に200 µLの99.5%エタノール(和光純薬)を加えよく懸濁し、混合液をDNeasy Mini Spin Columnに移した。8,000 rpmでDNeasy Mini Spin Columnを1分間遠心分離し、濾過液を捨てた。500 µLのBuffer AW1を加え、8,000 rpmで1分間の遠心分離を行い、濾過液を捨て、続いて500 µLのBuffer AW2を加え、13,000 rpmで3分間の遠心分離をし、DNeasy Mini Spin Columnを洗浄した。濾過液を捨て、さらに13,000 rpmで1分間遠心分離し、Buffer AW2を完全に取り除いた。DNeasy Mini Spin Columnを1.5 mLチューブに移し、200 µLのBuffer AEを加えて1分間の静置後、8,000 rpmで1分間遠心分離し、精製genomic DNA溶液を得た。精製したgenomic DNAは、NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific)を用いてDNA濃度を測定した。また、A260/A280が1.8以上であることを確認し、解析に用いるまで4°Cで保存した。なお、使用したTETバッファーと1 M Tris-HCl (pH 8.0)の組成は以下の通りである。

TET バッファー組成 (20 mL スケール)

- |   |                                    |         |
|---|------------------------------------|---------|
| ① | 1 M Tris-HCl (pH 8.0) (下記調製)       | 0.4 mL  |
| ② | 0.5 M EDTA (pH 8.0) (同仁化学, 熊本, 日本) | 0.08 mL |
| ③ | 10% Triton X-100 (和光純薬)            | 2.4 mL  |

pH8.0に調整後、オートクレーブ済みMilliQ水で20 mLにメスアップした。

#### 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 組成 (500 mL スケール)

- |   |                          |         |
|---|--------------------------|---------|
| ① | トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬) | 60.55 g |
| ② | 6 N HCl (和光純薬)           | 50 mL   |
| ③ | MilliQ 水                 | 適量      |

pH8.0 に調整後, MilliQ 水で 500 mL にメスアップし, オートクレーブした。

#### 5. Multi locus sequence typing

ブドウ球菌食中毒 83 事例の代表 1 株について, Enright ら [21] が報告した方法に従い MLST 解析を行った。解析対象となる 7 つの遺伝子座, プライマー配列及び PCR 反応条件は, MLST データベース (<http://saureus.mlst.net/>) に公開されているものに従った。各プライマーの配列は表 1 の通りである。PCR は前項 (第一章 材料及び方法 4.) で精製した genomic DNA を鋳型にして, *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を使用し行った。反応溶液及び反応条件は以下の通りである。

#### PCR 反応液組成 (50 $\mu$ L スケール)

- |   |                                                    |              |
|---|----------------------------------------------------|--------------|
| ① | 10 $\times$ <i>Ex Taq</i> Buffer                   | 5 $\mu$ L    |
| ② | dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)                         | 4 $\mu$ L    |
| ③ | Forward primer (20 $\mu$ M)                        | 0.5 $\mu$ L  |
| ④ | Reverse primer (20 $\mu$ M)                        | 0.5 $\mu$ L  |
| ⑤ | <i>Ex Taq</i> Hot Start Version (5 units/ $\mu$ L) | 0.25 $\mu$ L |
| ⑥ | Template genomic DNA (< 1 $\mu$ g)                 | 1 $\mu$ L    |

⑦ Nuclease-free H<sub>2</sub>O (Thermo Fisher Scientific) 38.75 μL

反応条件

①	95°C	10 分	}	30 サイクル
②	95°C	30 秒		
③	55°C	1 分		
④	72°C	30 秒		
⑤	72°C	10 分		

反応終了後、MonoFas DNA Purification Kit (GL サイエンス, 東京, 日本) を用いて PCR 増幅産物の精製を行った。方法はキットに添付の説明書に従った。すなわち, 500 μL の Buffer A を加えた MonoFas I spin column に PCR 反応液 50 μL を加え 9,000 rpm で 1 分間遠心分離し, 濾過液を捨てた。500 μL の Buffer B を加え, 9,000 rpm で 1 分間遠心分離し, MonoFas I spin column を洗浄した。濾過液を捨て, さらに 9,000 rpm で 1 分間の遠心分離を行い Buffer B を完全に取除いた。MonoFas I spin column を 1.5 mL チューブに移し, 20 μL の Buffer C を加えて 1 分間の静置後, 9000 rpm で 1 分間の遠心分離によって精製 PCR 増幅産物を得た。

上記の精製 PCR 増幅産物を鋳型にして, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。なお, PCR 反応を行った Forward primer 及び Reverse primer をそれぞれシーケンス用プライマーとして使用した。反応溶液及び反応条件は以下の通りである。

シーケンス反応液組成 (10  $\mu$ L スケール)

①	5 $\times$ Sequencing Buffer	2 $\mu$ L
②	Template DNA (150-300 ng)	1 $\mu$ L
③	Forward もしくは Reverse primer	1 $\mu$ L
④	Terminator ready reaction mix	1 $\mu$ L
⑤	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	5 $\mu$ L

反応条件

①	96 $^{\circ}$ C	1 分	} 25 サイクル
②	96 $^{\circ}$ C	10 秒	
③	50 $^{\circ}$ C	5 秒	
④	60 $^{\circ}$ C	4 分	

反応液に 10  $\mu$ L の Nuclease-free H<sub>2</sub>O (Thermo Fisher Scientific) を加え, BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち, 20  $\mu$ L のサイクルシーケンス反応液を, 96 Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) のウェルに移し, 90  $\mu$ L の SAM Solution と 20  $\mu$ L の XTerminator Solution をそれぞれのウェルに添加した。PCR Foil Seal (日本ジェネティクス, 東京, 日本) で 96 Well Reaction Plate を密封し, 30 分間攪拌した後 1,000 rpm で 2 分間の遠心分離を行い, XTerminator Solution を沈澱させ, 上清をキャピラリー電気泳動に用いた。

塩基配列の決定には, ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用し, 以下の条件でキャピラリー電

気泳動を行った。

- ① キャピラリー ; 50 cm×50 μm
- ② ポリマー ; POP-7 (Thermo Fisher Scientific)
- ③ 泳動用バッファー ; 10×Capillary Electrophoresis Running Buffer (Sigma-Aldrich)
- ④ Dye Set ; Z
- ⑤ Instrument Protocol ; BDx\_FastSeq50\_POP7\_BDv3
- ⑥ Analysis Protocol ; 3130KB\_POP7\_v3

得られた塩基配列を MEGA5 software [70] を用いて整列させ、解析対象となる 7 つの遺伝子座の配列を決定した。決定した配列を上記の MLST データベースに照合し、各遺伝子座の allele number 及びその組み合わせから導かれる Sequence type (ST) を得た。Clonal complex (CC) 解析はそれぞれの ST の Single locus variant (slv) と Double locus variant を同一の CC 型と定義し、前述の MLST データベース上に公開されている eBURST software を用いて行った。

## 6. SaPI scanning

ブドウ球菌食中毒 83 事例の代表各 1 株(計 83 株)について、Sato'ora が報告した SaPI scanning 法 [64] を実施し、ゲノム上の SaPI の挿入の有無を網羅的に解析した。Long and accurate (LA) -PCR による解析は、前項(第一章 材料及び方法 4.) で精製した genomic DNA を鋳型にして、*TaKaRa LA Taq* Hot Start Version (タカラバイオ) を

使用し行った。LA-PCR のプライマーは Sato'o らが用いた配列 [64] を使用した。各プライマーの配列は表 1 の通りである。LA-PCR 反応溶液及び反応条件は以下の通りである。

#### LA-PCR 反応液組成 (50 $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu$ L
②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	8 $\mu$ L
③	Forward primer (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
④	Reverse primer (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
⑤	LA Taq Hot Start Version (5 units/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
⑥	Template genomic DNA (< 1 $\mu$ g)	1 $\mu$ L
⑦	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	34.5 $\mu$ L

#### LA-PCR 反応条件

①	96 $^{\circ}$ C	1 分	} 33 サイクル
②	98 $^{\circ}$ C	10 秒	
③	68 $^{\circ}$ C	20 分	
④	68 $^{\circ}$ C	10 分	

10 kb 以上の増幅産物を, MonoFas DNA Purification Kit を用いて精製した。方法は前項 (第一章 材料及び方法 5.) に従った。得られた精製済み LA-PCR 増幅産物について, *Hind*III (タカラバイオ) を用いた制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism : RFLP) 解析を行った。すなわち, 以下の反応液を調製後, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置し LA-PCR 増幅産物を切断した。

反応液組成 (20  $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ M Buffer	2 $\mu$ L
②	精製済み LA-PCR 増幅産物 (< 1 $\mu$ g)	3 $\mu$ L
③	<i>Hind</i> III (5 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
④	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	14 $\mu$ L

反応液に反応液量の 1/10 量以上の 10 $\times$ Loading Buffer (タカラバイオ) を添加し、制限酵素反応を止めた。切断された DNA 鎖を 0.7% SeaKem GTG Agarose gels (Lonza, Rockland, ME, USA) を用いて電気泳動した。0.5  $\mu$ g/mL EtBr 溶液にアガロースゲルを浸漬し DNA 染色し、ゲル撮影装置 AE-6933FXES (ATTO) を用いて、RFLP パターンを確認した。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されている既知 SaPI の *Hind*III 予測切断パターンの *in silico* 解析を Genetyx software program, ver. 8 (GENETYX Corp., 東京, 日本) を用いて行った。得られた RFLP 切断パターンと既知 SaPI の予測切断パターンを比較し SaPI を同定した。

## 7. 分子系統解析

前項 (第一章 実験材料及び実験方法 5.) MLST 解析で得られた各遺伝子座の配列を繋ぎ合わせたもの (結合配列) を用い分子系統解析を行った。供試事例代表株合計 83 株の結合配列についてマルチプルアライメントを行い、近隣結合法 [61] により系統樹を作製し

た。また、この際の塩基置換モデルとして Kimura の 2 変数法 [36] を使用した。得られた系統樹について、1,000 回ランダム抽出によるブートストラップ検定を行い、樹形の信頼性評価を行った。系統樹の作製及び信頼性評価は MEGA5 software [70] を用いて行った。

## 8. Sandwich ELISA を用いた SEA タンパク質の定量

CC81 に属する *sea* 遺伝子陽性 *S. aureus* 株 10 株について、Sandwich ELISA による SEA タンパク質発現量を測定した。本定量は Omoe ら [52] の方法を一部改変して行った。すなわち、カジトン半流動培地に保存されている菌株を、MSEY 寒天培地を用いて 2 回継代した後、5 mL の 1% (w/v) Yeast Extract (Becton Dickinson) を添加した BHI broth に 1 コロニー接種し、37°C で一晩振盪培養し seed culture 液とした。続いて、seed culture 液 0.6 mL を 60 mL の 1% (w/v) Yeast Extract 添加 BHI broth に接種し、37°C で 48 時間振盪培養した。培養液を 10,000 rpm, 20 分間遠心分離し、その上清を 0.22  $\mu$ m のフィルター (MILLEX GP ; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) で濾過し、濾過液を解析に用いるまで -20°C で保存した。

上記で調製し凍結保存した *S. aureus* 培養上清サンプル液を融解後、10,000 rpm, 20 分間遠心分離し上清を回収し測定サンプルとした。黄色ブドウ球菌が産生するプロテイン A を上清サンプル液中から除去するために、ImmunoPure Normal Rabbit Serum (Thermo Fisher Scientific) を測定サンプルと等量加え、4°C で一晩静置した。その後、5 倍量の Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡, 大阪, 日本) を加え 10 倍希釈測定サンプル液とし、Can Get



Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 を用いて適宜 10 倍から 100,000 倍までの希釈測定サンプル液を作製した。また，岩手大学の重茂克彦教授より分与された 100 ng/mL の 0.1% (w/v) Bovine serum albumin(BSA)添加リコンビナント SEA タンパク質を，Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 を用いて階段希釈し，標準曲線の作製に用いた。

Nunc ルミノクプレート (Thermo Fisher Scientific) に Capture 抗体及び Rabbit IgG Isotype Control, Purified (UNLB) IgG (コスモバイオ，東京，日本) を 100  $\mu$ L/well 加え，4°Cで一晩静置し，Capture 抗体及び正常ウサギ IgG を固相化した。Capture 抗体には，岩手大学の重茂克彦教授より分与された SEA に対するウサギ抗体を，1  $\mu$ g/mL に希釈して使用した。固相化後，Capture 抗体を捨て 200  $\mu$ L/well の 1×Phosphate buffered saline (-) [1×PBS (-)] でウェルを 3 回洗浄した。次に，300  $\mu$ L/well の StartingBlock (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え 3 分間静置し，ブロッキングを行った。StartingBlock (PBS) Blocking Buffer を捨て，200  $\mu$ L/well の 1×PBS (-) でウェルを 3 回洗浄後，測定サンプル液及び標準曲線作製用リコンビナント SEA 希釈液を 100  $\mu$ L/well 加え，37°Cで 1 時間静置した。サンプル液を捨て，Atlantis マイクロプレートウォッシャー (Biochrom, Cambridge, UK) を用いて，Tween 20 (和光純薬) を 0.05% (w/v) になるように添加した 1×PBS (1×PBST) でウェルを 8 回洗浄した。洗浄後，Detection 抗体を 100  $\mu$ L/well 加え，37°Cで 1 時間静置した。Detection 抗体には，岩手大学の重茂克彦教授より分与された Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 SEA ウサギ抗体を，Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (東洋紡)

を用いて、20,000 倍に希釈して使用した。反応後、Detection 抗体を捨て、1×PBST でウェルを 8 回洗浄した。洗浄後、基質溶液 (SuperSignal ELISA FemtoMaxmum Sensitivity Substrate ; Thermo Fisher Scientific) を 100  $\mu$ L/well 加え、SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で発光測定を行った。プロテイン A の影響の有無は、Rabbit IgG Isotype Control, Purified (UNLB) IgG を固相化したウェルで同一のサンプルを測定し、非特異反応がブランクと同等になることにより確認した。ブランクには 1% (w/v) yeast extract を添加した BHI broth (100  $\mu$ L/well) を使用した。使用した 1×PBS (－) の組成は以下の通りである。

1×PBS (－) 組成 (1 L スケール)

① NaCl (和光純薬)	8 g
② KCl (和光純薬)	0.2 g
③ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O (和光純薬)	2.9 g
④ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (和光純薬)	0.2 g

pH7.4 に調整後、オートクレーブ済み MilliQ 水で 1 L にメスアップし、オートクレーブした。

## 結果

### 1. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株の MLST 解析

MLST 解析の結果、ブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 合計 83 株は 17 種類の ST (ST1, ST5, ST6, ST8, ST12, ST20, ST30, ST45,

ST59, ST81, ST96, ST121, ST398, ST508, ST2272, ST45slv 及び ST81slv) に型別された。またこれらの ST 型について, eBURST を用いた CC 解析に供すると, 8 種類の主要な CC に分類された(図 4)。このうち CC81 (ST1, ST81 及び ST81slv を含む) に属する *S. aureus* 株 (以後 CC81 株と表記する) が最も多く, 全体の 25.3% を占め, 次いで CC8 (ST8) 株, CC6 (ST6) 株, CC5 (ST5) 株, CC508 (ST45, ST508 及び ST45slv) 株, CC20 株 (ST20), CC30 (ST30) 株, CC59 (ST59) 株の順であった。また供試 *S. aureus* 株の 8.4% が, 上記 8 種類の CC に属さない ST 型 (ST12, ST96, ST121, ST398 及び ST2272) であった。

## 2. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株のコアグララーゼ型と Clonal complex との関係性

上記 8 種類の CC に属する *S. aureus* 株は, 5 種類のコアグララーゼ型に分類された(表 2)。これらのうちコアグララーゼ VII 型 (CoaT VII) に属する *S. aureus* 株が最も多く全体の 38.5% を占めていた。表 2 に示すように, CC81 株は CoaT VII を示した。同様の関係性が他の 7 種類の CC 型とコアグララーゼ型にも認められ, 特定の CC 株はそれぞれ特定のコアグララーゼ型を保有するという関係性が存在した。列挙すると CC8-CoaT III, CC6-CoaT IV, CC5-CoaT II, CC508-CoaT VII, CC20-CoaT VIII, CC30-CoaT IV 及び CC59-CoaT VII であった。

## 3. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株の SE/SEIs 遺伝子型と Clonal complex との関係性

*sea* 遺伝子陽性株は，CC508 と CC20 を除く 6 種類の CC に属する *S. aureus* 株で認められた。特に，分離比率が高い CC 株で *sea* 遺伝子の高い保有率を認めた。すなわち，CC81 株の 76%，CC8 株の 100%，CC6 株の 100%が *sea* 遺伝子を保有していた（図 5）。特定の CC 株は，それぞれ特定の SE/SEIs 遺伝子を保有するという関係性が存在した。そして，それら SE/SEIs が存在すると推測される可動性遺伝因子の保有に関しても，それぞれの CC 株が必ず保有する可動性遺伝因子とその中の一部の CC 株が保有する可動性遺伝因子が存在した（表 3）。例えば，全ての CC8 株はプロファージ上に存在する SE 遺伝子である *sea* 遺伝子を保有していた。また，一部の CC8 株がプラスミド上に存在する SE 遺伝子である *sed*，*selj* 及び *ser* 遺伝子を保有していた。一方で，全ての CC8 株は，SaPI 上に存在する SE 遺伝子である *seb*，*sec*，*sel*，*sek* 及び *seq* 遺伝子や，the highly variable genomic region vSaβ 上に存在する SE 遺伝子である *seg*，*sei*，*sem*，*sen* 及び *seo* 遺伝子を保有していなかった。同様の関係性が他の 7 種類の CC に属する *S. aureus* 株においても認められた（表 3）。

#### 4. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株が保有する SaPI の同定と Clonal complex との関係性

各ブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株の 6 か所の SaPI 挿入可能領域を解析した。いずれの株にも 49' 領域には 10 kb 以上の増幅産物は認められなかった（表 4）。その他 5 領域には，解析した何れかの株において 10 kb 以上の増幅産物が認められ，SaPI を含む Genomic

island (GI) が存在した。

CC8 及び CC5 を除く 6 種類の CC に属する *S. aureus* 株には、それぞれ特定の領域に各 CC 内で共通した GI が存在した。例えば、全 CC81 株の 9' 領域には、10 kb 以上の増幅産物が認められ、それらは同一の RFLP パターンを示した。同様に、CC6 株の 9' 領域、CC508 株の 9' 領域、CC20 株の 9' 領域、CC30 株の 8' 領域と 44' 領域、CC59 株の 9' 領域と 19' 領域に存在する GI は、それぞれ同一の RFLP パターンを示した (図 6 の “Common insertion”)。これら RFLP パターンと既報の SaPI 配列 [51, 64] データを比較し、各領域の挿入配列を同定した。CC59 株の 19' 領域の RFLP パターンは SaPI3 のそれと一致した。CC30 株の 8' 領域と 44' 領域の RFLP パターンはそれぞれ SaPI4 及び SaPI2 のそれらと一致した。また、CC81 株及び CC6 株の 9' 領域の RFLP パターンは、MW2 株が 9' 領域に持つ未解明の GI のそれと一致した (MW2-like RFLP) [64] (表 4 及び図 6 の “Common insertion”)。

一方、各 CC に属する一部の *S. aureus* 株には、その CC 特有の RFLP パターンを持つ GI の挿入を認めた。すなわち、CC81 株の 19% は、その 18' 領域に SaPIishikawa11 を保有し、24% の CC81 株が 19' 領域に SaPIhnm2 を、14% が 44' 領域に SaPIno10 をそれぞれ保有していた。また、CC20 株の 50% は、44' 領域に SaPIhirosaki4 を、CC508 株の 29% は、18' 領域に SaPI68111 をそれぞれ保有していた。その他の挿入配列が存在した増幅産物の RFLP パターンは既知の SaPIs の RFLP パターンとは一致しなかった (表 4 及び図 6 の “Frequent insertion”)。

MLST 解析における配列を基に、各ブドウ球菌食中毒由来 *S.*

*aureus* 株の分子系統樹を作成した結果、各 CC 型に対応する分子系統が存在した (図 7A)。また、供試 *S. aureus* 株の分子系統と SaPI の保有状況との関係性を検討した結果、それぞれの系統すなわち CC で SaPI の保有分布が異なるという関係性が明らかになった。例えば、CC81 株は MW2-like RFLP の他に、SaPIishikawa11, SaPIhhm2, SaPIino10 を保有していた。これら 3 種の SaPI は、分子系統的に近い他の CC 株においてもその分布が認められない、CC81 株に特有のものであった。同様に、SaPI2, SaPI3, SaPI4, SaPI68111 及び SaPIhirosaki4 も特定の一つの CC 株にのみ、その分布が認められた (図 7B 及び 7C)。

#### 5. CC81 に属する *sea* 遺伝子陽性黄色ブドウ球菌株の SEA 産生量

CC81 に属する *sea* 遺伝子陽性 *S. aureus* 株について、培養液中の SEA 産生量を測定した。SEA 産生量はそれぞれの株で異なっていたが、全ての株で 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の SEA の産生が認められ、10 株中 7 株が 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の SEA の産生を認めた (図 8)。

### 考察

SEs を産生する *S. aureus* 株を原因とするブドウ球菌食中毒は、世界中で発生する最も主要な食品媒介性疾患の一つである。ブドウ球菌食中毒由来株の疫学解析は、発生した地域ごとに別々の手法を用いてなされてきた [17, 68, 69, 79, 81]。本章では、東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株について、分子生物学的手法

を含めた 4 種類の疫学解析を実施した。さらに、事例株の遺伝学的特性を検討した。

MLST 法を用いた分子疫学的解析の結果、東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株は 8 種類の CC に分類された (図 4)。食中毒に関与する *S. aureus* 株の MLST 解析はドイツ、スイス、韓国、中国等、一部の国で実施されているのみで、その報告数は少ない [17, 79, 81]。東京都における分離比率が高い CC 株である CC81, CC8 及び CC6 等は、これらの国の食中毒事例においても、全てではないが優先的に分離されることが報告されている。一方、日本国内において、食中毒以外の疾病やヒトの常在菌として分離される *S. aureus* 株の CC は、今回の結果とは明らかに異なる。例えば、乳房炎を罹患したウシの乳由来の *S. aureus* 株は、主に CC97 と CC705 であり [27]、また、健常人の鼻腔からは、主に CC508, CC15 及び CC188 に分類される CC を持つ *S. aureus* が分離されると報告されている [65]。以上の結果から、CC81, CC8, CC6 などの特定の CC を持つ *S. aureus* は、食中毒事例から分離されやすい株であることが示唆された。

コアグラマーゼ型別の結果から、CoaT VII がブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株において最も多く分離された (表 2)。この事実は、過去に日本で行われた報告と一致していた [68]。また、*S. aureus* 株における CC と CoaT には密接な関係性が存在することが以前より報告されており [27]、本研究においても特定の CC 株が例外なく単一の CoaT を持つことが明らかになった (表 2)。これら 2 つの型別法を組み合わせることで、ブドウ球菌食中毒を引き起こす *S. aureus* の疫学的特性に関する有益な情報を得ることができると考えられる。



SE/SEIs 遺伝子型別の結果から、各 CC 株において必ず保有する SE/SEIs 遺伝子とその一部の株が保有する SE/SEIs 遺伝子の特異的な組み合わせが存在することが明らかとなった。また、各 CC 株において、必ず保有される可動性遺伝因子がある他に、部分的な株群にのみ保有が認められる可動性遺伝因子があり、CC と可動性遺伝因子間に一定の関係性があることが推測された（表 3）。これらのことは、ブドウ球菌ゲノム上に存在する SE/SEIs 遺伝子と可動性遺伝因子のタイプ間に特異的な組み合わせが存在することを示している。SEs は食中毒起因毒素であることから、食中毒を誘発する *S. aureus* は特定のゲノム構造を持つことを示唆している。

MLST に基づく分子系統樹解析を行った結果、供試 *S. aureus* 株には各 CC 型に対応する分子系統が存在した（図 7A）。これらの分子系統と SaPI 保有分布を解析した結果、CC5 及び CC8 を除く 6 種類の CC 株には、この両者の間に特徴的な関係性が存在することが明らかとなった。すなわち、各 SaPI は分子系統的に単一の CC 株においてのみ、その分布（保有）が認められ、分子系統的に近い他の CC 株でさえその分布（保有）が認められなかった。例えば、SaPIishikawa11, SaPIhbm2, SaPIno10 は CC81 株にのみ認められ、他の CC 株は保有していなかった（図 7B）。

一方で、多くの CC5 株及び CC8 株は、どの挿入可能領域においても SaPI を含めた GI の挿入が認められなかったが、これらの CC 株においてのみ *sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子を保有する *S. aureus* 株が存在した（表 3）。*sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子は pIB485-like plasmid, pUO-Sa-SED1, pUO-Sa-SED2 などのプラスミド上に存在することが報告されており、これらのプラスミドを通じて伝播することが知ら



れている [2]。このことから、CC5 株及び CC8 株は、SE/SEIs をコードするプラスミドを保有しやすく、その他の 6 種類の CC 株はこのプラスミドを保有する可能性が低いことを示唆している。すなわち、それぞれの系統が受け入れやすい特定の可動性遺伝子のタイプが存在することが推測された。このような各系統における可動性遺伝子の受け入れやすさの違いは、各系統が保有する制限修飾系の違いによるものである可能性が考えられる。制限修飾系は、自身の DNA をメチル化などで修飾する修飾酵素と DNA の特定配列を認識切断するが修飾を受けた部位は切断しない制限酵素の組み合わせから成り、外部から侵入した DNA を選択的に切断分解する働きを持つ。すなわち、ファージ感染など外来性遺伝子の水平伝播から自身のゲノムを守る、細菌の生体防御機構である。Waldron と Lindsay [78] は、*S. aureus* の特定の系統が保有する制限修飾系により可動性遺伝子の水平伝播が制限されると報告している。また、McCarthy ら [47] は、*S. aureus* は各自異なった制限修飾系を獲得したために独立した進化を遂げた系統が発生し、それらの異なった系統が異なる頻度で、可動性遺伝子の一つであるプロファージを保有すると報告している。これらの報告は、今回の考察を支持するものと考えられる。

SEA はブドウ球菌食中毒事例から最も多く検出されることが知られている [2, 65, 68, 81]。本研究においても、供試 *S. aureus* 株において分離比率が高い CC 株である CC81 株、CC8 株及び CC6 株の多くは *sea* 遺伝子が陽性であった (図 5)。*sea* 遺伝子はプロファージ上に存在することが知られている [2, 67]。その産生量は、プロファージの genotype に関連し、高産生型のプロファージと低産生

型のプロファージの 2 種類に分類されている [12, 67]。 *sea* 遺伝子陽性株の中で最も分離頻度の高い系統である CC81 株の多くは、高産生型プロファージである  $\phi$ Sa3MW2 を持ち [14, 65]、培養液中で SEA 産生量が 6  $\mu$ g/mL 以上であると報告されている [65]。本研究における *sea* 遺伝子陽性 CC81 株の中にも、同一条件の培養液中で 6  $\mu$ g/mL 以上の SEA タンパク質を産生した株が 10 株中 7 株 (70%) 存在した (図 8)。これらの結果は高発現プロファージを持ちかつ *sea* 陽性株の多く存在する CC81 株, CC8 株, CC6 株がブドウ球菌食中毒を引き起こすことを示唆しており、ブドウ球菌食中毒の分子疫学解析において MLST 及び SE/SEIs 遺伝子分析が重要であることを裏付けている。

CC5 株, CC508 株, CC20 株の一部は、古典的 SEs を保有していなかったが、これらの CC 株は全て enterotoxin gene cluster (*egc*) 関連エンテロトキシン (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* 及び *seo*) 遺伝子を保有していた (図 5)。近年、*egc* 関連エンテロトキシンが古典的 SE と同様に哺乳類実験モデルで嘔吐活性を示すことが証明された [48, 56]。しかし、一般的に *egc* 関連エンテロトキシンは培養液内での発現量は非常に少ない [52, 67] ため、実際の食中毒へ関与しているかどうかを結論付けるのは難しい。一方で、SEs の産生量は様々な要因 (pH, 温度, 水分活性等) により影響を受け、その産生量が変わることが知られている [67]。これらの要因が、*egc* 関連エンテロトキシン発現に影響するかは解明されておらず、原因食品中における *egc* 関連エンテロトキシンの発現動態には未だ不明な点が多い。*egc* 関連エンテロトキシンの食中毒原性に関して、換言すれば *egc* 関連エンテロトキシンを持つ株が属する CC 株のブドウ球菌食中毒にお

ける重要性については今後の研究の展開が待たれる。

以上,本章では,東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株は MLST 法による分子疫学解析により 8 種類の CC に分類され, CC 型とコアグララーゼ型, SE/SEIs 遺伝子型, SE/SEIs 獲得に関連する可動性遺伝因子の保有状況には一定の法則が存在することが明らかとなった。このことは, *S. aureus* の中で, 特定の遺伝学的特性を持つ *S. aureus* 株が食中毒を引き起こしやすいという, 疾病特異的な *S. aureus* の集団が存在することを示唆するものである。

表 1. 本章で使用したオリゴヌクレオチド

目的	遺伝子名もしくは位置	オリゴ名	配列 (5'→3')	Primer set <sup>†</sup>
Multiplex PCR	<i>sea</i>	SEA3	CCTTTGGAACCGTTAAAAACG	set1
		SEA4	TCTGAAACCTTCCCATCAAAAAAC	set1
	<i>seb</i>	SEB5	AAGGACACTAAGTTAGGGAATTATGA	set1
		SEB6	CATCATGTCATACCAAAAAGCTATTCT	set1
	<i>sec</i>	SEC3	CTCAAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG	set1
		SEC4	TCAAAAATCGGATTAACATTATCC	set1
	<i>sed</i>	SED3	CTAGTTTGGTAATAATCTCCTTTAAAAACG	set1
		SED4	TTAATGCTATAATCTTATAGGGTAAACATC	set1
	<i>see</i>	SEE2	TAACTTACCGTGGACCCCTTC	set1
		SEE3	CAGTACCTATAGATAAAAGTTAAAAACAAGC	set1
	<i>seg</i>	SEG1	AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC	set2
		SEG2	AGAACCATCAAAACTCGTATAGC	set2
	<i>seh</i>	SEH1	GTCATATGGAGGTACAACACT	set2
		SEH2	GACCTTACTTATTTCGCTGTC	set2
	<i>sei</i>	SEI1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	set2
		SEI2	ATCCATATTCTTTGCCCTTACCAG	set2
	<i>selj</i>	SELJ1	ATAGCATCAGAACTGTTGTTCGG	set2
		SELJ2	CTTTCTGAATTTTACCACCAAAAGG	set2
	<i>sek</i>	SEK1	TAGGTGTCCTAATAATGCCA	set3
		SEK2	TAGATATTCGTTAGTAGCTG	set3
	<i>sel</i>	SEL1	TAAACGGCGATGTAGGTCCAGG	set4
		SEL2	CATCTAATTTCTTTGTGCGGTAAC	set4
	<i>sem</i>	SEM1	GGATAATTTCGACAGTAACAG	set3

	SEM2	TCCTGCATTAATAATCCAGAAC	set3
<i>sen</i>	sen forward	GCTTATGAGATTGTTCTACATAGCTGC	set4
	sen reverse	CAITTAACGGCTATAAAGCTTTCTCTTCATC	set4
<i>seo</i>	SEO1	TGTGTAAGAAAGTCAAGTGTAG	set3
	SEO2	TCTTTAGAAAATCGCTGATGA	set3
<i>sep</i>	SEP3	TGATTTATTAGTAGACCTTGG	set2
	SEP4	ATAACCAACCGAAATCACCCAG	set2
<i>seq</i>	SEQ1	AAITCTCTGGGTCAATGGTAAAG	set4
	SEQ2	TTGTAITCGTTTTGTAGGTAITTTTCG	set4
<i>ser</i>	SER1	GGATAAAAACGGTAATAAGCAG	set4
	SER4	GTATTCCAAAACACATCTAAC	set4
<i>ses</i>	SES-kanoS	TCGGAATATACTATGGGGCAAA	set1
	SES-kanoAS	GGTCTAACTCTTGAATTGTAGGTTT	set1
<i>set</i>	SET-kanoS	GGTTGGTGATATGTAGATGCTTG	set3
	SET-kanoAS	GTAGGCTTGTCTAAAAGGGCTATG	set3
<i>femA</i>	femA1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	set2 and set3
	femA2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	set2 and set3
<i>femB</i>	femB3	CACATGGTTACGAGCATCAT	set1 and set4
	femB4	TGTTTCGGGTGTTTACCTT	set1 and set4
<i>arcC</i>	arcC-Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	
	arcC-Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	aroE-Up	ATCGGAAATCCTATTTTCACATTC	
	aroE-Dn	GGTGTGTATTATAAACGATATC	
<i>glpF</i>	glpF-Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	
	glpF-Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	

MLST\*

<i>gmk</i>			ATCGTTTTATCGGGACCATC
	gmk-Up		
	gmk-Dn		TCATTAACACTACAACGTAATCGTA
<i>pta</i>			GTTAAAAATCGTATTACCTGAAAGG
	pta-Up		
	pta-Dn		GACCCTTTTGTGAAAAAGCTTAA
<i>tpi</i>			TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA
	tpi-Up		
	tpi-Dn		TTTGCACCTTCTAACAAATTGTAC
<i>yqiL</i>			CAGCATAACAGGACACACCTATTGGC
	yqiL-Up		
	yqiL-Dn		CGTTGAGGAATCGATACITGGAAC
8'site	SaPI4S		ATGGCAGGTGGACCAAGAAAGAAGCGGACGTCGTCCG
SaPI <sup>†</sup> scanning			
	SaPI4AS		CAITCTAGTAGACACCTCTGTCTGTTTTAACATAAG
9'site	SaPIbovS		GTTATGGGAGACTACCGTACGTAATGATCACACAG
	SaPIbovAS		GTTGCTATTTAATGGTGGCCTTTCAAAGCAATATTAG
18'site	SaPImw2S		CAICATGTTGGTGTGTTTTATCACTTTTTCATGATGC
	SaPImw2AS		GAAAAGAAAAAGAAAAAGCAAAAAAGATAAGATGACGACCCACAG
19'site	SaPI3externalS		GCTGTAGAAAAGTGCAGAAAAGATAATCCTTATGC
	SaPI3externalAS		GCGAAAATAGATTCAATCATTAACTTGAGGGGAG
44'site	SaPI2S		AAATTACCGCTACACTAAAGGACAAAATTTATC
	SaPI2AS		GGTATCGTTGATCCAACCTAAAGTAAACACCGCTCAGC
49'site	etdS		CGTTGTGAAAAGATAATGAATCGGTTTGGGCTG
	etdAS		CTAAAAGTGGCAGTAACAAAATGATTTTAGTTTC

\*MLST : Multi locus sequence typing

†SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

‡Primer set : 同じ Multiplex PCR 反応液に入れる Primer の組み合わせを示す。

表 2. 1994 年から 2012 年までに東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離株におけるコアグラマーゼ型と Clonal complex との関係性

CoaT*	Clonal complex	供試 83 株における割合 (%)
VII	CC†81, CC508, CC59	38.5
IV	CC6, CC30	19.3
III	CC8	18.1
II	CC5	10.8
VIII	CC20	4.8

\*CoaT: コアグラマーゼ型

†CC: Clonal complex

表 3. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離株の SE/SEI 遺伝子型と予測される Staphylococcal enterotoxin/Staphylococcal enterotoxin-like toxin をコードする可動性遺伝因子のタイプ

Clonal complex	各 CC*に属する全ての SE/SEI 遺伝子型	各 CC*に属する全ての <i>S. aureus</i> 株が保有する可動性遺伝因子†	各 CC に属する一部の <i>S. aureus</i> 株が保有する可動性遺伝因子*
81	<i>seh</i>	Transposon	<i>sea, seb, sek, seq</i> Prophage or SaPI
8	<i>sea</i>	Prophage	<i>sed, selj, ser</i> Plasmid
6	<i>sea</i>	Prophage	<i>seb, sec, sel</i> SaPI
5	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	vSa genomic island containing the enterotoxin gene cluster	<i>sea, sed, selj, ser</i> Prophage or Plasmid
508	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	vSa genomic island containing the enterotoxin gene cluster	<i>sec, sel, sek, seq</i> Prophage or SaPI
20	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	vSa genomic island containing the enterotoxin gene cluster	<i>seb</i> SaPI
30	<i>seg, sei, sen,</i>	vSa genomic island containing the enterotoxin gene cluster	<i>sea</i> Prophage
59	<i>seb, sek, seq</i>	SaPI	<i>sea</i> Prophage

\*CC: Clonal complex

†推測される可動性遺伝因子：推測方法は、本文（第一章（第一章 材料及び方法 3.）に記載した



表 4. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離株の各 Clonal complex における Genomic island の構成

Clonal complex	SaPI 挿入可能領域					
	8'	9'	18'	19'	44'	49'
81	-	<b>MW2-like RFLP</b> (100 %)	SaPIshikawa11 ( <i>seb</i> ; 19 %)	SaPIhlm2 (No SAG genes; 24 %)	SaPIno10 ( <i>seb</i> ; 14 %)	-
8	8'-Unknown GI* s type1 (20 %)	-	18'-Unknown GIs type1 (7 %)	-	-	-
6	8'-Unknown GIs type2 (8 %)	<b>MW2-like RFLP</b> (100 %)	18'-Unknown GIs type2 (17 %)	-	-	-
	8'-Unknown GIs type3 (8 %)		18'-Unknown GIs type3 (8 %)			
5	-	-	18'-Unknown GIs type1 (11 %)	-	-	-
508	-	<b>9'-Unknown GIs type1</b> (100 %)	SaPI68111 ( <i>sec, sel, tst-I*</i> ; 29 %)	-	-	-
			18'-Unknown GIs type4 (14 %)			

20	-	9'-Unknown GIs type2 (100 %)	-	SaPIhirosaki4 ( <i>seb</i> ; 50 %)	-
30	SaPI4 (No SAG <sup>†</sup> genes; 100 %)	-	-	SaPI2 ( <i>tst-I</i> ; 100 %)	-
59	-	9'-Unknown GIs type3 (100 %)	-	SaPI3 ( <i>seb, sek, seq</i> ; 100 %)	-

上段には各 GI の名称を，下段の括弧内にはその GI 上に存在する SAG 遺伝子の名称及び各 CC に属する *S. aureus* 株がその GI を保有する割合 (%) を示す。太字は各 CC に属する *S. aureus* 株が必ず保有する GI を示す。

\*GI : Genomic island

†SAG : Superantigen

‡*tst-I* : toxic shock syndrome toxin-1 gene

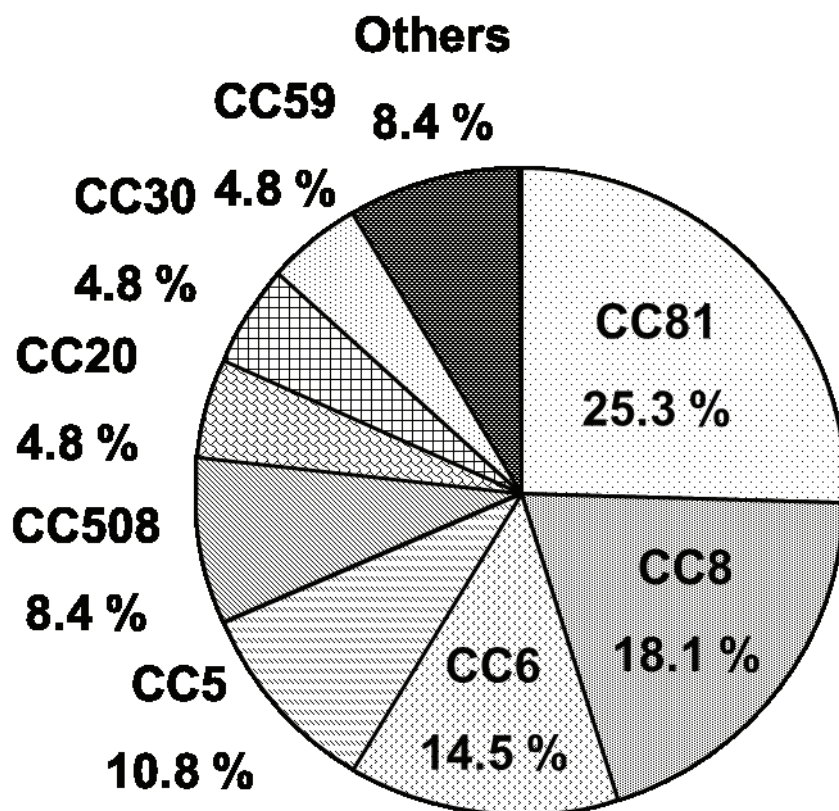


図 4. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 株における Clonal complex の割合  
 “Others”は、ST12, ST96, ST121, ST398及びST2272を含む。

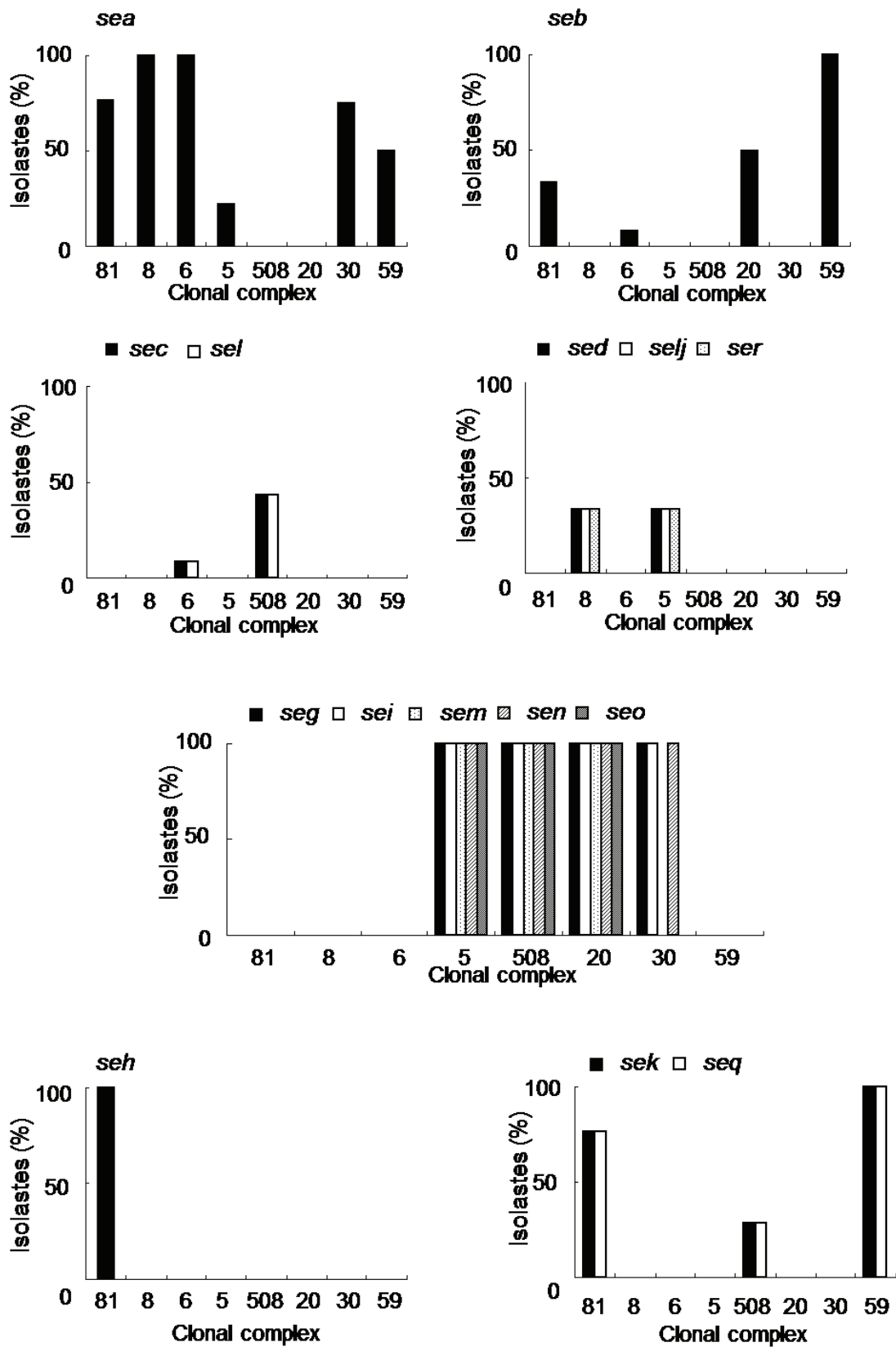


図 5.東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離株が保有するSE/SEI遺伝子型と Clonal complex との関係性

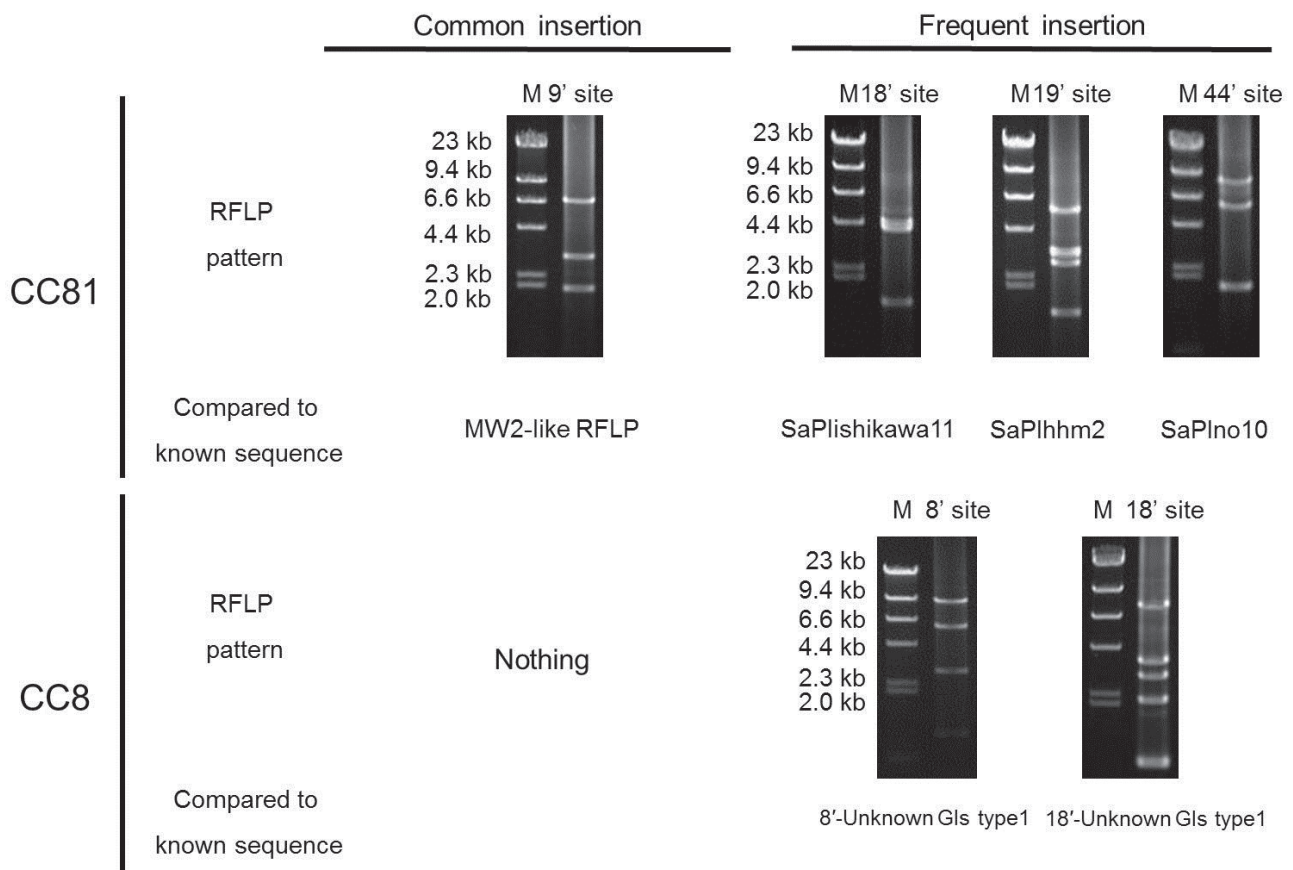


図 6. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離株が SaPI 挿入可能領域に保有する Genomic island の Restriction fragment length polymorphism (RFLP) パターンの比較

制限酵素は *Hind*III を使用した。Common insertion (写真左側) はそれぞれの CC に属する全ての *S. aureus* 株が共通して保有する GI の RFLP パターンを示し, Frequent insertion (写真右側) はそれぞれの CC に属する一部の *S. aureus* 株が付加的に保有する GI の RFLP パターンを示している。既知の GI の RFLP パターンと一致したものは, その写真の下部に名称を記載した。"Unknown GIs type" は, 既知の GI の RFLP パターンと異なることを示している。

M: DNA サイズマーカー

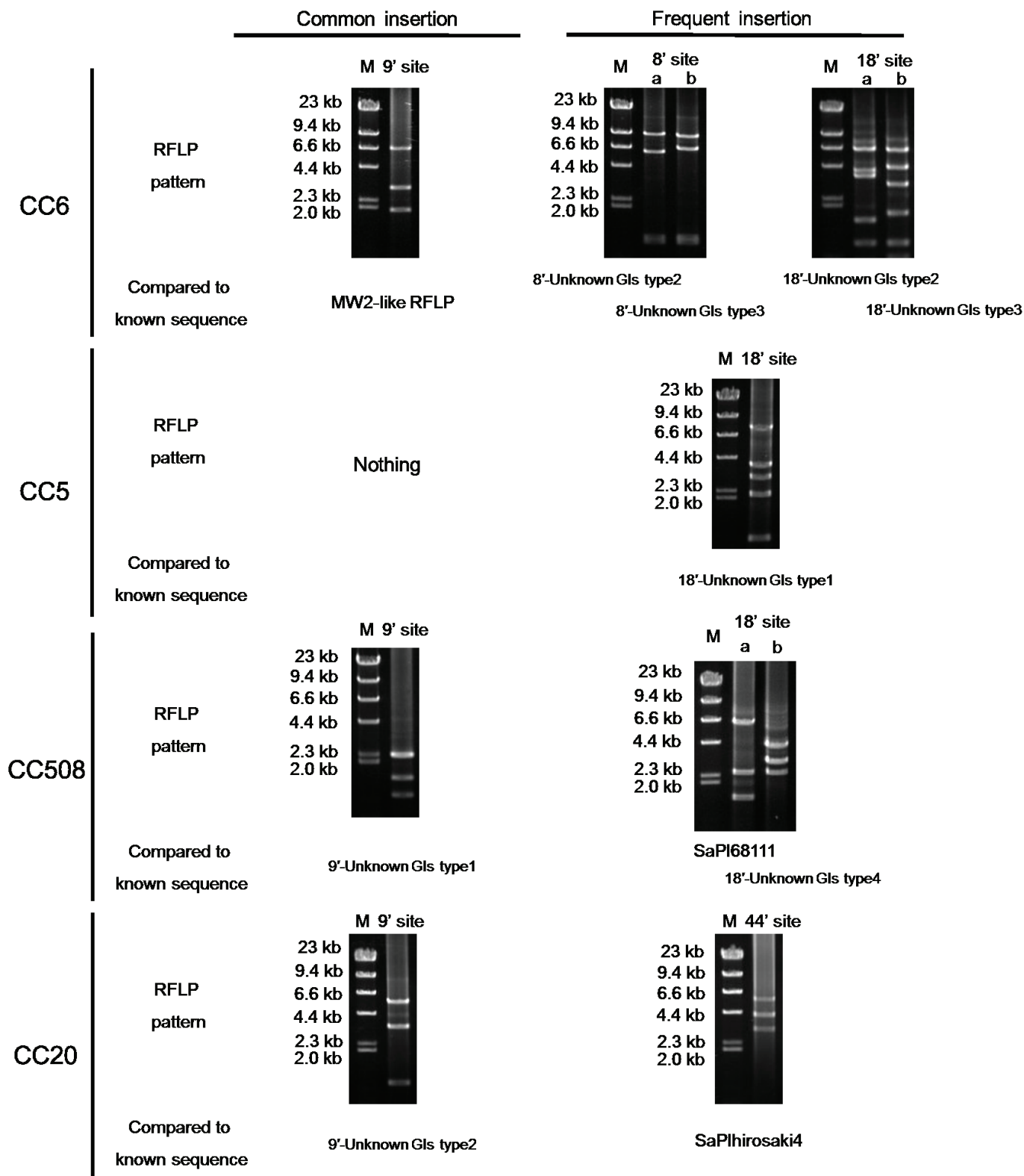


図 6. (続き)

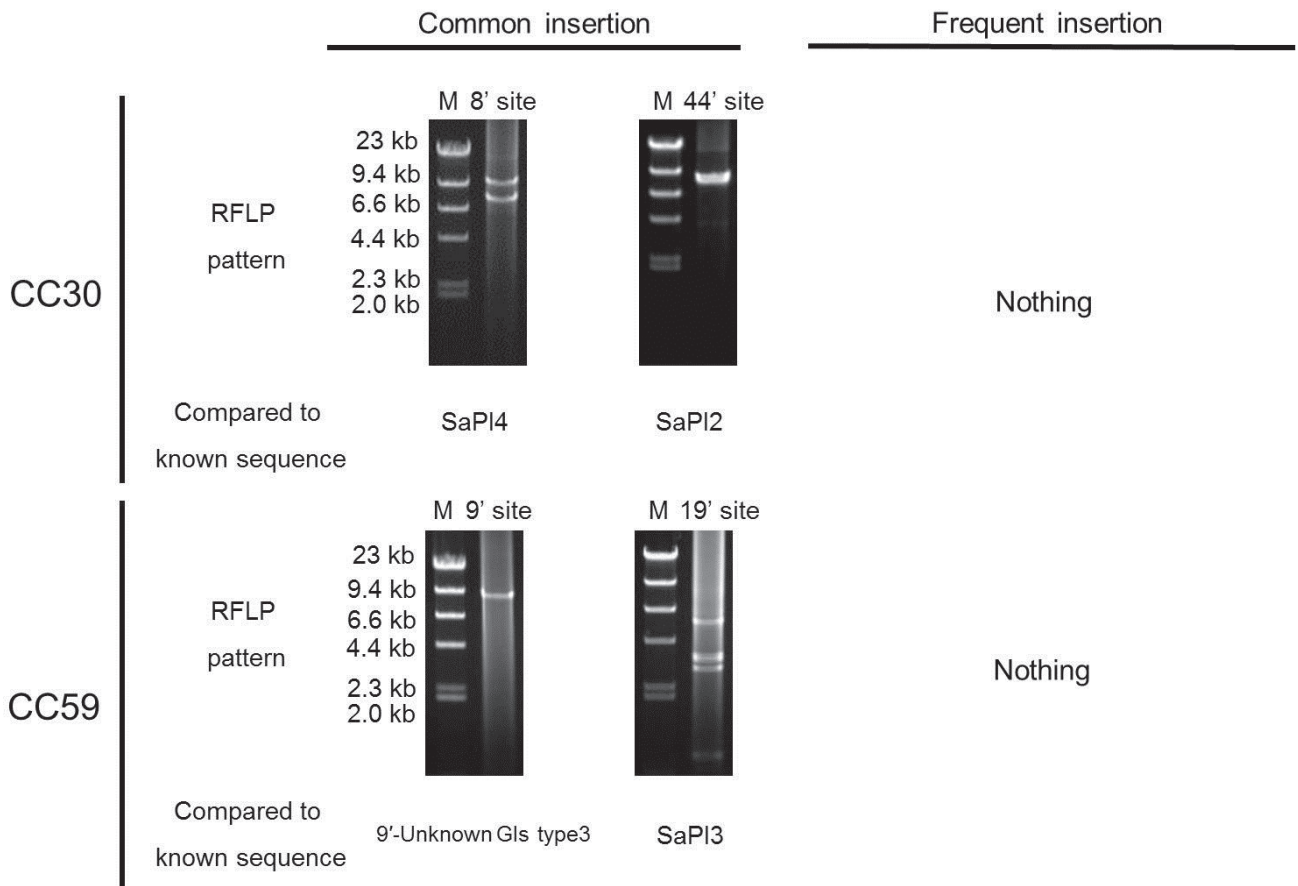


図 6. (続き)

A

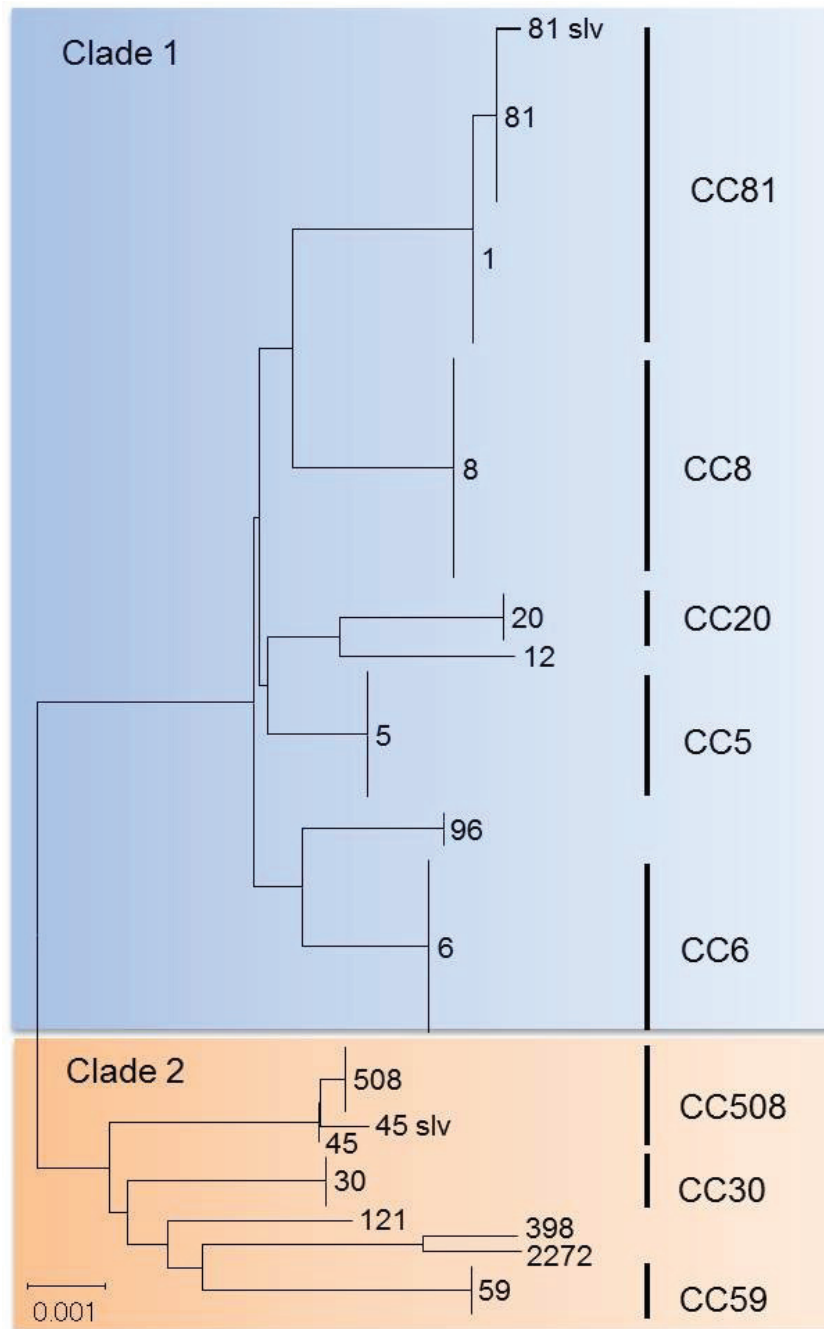


図 7. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来*S. aureus* 分離株におけるGenomic islandの分布様式と分子系統との関係性

(A) MLST法を基にした分子系統樹解析 系統樹の先端の数字は各*S. aureus*株のSTを示す。図中の”81slv”並びに”45slv”は、それぞれST81並びにST45のSingle locus variantであることを示す。主要な分子系統を系統樹の右側に縦線で記載し、対応するCC型を示す。



B

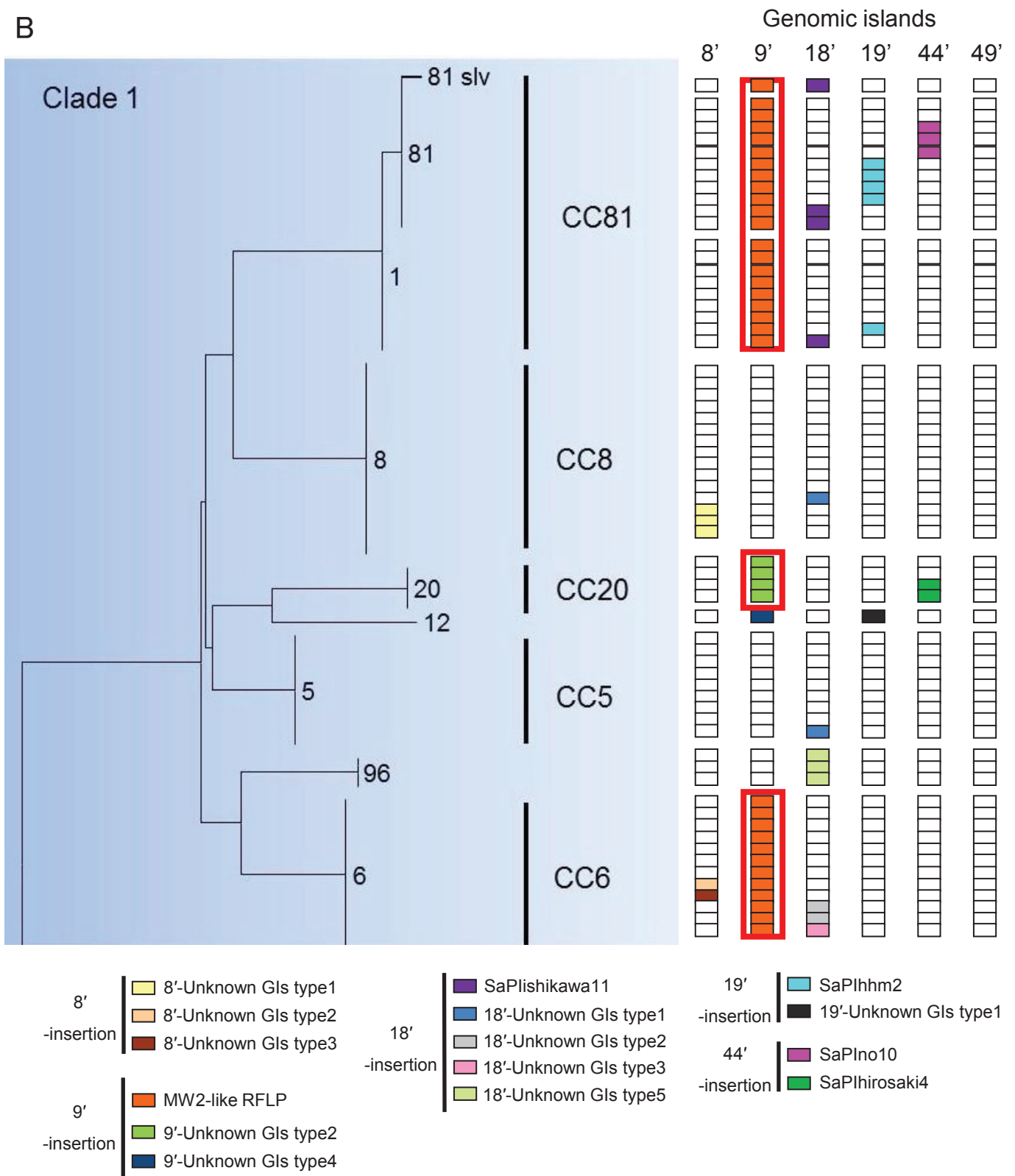


図 7. (続き)

(B, C) 各分子系統とGIの分布様式 系統樹の右側にGIの分布様式を記載した。色のついたBoxは、それぞれのGI (SaPIを含む) を示す。無色のBoxは、GIが存在していないことを示す。各CC内で共通して認められたGIを赤線で囲んだ。"B"は"A"で示した系統樹のClade1の部分, "C"は"A"で示した系統樹のClade2の部分を示す。

C

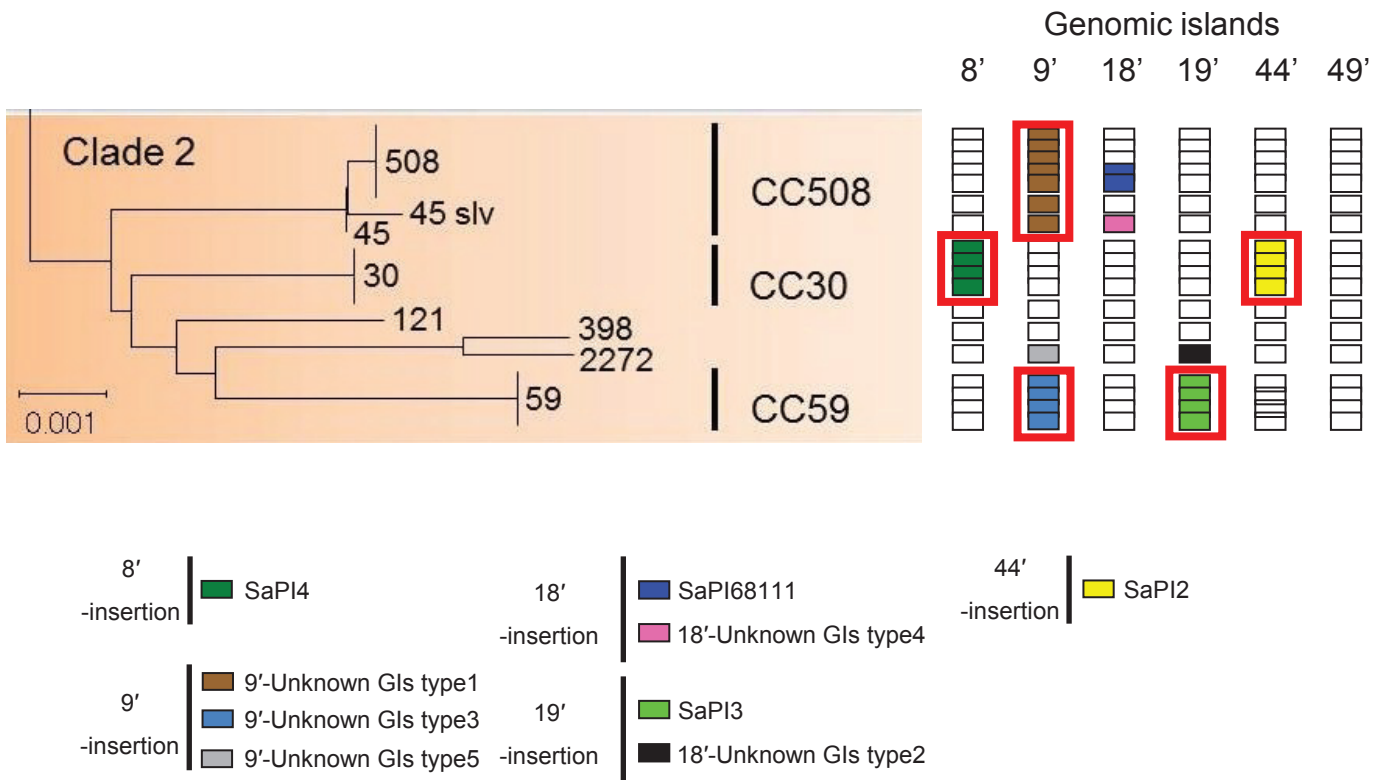


図 7. (続き)

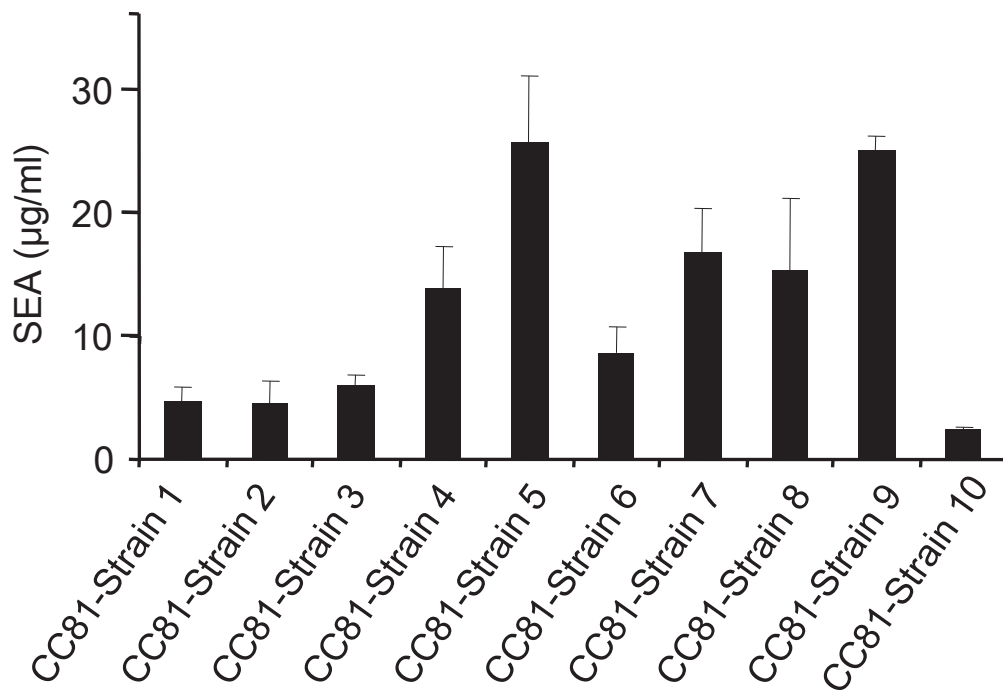


図 8. CC81に属する $sea$ 遺伝子陽性 $S. aureus$  分離株におけるStaphylococcal enterotoxin Aの産生量

実験は独立した3回の試行で実施した。各株の産生量は3回の平均値±標準偏差で示している。

## 第二章 ブドウ球菌エンテロトキシンを保有する新規 SaPI の同定 とその特性

### 序論

SEs 遺伝子など *S. aureus* の保有する毒素遺伝子の一部は、可動性遺伝因子上に存在することが知られており、それ自身の伝播や宿主ゲノムへの挿入を調節する遺伝子群の間に毒素遺伝子が存在する場合がある [44, 51, 64]。毒素遺伝子が存在する可動性遺伝因子の菌株間における水平伝播が、*S. aureus* の病原性の獲得や病原因子の拡散といった現象に大きく関与していると考えられている [42, 44, 49]。様々な可動性遺伝因子を同定しその分子遺伝学的特性を理解することは、起病性の高い *S. aureus* を特定することに繋がりその重要性は高い。

多くの SaPI は SEs 遺伝子を保有することが知られている [44, 51]。既知の 23 種類の SE/SEIs 遺伝子のうち、*seb*, *sec*, *sel*, *sek* 及び *seq* の 5 種類の SEs 遺伝子は SaPI 上に存在し、伝播することが報告されている (本研究ではこれらの SEs を“SaPI 関連 SEs”と呼称する) [51, 64, 67]。第一章において、東京都で発生したブドウ球菌食中毒事例由来 *S. aureus* 株における SaPI 保有状況を解析した結果、SEs をコードする 5 種類の既知 SaPI (SaPI3, SaPIishikawa11, SaPIno10, SaPI68111 及び SaPIhirosaki4) が、供試 *S. aureus* 株に保有されていることを明らかにした (表 4)。しかしながら、SaPI 関連 SEs 遺伝子を保有する *S. aureus* 株の中には、上記の既知 SaPI を持たないものが存在した。それゆえ、これらの食中毒由来 *S. aureus* 株には SEs

をコードする未知の SaPI が存在することが推測された。このような未同定の SaPI がどの程度ブドウ球菌食中毒の発生に関与するのかは不明である。

そこで本章では、食中毒事例由来 *S. aureus* 株から SEs をコードする新規 SaPI を同定した。続いて、新規 SaPI を持つ *S. aureus* の食中毒起病性を評価し、SaPI の複製に関するタンパク質の機能を解析することによって、新規 SaPI の食中毒への関与や分子遺伝学的特性について検討した。

## 材料及び方法

### 1. 黄色ブドウ球菌株と使用培地

本章で使用した *S. aureus* 株を表 5 に示す。供試 *S. aureus* 株 (Tokyo11212, Tokyo12381, Tokyo12413, Tokyo12571, Tokyo12709 及び Tokyo12954) は、東京都で発生した食中毒事例の患者糞便由来もしくは患者嘔吐物由来株である。各菌株を SEs 遺伝子型ごとに分類すると, *sea, seb* 遺伝子保有株が 2 株 (Tokyo11212 及び Tokyo12413), *sea, sec, sel* 遺伝子保有株が 1 株 (Tokyo12381), *sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo* 遺伝子保有株が 2 株 (Tokyo12571 及び Tokyo12709), *seb, seh* 遺伝子保有株が 1 株 (Tokyo12954) である。なお, Tokyo12709 株は, *sec, sel* 遺伝子関連 SaPI である SaPI68111 を, Tokyo12954 株は *seb* 遺伝子関連 SaPI である SaPI<sub>no10</sub> をそれぞれ保有する株である。本章における *S. aureus* の使用培地は, 前章 (第一章 材料及び方法 1.) 記載の通りである。

## 2. 大腸菌株と使用培地

本章で使用した *Escherichia coli* (*E. coli*) 株を表 5 に示す。K12 株誘導体である DH5 $\alpha$  は Promega 社 (Madison, WI, USA), B 株誘導体である BL21 (DE3) は Merck 社 (Darmstadt, Germany) からそれぞれ購入した。*E. coli* の培養には Luria-Bertani (LB) 寒天培地 (Sigma-Aldrich) と LB 液体培地 (Sigma-Aldrich) を用い, 必要に応じてアンピシリン (Sigma-Aldrich) を終濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように添加した。

## 3. 使用したプラスミドの概要

本章で使用したプラスミドを表 6 に示す。また, それぞれのプラスミドを作製する際に使用したプライマーを表 7 に示す。pKOB, pKOC 及び pKOL は, 岩手大学の重茂克彦教授と小野久弥博士より分与されたプラスミドであり, それぞれ *seb*, *sec* もしくは *sel* 遺伝子全長配列を pGEM-3Zf(+) vector (Promega) に組み込んだプラスミドである。pGTR212, pGTR413, pGTR381/571, pGTO212, pGTO413, pGTO381/571 及び pGTN413 は, 表 7 に記載したプライマーを用いて作製した PCR 産物を, pGEM-T easy vector (Promega) に組み込んだプラスミドである。pER212, pER413 及び pER381/571 は, pET-15b vector (Merck) に, それぞれ pGTR212, pGTR413 及び pGTR381/571 から制限酵素 *Nde*I と *Bam*HI (タカラバイオ) によって切り出した DNA 断片を組み込んだプラスミドである。

#### 4. 黄色ブドウ球菌 Genomic DNA の精製

供試 *S. aureus* 4 株 (Tokyo11212, Tokyo12381, Tokyo12413 及び Tokyo12571) の Genomic DNA 精製を, 前章 (第一章 材料及び方法 4.) の方法に従い実施した。

#### 5. SaPI scanning

供試 *S. aureus* 4 株 (Tokyo11212, Tokyo12381, Tokyo12413 及び Tokyo12571) の SaPI scanning を, 前章 (第一章 材料及び方法 6.) の方法に従い実施した。

#### 6. Southern blotting を用いた LA-PCR 増幅産物中の SEs 遺伝子の検出

前項 (第二章 材料及び方法 5.) で得られた LA-PCR 増幅産物内における SaPI 関連 SEs の存在の有無を確認するため, Southern blotting による検出を行った。

##### A. pKOB, pKOC 及び pKOL プラスミドの大量精製

pKOB, pKOC 及び pKOL の各プラスミドを用いてコンピテントセル (*E. coli* DH5 $\alpha$ 株) を形質転換した。−80℃で凍結保存してあるコンピテントセルを氷上に 10 分間静置して溶解し, コンピテントセ

ル 15  $\mu\text{L}$  に対して 100 ng のプラスミドを添加し、さらに氷上に 20 分間静置した。ブルーホワイトカラーセレクションを行うために、アンピシリン (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 添加 LB 寒天培地に 50  $\mu\text{L}$  の 2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (タカラバイオ) と 50  $\mu\text{L}$  の 100 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG; タカラバイオ) を添加し、寒天全体に塗り広げた。菌液とプラスミドの混合液に、42 $^{\circ}\text{C}$  に温めておいたウォーターバスで 42 秒間ヒートショックを与え、その後すぐに氷上に移し 90 秒間冷却した。そこへ 37 $^{\circ}\text{C}$  に温めておいた SOC 培地 (Promega) を 150  $\mu\text{L}$  加え、37 $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間振盪培養した。培養液を 37 $^{\circ}\text{C}$  に加温しておいたブルーホワイトカラーセレクション用アンピシリン添加 LB 寒天培地に全量添加し、寒天全体に塗り広げ 37 $^{\circ}\text{C}$  で一晩培養した。生じた白いコロニーを、終濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるようにアンピシリンを添加した 5 mL の LB 液体培地に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$  で 16 時間の振盪培養を行った。

増殖後の大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドの精製を行った。すなわち、培養液を 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。回収した菌体を 250  $\mu\text{L}$  の Buffer P1 で懸濁した。懸濁液を 1.5 mL チューブに移し、そこへ 250  $\mu\text{L}$  の Buffer P2 を加えて緩やかに 6 回転倒混和した。さらに 350  $\mu\text{L}$  の Buffer N3 を加え、白色の塊が生じるまで転倒混和した。13,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を QIAprep spin column に移した。13,000 rpm で spin column を 1 分間遠心分離し、濾過液を捨てた。750  $\mu\text{L}$  の Buffer PE を spin column に加え、13,000 rpm で 1 分間遠心分離し spin column を洗浄した。濾過液を捨て、さらに 13,000 rpm で 1 分間遠心分離し、Buffer PE を完全に取り除いた。QIAprep spin column



を 1.5 mL チューブに移し, 50  $\mu$ L の Buffer EB を加えて 1 分間の静置後, 13,000 rpm で 1 分間遠心分離し, 精製プラスミド溶液を得た。精製プラスミド溶液の DNA 濃度を, Nanodrop 2000c (Thermo fisher scientific) を用いて測定した。また A260/A280 が 1.8 以上であることを確認し, 解析に用いるまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

精製したプラスミドを鋳型にして, 前章 (第一章 材料及び方法 5.) の方法に従い, クローニングされている各 SE 遺伝子の塩基配列の確認を行った。なお, シークエンスプライマーには表 7 に記載した M13F と M13R をそれぞれ使用した。塩基配列を確認した pKOB, pKOC 及び pKOL を次の実験に用いた。

#### B. *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子断片の精製

上記の pKOB, pKOC 及び pKOL について 2 種類の制限酵素による切断を行った。すなわち, 以下の反応液を調製後,  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間の静置を行い, *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子断片を切り出した。制限酵素は *EcoRI*, *BamHI* または *SalI* (タカラバイオ) のいずれかを使用した。

#### *seb*, *sec* プローブ作成用反応液組成 (20 $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ K Buffer	2 $\mu$ L
②	pKOB もしくは pKOC (< 1 $\mu$ g)	3 $\mu$ L
③	<i>BamHI</i> (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
④	<i>EcoRI</i> (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
⑤	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher scientific)	13 $\mu$ L

*sel* プローブ作成用反応液組成 (20  $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ T Buffer	3 $\mu$ L
②	pKOL (< 1 $\mu$ g)	3 $\mu$ L
③	<i>Bam</i> HI (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
④	<i>Sal</i> I (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
⑤	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher scientific)	12 $\mu$ L

反応液に、反応液量の 1/10 量以上の 10 $\times$ Loading Buffer を添加し酵素反応を止め、アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動には 0.7% SeaKem GTG Agarose gels (Lonza) を用いた。EtBr 溶液 (0.5  $\mu$ g/mL) にアガロースゲルを浸漬し DNA 染色し、ゲル撮影装置 AE-6933FXES (ATTO) を用いて、紫外線照射下で 700-800 bp 付近のバンドをメスで切り出した。MonoFas DNA purification Kit (GL サイエンス) を用い、切り出したゲルから *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子断片を精製した。すなわち、切り出したゲルに等量の Buffer A を加え、70 $^{\circ}$ C で 10 分間加温しゲルを完全に溶解させた。MonoFas I spin column にゲル溶解液を加え、column を 9,000 rpm で 1 分間遠心分離し、濾過液を捨てた。500  $\mu$ L の Buffer B を加え、9,000 rpm で 1 分間遠心分離し、column を洗浄した。濾過液を捨て、さらに 9,000 rpm で 1 分間遠心分離し、Buffer B を完全に取り除いた。MonoFas I spin column を 1.5 mL チューブに移し、20  $\mu$ L の Nuclease-free H<sub>2</sub>O (Thermo Fisher scientific) を加えて 1 分間の静置後、9,000 rpm で 1 分間遠心分離し、精製した *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子断片を得た。

C. *seb*, *sec*, *sel* プローブの標識

精製した *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子断片を ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, UK) を用いて西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase ; HRP) を直接標識し、プローブとした。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち、100 ng の *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子断片を 10  $\mu$ L になるように添付の Water で希釈し、95°C で 10 分間静置した。次に氷中に移し 5 分間静置した。そこへ 10  $\mu$ L の DNA labelling reagent と Glutaraldehyde solution 加えて、37°C のウォーターバスで 10 分間保温し HRP 標識プローブを作製した。

#### D. Southern blotting

前項(第二章 材料及び方法 5.)で得られた 250-500 ng の LA-PCR 増幅産物を、100 units の *Hind*III (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いて切断し、0.7% SeaKem GTG Agarose gels (Lonza) を用いて 18V の定電圧で 15 時間電気泳動を行った。EtBr 溶液 (0.5  $\mu$ g/mL) に泳動後のアガロースゲルを浸漬し DNA 染色し、ゲル撮影装置 AE-6933FXES (ATTO) を用いて LA-PCR 増幅産物の切断を確認した。続いて泳動後のゲルを、300 mL の 0.35 N HCl 内で 10 分間振盪し、長鎖 DNA の加水分解処理を行った。続いてゲルを、300 mL の denaturalization buffer 内で 25 分間振盪し、2 本鎖 DNA の変性処理を行った。次にゲルを 300 mL の neutralization buffer 内で 15 分間振盪する操作を 2 回繰り返し、中和処理を行った。処理後のゲルか

らポジティブチャージナイロンメンブレン（Hybond-N<sup>+</sup>；GE Healthcare）への DNA の転写は，フナー核酸プロテイング槽（フナコシ，東京，日本）及びフナーパット（フナコシ）を用いて一晩かけて行った。UV クロスリンカー CL-1000（フナコシ）を用いて，DNA 転写後のメンブレンに 120 mj の紫外線を照射し DNA をメンブレンに架橋させた。なお，転写用バッファーとして 10×SSC を使用した。

化学発光によるプローブの検出は ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System（GE Healthcare）を用いて行った。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち，DNA を架橋させたメンブレンと 21 mL の hybridization buffer をハイブリ・バック（コスモバイオ）に入れ，MULTI-SHAKER OVEN HB+S（タイテック，東京，日本）を用いて，42℃，61 rpm で 3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後，900 μL の hybridization buffer をハイブリ・バックから抜き取り，HRP 標識した *seb*，*sec* もしくは *sel* プローブに加え混合した。混合プローブ溶液をハイブリ・バックに戻し，42℃，61 rpm で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンを，300 mL の primary wash buffer 内で 20 分間振盪する操作を 2 回繰り返す，続いて 300 mL の secondary wash buffer で 5 分間振盪する操作を 2 回繰り返して洗浄した。その後，8 mL の ECL Detection reagent 1 と 8 mL の ECL Detection reagent 2 の混合液をメンブレンにかけ 1 分間反応させた後，ATTO CoolSaver AE-6955（ATTO）を用いて化学発光を検出し，増幅産物中の *seb*，*sec* 及び *sel* 遺伝子の有無を確認した。使用した 0.35 N HCl，denaturalization buffer，neutralization buffer，10×SSC，hybridization

buffer, primary wash buffer, secondary wash buffer, 5 M NaCl 及び 1 M Tris-HCl (pH7.5) の組成は以下の通りである。

0.35 N HCl 組成 (1 L スケール)

①	1 N HCl (和光純薬)	350 mL
②	オートクレーブ済み MilliQ 水	650 mL

denaturalization buffer 組成 (300 mL スケール)

①	5 M NaCl (下記調製)	90 mL
②	水酸化ナトリウム (和光純薬)	6 g
③	オートクレーブ済み MilliQ 水	210 mL

neutralization buffer 組成 (1 L スケール)

①	5 M NaCl (下記調製)	300 mL
②	Tris-HCl (pH 7.5) (下記調製)	500 mL
③	オートクレーブ済み MilliQ 水	200 mL

10×SSC 組成 (1 L スケール)

①	オートクレーブ済み MilliQ 水	500 mL
②	20×SSC (Thermo fisher scientific)	500 mL

hybridization buffer 組成 (200 mL スケール)

①	Gold hybridization buffer (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System に付属)	200 mL
②	Blocking agent (ECL Direct Nucleic Acid Labelling	

and Detection System に付属)	10 g
③ NaCl (和光純薬)	3.5 g

primary wash buffer 組成 (1 L スケール)

① オートクレーブ済み MilliQ 水	適量
② 尿素 (和光純薬)	360 g
③ 10% SDS (和光純薬)	40 mL
④ 20×SSC (Thermo Fisher Scientific)	15 mL

オートクレーブ済み MilliQ 水で 1 L にメスアップした。

secondary wash buffer 組成 (1 L スケール)

① オートクレーブ済み MilliQ 水	900 mL
② 20×SSC (Thermo Fisher Scientific)	100 mL

5 M NaCl 組成 (1 L スケール)

① NaCl (和光純薬)	292.2 g
② MilliQ 水	適量

MilliQ 水で 1 L にメスアップし，オートクレーブした。

1 M Tris-HCl (pH 7.5) 組成 (500 mL スケール)

① トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬)	60.55 g
② 6 N HCl (和光純薬)	67 mL
③ MilliQ 水	適量

pH7.5 に調整後，MilliQ 水で 500 mL にメスアップし，オートクレーブした。

## 7. 新規 SaPI 配列の同定

得られた塩基配列から新たにプライマーを設計し、同様の手順を繰り返すことで長鎖 DNA 配列を決定するプライマーウォーキング法を用いて SaPI の塩基配列を決定した。前項（第二章 材料及び方法 5.）で得られた LA-PCR 増幅産物を鋳型とし、前章（第一章 材料及び方法 5.）の方法に従いシーケンス解析を行った。得られた塩基配列は MEGA5 software を用いて整列させた。決定した LA-PCR 増幅産物の塩基配列の中から新規 SaPI を同定するため、Genetyx software program, ver. 8 を用いて、SaPI 特有の繰り返し配列（att 配列）の検索及び既知 SaPI との共通配列の検索を行った。また、GeneMark（<http://exon.gatech.edu/>）及び ORF Finder（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>）を用いて、同定した新規 SaPI 配列内における Open reading frame（ORF）抽出を行った。Basic local alignment search tool（BLAST；<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を用いた相同性検索を行うことで、抽出した各 ORF の機能推定を行った。

新規 SaPI の配列及びアノテーション情報は DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースに登録した。割り当てられたアクセッション番号はそれぞれ AB860415 (SaPITokyo12413), AB860416 (SaPITokyo11212), AB860417 (SaPITokyo12571), AB860418 (SaPITokyo12381) である。

## 8. Sandwich ELISA を用いた SE タンパク質の定量

新規 SaPI を保有する *S. aureus* 4 株及び既知 SaPI 保有対照株 2 株について、前章（第一章 材料及び方法 8.）の方法に従い、Sandwich ELISA による SEB, SEC 及び SEL タンパク質濃度を測定した。なお、SEB, SEC 及び SEL の Capture 抗体と Detection 抗体には岩手大学の重茂克彦教授より分与されたウサギ抗体を使用した。Capture 抗体はそれぞれ、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEB), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEC), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEL) の濃度に希釈して使用した。Detection 抗体はそれぞれ、4,800 倍 (Anti-SEB), 3,200 倍 (Anti-SEC), 200 倍 (Anti-SEL) に希釈して使用した。また、岩手大学の重茂克彦教授より分与された 100 ng/mL の 0.1% (w/v) BSA 添加リコンビナント SEB, SEC 及び SEL タンパク質を、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡) を用いて階段希釈し、それぞれの標準曲線の作製に用いた。

## 9. Rep の発現と精製

前項（第二章 材料及び方法 7.）の ORF 抽出及びアノテーションの結果から *rep* 遺伝子と推測された配列 (SaPITokyo11212-ORF9, SaPITokyo12413-ORF9 及び SaPITokyo12381-ORF8) を基に、6×ヒスチジンタグ付組換えタンパク質を作製した。

### A. Rep 発現用プラスミドの構築

前項（第二章 材料及び方法 5.）で得られた LA-PCR 増幅産物を鋳型とし、SaPITokyo11212-ORF9, SaPITokyo12413-ORF9 及び



SaPITokyo12381-ORF8 の全長配列が増幅されるようにプライマーを設計し，PCR を行った。使用したプライマーを表 7 に示す。PCR には *TaKaRa LA Taq Hot Start Version* を使用した。反応液及び反応条件は以下の通りである。

PCR 反応液組成 (50  $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu$ L
②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	8 $\mu$ L
③	Forward primer (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
④	Reverse primer (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
⑤	<i>LA Taq Hot Start Version</i> (5 units/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
⑥	Template DNA (< 1 $\mu$ g)	1 $\mu$ L
⑦	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher scientific)	34.5 $\mu$ L

反応条件

①	95 $^{\circ}$ C	10 分	} 18 サイクル
②	95 $^{\circ}$ C	30 秒	
③	55 $^{\circ}$ C	30 秒	
④	72 $^{\circ}$ C	2 分 30 秒	
⑤	72 $^{\circ}$ C	10 分	

得られた PCR 産物について pGEM-T Easy Vector (Promega) にライゲーションを行った。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち，以下の反応液を調製後 4 $^{\circ}$ C で 16 時間静置しライゲーション反応を行った。

ライゲーション反応液組成 (10  $\mu$ L スケール)

①	2×Rapid Ligation Buffer	5 $\mu$ L
②	PCR 産物	3.5 $\mu$ L
③	pGEM-T Easy (50 ng/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
④	T4 DNA Ligase (3 Unit/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

反応後，前項（第二章 材料及び方法 6.）に従い，ライゲーションしたプラスミドによる形質転換後の大腸菌から精製したプラスミドのシーケンス解析を行い，各 *rep* 遺伝子全長配列を含むプラスミド（pGTR212，pGTR413 及び pGTR381/571）を得た。シーケンスプライマーには表 7 に記載した M13F と M13R をそれぞれ使用した。

これらのプラスミドから *rep* 遺伝子配列を精製し，pET-15b vector に組み込むことで発現用プラスミドを構築した。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち，以下の反応液を調整後，37°C で 1 時間の静置を行い 2 種類の制限酵素による切断を行った。制限酵素は *Nde*I と *Bam*HI（タカラバイオ）を使用した。

制限酵素切断用反応液組成 (20  $\mu$ L スケール)

①	10×K Buffer	2 $\mu$ L
②	pGTR212, pGTR413, pGTR381/571 あるいは pET-15b (< 1 $\mu$ g)	3 $\mu$ L
③	<i>Nde</i> I (10 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
④	<i>Bam</i> HI (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

- ⑤ Nuclease-free H<sub>2</sub>O (Thermo Fisher scientific) 13 μL

反応液に反応液量の 1/10 量以上の 10×Loading Buffer を添加し、酵素反応を止め、アガロースゲルによる電気泳動を行い、前項（第二章 材料および方法 6.）の方法に従いゲルの切り出しを行った。ゲル中の DNA を精製後、Ligation high（東洋紡）を用いて制限酵素切断済み *rep* 遺伝子配列と制限酵素切断済み pET-15b をライゲーションした。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち、以下の反応液を調製後、16°C で 16 時間静置した。

ライゲーション反応液組成（8 μL スケール）

- |                             |        |
|-----------------------------|--------|
| ① 制限酵素切断済み <i>rep</i> 遺伝子配列 | 3.5 μL |
| ② 制限酵素切断済み pET-15b          | 0.5 μL |
| ③ Ligation high（東洋紡）        | 4 μL   |

反応後、前項（第二章 材料及び方法 6.）に従い、ライゲーションしたプラスミドによる形質転換後の大腸菌から精製したプラスミドのシーケンス解析を行い、各 Rep 発現用プラスミド（pER212, pER413 及び pER381/571）を得た。なお、コンピテントセルとして *E. coli* BL21（DE3）株を使用し、シーケンスプライマーには表 7 に記載した T7UP と T7TER をそれぞれ使用した。

## B. 組換え Rep の発現及び精製

組換え Rep（rRep）の発現及び精製は、QIAGEN 社が提供する The

### *QIAexpressionist*

( [http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN\\_QIAexpressionist\\_EN.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf) ) の方法を一部改変して行った。すなわち, pER212, pER413 または pER381/571 を用いて形質転換した *E. coli* BL21(DE3) を終濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるようにアンピシリンを添加した 100 mL の LB 液体培地に接種し, 37°C で振盪培養した。O.D.<sub>600</sub> が 0.5 から 0.8 の範囲になるまで培養した後, 100 mM の IPTG を 1 mL 添加し, 20°C で 15 時間振盪培養した。培養液を 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し, 上清を捨てた。集めた菌体を液体窒素で急速冷凍した後, 組換えタンパク質の精製に用いるまで -80°C で保存した。

上記の菌体を常温で融解した後, 氷冷した 10 mL の Lysis buffer に懸濁し, 超音波破碎機 (Ultrasonic Homogenizer ; SMT, 東京, 日本) を用いて菌体を破碎した。超音波破碎菌液を 14,500 rpm で 30 分間遠心分離した。1.5 mL の Ni-NTA Agarose (QIAGEN) に氷冷した 10 mL の Lysis buffer を加え, 1,000 rpm で 10 秒間遠心分離し上清を捨てる作業を 3 回繰り返す, Ni-NTA Agarose を平衡化した。平衡化済み Ni-NTA Agarose に遠心分離後の上清を加え, 4°C で 90 分間転倒混和した。反応後, 1,000 rpm で 10 秒間遠心分離し Ni-NTA Agarose を沈殿させ上清を捨てた。氷冷した 10 mL の Wash buffer を加え, 1,000 rpm で 10 秒間遠心分離し上清を捨てる作業を 8 回繰り返す, Ni-NTA Agarose を洗浄した。洗浄後の Ni-NTA Agarose に少量の Wash buffer を加え 2 mL とし, Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-rad, Hercules, CA, USA) に充填し, 濾液を捨てた。カラムの界面を乱さないように氷冷した Elution buffer を 1 mL ゆっくりと加え, 濾液を回収する作業を 3 回繰り返す, rRep 溶出液を回収した。

Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて 280 nm の吸光度を測定することにより rRep 濃度を算出し、最も多く rRep を回収した溶出液について、透析用カセット (Slide-A-Lyzer G2, NMCO 10K ; Thermo Fisher Scientific) を用いて、4°C で一晩透析を行った。透析外液には 1 L の 1×PBS (-) を用い、開始 5 時間後に透析外液を新鮮な 1×PBS(-) に交換した。使用した Lysis buffer, Wash buffer, Elution buffer の組成は以下の通りである。

#### Lysis buffer 組成 (100 mL スケール)

①	オートクレーブ済み MilliQ 水	適量
②	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (和光純薬)	0.69 g
③	NaCl (和光純薬)	1.754 g
④	Imidazole (和光純薬)	0.068 g

pH8.0 に調整後、オートクレーブ済み MilliQ 水で 100 mL にメスアップし、0.5 M フッ化フェニルメチルスルホニル溶液 (Sigma-Aldrich) を 200 μL, 100 mg/mL ロイペプチン溶液 (和光純薬) を 100 μL, 2 mg/mL キモスタチン/ペプスタチン溶液 (和光純薬) を 1 mL, 2-メルカプトエタノール (和光純薬) を 40 μL 添加した。

#### Wash buffer 組成 (100 mL スケール)

①	オートクレーブ済み MilliQ 水	適量
②	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (和光純薬)	0.69 g
③	NaCl (和光純薬)	1.754 g
④	Imidazole (和光純薬)	0.136 g

pH8.0 に調整後、オートクレーブ済み MilliQ 水で 100 mL にメスア

ップした。

#### Elution buffer 組成 (100 mL スケール)

①	オートクレーブ済み MilliQ 水	適量
②	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (和光純薬)	0.69 g
③	NaCl (和光純薬)	1.754 g
④	Imidazole (和光純薬)	1.7 g

pH8.0 に調整後，オートクレーブ済み MilliQ 水で 100 mL にメスアップした。

得られた rRep 溶液を Quick Start Bradford Protein assay kit (Bio-rad) 及び Quick Start Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set (Bio-rad) を用い，付属の説明書に従ってタンパク質濃度を測定した。すなわち，0，125，250，500，750，1000，1500 µg/mL に希釈された BSA をスタンダードとして検量線を作製した。rRep 溶液は検量線の範囲に入るように希釈した。サンプル溶液の 10 倍量の染色液を添加し，ボルテックス後 Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて 595 nm の吸光度を測定し，検量線から各 rRep 溶液のタンパク質濃度を算出した。

#### C. rRep の純度の確認

目的とする rRep の純度を SDS-PAGE 及び western blotting を用いて確認した。SDS-PAGE には，500 ng/10 µL に調整した rRep 溶液を用いた。10 µL の rRep 溶液に 10 µL の 2×Laemmli sample buffer

(Bio-rad)を混合し, 100℃で 10 分間加熱した。全量を 4–20% precast polyacrylamide gel (Bio-rad)に加え, 40 mA で 40 分間電気泳動を行った。泳動後のゲルは, Quick-CBB (和光純薬)を用いてクーマシブリリアントブルー染色を行い, 分離されたタンパク質を可視化した。方法は試薬に添付の説明書に従った。すなわち, 泳動後のゲルを 100 mL の固定液内で 10 分間振盪する操作を二回繰り返し, 続いて 60 mL の染色液内で 30 分間振盪し, 最後に 100 mL の脱色液内で 15 分間振盪する操作を二回繰り返した。分子量マーカールには Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-rad), 電気泳動には ミニプロティアン 3 セル (Bio-rad) をそれぞれ使用した。使用した SDS-PAGE 泳動用バッファー, 固定液, 染色液及び脱色液の組成は以下の通りである。

#### 10×SDS-PAGE 泳動用バッファー組成 (1 L スケール)

①	オートクレーブ済み MilliQ 水	適量
②	トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬)	30.3 g
③	グリシン (和光純薬)	144 g
④	SDS (和光純薬)	10 g

オートクレーブ済み MilliQ 水で 1 L にメスアップし, 使用時は MilliQ 水で 10 倍に希釈した。

#### 固定液組成 (100 mL スケール)

①	メタノール (和光純薬)	50 mL
②	酢酸 (和光純薬)	10 mL
③	MilliQ 水	40 mL

染色液組成 (60 mL スケール)

① Quick-CBB 染色液 A (和光純薬)	30 mL
② Quick-CBB 染色液 B (和光純薬)	30 mL

脱色液組成 (100 mL スケール)

① メタノール (和光純薬)	25 mL
② 酢酸 (和光純薬)	7.5 mL
③ MilliQ 水	67.5 mL

Western blotting には, 100 ng/10  $\mu$ L に調整した rRep 溶液を用いた。SDS-PAGE 後のゲルを iBlot Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific) 及び iBlot Transfer Stack, PVDF Mini (Thermo Fisher Scientific) を用いて付属のポリフッ化ビニリデン膜にタンパク質を転写した。転写後膜をブロッキング溶液中で 30 分間振盪した。10 mL の一次抗体希釈液とブロッキング済み膜をハイブリ・バックに入れ, 4°C で一晩振盪した。一次抗体には 6  $\times$  His epitope tag antibody (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, USA) を 2,000 倍に希釈して使用した。一次抗体希釈液を捨て, 膜を 1  $\times$  Tris Buffered Saline with Tween 20 (1  $\times$  TBST) 中で 10 分間振盪する操作を 3 回繰り返す, 膜を洗浄した。続いて, 10 mL の二次抗体希釈液と膜をハイブリ・バックに入れ, 室温で 1 時間振盪した。二次抗体は Goat anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase Conjugated (Thermo Fisher Scientific) を 2,000 倍に希釈して使用した。二次抗体希釈液を捨て,



メンブレンを 1×TBST 中で 10 分間振盪する操作を 3 回繰り返す、メンブレンを洗浄した。検出には ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を使用した。すなわち、8 mL の Solution A と 200  $\mu$ L の Solution B を混合した検出液をメンブレンにかけ、5 分間反応させた後、Typhoon Trio variable image analyzer (GE Healthcare) を用いて化学蛍光を検出した。使用した 1×TBST 及びブロッキング溶液の組成は以下の通りである。

#### 10×TBS 組成 (1 L スケール)

①	MilliQ 水	適量
②	トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬)	60.6 g
③	NaCl (和光純薬)	80.6 g
④	KCl (和光純薬)	2 g

pH7.4 に調整後、MilliQ 水で 1 L にメスアップし、オートクレーブした。使用時にオートクレーブ済み MilliQ 水で 10 倍に希釈し、0.5 mL の Tween 20 (和光純薬) を添加し、1×TBST とした。

#### ブロッキング溶液組成 (100 mL スケール)

①	1×TBST	100 mL
②	スキムミルク (和光純薬)	5 g

## 10. ゲルシフトアッセイ

前項 (第二章 材料および方法 9.) で作製した rRep の *ori site* 配列との結合活性をゲルシフトアッセイによって確認した。ゲルシフト

アッセイは Masuda ら [46] の方法を一部改変して行った。

#### A. *ori* site 配列プローブの作製

前項（第二章 材料及び方法 5.）で得られた LA-PCR 増幅産物を鋳型とし， SaPITokyo11212 の 7,765 bp から 8,093 bp まで， SaPITokyo12413 の 6,016 bp から 6,185 bp まで及び 7,769 bp から 8,340 bp まで， SaPITokyo12381/SaPITokyo12571 の 5,708 bp から 6,007 bp までが増幅されるようにそれぞれ PCR を行った。使用したプライマーを表 7 に示す。PCR の試薬及び反応条件は前項（第二章 材料および方法 9.）に従った。得られた PCR 産物を TA クローニングし，プラスミドを精製した。TA クローニングの方法は前項（第二章 材料および方法 9.）に従った。上記 PCR 産物を pGEM-T Easy Vector（Promega）に組み込んだプラスミド（pGTO212, pGTO413, pGTN413 及び pGTO381/571）を得た。

続いて，これらのプラスミドを鋳型とし，クローニングした塩基配列部分が増幅されるようにそれぞれ PCR を行った。すなわち，Forward primer として T7UP-Cy5 もしくは T7UP を，Reverse primer として pGTO212 を鋳型とした場合には ST212ORI329R，pGTO413 には ST413ORI171R，pGTN413 には ST413-8340R，pGTO381/571 には ST381ORI300R をそれぞれ使用した。PCR の試薬及び反応条件は前章（第一章 材料および方法 5.）に従った。なお，5'末端に Cy5 を標識したプライマーである T7UP-Cy5 は，塩基配列を設計後 Fasmac 社（神奈川，日本）に合成を依頼した。

反応後，反応液量の 1/6 量の 6×Loading Buffer を添加した。混合

液全量をアガロースゲル電気泳動した。前項（第二章 材料および方法 6.）に従い、ゲルから DNA 精製を行った。精製後の DNA を 5'末端 Cy5 標識 *ori* site 配列プローブもしくは 5'末端 Cy5 非標識 *ori* site 配列プローブとし次の実験に用いた。

## B. ゲルシフトアッセイ

精製した 5'末端 Cy5 標識 *ori* site 配列プローブを 20 ng/ $\mu$ L に調整した。1  $\mu$ L のプローブ溶液と 2  $\mu$ L の Gel Shift Binding 5 $\times$  Buffer (Promega)を混合し、室温で 15 分間静置した。そこに 0~1000 ng に調整した rRep 溶液を加え、Nuclease-free H<sub>2</sub>O(Thermo Fisher scientific)で総量 10  $\mu$ L にメスアップし、室温で 15 分間静置した。続いて、混合液を 4%ポリアクリルアミドゲルに全量加え、120 V で約 45 分間電気泳動を行った。泳動用バッファには 1 $\times$ TBE buffer (Thermo Fisher scientific) を用いた。

泳動後、Typhoon Trio variable image analyzer(GE Healthcare)を用いて Cy5 の蛍光の検出を行い、rRep の各 *ori* site 配列プローブとの結合活性を確認した。また結合阻害実験は、Cy5 標識 *ori* site 配列プローブと Gel Shift Binding 5 $\times$  Buffer の混合液に Cy5 標識 *ori* site 配列プローブの 10 倍量の Cy5 非標識 *ori* site 配列プローブを添加して実施した。使用した 4%ポリアクリルアミドゲルの組成は以下の通りである。

4%ポリアクリルアミドゲル組成 (10 mL スケール)

① 30% Acrylamide/Bis Solution (Bio-rad) 1.33 mL

②	10×TBE (Thermo Fisher scientific)	1 mL
③	10% 過硫酸アンモニウム (和光純薬)	0.1 mL
④	N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (和光純薬)	20 $\mu$ L
⑤	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher scientific)	7.55 mL

## 11. 蛍光ヘリカーゼアッセイ

前項 (第二章 材料および方法 9.) で作製した rRep の DNA ヘリカーゼ活性を蛍光共鳴エネルギー移動に基づくヘリカーゼアッセイによって確認した。使用したオリゴヌクレオチドを表 7 に示す。なお、5'末端に Cy3 を標識したオリゴヌクレオチドである Fluorescent strand と 3'末端に BHQ2 を標識したオリゴヌクレオチドである Quencher strand は、塩基配列を設計後 Fasmac 社 (前出) に合成を依頼した。蛍光ヘリカーゼアッセイは Boguszevska-Chachulska ら [9] 及び Tani ら [71] の方法を一部改変して行った。すなわち、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に、Fluorescent strand 及び Quencher strand を 1:2 の割合で混合し、95°C で 5 分間加熱した。加熱後、室温で 2~3 時間かけてゆっくりと冷却し、double-stranded DNA (dsDNA) を合成した。続いて、以下の反応液を調製後 14.5  $\mu$ L ずつ分注し、終濃度が 0, 75, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 nM になるように調整した rRep 溶液を 5.5  $\mu$ L 加え、直ちに Cy3 の蛍光強度の測定を開始した。蛍光強度の測定には ABI 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使い、37°C, 99 分間の蛍光強度を 1 分間隔で測定した。時間 ( $t$ ) を横軸に、蛍光の実測値  $F(t)$  を縦軸として実測値をプロットした後、最小二乗法を用いて式 (a) にフィッティングし、最適な

定数 ( $C$ ,  $A$ ,  $k_{obs}$ ) を算出した。なお,  $C$  は測定開始時の蛍光強度,  $A$  は振幅,  $k_{obs}$  は速度定数であり, 初速 ( $F'(0)$ ) は, 振幅に速度定数を掛け合わせたものとした。

$$F(t) = C + A[1 - \exp(-k_{obs}t)], \quad (a)$$

使用した反応液, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM Tris-HCl (pH 7.5) 及び 1.5% Triton X-100 の組成は以下の通りである。

蛍光ヘリカーゼアッセイ反応液組成 (14.5  $\mu$ L スケール)

①	300 mM Tris-HCl (pH 7.5) (下記調製)	2 $\mu$ L
②	50 mM MgCl <sub>2</sub> (和光純薬)	2 $\mu$ L
③	1.5% Triton X-100 (下記調製)	1 $\mu$ L
④	100 mM ATP (和光純薬)	0.2 $\mu$ L
⑤	1 $\mu$ M dsDNA (上記調製)	0.4 $\mu$ L
⑥	12.5 $\mu$ M capture strand (Fasmac に合成を依頼)	0.2 $\mu$ L
⑦	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	8.7 $\mu$ L

20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 組成 (100 mL スケール)

①	1 M Tris-HCl (pH 7.5) (第二章 材料及び方法 6.)	2 mL
②	オートクレーブ済み MilliQ 水	適量

pH7.5 に調整後, MilliQ 水で 100 mL にメスアップし, オートクレーブした。

300 mM Tris-HCl (pH 7.5) 組成 (100 mL スケール)

①	1 M Tris-HCl (pH 7.5) (第二章 材料及び方法 6.)	30 mL
②	オートクレーブ済み MilliQ 水	適量

pH7.5 に調整後，MilliQ 水で 100 mL にメスアップし，オートクレーブした。

1.5% Triton X-100 組成（100 mL スケール）

- |   |                    |         |
|---|--------------------|---------|
| ① | Triton X-100（和光純薬） | 1.5 mL  |
| ② | オートクレーブ済み MilliQ 水 | 98.5 mL |

## 12. 統計学的解析

各 *S. aureus* 株の SEs 産生量における統計学的解析は，one way ANOVA で分析後 Tukey-Kramer の HSD 検定を行い，すべてのペアを比較することで統計的有意性を検証した。また，ヘリカーゼ酵素反応速度結果の統計学的解析は，*F* 検定による母分散の比の検定後，スチューデントの *t* 検定を行い，統計的有意性を検証した。全ての検定結果の *p* 値が 0.01 以下のものを有意差ありとみなした。全ての統計学的解析は JMP software（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いて行った。

## 結果

### 1. *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子が存在する GI の同定

供試した *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子を保有する *S. aureus* 4 株（Tokyo12413, Tokyo11212, Tokyo12571 及び Tokyo12381 株）について，SaPI scanning 法を用い各 SaPI 挿入可能領域における SaPI の有無を調べた。10 kb

以上の LA-PCR 増幅産物が、Tokyo12413 株の 8' 及び 9' 領域、Tokyo11212 株の 9' 及び 19' 領域、Tokyo12571 株の 9' 及び 18' 領域、Tokyo12381 株の 9' 及び 18' 領域においてそれぞれ認められた (図 9A)。これらの長鎖 LA-PCR 増幅産物について *Hind*III を用いた RFLP 解析を行った。Tokyo12413, Tokyo11212 及び Tokyo12381 株の 9' 領域における GIs の RFLP パターンは、第一章 図 6 で示した "MW2-like RFLP" であり、Tokyo12571 株の 9' 領域における GI の RFLP パターンは "9' -Unknown GIs type1" であった。第一章の結果から "MW2-like RFLP" は、全ての CC81 株及び CC6 株が保有する GI であり、"9' -Unknown GIs type1" は、全ての CC508 株が保有する GI であることが明らかになっている (表 4)。*seb*, *sec* もしくは *sel* 遺伝子の何れかが、"MW2-like RFLP" や "9' -Unknown GIs type1" 上に存在すると仮定した場合、CC81 株、CC6 株及び CC508 株における *seb*, *sec* もしくは *sel* 遺伝子の何れかの保有率が 100% になると予測されるが、実際の上記 CC 株におけるこれらの遺伝子保有率は 100% ではなかった (図 5)。以上のことから、"MW2-like RFLP" と "9' -Unknown GIs type1" 上には、*seb*, *sec*, *sel* 遺伝子が存在しないことが予測された。一方で、図 9B に示した 4 つの LA-PCR 増幅産物の RFLP パターン (Tokyo12413 株の 8' 領域、Tokyo11212 株の 19' 領域、Tokyo12571 の 18' 領域、Tokyo12381 株の 18' 領域) は、既知 SaPI の RFLP パターンと一致しないものであった。そこで Southern blotting を行い、これら 4 つの LA-PCR 増幅産物中の *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子の有無を確認した。*seb* プローブを使用した際には、Tokyo12413 株の 8' 領域と Tokyo11212 株の 19' 領域の増幅産物でバンドが検出された (図 9C)。また、*sec* プローブ及び *sel* プローブ

を用いた際には、Tokyo12571株とTokyo12381株の18'領域の増幅産物でバンドが検出された（図9D及び9E）。

## 2. *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子保有新規 SaPI 配列の同定

上記 *seb*, *sec*, *sel* 遺伝子陽性 LA-PCR 増幅産物の塩基配列を決定した。それぞれの増幅産物から 14 kb 以上の塩基配列を得た。これらの配列のアノテーションの結果を表 8~11 及び図 10 に示す。4 種の LA-PCR 増幅産物は、既知 SaPI が共通して保有する特徴を含んでいた。すなわちその両端には、それぞれの挿入領域特異的な att 配列（8' 領域：AAAGAAGAACAATAATAT；18' 領域：TCCCGCCGTCTCCAT；19' 領域：TTATTCCTGCTAAATAA）[51] が存在し、SaPI 伝播に関与する *int*, *pri*, *ter*, *cp* などの基本遺伝子が存在していた。また、ペニシリン結合タンパク質をコードする *ear* 遺伝子など複数のアクセサリー遺伝子が基本遺伝子の間に存在していた（表 8~11 及び図 10）。さらに、4 種の決定した 14 kb から 17 kb の塩基配列は、既知 SaPI の塩基配列を部分的に含み（図 10）、SaPI の基本構造を保有するが、NCBI のデータベース上には登録されていない塩基配列であった。以上の結果から、決定した配列は新規の SaPI 配列であると考えられ、SaPI の命名法 [50] に従い、それぞれ SaPITokyo12413（Tokyo12413 株の 8' 領域）、SaPITokyo11212（Tokyo11212 株の 19' 領域）、SaPITokyo12571（Tokyo12571 株の 18' 領域）、及び SaPITokyo12381（Tokyo12381 株の 18' 領域）とした。これらの新規 SaPI の内、SaPITokyo12413 と SaPITokyo11212 は既報の *seb* 配列と、SaPITokyo12571 と SaPITokyo12381 は既報の *sec*



配列及び *sel* 配列と 99%以上の相同性を持つ配列を保有し(表 8~11 及び図 10), Southern blotting の結果と一致していた。

個々の新規 SaPI の概略は以下の通りである。14,157 bp の SaPITokyo12413 (アクセッション番号: AB860415) は ORF を 20 個保有していた。それらの ORF は SaPI3, SaPI4, SaPIivm10, SaPIivm60 及び SaPIj50 などの既知 SaPI が保有する ORF と高い類似性があった(表 8 及び図 10)。16,725 bp の SaPITokyo11212 (アクセッション番号: AB860416) は 20 個の ORF を保有していた(表 9 及び図 10)。SaPITokyo11212 の全塩基配列は SaPIivm60 のそれと 92%一致していた。SaPITokyo11212 と SaPIivm60 の相違点として, SaPITokyo11212 の *seb* 遺伝子上流に 1,342 bp からなる Insertion sequence (IS256) が挿入されていた(表 9)。16,305 bp の SaPITokyo12571 (アクセッション番号: AB860417) と 15,419 bp の SaPITokyo12381 (アクセッション番号: AB860418) は, それぞれ 22 個, 20 個の ORF を保有していた。これら 2 つの SaPI は, 開始部から 16 番目の ORF までと *ear* 遺伝子以降の塩基配列が 99%一致していた。両 SaPI が保有する ORF は, SaPI3, SaPIin10, SaPImw2, SaPIj11 及び SaPIj50 などが保有する ORF と高い類似性があった(表 10, 11 及び図 10)。

### 3. 新規 SaPI と既知 SaPI が保有する *sel* 配列の比較

SaPImw2, SaPITokyo12381 及び SaPITokyo12571 が保有する *sel* 配列を比較した。SaPITokyo12381 の保有する *sel* 配列は他の SaPI が保有するそれと 99%一致していたが, 開始コドンの “A” から 249 番目の塩基 “A” が欠損していた。その結果, 欠損部位のすぐ下流に

フレームシフト変異による終止コドン“TAA”の出現が認められた (図 11)。

#### 4. 新規 SaPI における *rep-ori* site 領域の比較

新規 SaPI の複製過程で必須となる *rep* 遺伝子及び *ori* site の配列を比較した。Ubeda ら [74] の報告に基づき, *rep* 遺伝子と 3'側の ORF との間の領域を *ori* site とした。SaPITokyo11212 の *rep* 遺伝子及び *ori* site の配列は SaPIlivm60 のそれらと一致し, また SaPIbov1 のそれらとそれぞれ 97%, 92%の類似性が認められた (表 9)。SaPITokyo11212 の *ori* site 内には, 同方向反復配列 (GTACCC) が 6 回, 逆方向反復配列 (GGGTAC) が 4 回存在し, この反復配列は SaPIbov1 が持つイテロン配列と一致した (図 12A)。また, GC 含量の少ない領域 (AT-rich 領域) が, それらの反復配列に挟まれていた (図 13)。SaPITokyo12571 の *rep* 遺伝子及び *ori* site の配列は, SaPITokyo12381 のそれらと一致した。また, これら 2 種の SaPI の *rep* 遺伝子及び *ori* site の配列は, SaPI3 のそれらとそれぞれ 98%, 97%の類似性が認められた (表 10, 11)。SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381 の *ori* site 内には, 同方向反復配列 (A/AGACA) が 6 回, 逆方向反復配列 (TGTCTT) が 3 回存在し, この反復配列は SaPI3 が持つイテロン配列と一致した (図 12B)。また, AT-rich 領域が, それらの反復配列に挟まれていた (図 13)。SaPITokyo12413-ORF9 は SaPIj50 の *rep* 遺伝子と 98%の類似性があった (表 8)。一方で, SaPITokyo12413-ORF9 の 3'側近傍の *ori* site が位置する領域の塩基配列は, 90%以上の相同性を持つ既知 SaPI の配列が存在せず,

bacteriophage PT1028 内にのみ相同性を持つ配列が認められた（図 10）。また，本領域の配列長は，既知の *ori site* の長さ（300 bp）の約半分（170 bp）に過ぎなかった。この 170 bp の配列には，既報のイテロン配列 [74] は存在しなかったが，5 塩基以上の繰り返し配列を検索したところ，同方向反復配列（GGTTA）が 3 回，逆方向反復配列（TAACC）が 2 回存在していた（図 14）。

## 5. 新規 SaPI を保有する黄色ブドウ球菌株の SEs 産生量

供試 *S. aureus* 株の SaPI 関連 SEs タンパク質産生量を Sandwich ELISA を用いて測定した。既知及び本研究で同定した新規 *seb* 関連 SaPI を保有する全ての *S. aureus* 株は，培養液中に 80 µg/mL 以上の SEB タンパク質を産生した。特に，Tokyo11212 株の SEB タンパク質の産生量は，他の二株のそれと比較して有意に高かった（表 12）。一方で，*sec*，*sel* 関連 SaPI を保有する株は，それぞれ 20 µg/mL 以上の SEC タンパク質を産生していたが，SEL タンパク質は 1 µg/mL 以下であった。Tokyo12571 株の SEC タンパク質産生量は，既知 SaPI である SaPI68111 保有する対照株（Tokyo12709 株）のそれと同程度であったが，SEL タンパク質産生量は，Tokyo12709 株のそれと比較して有意に低かった。一方で，Tokyo12381 株の SEC タンパク質の産生量は，他の二株のそれと比較して有意に高かったが，SEL タンパク質の産生量は検出限界（20 ng/mL）以下だった（表 12）。

## 6. rRep の精製と *ori site* への特異的結合

新規 SaPI における Rep の機能を調べるため、大腸菌タンパク質発現系を用い、それぞれの新規 SaPI の組換え Rep タンパク質 (rRep) を作製した。SDS-PAGE 及び western blotting の結果、目的のサイズ (SaPITokyo12413-rRep : 62.7 kDa ; SaPITokyo11212-rRep : 64.8 kDa ; SaPITokyo12381-rRep : 55.0 kDa) に 6×ヒスチジンタグを持つ rRep を精製したことを確認した (図 15)。次にこれらの rRep を用い、各 SaPI が持つ Rep の *ori site* への結合活性をゲルシフトアッセイによって測定した。SaPITokyo11212-rRep と Cy5 標識 SaPITokyo11212-*ori site* 配列プローブを使用した結果、明確なバンドのシフトが認められ、少なくとも 5 つの異なる DNA-タンパク質複合体が確認された (図 16A)。DNA-タンパク質複合体形成量は、rRep の濃度依存的に増加した。同様の結果が SaPITokyo12381-rRep と Cy5 標識 SaPITokyo12381-*ori site* 配列プローブを使用した際にも認められた (図 16A)。一方で、SaPI が異なる組み合わせの rRep と *ori site* 配列プローブを使用した際、すなわち、SaPITokyo11212-rRep と Cy5 標識 SaPITokyo12381-*ori site* 配列プローブの組み合わせ、または SaPITokyo12381-rRep と Cy5 標識 SaPITokyo11212-*ori site* 配列プローブの組み合わせで使用した際には、バンドのシフトは認められなかった (図 16B)。SaPITokyo11212-rRep 及び SaPITokyo12381-rRep のバンドのシフトは、Cy5 標識 *ori site* 配列プローブと同一の DNA 配列を持つ 10 倍量の Cy5 未標識 *ori site* 配列プローブを添加することで阻害された (図 16C)。一方で、SaPITokyo11212-rRep や SaPITokyo12381-rRep でゲルシフトが確実に認められる量 (500 ng 以上) の SaPITokyo12413-rRep を、Cy5 標識予測 *ori site* 配列 (前述の 170 bp 配列) プローブに添加した際には、明確なバンドのシフト

は認められなかった（図 16A）。同様に，SaPITokyo12413-rRep を *rep* 遺伝子から離れた部分の配列（7,769 bp から 8,340 bp）プローブに添加した際においても，バンドのシフトは認められなかった（図 16A）。

## 7. rRep のヘリカーゼ活性

上記の rRep について蛍光ヘリカーゼアッセイを用い，DNA ヘリカーゼ活性を測定した。SaPITokyo11212-rRep のヘリカーゼ活性は，SaPITokyo11212-rRep の濃度依存的にその活性が高くなった（図 17A）。同様の結果が SaPITokyo12381-rRep を使用した際にも認められた（図 17B）。対照的に SaPITokyo12413-rRep では，1  $\mu$ M 以上の高濃度の同タンパク質存在下でも，ヘリカーゼ活性を認めることができなかった（図 17C）。SaPITokyo11212-rRep 及び SaPITokyo12413-rRep の同濃度間におけるヘリカーゼ反応速度を比較したところ，SaPITokyo11212-rRep の反応速度は，300 nM 以上の濃度において SaPITokyo12413-rRep のそれと比べ有意に高かった（図 17D）。

## 考察

*S. aureus* の株間における SaPI の水平伝播，及びそれに伴う病原遺伝子の伝播は，*S. aureus* の病原体としての起病性や分子遺伝学的特性の変化といった点で重要な役割を担っている。本章では，食中毒事例由来 *S. aureus* 株から SE をコードする 4 つの新たな SaPI を同定

した。これらは SaPI の基本遺伝子を保存し、それぞれが既知 SaPI の配列を部分的に含むモザイク様の構造をとっていることが明らかとなった (図 10)。このような構造を有する SaPI に関して、Yarwood ら [82] は、全ての SaPI には原型が存在し、一定の DNA の大ききで相同組換えを起こし続けることで SaPI の多様性を生み出すという仮説を提唱している。本研究では、SaPITokyo12571 は SaPIj50, SaPI3, SaPIj11, SaPImw2 などの部分的な配列を含んでいた (図 10)。また、SaPITokyo12571 の *sec* 及び *sel* 遺伝子が存在する病原性に関与する領域は、既報の SaPI の内 SaPImw2 が持つ領域と最も高い類似性を示した (表 10)。これら事実を Yarwood らの仮説で説明すると、SaPITokyo12571 は、連続した相同組換えの結果生じたモザイク構造を持つ SaPI であることが考えられた。また、SaPITokyo12571 の病原性に関与する領域は、相同組換えを通して SaPITokyo12571 と SaPImw2 のどちらか一方の SaPI が、もう一方の SaPI から直接この病原性に関与する領域を獲得したか、もしくは SaPITokyo12571 と SaPImw2 は、両者に共通する祖先の SaPI からこの病原性に関与する領域を獲得したということが推察された。

食品中に産生された古典的 SEs (SEA, SEB, SEC, SED 及び SEE) を、数十 ng から数千 ng 経口摂取した場合に食中毒が発生することが報告されている [10, 11, 22, 35, 52, 59]。本研究で同定した新規 SaPI を保有する *S. aureus* 株の SE 産生量解析の結果、各菌株でその産生量が異なったが、全ての新規 SaPI 保有 *S. aureus* 株は、培養液 1 mL 当たりで上述の発症毒素量を超える SEB もしくは SEC を産生し、過去の食中毒由来で既知 SaPI を保有する対照株と同等以上の SE 産生能を持つことを確認した (表 12)。温度、pH、水分活性等の

違いにより *S. aureus* 株の SE 産生量は変化するため、培養液中の SE 産生量を単純に食品中の SE 産生量に外挿することはできないとされる [52, 67] が、新規 SaPI を保有する *S. aureus* 株は食中毒を起こす原因と成り得ると考えられ、これら新規 SaPI の獲得が、*S. aureus* 株の食中毒の起病性に大きく関与することが示唆された。

Tokyo11212 株の SEB 産生量は、他の株のそれと比較して有意に高かった（約 2.5 倍、表 12）。このことの原因の一つとして、*seb* 遺伝子の上流にある配列の影響が考えられる。すなわち、SaPITokyo11212 では、IS256 が *seb* 翻訳開始点の 172 bp 上流に挿入されていた。IS256 は、ゲノム上の様々な場所に転移することで、下流の遺伝子発現に影響を与えることが報告されている。例えば、発現抑制遺伝子配列内に挿入しその機能を停止させたり、遺伝子の上流に IS256 が挿入した結果、当該遺伝子の発現を正に増強するハイブリッドプロモーターを形成することなどが知られている [30, 45]。これらの事実から、Tokyo11212 株は IS256 の挿入により SEB の発現が増強されている可能性が考えられた。SaPITokyo12381 の *sel* 配列は他の SaPI の *sel* 配列と 99%一致したが（表 11）、Tokyo12381 株の SEL 産生量は検出限界以下であった（表 12）。このことはフレームシフト変異によって生じた終止コドンの出現に起因するものと考えられる（図 11）。すなわち、SaPITokyo12381 における *sel* 様配列は偽遺伝子として存在していた。これら SEB や SEL のように、それぞれの SaPI が持つ配列の相違が、各 *S. aureus* 株の SE 産生性の強度に影響することが推測された。

SaPI の伝播性を解析することは、SE 遺伝子の拡散様式や *S. aureus* の分子遺伝学的特性の変化を理解する上で重要となる。SaPI 配列の



複製は伝播における重要な過程の一つである。Rep 及び *ori site* はその複製過程に必須であり、各 SaPI の保有する Rep は特定の *ori site* を認識することで機能することが知られている[51, 74]。本章では、同定した新規 SaPI に保有される *rep* 遺伝子及び *ori site* について興味深い知見が得られた。SaPITokyo11212 の *rep* 遺伝子及び *ori site* の配列は、既報の SaPI である SaPIivm60, SaPIbov1 のそれらと高い類似性があった（表 9）。これら 3 つの SaPI の *ori site* には共通して “GTACCC” のイテロン配列と AT-rich 領域が保存されていた（図 12, 13）。また、SaPITokyo12381, SaPITokyo12571 及び SaPI3 間における *rep* 遺伝子及び *ori site* の配列は類似し、これら 3 つの SaPI の *ori site* には共通して “A/ AGACA” のイテロン配列と AT-rich 領域が保存されていた（表 10, 11 及び図 12, 13）。これらの結果から、SaPITokyo11212, SaPIivm60 及び SaPIbov1 の 3 種の SaPI と SaPITokyo12381, SaPITokyo12571 及び SaPI3 の 3 種の SaPI は、SaPI の多様性が生み出される過程において、各グループに特異的な複製単位を獲得したことが示唆された。Ubeda ら [74] は、複数種類ある *ori site* の内、同一の Rep により認識される *ori site* が存在することを明らかにし、それら同一の *ori site* を認識する Rep を 9 種類に分類している（RepA-RepI）。この分類に従うと、SaPITokyo11212 を含む前者のグループが持つ Rep は RepB に、SaPITokyo12381 を含む後者のグループが持つ Rep は RepA に属するものであった。これらの新規 SaPI が保有する Rep が、SaPI 複製のイニシエーターとして機能しているかを確認するため、rRep を作製しその活性を調べた。ゲルシフトアッセイの結果 SaPITokyo11212-rRep と SaPITokyo12381-rRep は、同じ SaPI が持つ *ori site* 配列に結合したが、



異なる SaPI の持つ *ori site* 配列には結合しなかった(図 16A, 16B)。また, SaPITokyo11212-rRep と SaPITokyo12381-rRep は, 濃度依存的なヘリカーゼ活性を示した(図 17)。以上の結果から, 既知 SaPI が保有する Rep と同様に SaPITokyo11212-Rep 及び SaPITokyo12381-Rep は特定の *ori site* 配列を認識し, ヘリカーゼ活性を有する複製開始タンパク質として機能することが明らかとなった。

アノテーションの結果から予測された SaPITokyo12413 の *rep* 遺伝子と *ori site* は特徴的な配列であった。すなわち, SaPITokyo12413-ORF9 は SaPIj50 の *rep* 遺伝子と 98%の相同性が認められたが(表 8), *ori site* の長さが既知の *ori site* の約半分(170 bp)であった。この予測 *rep* 遺伝子は, Ubeda らが分類した Rep グループのいずれにも属さなかった。一方, この 170 bp の配列は bacteriophage PT1028 の配列内に類似性の高い部分を認めた(図 14)。しかしながら, bacteriophage PT1028 の *rep* 遺伝子及び *ori site* の領域は, 当該の 170 bp の配列の上流に位置しており, *ori site* の存在部位が異なっていた。さらに, 170 bp の配列の中には既報のイテロン配列が存在しなかったが, イテロン配列である可能性のある “GGTTA” という短い反復配列が存在していた(図 14)。これらの事実から, SaPITokyo12413-ORF9 が *rep* 遺伝子であり, SaPITokyo12413 内の 170 bp の配列は新規の *ori site* であることが推測されたため, SaPITokyo12413-ORF9 の塩基配列を基に作製した rRep を用いたアッセイでこの仮説を検証した。しかし, SaPITokyo12413-rRep は *ori site* と疑われた配列(前述の 170bp 配列)に対して明確な結合活性を保持していないことが判明した(図 16A)。加えて, SaPITokyo12413-rRep は明確なヘリカーゼ活性を示さな

った（図 17）。これらの結果から、上述の仮説は支持されず、SaPITokyo12413-Rep は複製開始タンパク質としての機能を保持していないことが明らかとなった。

SaPITokyo12413 の *rep* 遺伝子と予測された SaPITokyo12413-ORF9 の配列全長を NCBI のデータベース内で検索したところ、SaPIj50 の *rep* 遺伝子以外で相同性のある遺伝子は存在しなかった。部分的な配列を検索したところ、この ORF9 の後ろ半分の配列が、bacteriophage PT1028 配列と一致した（図 10）。しかし、この類似性の高い配列は、bacteriophage PT1028 の複製に関与する *rep* 遺伝子及び *ori* site とは一致せず、機能不明とされる bacteriophage PT1028-ORF12 の後半と一致した。これらの事実から、SaPITokyo12413-ORF9 は、2 種類の ORF の中間部分で相同組換えが起こって形成された ORF であることが推測された。すなわち、SaPITokyo12413-ORF9 は、機能不明のタンパク質あるいは機能を持たないタンパク質の可能性がある。結果として SaPITokyo12413 は、相同組換えの過程において複製を担う *rep* 遺伝子及び *ori* site を欠失し、複製機能を持たないことが考えられ、伝播性を失っていることが推測された。

以上、本章では、食中毒由来 *S. aureus* 株から SEs をコードする 4 つの新規 SaPI を同定し、その特徴に関して新たな知見を得た。全ての新規 SaPI 保有 *S. aureus* 株は、既知の SEs 関連 SaPI を保有する対照株と比較して同等もしくは有意に高い SE 産生能を示し、ブドウ球菌食中毒を起こす原因と成り得ることが示唆された。また、“SaPI 複製”の過程において、SaPITokyo11212、SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381 は既知 SaPI と同様に複製に関与する機能を保持し

ていることを確認した。しかし SaPITokyo12413 は、複製開始タンパク質や複製開始点が保存されていなかったため、SaPI を複製する能力を欠失していることが明らかとなった。この複製能力の欠失は、SaPITokyo12413 の伝播能力の低下あるいは欠如の原因になるものだと推測される。以上の結果は、SaPI は、それ自体の伝播能力によって、*S. aureus* 株に対し食中毒起病性の獲得といった分子遺伝学的特性の変化を起こす一方で、伝播能力を失っていくという独自の分子遺伝学的特性を保有していることを示唆するものである。

表 5. 本章で使用した菌株

菌株名	SEs 遺伝子型	由来	特徴
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Tokyo11212	<i>sea seb</i>	食中毒事例の患者糞便由来	
Tokyo12381	<i>sea sec sel</i>	食中毒事例の患者嘔吐物由来	
Tokyo12413	<i>sea seb</i>	食中毒事例の患者糞便由来	
Tokyo12571	<i>sec seg sei sel sem sen seo</i>	食中毒事例の患者嘔吐物由来	
Tokyo12709	<i>sec seg sei sel sem sen seo</i>	食中毒事例の患者糞便由来	SaPI68111 保有株
Tokyo12954	<i>seb seh</i>	食中毒事例の患者糞便由来	SaPIno10 保有株
<i>Escherichia coli</i>			
DH5 $\alpha$	—	Promega 社	
BL21(DE3)	—	Merck 社	

太字は SaPI 関連 SE 遺伝子を示す。

表 6. 本章で使用したプラスミド

プラスミド名	特徴	由来
pGEM-3Zf(+)	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	Promega 社
pGEM-T easy	Ap <sup>r</sup> , TA cloning vector	Promega 社
pET-15b	Ap <sup>r</sup> , Histidine tag fusion expression vector	Merck 社
pKOB	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with <i>seb</i>	重茂ら <sup>††</sup>
pKOC	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with <i>sec</i>	重茂ら <sup>††</sup>
pKOL	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with <i>sel</i>	重茂ら <sup>††</sup>
pGTR212	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPI <sup>*</sup> Tokyo11212-ORF <sup>†9</sup>	本研究
pGTR413	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPITokyo12413-ORF9	本研究
pGTR381/571	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPITokyo12381/SaPITokyo12571-ORF8	本研究
pGTO212	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPITokyo11212 sequence (7765 bp - 8093 bp)	本研究
pGTO413	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPITokyo12413 sequence (6016 bp - 6185 bp)	本研究
pGTO381/571	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPITokyo12381/SaPITokyo12571 sequence (5708 bp - 6007 bp)	本研究
pGTN413	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing SaPITokyo12413 sequence (7769 bp - 8340 bp)	本研究
pER212	Ap <sup>r</sup> , pET-15b with SaPITokyo11212-ORF9	本研究

pER413 Ap<sup>r</sup>, pET-15b with SaPITokyo12413-ORF9 本研究

pER381/571 Ap<sup>r</sup>, pET-15b with SaPITokyo12381/SaPITokyo12571-ORF8 本研究

---

\*SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

†ORF : Open reading frame

‡重茂ら：重茂克彦教授及び小野久弥博士（岩手大学）から分与されたプラスミド

表 7. 本章で使用したオリゴヌクレオチド

目的	遺伝子名もしくは位置	オリゴ名	配列 (5'→3')	制限酵素	標識
Cloning	SaPI_Tokyo11212-ORF <sup>†</sup> 9	ST212REPIF	TACATA <u>TGGAAA</u> CAGGTAAAAGTGATGTAC	<i>Nde</i> I	
		ST212REPI710R	TAGGAT <u>TCCTCA</u> ATAATCAGAAATTAGGATTA	<i>Bam</i> HI	
	SaPI_Tokyo12413-ORF9	ST413REPIF	TACATA <u>TGGACG</u> AAAGTATCACCTTATATAAAA	<i>Nde</i> I	
		ST413REP1614R	TAGGAT <u>CCCTAA</u> TCAATTAATTAATCTAAA	<i>Bam</i> HI	
	SaPI_Tokyo12381/SaPI_Tokyo12571-ORF8	ST381REPIF	TACATA <u>TGATTG</u> ATAGCAGAAACCGGTG	<i>Nde</i> I	
		ST381REP1425R	TAGGAT <u>CCCTAAA</u> ACTTTAAGTTTCTGATAA	<i>Bam</i> HI	
	SaPI_Tokyo11212 sequence (7765 bp - 8093 bp)	ST212ORIIF	TAAAGTACCCATCGGTACCCGGTTGAG		
		ST212ORI329R	GTGTAACCTCCAGAAATAAATTTG		
	SaPI_Tokyo12413 sequence (6016 bp - 6185 bp)	ST413ORIIF	GGTTAGAAAATAA <u>ACTCTT</u> GCTAA		
		ST413ORI171R	TGAACTCCTCCTTTTAA <u>AAACTAA</u>		
SaPI_Tokyo12381/SaPI_Tokyo12571 sequence (5708 bp - 6007 bp)	ST381ORIIF	ACATCTTA <u>TTTTTT</u> AGGACAGTAAG			
	ST381ORI300R	TTTTCTCCTCCTAAATTTTGTAGGTG			
SaPI_Tokyo12413 sequence (7769 bp - 8340 bp)	ST413-7769F	GTTGAGGGATTA <u>AAAAATTAG</u> TAAC			
	ST413-8340R	TTCTACACCTCCTTTCTTTTAA			
Insert check	pUC/M13 Forward sequencing primer binding site	M13F	CGCCAGGGTTTTTCC <u>CCAGTCA</u> CGAC		
	pUC/M13 Reverse sequencing primer binding site	M13R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC		

T7 promoter site	T7UP	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7 terminator site	T7TER	GCTAGTTAATTGCTCAGCGG	
Mobility-shift Assay	T7UP	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7 promoter site	T7UP-Cy5	TAATACGACTCACTATAGGG	5' Cy5-labeled
Helicase Assay	Fluorescent strand	TAGTACCGCCACCCTCAGAAACCTTTTTTTTTTTTTT	5' Cy3-labeled
	Quencher strand	GGTTCTGAGGGTGGCGGTACTA	3'BHQ2-labeled
	Capture strand	TAGTACCGCCACCCTCAGAAACC	

下線部は各制限酵素の認識配列を示す。

\*SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

†ORF : Open reading frame



表 8. SaPITokyo12413 が持つ Open reading frame の特徴

	類似する ORF を持つ既知 SaPI			類似する ORF の塩基配列に対する相同性 (%)		att 配列と各 ORF の特徴 <sup>s</sup>	その他
	開始部	終止部	長さ	遺伝子名	類似する ORF の塩基配列に対する相同性 (%)		
(Repeat)	1	18	18			att 配列 (AAAGAAGAACAATAATAT)	
SaPI <sup>†</sup> Tokyo12413-ORF <sup>†</sup> 1	247	1080	834	hypothetical	SaPI4	99% (partial <sup>†</sup> )	similar to PemK like protein (99%, partial)
SaPITokyo12413-ORF2	1081	2295	1215	<i>int</i>	SaPI4	99%	
SaPITokyo12413-ORF3	2465	3079	615	<i>stl</i>	SaPI4	99%	
SaPITokyo12413-ORF4	3174	3392	219	<i>str</i>	SaPI4	98%	
SaPITokyo12413-ORF5	3393	3665	273	<i>xis</i>	SaPI3	86%	
SaPITokyo12413-ORF6	3656	3823	168	hypothetical	SaPI3	91%	similar to SaPI3ORF16
SaPITokyo12413-ORF7	3816	4025	210	hypothetical	SaPI3	99%	similar to SaPI3ORF15
SaPITokyo12413-ORF8	4028	4327	300	hypothetical	SaPIivm10	95% (partial)	similar to SaPIivm10ORF10
SaPITokyo12413-ORF9	4402	6015	1614	hypothetical	SaPIj50	98%	similar to SAI10131_00383 in T0131 (94%) similar to replication initiator ( <i>rep</i> ) in SaPIj50 <sup>†</sup>
SaPITokyo12413-ORF10	6186	6989	804	<i>pri</i>			similar to bifunctional DNA primase/polymerase N-terminal domain protein in bacteriophage PT1028 (96%)
SaPITokyo12413-ORF11	6976	7248	273	hypothetical	SaPIj50	98%	similar to SaPIj50ORF
SaPITokyo12413-ORF12	7250	7768	519	hypothetical	SaPIj50	99% (partial)	similar to SaPIj50ORF

SaPITokyo12413-ORF13	8341	8682	342	<i>cp1</i>	SaPivm10	99%
SaPITokyo12413-ORF14	8694	9272	579	<i>cp2</i>	SaPI2	99%
SaPITokyo12413-ORF15	9290	9508	219	<i>cp3</i>	SaPivm60	100%
SaPITokyo12413-ORF16	9559	10086	528	<i>cp4</i>	SaPivm10	98%
SaPITokyo12413-ORF17	10089	10430	342	<i>cp5</i>	SaPIj11	98%
SaPITokyo12413-ORF18	10427	10996	570	<i>ter</i>	SaPivm10	99%
SaPITokyo12413-ORF19	11304	12104	801	<i>seb</i>	SaPivm10	99%
SaPITokyo12413-ORF20	12182	12739	558	<i>ear</i>	SaPivm10	94%
(Repeat)	14140	14157	18			

identical to C427; beta-lactamase (100%)  
att 配列 (AAAAGAAGAAACAATAATAT)

\*SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

†ORF : Open reading frame

‡partial : 既知 ORF の塩基配列と比較した際、その全長ではなく部分的な相同性の割合

§各 ORF の特徴 : SaPITokyo12413 が保有する ORF と類似性の高い ORF の名称、もしくは SaPITokyo12413 が保有する ORF の塩基配列を基に翻訳されると予測されるタンパク質の名称とそのアミノ酸配列の相同性の割合 (%) を示す。括弧内に partial の記載があるものは、アミノ酸配列の部分的な相同性の割合を示す

¶similar to replication initiator (*rep*) in SaPIj50 : SaPITokyo12413-ORF9 の塩基配列が、SaPIj50 の *rep* 遺伝子の塩基配列と 98%の相同性があることを示す。

表 9. SaPITokyo11212 が持つ Open reading frame の特徴

	類似する ORF を持つ既知 SaPI			類似する ORF の塩基配列に対する相同性 (%)		att 配列と各 ORF の特徴 <sup>§</sup>	その他
	開始部	終止部	長さ	遺伝子名	塩基配列		
(Repeat)	1	17	17			att 配列 (TTAATTCCTGCTAAATAA)	
SaPI <sup>†</sup> Tokyo11212-ORF <sup>†</sup> 1	160	1404	1245	SaPIivm60	99%		
SaPITokyo11212-ORF2	1394	2782	1389	hypothetical SaPIivm60	100%	identical to SaPIivm60ORF2	
SaPITokyo11212-ORF3	2809	3381	573	SaPIivm60	100%		
SaPITokyo11212-ORF4	3553	3774	222	hypothetical			
SaPITokyo11212-ORF5	3775	4047	273	hypothetical			
SaPITokyo11212-ORF6	4404	4787	384	hypothetical SaPIivm60	100%	identical to SaPIivm60ORF4	
SaPITokyo11212-ORF7	4788	5105	318	hypothetical SaPIivm60	100%	identical to SaPIivm60ORF5	
SaPITokyo11212-ORF8	5172	6041	870	SaPIlhm2	99%	similar to SaPIlhm2ORF6	
SaPITokyo11212-ORF9	6055	7764	1710	SaPIivm60	100%		similar to SaPIbovl- <i>rep</i> (97%) <sup>†</sup>
( <i>ori</i> site <sup>‡</sup> )	7765	8064		SaPIivm60	100%		similar to SaPIbovl- <i>ori</i> site (92%) <sup>**</sup>
SaPITokyo11212-ORF10	8094	8474	381	SaPIivm60	100%		
SaPITokyo11212-ORF11	8471	9112	642	hypothetical SaPIivm60	100%	identical to SaPIivm60ORF9	
SaPITokyo11212-ORF12	9629	9970	342	SaPIivm60	100%		
SaPITokyo11212-ORF13	9982	10560	579	SaPIivm60	100%		

SaPITokyo11212-ORF14	10578	10769	219	<i>cp3</i>	SaPlivm60	100%
SaPITokyo11212-ORF15	10799	11374	576	<i>cp4</i>	SaPlivm60	100%
SaPITokyo11212-ORF16	11377	11718	342	<i>cp5</i>	SaPlivm60	100%
SaPITokyo11212-ORF17	11715	12284	570	<i>ter</i>	SaPlivm60	100%
SaPITokyo11212-ORF18	12479	13651	1173	<i>tmp</i>		transposase for insertion sequence (IS256)
SaPITokyo11212-ORF19	13924	14724	801	<i>seb</i>	SaPlivm60	100%
SaPITokyo11212-ORF20	14802	15359	558	<i>ear</i>	SaPlivm60	100%
(Repeat)	16709	16725	17			att 配列 (TTATTCTTGCTAAATAA)

\*SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

†ORF : Open reading frame

‡*ori* site : 複製開始点

§各 ORF の特徴 : SaPITokyo11212 が保有する ORF と類似性の高い ORF の名称, もしくは SaPITokyo11212 が保有する ORF の塩基配列を基に翻訳されると予測されるタンパク質の名称を示す。

¶similar to SaPIbov1-*rep* (97%) : SaPITokyo11212-ORF9 の塩基配列が, SaPIbov1 の *rep* 遺伝子の塩基配列と 97%の相同性があることを示す。

\*\* similar to SaPIbov1-*ori* site (92%) : SaPITokyo11212 の *ori* site 配列が, SaPIbov1 の *ori* site 配列と 92%の相同性があることを示す。

表 10. SaPITokyo12571 が持つ Open reading frame の特徴

	開始部	終止部	長さ	遺伝子名	類似する ORF を持つ		att 配列と各 ORF の特徴*
					既知 SaPI	類似する ORF の塩基配列に 対する相同性 (%)	
(Repeat)	1	15	15				att 配列 (TCCCGCCGCTCCAT)
SaPI*Tokyo12571-ORF1	128	1234	1107	<i>int</i>	SaPj50	97%	
SaPITokyo12571-ORF2	1224	2027	804	hypothetical			identical to T1031; SAT0131_00856 (100%)
SaPITokyo12571-ORF3	2163	2366	204	hypothetical			identical to T1031; SAT0131_00857 (100%)
SaPITokyo12571-ORF4	2402	2620	219	<i>str</i>	SaPfishikawa11	99%	identical to T1031; SAT0131_00858 (100%)
SaPITokyo12571-ORF5	2771	2980	210	hypothetical	SaP3	98%	similar to SaP3ORF15
SaPITokyo12571-ORF6	2983	3300	318	hypothetical	SaPihirosaki4	99%	similar to SaPihirosaki4ORF5
SaPITokyo12571-ORF7	3364	4233	870	<i>pri</i>	SaPIno10	96%	
SaPITokyo12571-ORF8	4283	5707	1425	<i>rep</i>	SaP3	98%	
( <i>ori</i> site*)	5708	6007			SaP3	97%	
SaPITokyo12571-ORF9	6008	6370	363	<i>ppi</i>	SaP3	99%	
SaPITokyo12571-ORF10	6372	6656	285	hypothetical	SaPIno10	99%	similar to SaPIno10ORF9
SaPITokyo12571-ORF11	6653	7294	642	hypothetical	SaPj11	96%	similar to SaPj11ORF15
SaPITokyo12571-ORF12	8003	8347	345	<i>cp1</i>	SaPj11	99%	
SaPITokyo12571-ORF13	8382	8960	579	<i>cp2</i>	SaPj11	99% (partial <sup>§</sup> )	identical to 21305; SA21305_0540 (100%)

SaPITokyo12571-ORF14	8960	9136	177	<i>cp3</i>			identical to 21305; SA21305_0539 (100%)
SaPITokyo12571-ORF15	9189	9716	528	<i>cp4</i>	SaPI3	98%	
SaPITokyo12571-ORF16	9719	10060	342	<i>cp5</i>	SaPIj50	99%	
SaPITokyo12571-ORF17	10057	10425	369	<i>ter</i>			identical to 21305; SA21305_0536 (100%)
SaPITokyo12571-ORF18	10731	11771	1041	hypothetical			similar to 21305; SA21305_0534 (99%)
SaPITokyo12571-ORF19	12065	12733	669	hypothetical			identical to 21305; SA21305_0532 (100%)
SaPITokyo12571-ORF20	12954	13508	555	<i>ear</i>	SaPI4	99%	similar to restriction endonuclease (100%)
SaPITokyo12571-ORF21	14292	15092	801	<i>sec</i>	SaPImw2	99%	
SaPITokyo12571-ORF22	15259	15981	723	<i>sel</i>	SaPImw2	99%	
(Repeat)	16291	16305	15				att 配列 (TCCCGCCGTCCTCCAT)

\*SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

†ORF : Open reading frame

‡*ori* site : 複製開始点

§partial : 既知の ORF の塩基配列と比較した際、その全長ではなく部分的な相同性の割合

¶各 ORF の特徴 : SaPITokyo12571 が保有する ORF と類似性の高い ORF の名称、もしくは SaPITokyo12571 が保有する ORF の塩基配列を基に翻訳されると予測されるタンパク質の名称とそのアミノ酸配列の相同性の割合 (%) を示す。

表 11. SaPITokyo12381 が持つ Open reading frame の特徴

	開始部		長さ	遺伝子名	類似する ORF を持つ既知 SaPI		類似する ORF の塩基配列に対する同一性 (%)	att 配列と各 ORF の特徴 <sup>a</sup>	その他
	1	15			15	15			
( Repeat )	1	15	15					att 配列 ( TCCCGCCGTCCTCCAT )	
SaPITokyo12381-ORF1	128	1234	1107	<i>int</i>	SaPij50	97%			
SaPITokyo12381-ORF2	1224	2027	804	hypothetical			identical to T1031; SAT0131_00856 ( 100% )		
SaPITokyo12381-ORF3	2163	2366	204	hypothetical			identical to T1031; SAT0131_00857 ( 100% )		
SaPITokyo12381-ORF4	2402	2620	219	<i>str</i>	SaPliShikawa11	99%	identical to T1031; SAT0131_00858 ( 100% )		
SaPITokyo12381-ORF5	2771	2980	210	hypothetical	SaPI3	98%	similar to SaPI3ORF15		
SaPITokyo12381-ORF6	2983	3300	318	hypothetical	SaPihirosaki4	99%	similar to SaPihirosaki4ORF5		
SaPITokyo12381-ORF7	3364	4233	870	<i>pri</i>	SaPIno10	96%			
SaPITokyo12381-ORF8	4283	5707	1425	<i>rep</i>	SaPI3	98%			
( <i>ori site</i> <sup>b</sup> )	5708	6007			SaPI3	97%			
SaPITokyo12381-ORF9	6008	6370	363	<i>ppi</i>	SaPI3	99%			
SaPITokyo12381-ORF10	6372	6656	285	hypothetical	SaPIno10	99%	similar to SaPIno10ORF9		
SaPITokyo12381-ORF11	6653	7294	642	hypothetical	SaPij11	96%	similar to SaPij11ORF15		
SaPITokyo12381-ORF12	8004	8348	345	<i>cp1</i>	SaPij11	99%			
SaPITokyo12381-ORF13	8383	8961	579	<i>cp2</i>	SaPij11	99% ( partial <sup>§</sup> )	identical to 21305; SA21305_0540 ( 100% )		

SaPITokyo12381-ORF14 8961 9137 177 *cp3* identical to 21305; SA21305\_0539 ( 100% )

SaPITokyo12381-ORF15 9190 9717 528 *cp4* SaPI3 98%

SaPITokyo12381-ORF16 9720 10061 342 *cp5* SaPI<sub>no10</sub> 99%

SaPITokyo12381-ORF17 10058 10627 570 *ter* SaPI<sub>no10</sub> 100%

SaPITokyo12381-ORF18 10904 11872 969 hypothetical SaPI<sub>no10</sub> identical to CAAX protease ( 100% )

SaPITokyo12381-ORF19 12069 12623 555 *ear* SaPI4 99%

SaPITokyo12381-ORF20 13362 14207 801 *sec* SaPI<sub>mw2</sub> 99%

similar to *sel* in SaPI<sub>mw2</sub>

putative frameshift mutation because of deletion at 14843th "T"

( Repeat ) 15405 15419 15 att 配列 ( TCCCGCCGCTCCCAT )

---

### \*SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

†ORF : Open reading frame

‡*ori* site : 複製開始点

§partial : 既知の ORF の塩基配列と比較した際、その全長ではなく部分的な相同性の割合

¶各 ORF の特徴 : SaPITokyo12381 が保有する ORF と類似性の高い ORF の名称、もしくは SaPITokyo12381 が保有する ORF の塩基配列を基に翻訳されると予測されるタンパク質の名称とそのアミノ酸配列の相同性の割合 (%) を示す。

\*\* putative frameshift mutation because of deletion at 14843th "T" : SaPITokyo12381 の 14374 bp から 15095 bp までの塩基配列が、SaPI<sub>mw2</sub> の *sel* 遺伝子の塩基配列と 99%の相同性があるが、14843 番目の塩基 "T" が欠損しフレームシフト変異が起きていることを示す。



表 12. 新規 SaPI を保有する *S. aureus* 株における Staphylococcal enterotoxin の産生量

菌株名	保有する SaPI <sup>†</sup>	SEB 産生量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SEC 産生量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SEL 産生量 ( $\text{ng/mL}$ )
Tokyo12413	SaPITokyo12413	$82.6 \pm 2.9^*$		
Tokyo11212	SaPITokyo11212	$201.8 \pm 52.8^{**}$		
Tokyo12954	SaPIIno10	$80.6 \pm 7.8^*$		
Tokyo12381	SaPITokyo12381		$52.3 \pm 1.6^{**}$	Not detected <sup>*</sup>
Tokyo12571	SaPITokyo12571		$23.2 \pm 2.2^*$	$56.1 \pm 8.7^{**}$
Tokyo12709	SaPI68111		$30.4 \pm 2.8^*$	$149.3 \pm 18.5^{***}$

実験は独立した 3 回の試行で実施した。各株の産生量は 3 回の平均値  $\pm$  標準偏差で示している。

表中のアスタリスクの数 (\*, \*\*, \*\*\*) は, *S. aureus* 株間の各 SE 産生量に有意差があることを示す ( $p < 0.01$ )。

<sup>†</sup>SaPI : *Staphylococcus aureus* pathogenicity island

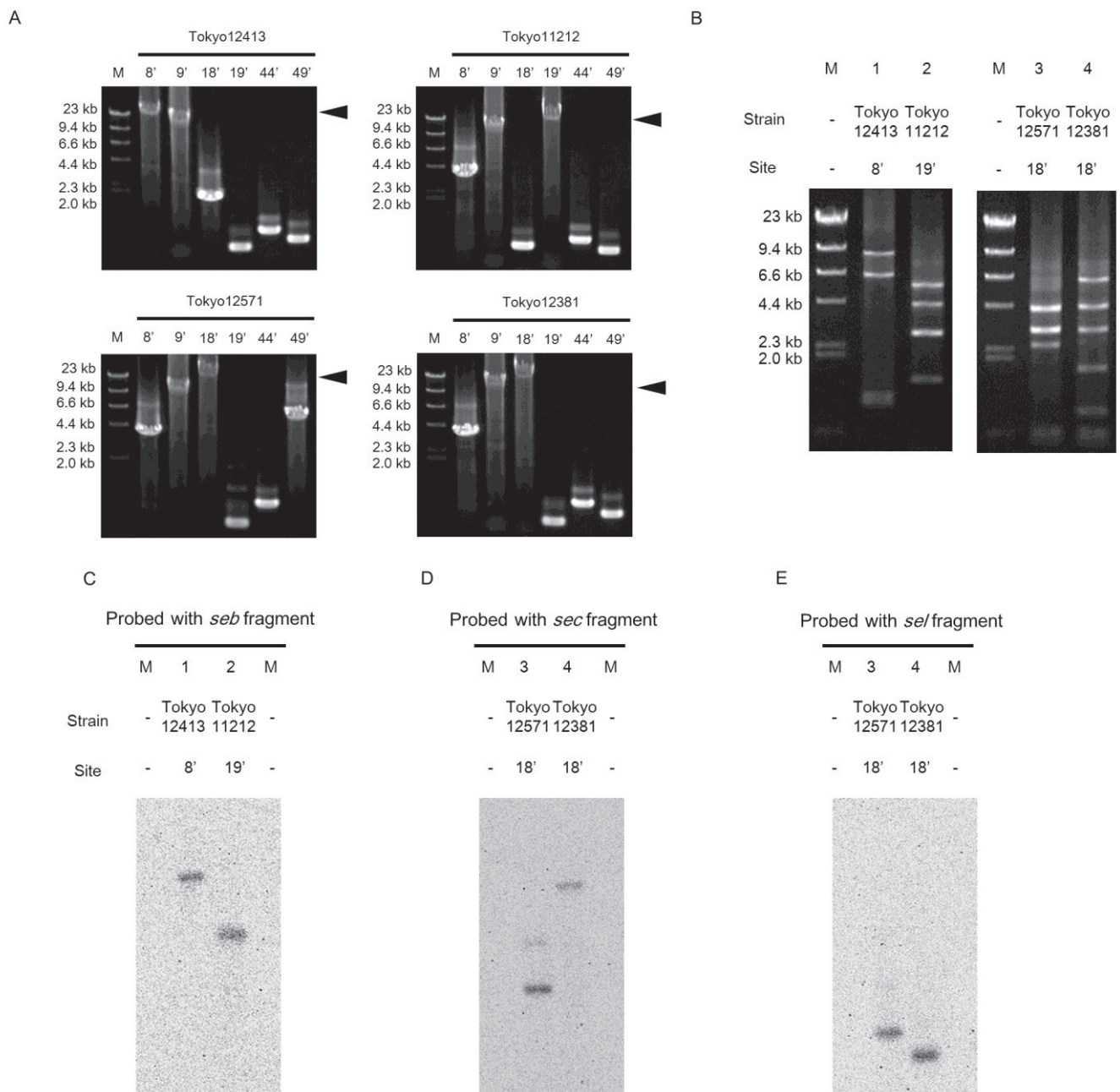


図 9. Staphylococcal enterotoxin遺伝子を保有するLong and accurate-PCR増幅産物の同定

(A) *S. aureus* 4株 (Tokyo12413, Tokyo11212, Tokyo12571, Tokyo12381) の各SaPI挿入可能領域におけるLong and accurate (LA) - PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動図 矢頭はSaPIが含まれると予測される10 kb以上の増幅産物 (長鎖LA-PCR増幅産物) を示す。

(B) 長鎖LA-PCR増幅産物のRFLPパターン 制限酵素は*Hind*IIIを使用した。M: DNAサイズマーカー (C, D, E) 長鎖LA-PCR増幅産物のSouthern blotting解析 制限酵素は*Hind*IIIを使用した。“C”では *seb*プローブ, ”D”では*sec*プローブ, ”E”では*sel*プローブをそれぞれ使用した。

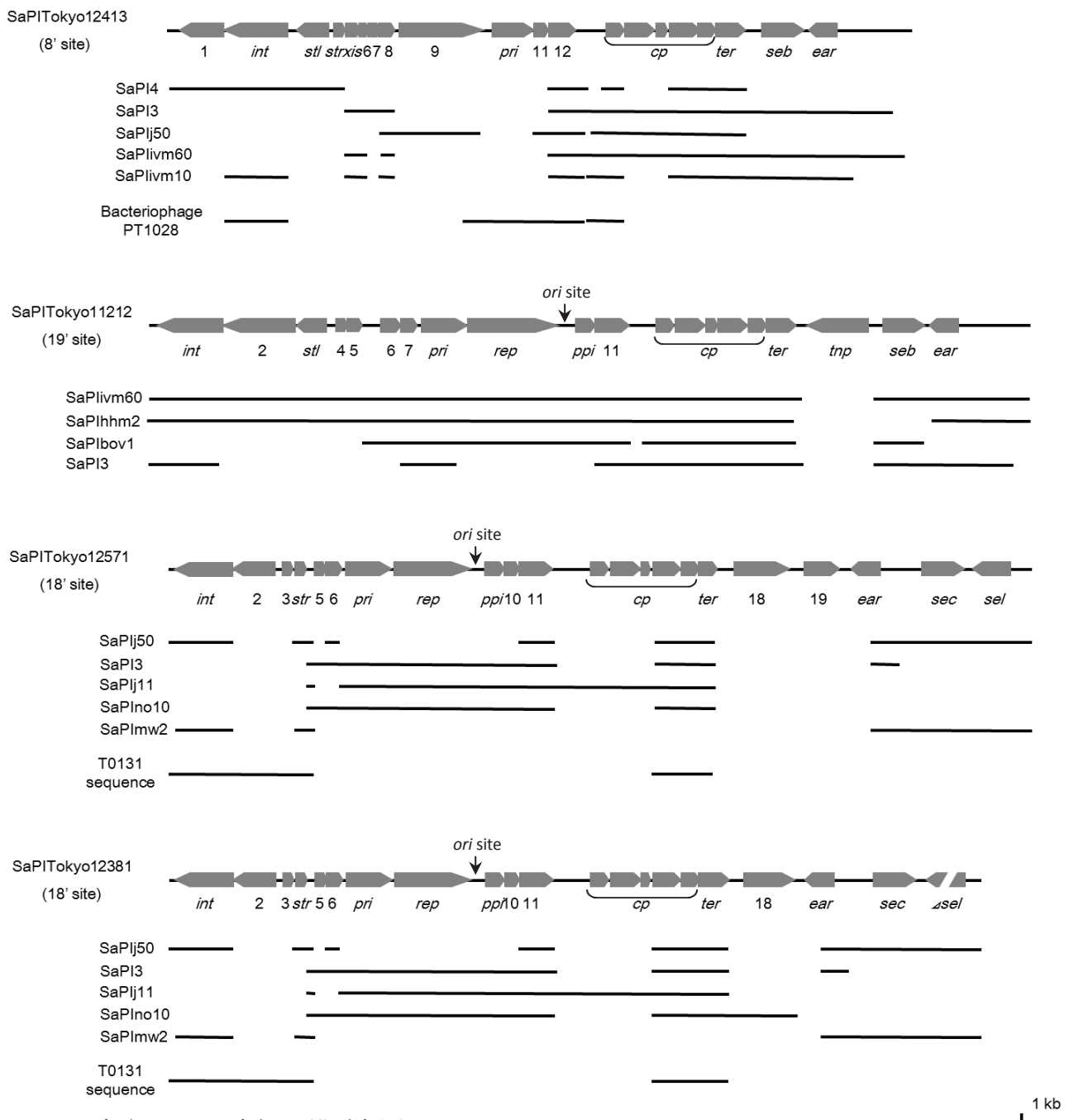


図 10. 新規SaPIの遺伝子構造概略図

各矢頭は，新規 SaPI（SaPITokyo12413，SaPITokyo11212，SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381）の Open reading frame（ORF）の位置と向きを示している。矢頭下部の直線は，新規SaPIと部分的に90%以上の相同性を示す既知のSaPI配列もしくは *S. aureus* が保有する配列の部位を示す。各遺伝子の略語は以下の通りである。*int* : integrase ; *stl* : master repressor ; *str* : regulatory protein ; *xis* : excisionase ; *pri* : primase ; *rep* : replication initiator ; *ppi* : phage interference ; *cp* : packaging genes ; *ter* : terminase small subunit ; *seb* : staphylococcal enterotoxin B ; *ear* : penicillin-binding protein ; *tnp* : transposase ; *sec* : staphylococcal enterotoxin C ; *sel* : staphylococcal enterotoxin L ;  $\Delta sel$  : フレームシフト変異により破壊されたstaphylococcal enterotoxin L

```

SaPIMW2 sel      1:ATGAAAAAAAAAGATTATTATTTGTAATTGTTATTACTTTATTTATTTTTCTTCTAATCAT 60
SaPITokyo12571 sel 1:-----A----- 60
SaPITokyo12381 sel 1:-----A----- 60
*****

SaPIMW2 sel      61:ACAGTCTTATCTAACGGCGATGTAGGTCCAGGAAACCTAAGAAATTTTATACTAAATAT 120
SaPITokyo12571 sel 61:-----A----- 120
SaPITokyo12381 sel 61:-----A----- 120
*****

SaPIMW2 sel      121:GAATATGTGAATTTAAAGAATGTTAAAGACAAAAAATTCACCAGAATCACACCGCTTAGAA 180
SaPITokyo12571 sel 121:----- 180
SaPITokyo12381 sel 121:----- 180
*****

SaPIMW2 sel      181:TACTCGTATAAAAAATGATACATTGTATGCTGAATTTGACAATGAATATATAACTAGTGAT 240
SaPITokyo12571 sel 181:----- 240
SaPITokyo12381 sel 181:----- 240
*****

SaPIMW2 sel      241:CTAAAGGGAAAAAATGTCGATGTTTTGGTATAAGCTATAAATAIGGTTCTAACTCTCGT 300
SaPITokyo12571 sel 241:----- 300
SaPITokyo12381 sel 241:----- 299
*****

```

Deletion "A"  
in SaPITokyo12381
Appearance of the stop codon "TAA"  
by the frameshift mutation in SaPITokyo12381

図 11. SaPImw2, SaPITokyo12571及びSaPITokyo12381が持つStaphylococcal enterotoxin L遺伝子塩基配列の比較

左側のハイライト部分は、SaPITokyo12381の*sel*配列における塩基欠損部位を、右側のハイライト部分はフレームシフト変異による終止コドン部位をそれぞれ示す。矢印と二重線は本来のコドンを示す。



A

```

SaPITokyo11212 ori 1:AGTACCCATCGGTACCCGTTGAGTACCCA-ATAAAAAATAAAACGGGTACTCAATAAAC 59
SaPIivm60 ori 1:.....-..... 59
SaPIbov1 ori 1:.....CAT.....T.A.T...TG..T..... 60
*****.....*****

SaPITokyo11212 ori 60:GCAGTAATATCAAGTCTCTAAAGCCATAAGTACCCGAAGTACCCAAATGTTTATTAATAGT 119
SaPIivm60 ori 60:..... 119
SaPIbov1 ori 61:.....CA.....T..T..... 120
*****.....*****

SaPITokyo11212 ori 120:ATTTAATTAATAAGTTG-TTTTGTAAAGAACATTCATATAATACAGGTTTCCTATTATA 178
SaPIivm60 ori 120:.....-..... 178
SaPIbov1 ori 121:G.....C.T.....GAG..T..... 180
***** * ***** ** *****

SaPITokyo11212 ori 179:TAATAACGGGTACAACGGGTACTTTTTGCATAAAGTAACGTAGTGATAAGAGTTTGATA 238
SaPIivm60 ori 179:..... 238
SaPIbov1 ori 181:..... 240
**********

SaPITokyo11212 ori 239:GTACCCGAAGTAAAAGAATCACTGGGACTCACTGGGTACTAGTCCTCTACTAAAATAAA 298
SaPIivm60 ori 239:..... 298
SaPIbov1 ori 241:.....G.....C..CT..... 298
*****.....*****

```

B

```

SaPITokyo12571 ori 1:ATCTATTTTTTAGGACAGTAAGACACTTATAAGACAAGTTTAAAGACACCCGCAATCCCTT 60
SaPITokyo12381 ori 1:..... 60
SaPI3 ori 1:..... 60
**********

SaPITokyo12571 ori 61:GTGGCAGTATATGCCATGCTATAAGTGTCTTGGTGTCTTGATAGTTTTTAGGGTAAAGTT 120
SaPITokyo12381 ori 61:..... 120
SaPI3 ori 61:.....C.....G..... 120
*****.....*****

SaPITokyo12571 ori 121:TTATAAAAATTATTACACAATATACAAAATATATAAATGTAGGTCGTAAACAGTGAAGAC 180
SaPITokyo12381 ori 121:..... 180
SaPI3 ori 121:..C.G..... 180
*** * *****

SaPITokyo12571 ori 181:AGTGAGACAGATTAAGTGAAGCCCTTGAGGGAGTAAGTGTA AAAAGAAGTTCATAAGTGT 240
SaPITokyo12381 ori 181:..... 240
SaPI3 ori 181:.....C.....A..... 240
*****.....*****

SaPITokyo12571 ori 241:CTTGAATTGCTATTTCGAATAAGACAGTGAGGCACCTATCAAAAATTAGGAGGAAGAAA 298
SaPITokyo12381 ori 241:..... 298
SaPI3 ori 241:.....A.....G.A..... 298
*****.....*****

```

図 12. 各SaPIに存在する複製開始点塩基配列の比較

青色とピンク色のハイライト部分は反復配列（イテロン配列）であり、青色は同方向反復配列を、ピンク色は逆方向反復配列をそれぞれ示す。太線で囲んだ部分はAT-rich領域を示す。“A”ではSaPTokyo11212、SaPIivm60及びSaPIbov1のori site配列を、“B”ではSaPITokyo12571、SaPITokyo12381及びSaPI3のori site配列をそれぞれ示す。

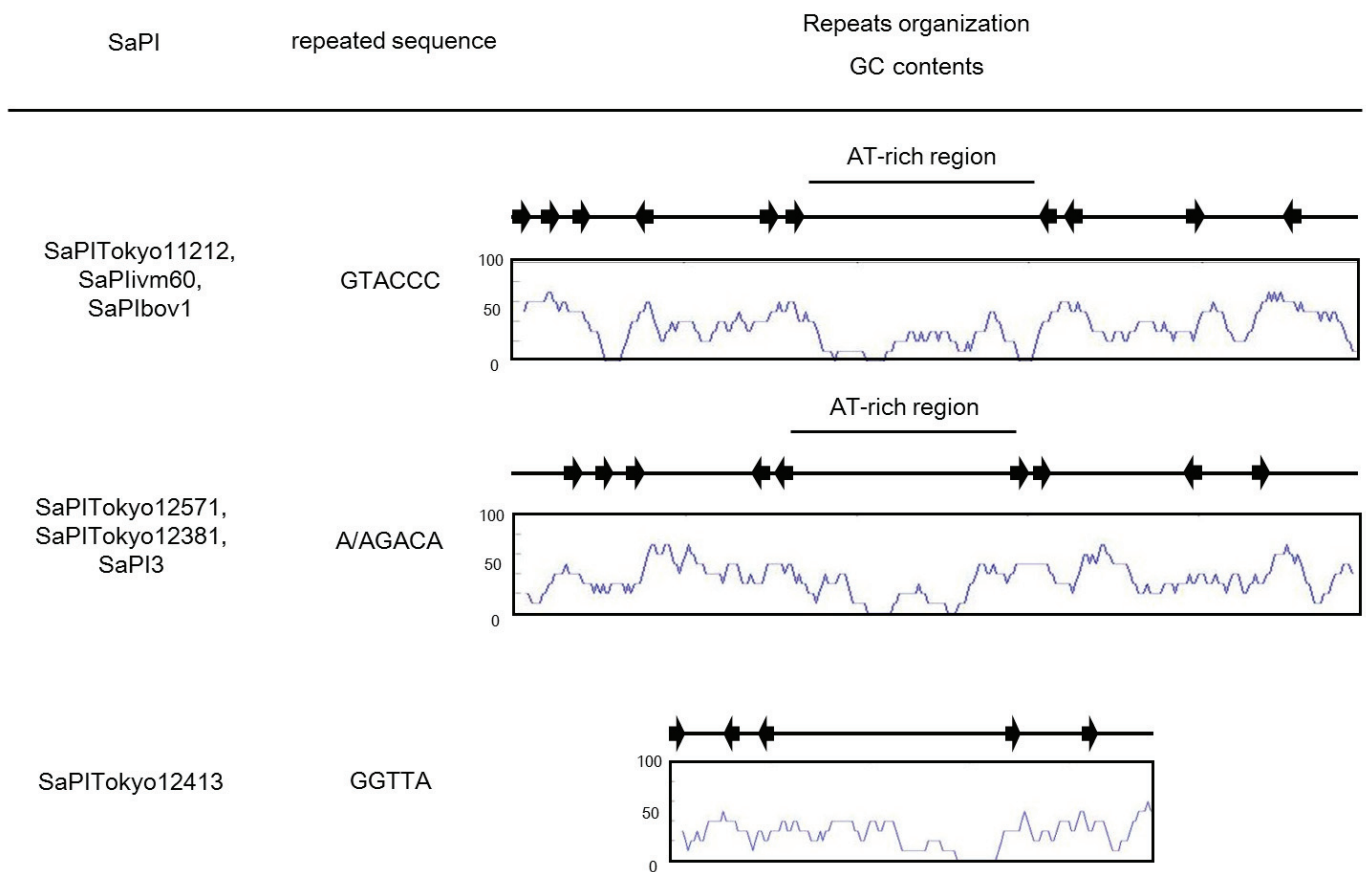


図 13. 本研究で同定した新規SaPIの予測される複製開始点の模式図

矢印は複製開始点 (*ori site*) 内の反復配列 (予測イテロン配列) の位置と向きを示す。折れ線グラフは各 *ori site* のGC含量を示す。二重鎖の解離部位である、AT-rich領域は複数の反復配列に挟まれた位置に存在する。

```

SaPITokyo12413 ori      1: GGTTAGAAATAACTCTTGCTAACCTTTGTTATAACCTATGAATCGTTGTAATAACAGTCA 60
Bacteriophage PT1028    1: ..... 60
    *****

SaPITokyo12413 ori      61: CTAACCTCTTATAGCCTAAGTTTTATTAGTAATCTATAATTATTTAAATTTAATAAAGGG 120
Bacteriophage PT1028    61: ..... 120
    *****

SaPITokyo12413 ori      121: TTATAGGTAAAACAATGGCTATAAGGGTTAGTTTTAAAAGGAGGAGTTCA 170
Bacteriophage PT1028    121: .....A..... 170
    *****

```

図 14. SaPITokyo12413の複製開始点と予測された塩基配列とBacteriophage PT1028内に存在する塩基配列との比較

青色とピンク色のハイライト部分は反復配列であり、青色は同方向反復配列を、ピンク色は逆方向反復配列をそれぞれ示す。

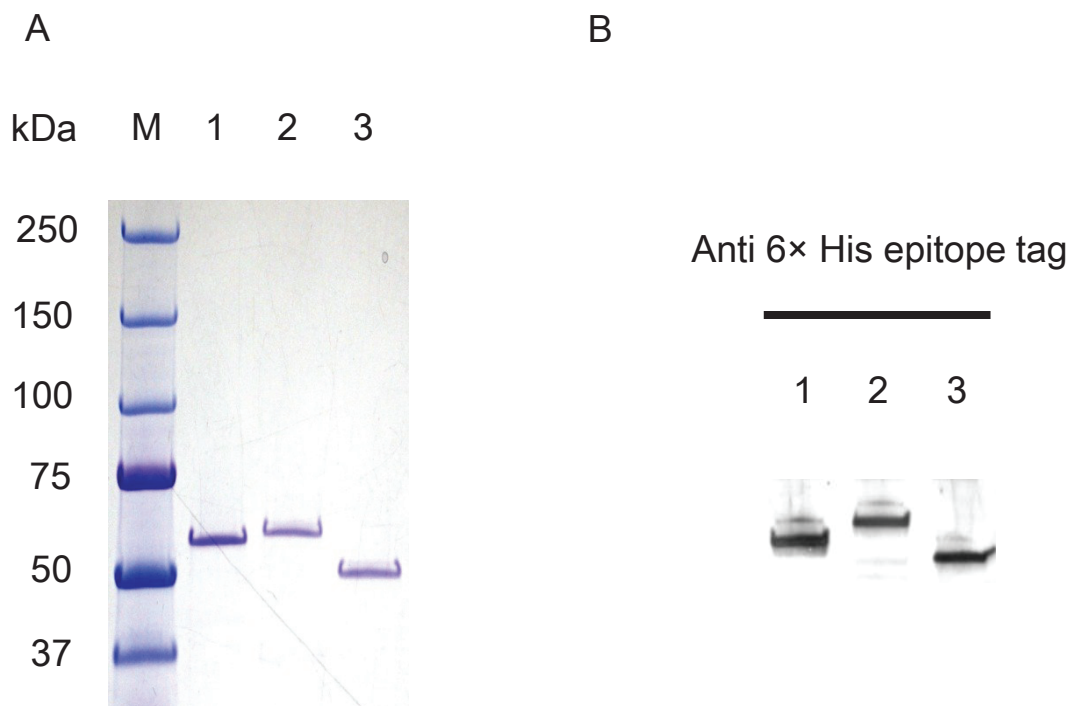


図 15. 同定した新規SaPIの組換え予測複製開始タンパク質の精製

(A) 精製した組換え複製開始タンパク質 (recombinant replication initiator protein; rRep) のSDS-PAGE泳動像 クーマシーブリリアントブルーを用いて、タンパク質泳動後のゲルの染色を行った。 Lane 1 : 500 ng 予測SaPITokyo12413-rRep ; lane 2 : 500 ng 予測SaPITokyo11212-rRep ; lane 3 : 500 ng 予測SaPITokyo12381-rRep ; M : 分子量マーカー

(B) 精製したrRepのWestern blotting解析 一次抗体には6× His epitope tag antibodyを使用した。 Lane 1 : 100 ng 予測SaPITokyo12413-rRep ; lane 2 : : 100 ng 予測SaPITokyo11212-rRep ; lane 3: : 100 ng 予測SaPITokyo12381-rRep



A

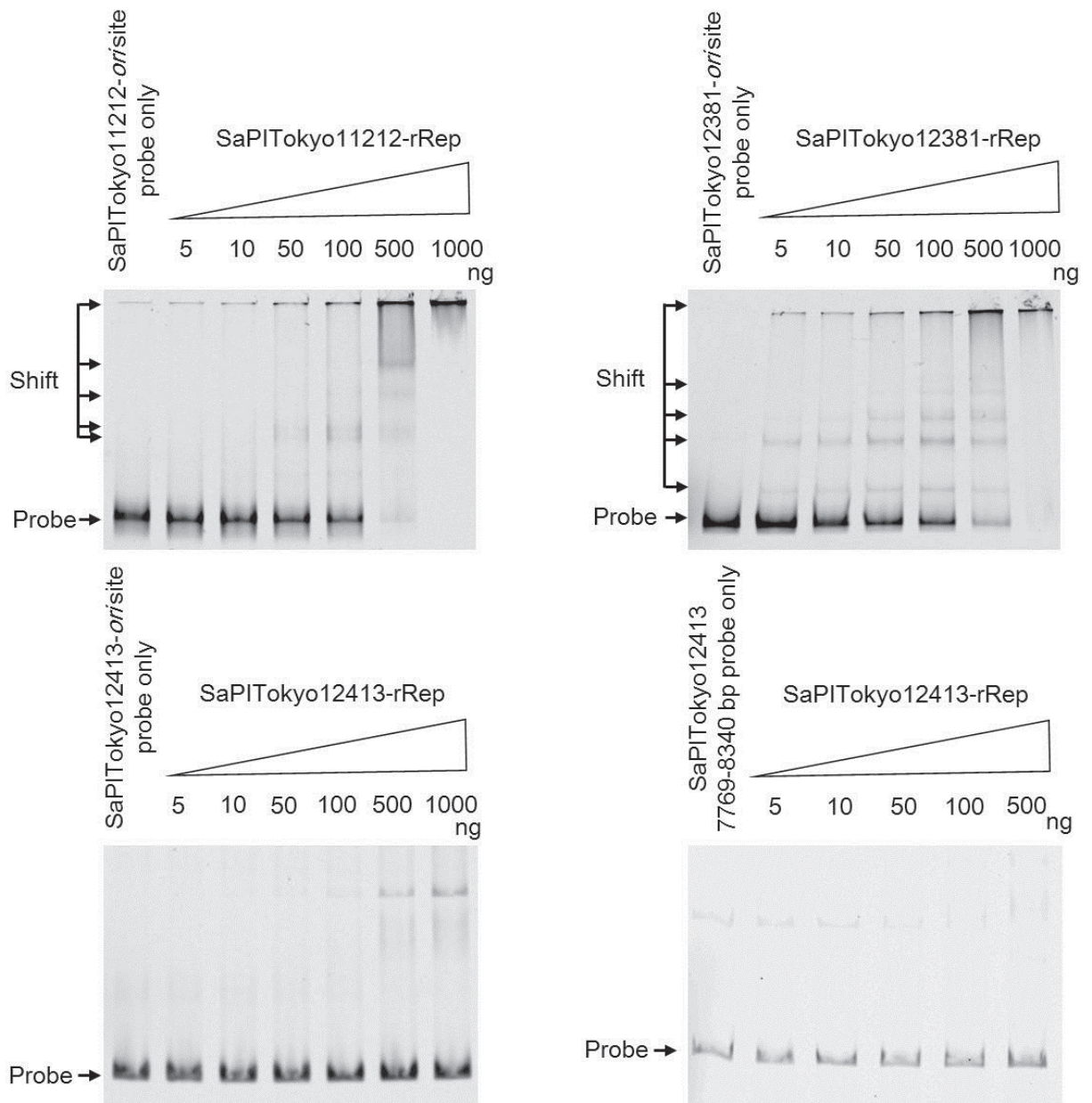


図 16. 組換え予測複製開始タンパク質-DNA複合体の検出

(A) 精製組換え複製開始タンパク質 (recombinant replication initiator protein ; rRep) と Cy5標識DNAプローブを用いたゲルシフトアッセイ 左上の写真は, SaPITokyo11212-rRep と Cy5標識SaPITokyo11212-ori sites配列プローブを, 右上の写真は, SaPITokyo12381-rRep と Cy5標識SaPITokyo12381-ori sites配列プローブを, 左下の写真はSaPITokyo12413-rRepと Cy5標識SaPITokyo12413-ori sites配列プローブを, 右下の写真はSaPITokyo12413-rRepと SaPITokyo12413の7769 bpから8340 bpまでの配列をCy5標識したプローブをそれぞれ用いたゲルシフトアッセイを示す。”Shift”はrRep-Cy5標識DNAプローブ複合体を, ”Probe”はrRepの結合していないCy5標識DNAプローブをそれぞれ示す。

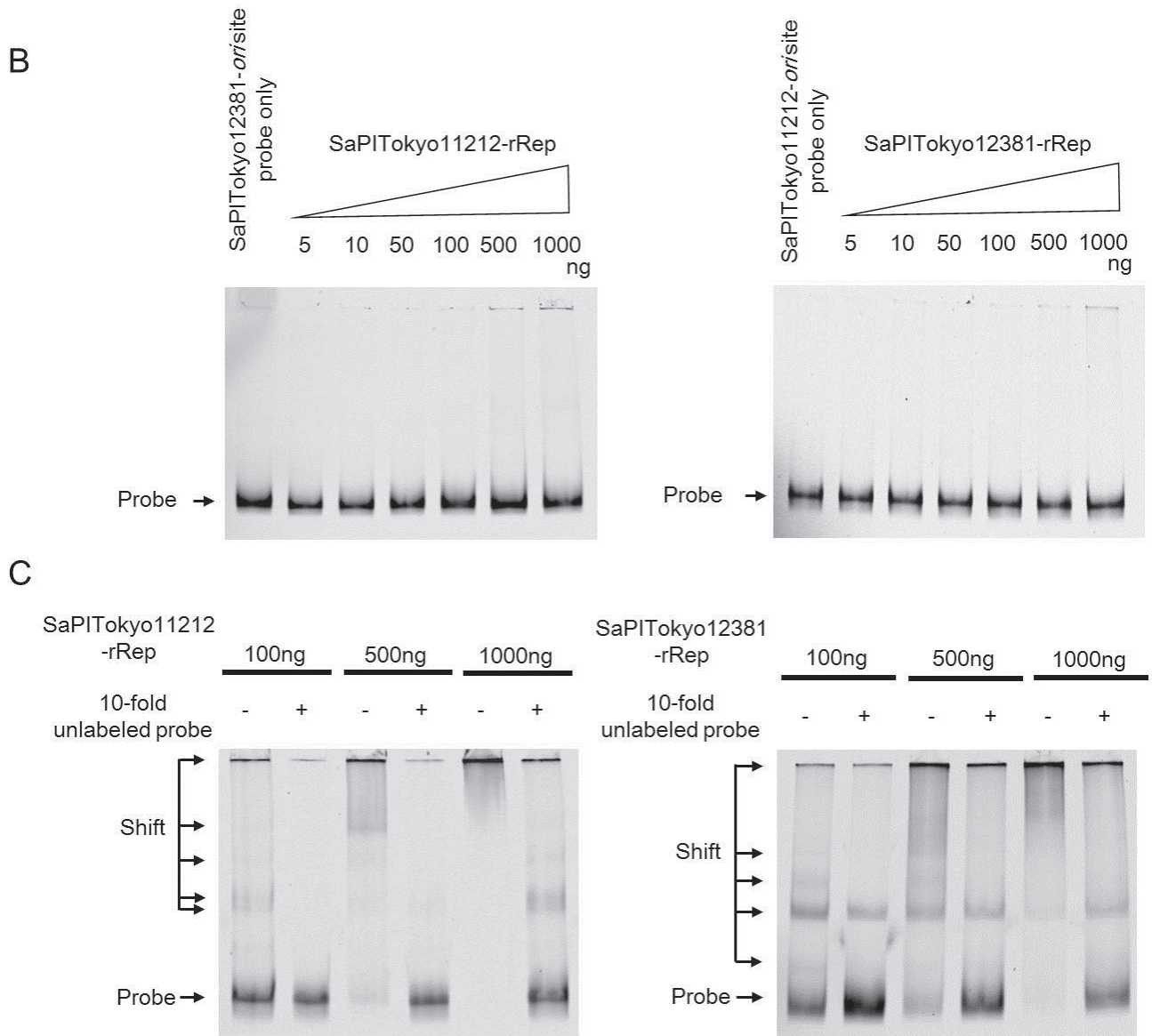


図 16. (続き)

(B) 精製rRepと *ori* site配列のSaPIが異なる組合せを用いたゲルシフトアッセイ  
 左の写真は、SaPITokyo11212-rRepとCy5標識SaPITokyo12381-*ori* site配列プローブを、  
 右の写真は、SaPITokyo12381-rRepとCy5標識SaPITokyo11212-*ori* site配列プローブを  
 それぞれ用いたゲルシフトアッセイを示す。(C) 精製rRep、Cy5標識DNAプローブ  
 及びCy5非標識DNAプローブを用いた結合阻害実験 左側の写真は、  
 SaPITokyo11212-rRep (100-1000 ng) , Cy5標識SaPITokyo11212-*ori* site配列プローブ  
 及びその10倍量のCy非標識SaPITokyo11212-*ori* site配列プローブを、右の写真は、  
 SaPITokyo12381-rRep (100-1000 ng) , Cy5標識SaPITokyo12381-*ori* site配列プローブ  
 及びその10倍量のCy5非標識SaPITokyo12381-*ori* site配列DNAプローブをそれぞれ用  
 いたゲルシフトアッセイを示す。"Shift"はrRep-Cy5標識DNAプローブ複合体  
 を、"Probe"はrRepの結合していないCy5標識DNAプローブをそれぞれ示す。

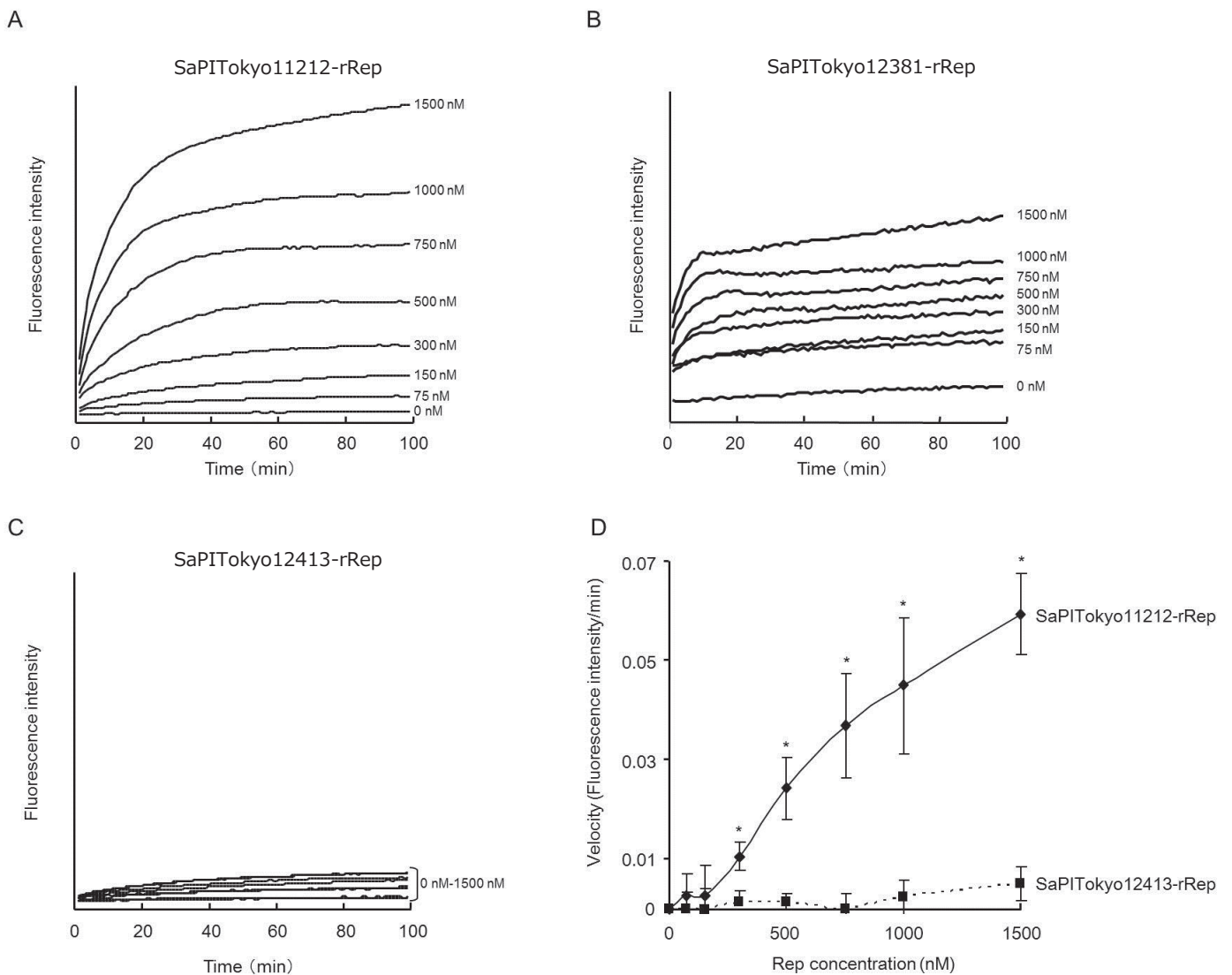


図 17. 同定した新規SaPI由来組換え予測複製開始タンパク質のDNAヘリカーゼ活性

(A, B, C) 精製組換え複製開始タンパク質 (recombinant replication initiator protein ; rRep) の各濃度におけるDNAヘリカーゼ反応の継時推移 “A”はSaPITokyo11212-rRep, ”B”はSaPITokyo12381-rRep, ”C”はSaPITokyo12413-rRepにおけるDNAヘリカーゼ反応の継時推移をそれぞれ示す。蛍光シグナルは1分ごとに測定しプロットした。(D) rRepの各濃度における反応速度 SaPITokyo11212-rRep及びSaPITokyo12413-rRepの各濃度における反応速度を算出しプロットした。実験は独立した3回の試行で実施した。各濃度における反応速度は3回の平均値±標準偏差で示している。グラフ中のアスタリスク (\*) は、同一濃度における反応速度に有意差があることを示す ( $p < 0.01$ )。

### 第三章 SE/SEIs 関連プラスミドの食中毒事例への関与 と変異型 *sed* 遺伝子の同定

#### 序論

プラスミドは、*S. aureus* に限らず多くの菌種で認められる可動性遺伝因子であり、その水平伝播を通して細菌が様々な形質を獲得することはよく知られている。*S. aureus* が保有するプラスミド上には、SEs 遺伝子などの病原遺伝子が存在する場合があります。第二章で検討した SaPI と同様、プラスミドも *S. aureus* の起病性に深く関与している。23 種類の SE/SEIs の内、少なくとも 5 つのタイプの SE/SEIs 遺伝子 (*sed*, *selj*, *ser*, *ses* 及び *set*) がプラスミド上に存在し、伝播することが知られている [2, 53, 57]。例えば、*sed*, *selj* 及び *ser* は pIB485-like plasmid や pUO-Sa-SED1, pUO-Sa-SED2 などのプラスミド上に存在することが報告されている [2, 53]。同様に、*selj*, *ser*, *ses* 及び *set* は pF5 上に存在することが知られている [57]。しかし、どのタイプのプラスミドが実際の食中毒分離株に多く分布し、食中毒の発生に関与するのかは不明である。また、古典的 SEs である SED 以外のプラスミド関連 SEs の食中毒原性についても未だ不明な点が多い。

第一章で 1994 年から 2012 年に東京都で発生したブドウ球菌食中毒の分子疫学的特性を解析した結果、*sed* 遺伝子を保有する食中毒事例由来 *S. aureus* 株が複数存在し (第一章 図 5)、SED が原因毒素の一つと同定されたブドウ球菌食中毒事例が発生していることを示した。また、*sed* 遺伝子陽性 *S. aureus* 株は、同時に *selj*, *ser* 遺伝



子も保有していた（第一章 図 5）ため、これらの食中毒発生には、*sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子が存在するプラスミドを保有する *S. aureus* 株が関与していることや SEIJ や SER も食中毒発生の原因毒素となることが推測された。

そこで本章では、*sed* 遺伝子保有食中毒由来 *S. aureus* 株の持つ SEs 関連プラスミドを同定し、プラスミド関連 SE/SEIs の食中毒への関与を分子生物学に解析することで、プラスミドによる食中毒起病性を検討することを目的とした。また、食中毒由来 *S. aureus* 株に保有されることが報告されていない変異型 *sed* 遺伝子が、複数の供試プラスミド上に存在することが明らかとなったため、その食中毒原因毒素としての可能性について考察した。

## 材料および方法

### 1. 黄色ブドウ球菌株と使用培地

本章で使用した *S. aureus* 株を表 13 に示す。供試 *S. aureus* 株（Tokyo10539, Tokyo11726, Tokyo12261, Tokyo12804, Tokyo12902, Tokyo13057 及び Tokyo13231）は、東京都で発生した食中毒事例の患者糞便由来、患者嘔吐物由来もしくは推定原因食品由来株である。各菌株を SE/SEIs 遺伝子型ごとに分類すると、*sea*, *sed*, *selj*, *ser* 遺伝子保有株が 5 株（Tokyo11726, Tokyo12261, Tokyo12804, Tokyo12902 及び Tokyo13231）、*sed*, *seg*, *sei*, *selj*, *sem*, *sen*, *seo*, *ser* 遺伝子保有株が 2 株（Tokyo10539 及び Tokyo13057）である。本章における *S. aureus* の使用培地は、前々章（第一章 材料及び方法

1.) 記載の通りである。

## 2. 大腸菌株と使用培地

本章で使用した *E. coli* 株を表 13 に示す。K12 株誘導体である DH5 $\alpha$  は Promega 社から購入した。本研究における *E. coli* の使用培地は、前章（第二章 材料及び方法 2.）記載の通りである。

## 3. 使用したプラスミドの概要

本章で使用したプラスミドを表 14 に示す。また、それぞれのプラスミド作製に使用したプライマーを表 15 に示す。pTokyo10539, pTokyo11726, pTokyo12261, pTokyo12804, pTokyo12902, pTokyo13057 及び pTokyo13231 は上述の供試 *S. aureus* 7 株から精製したプラスミドである。pG10539F は pTokyo10539 由来の 4,916 bp の *EcoRI* 断片を pGEM-3Zf(+) vector (Promega) に組み込んだプラスミドである。同様に、pG11726F, pG12261F, pG12804F, pG12902F, pG13057F 及び pG13231F はそれぞれ pTokyo11726, pTokyo12261, pTokyo12804, pTokyo12902, pTokyo13057 及び pTokyo13231 由来の約 4.9 kbp の *EcoRI* 断片を pGEM-3Zf(+) vector に組み込んだプラスミドである。pGTsed, pGTftsZ, pGTsodA 及び pGTspoB は、*sed*, *ftsZ*, *sodA* 及び *rpoB* の各遺伝子の一部を増幅するプライマー（表 15）を用いて作製した PCR 産物を、pGEM-T easy vector (Promega) に組み込んだプラスミドである。

#### 4. 黄色ブドウ球菌プラスミドの精製

*S. aureus* からのプラスミド精製は、Birnboim と Doly [8] の方法を一部改変して行った。すなわち、カジトン半流動培地に保存されている菌株を、MSEY 寒天培地を用いて 2 回継代した。単一コロニーを釣菌して 5 mL の BHI broth に接種し、37°C で一晩振盪培養した。培養液を 3,000 rpm, 10 分遠心分離し上清を取り除いた。回収した菌体を、終濃度 5 µg/mL になるように lysostaphin (和光純薬) を添加した溶菌バッファーで懸濁し、37°C で 1 時間加温し細胞壁を破壊した。細胞壁破壊菌液に 400 µL のアルカリ-SDS 溶液を添加し、数秒間転倒混和した。次に 300 µL の High-salt 溶液を添加し、数秒間転倒混和した。サンプルを 10 分間氷上に静置した後、4°C, 14,500 rpm で 15 分間遠心分離した。プラスミド DNA を含む上清を新しいチューブに移し、等量の Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (ナカライテスク, 京都, 日本) を加え、10 秒間攪拌した。4°C, 14,500 rpm で 10 分間遠心分離し、プラスミド DNA を含んだ水層を注意深く取り、新しいチューブに移した。プラスミド DNA 溶液と等量のイソプロパノール (和光純薬) 及びそれら混合液全体の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液 (和光純薬) を加え、-20°C で 1 時間静置した。4°C, 14,500 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を取り除いた後、1 mL の 70% エタノール (和光純薬) を加え転倒混和した。4°C, 14,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を取り除いた後、プラスミド DNA を 10 分間風乾した。その後、プラスミド DNA を TE (pH8.0) (ニッポンジー) に溶解した。抽出したプラスミド DNA は NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定した。また、A260/A280 が 1.8

以上であることを確認し、解析に用いるまで 4°C で保存した。使用した溶菌バッファー、アルカリ - SDS 溶液及び High - salt 溶液の組成は以下の通りである。

溶菌バッファー組成 (100 mL スケール)

- |   |                                       |        |
|---|---------------------------------------|--------|
| ① | 1 M Tris-HCl (pH 8.0) (第一章 材料及び方法 4.) | 2.5 mL |
| ② | 0.5 M EDTA (pH 8.0) (同仁化学)            | 2 mL   |
| ③ | グルコース (和光純薬)                          | 0.9 g  |

pH8.0 に調整後、オートクレーブ済み MilliQ 水で 100 mL にメスアップした。

アルカリ - SDS 溶液組成 (100 mL スケール)

- |   |                 |       |
|---|-----------------|-------|
| ① | 2 N NaOH (和光純薬) | 10 mL |
| ② | 10% SDS (和光純薬)  | 10 mL |

オートクレーブ済み MilliQ 水で 100 mL にメスアップした。

High - salt 溶液組成 (100 mL スケール)

- |   |               |         |
|---|---------------|---------|
| ① | 酢酸カリウム (和光純薬) | 29.5 g  |
| ② | 酢酸 (和光純薬)     | 11.5 mL |

pH4.8 に調整後、オートクレーブ済み MilliQ 水で 100 mL にメスアップした。

## 5. 黄色ブドウ球菌プラスミドの制限酵素断片長多型解析

前項 (第三章 材料及び方法 4.) で得られた *S. aureus* プラスミド



について、*EcoRI* (タカラバイオ) を用いた RFLP 解析を行った。すなわち、以下の反応液を調製後、37°C で 1 時間静置しプラスミドを切断した。

反応液組成 (20  $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ M Buffer	2 $\mu$ L
②	<i>S. aureus</i> プラスミド (< 1 $\mu$ g)	1 $\mu$ L
③	<i>EcoRI</i> (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
④	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	16 $\mu$ L

反応液に反応液量の 1/10 量以上の 10 $\times$ loading buffer を添加し、制限酵素反応を止めた。切断されたプラスミド DNA 断片を 0.7% SeaKem GTG Agarose gels (Lonza) を用いて電気泳動した。EtBr 溶液 (0.5  $\mu$ g/mL) にアガロースゲルを浸漬し DNA 染色し、ゲル撮影装置 AE-6933FXES (ATTO) を用いて、RFLP パターンを確認した。得られた RFLP パターンが、既報のプラスミドの RFLP パターン[53] と一致するか比較した。

## 6. Sandwich ELISA を用いた SE/SEI タンパク質の定量

供試 *S. aureus* 7 株について、前々章 (第一章 材料及び方法 8.) の方法に従い、Sandwich ELISA により SEA, SED, SEG, SEI, SEIJ, SEM, SEN, SEO 及び SER タンパク質量を測定した。なお、SED, SEG, SEI, SEIJ, SEM, SEN, SEO 及び SER の Capture 抗体と Detection 抗体には岩手大学の重茂克彦教授より分与されたウサギ抗体を使用

した。Capture 抗体はそれぞれ、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SED), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEG), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEI), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEIJ), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEM), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEN), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SEO), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SER) の濃度に希釈して使用した。Detection 抗体はそれぞれ、3,200 倍 (Anti-SED), 800 倍 (Anti-SEG), 1,200 倍 (Anti-SEI), 4,800 倍 (Anti-SEIJ), 800 倍 (Anti-SEM), 1,000 倍 (Anti-SEN) 3,500 倍 (Anti-SEO), 1,200 倍 (Anti-SER) に希釈して使用した。また、岩手大学の重茂克彦教授より分与された 100  $\text{ng}/\text{mL}$  の 0.1% (w/v) BSA 添加リコンビナント SED, SEG, SEI, SEIJ, SEM, SEN, SEO 及び SER タンパク質を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡) を用いて階段希釈し、それぞれの標準曲線の作製に用いた。

#### 7. *sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子を含む *EcoRI* 断片のシーケンス解析

*sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子を含む *EcoRI* 断片のシーケンス解析を行うため、制限酵素切断 DNA 断片を組み込んだプラスミドを作製した。Omoe ら [53] は、*sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子が pIB485-like plasmid の 4.5-5.0 kbp の *EcoRI* 断片に存在することを報告している。そこで、前項 (第三章 実験材料及び実験方法 5.) でアガロースゲル電気泳動して分離させた 4.5-5.0 kbp 付近のバンド (図 18 の矢頭で示す部分) を、SeaKem GTG Agarose gel (Lonza) から切り出し Monofas DNA Purification kit (GL サイエンス) を用いて前章の方法 (第二章 実験材料及び実験方法 7.) に従い上記 SE/SEIs 遺伝子を含む DNA 断片を精製した。また、以下の反応液を調製後、37°C で 1 時間静置し、

pGEM-3Zf(+) vector を *EcoRI* で切断した。

反応液組成 (20  $\mu$ L スケール)

①	10 $\times$ M Buffer	2 $\mu$ L
②	pGEM-3Zf(+) (< 1 $\mu$ g)	1 $\mu$ L
③	<i>EcoRI</i> (15 units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
④	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	16 $\mu$ L

上記の精製した *EcoRI* 断片と *EcoRI* 切断済み pGEM-3Zf(+) vector を用いて、ライゲーション反応、形質転換処理及びプラスミド精製を行った。これらは前章 (第二章 実験材料及び実験方法 9.) の方法に従った。

pGEM-3Zf(+) vector に組み込んだ *EcoRI* 断片の塩基配列を、プライマーウォーキング法を用いて、前々章 (第一章 実験材料及び実験方法 5.) の方法に従い決定した。得られた塩基配列を MEGA5 software を用いて整列させた。決定した *EcoRI* 断片の塩基配列について GeneMark 及び ORF Finder を用いて、ORF 抽出を行い、BLAST を用いて各 ORF の塩基配列の相同性検索を行った。また、pGEM-3Zf(+) vector に組み込んだ *EcoRI* 断片に存在した ORF 中の塩基配列の比較は、Genetyx software program, ver. 8 を用いて行った。

## 8. 黄色ブドウ球菌からの総 RNA の精製

供試 *S. aureus* 7 株からの総 RNA の精製は RiboPure-Bacteria Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、添付の説明書を一部改変して行

った。すなわち、5 mL の 1% (w/v) yeast extract 添加 BHI broth に単一コロニーを接種し、37°C で 24 時間振盪培養した。培養液を 5,000 rpm, 10 分遠心分離し上清を取り除き、回収した菌体を 350  $\mu$ L の RNAwiz に懸濁した。250  $\mu$ L の Zirconia Beads と菌液を添付のチューブに添加し、10 分間激しく懸濁し細胞壁を破壊した。細胞壁破壊菌液を 4°C, 14,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。移した溶液の容積の 1/5 量のクロロホルム (和光純薬) を加えよく懸濁し、混合液を室温で 10 分間静置した。4°C, 14,500 rpm で 5 分間遠心分離し、総 RNA を含む水層を注意深く取り、新しいチューブに移した。総 RNA 溶液の半量のエタノール (和光純薬) を加え懸濁し、混合液を Filter Cartridge に移した。4°C, 14,500 rpm で cartridge を 1 分間遠心分離し、濾過液を捨てた。700  $\mu$ L の Wash Solution 1 を加え、14,500 rpm で 1 分間遠心分離し濾過液を捨てた。続いて 500  $\mu$ L の Wash Solution 2/3 を加え、14,500 rpm で 1 分間遠心分離し濾過液を捨てる工程を 2 回繰り返す。Filter Cartridge を洗浄した。濾過液を捨て、さらに 14,500 rpm で 1 分間遠心分離し Wash Solution 2/3 を完全に除去した。Filter Cartridge を新しいチューブに移し、事前に 100°C に加温した 25  $\mu$ L の Elution Solution を加えて 1 分間の静置後、14,500 rpm で 1 分間遠心分離し、総 RNA 溶液を得た。混入した genomic DNA を取り除くため、総 RNA 溶液に 1/9 量の 10 $\times$ DNase Buffer 及び 4  $\mu$ L の DNase 1 (2 U/ $\mu$ L) を添加し、37°C, 30 分間保温した。続いて、1/5 量の DNase Inactivation Reagent を加えてタッピングしながら室温で 2 分間反応させた。14,500 rpm で 1 分間反応液を遠心分離し、上清を回収したものを精製済み総 RNA 溶液とした。総 RNA 溶液の濃度は NanoDrop 2000c (Thermo Fisher

Scientific) を用いて測定した。また A260/A280 が 2.0 前後であること及び 1%のアガロースゲル電気泳動で 23S と 16S ribosomal RNA の分解がないことを確認し、解析に用いるまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## 9. 逆転写反応

上記の精製した  $2\ \mu\text{g}$  の総 RNA を High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific) 用い、添付の説明書に従い逆転写反応を行った。合成した cDNA は解析に用いるまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保管した。反応溶液及び反応条件は以下の通りである。

### 逆転写反応液組成 ( $50\ \mu\text{L}$ スケール)

①	10×RT Buffer	5 $\mu\text{L}$
②	25×dNTP Mix (100 mM)	2 $\mu\text{L}$
③	10×RT Random Primers	5 $\mu\text{L}$
④	MultiScribe Reverse Transcriptase	2.5 $\mu\text{L}$
⑤	RNase Inhibitor	2.5 $\mu\text{L}$
⑥	総 RNA 溶液 ( $2\ \mu\text{g}/25\ \mu\text{L}$ )	25 $\mu\text{L}$
⑦	Nuclease-free $\text{H}_2\text{O}$ (Thermo Fisher Scientific)	8 $\mu\text{L}$

### 反応条件

①	$25^{\circ}\text{C}$	10 分
②	$37^{\circ}\text{C}$	120 分
③	$85^{\circ}\text{C}$	5 分

## 10. スタンダードプラスミドの作製

後述する定量的リアルタイム Reverse transcription (RT) - PCR に使用するスタンダードプラスミドには、各遺伝子の PCR 産物を pGEM-T easy vector に組み込んだプラスミドを使用した。PCR は、前々章（第一章 実験材料及び実験方法 4.）で精製した genomic DNA を鋳型にして、前々章と同じ条件（第一章 実験材料及び実験方法 5.）で行った。なお、PCR のプライマーは NCBI のデータベースに登録されている各遺伝子の配列情報を基に、Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)を用いて設計した。各プライマーの配列は表 15 の通りである。

得られた PCR 産物を TA クローニングし、プラスミドを精製した。TA クローニングの方法は前章（第二章 実験材料及び実験方法 9.）に従った。上記 PCR 産物を pGEM-T easy vector に組み込んだプラスミド（pGTsed, pGTsodA, pGTftsZ 及び pGTrpoB）を得た。シーケンスプライマーには第二章 表 7 に記載した M13F と M13R をそれぞれ使用した。

## 11. 定量的リアルタイム RT-PCR

各 *S. aureus* 株における *sed* もしくは変異型 *sed* (mutant *sed*; *msed*) 遺伝子発現量を Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 及び ABI7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いた定量的リアルタイム RT-PCR 法により定量した。また、過去の報告 [19] に従って 3 種類のハウスキーピング遺伝子

を選択し、その発現量を定量した。すなわち、Superoxide dismutase (*sodA*), Cell division protein (*ftsZ*) 及び RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) の各遺伝子である。遺伝子発現定量のための検量線は前項 (第三章 実験材料及び実験方法 10.) で作製したスタンダードプラスミドを  $1.0 \times 10^2$  copy/ $\mu$ L から  $1.0 \times 10^8$  copy/ $\mu$ L になるように階段希釈することにより作製した。それぞれの Ct 値を検量線の値に換算することで総 RNA 40 ng あたりのメッセンジャーRNAのコピー数を算出した。続いて、RT-PCR 反応間の変化を補正するために、*sodA*, *ftsZ* もしくは *rpoB* に対する *sed* もしくは *msed* 遺伝子発現量の比率を計算した。また、SYBR green はプライマーダイマー、DNA のコンタミネーション及びミスアニールしたプライマーによる PCR 産物などの二重鎖 DNA も検出してしまうため、SYBR green によって検出された二重鎖 DNA が目的の遺伝子の増幅産物かどうか検証するため解離曲線分析を行った。定量的リアルタイム RT-PCR のプライマーは NCBI のデータベースに登録されている各遺伝子の配列情報を基に、Primer Express Software Version 3.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いて設計した。各プライマーの配列は表 15 の通りである。反応溶液及び反応条件は以下の通りである。

定量的リアルタイム RT-PCR 反応液組成 (25  $\mu$ L スケール)

①	SYBR Green PCR Master Mix (2 $\times$ )	12.5 $\mu$ L
②	Forward primer (5 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
③	Reverse primer (5 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
④	Template cDNA or Standard plasmid	1 $\mu$ L
⑤	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Thermo Fisher Scientific)	8.5 $\mu$ L

## 反応条件

①	50℃	2分	
②	95℃	10分	
③	95℃	15秒	} 40サイクル
④	60℃	1分	
⑤	95℃	15秒	
⑥	60℃	30分	
⑦	95℃	15秒	

## 12. 統計学的解析

供試 *S. aureus* 7株の SEs 産生量及び遺伝子発現量における統計学的解析は、one way ANOVA で分析後 Tukey-Kramer の HSD 検定を行い、測定したすべての結果の一对を比較し、統計的有意性を検証した。 $p$  値が 0.05 以下のものを有意差ありとみなした。全ての統計学的解析は Statcel2 software (オーエムエス出版, 埼玉, 東京) を用いて行った。

## 結果

### 1. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株が保有するプラスミドの同定

供試 *S. aureus* 7株からプラスミドを精製し、*EcoRI* を用いた RFLP 解析を行った。*EcoRI* 処理したプラスミドは 3 種類の RFLP パター



ンを示した（図 18）。同一の RFLP パターンが pTokyo11726, pTokyo12804, pTokyo12902, pTokyo13057 及び pTokyo13231 で認められた。また, pTokyo12261 の RFLP パターンは, pTokyo11726 を含む上述のプラスミドのそれと比較し, 9.4 kb 付近のバンドが認められなかったが, その他のバンドの位置は一致していた。pTokyo10539 の RFLP パターンは, pTokyo11726 を含む上述のプラスミドのそれと比較し, バンドの位置が 1 本異なっていたが, その他のバンドの位置は一致していた。

## 2. 食中毒由来黄色ブドウ球菌株における SE/SEIs の産生量

供試 *S. aureus* 7 株の SED, SEIJ 及び SER 産生量を測定した。SED の産生量は 2 つのタイプに分けられた。すなわち, 500 ng/mL 以上の SED を産生するタイプと SED が検出できないタイプ [検出限界 (0.1 ng/mL) 以下] である。前者には, Tokyo10539, Tokyo12261, Tokyo12902 及び Tokyo13057 株が含まれ, 後者には Tokyo11726, Tokyo12804 及び Tokyo13231 が含まれた (図 19A)。また, SEIJ を産生していなかった Tokyo13231 を除く全ての株が, SEIJ 及び SER 両者を産生していたが, それらの産生量は各株それぞれ異なっていた。すなわち, SEIJ は 37-135 ng/mL の範囲内, SER は 523-2925 ng/mL の範囲内であった (図 19B 及び 19C)。

各株が産生する全種類の SE/SEIs 産生量を測定し, 各々の全体量に対する割合を求めた (図 20)。SED はそれぞれの分離株において全体の 0 から 76% の産生量の割合を占めていた。SEIJ は 0 から 5% を, SER は全体の 16 から 66% をそれぞれ占めていた。*sea* 遺伝子陽

性 5 株 (Tokyo11726, Tokyo12261, Tokyo12804, Tokyo12902 及び Tokyo13231) における SEA 産生量は, 全体の 71 から 78%を占めていた。また, *seg*, *sei*, *sem*, *sen* 及び *seo* 遺伝子陽性 2 株 (Tokyo10539 と Tokyo13057) におけるこれらの SEs の産生量はすべて全体の 0.1% 以下であった。

### 3. *sed* 配列が存在する *EcoRI* 断片のクローニングとシーケンス解析

上記 3 株において SED が検出されなかったことが, *sed* 遺伝子もしくはその周辺の配列の差異に由来するものと予測し, *sed* 遺伝子近傍のシーケンス解析を行った。すなわち, 供試 *S. aureus* 株から精製したプラスミドの 4.5-5.0 kbp の *EcoRI* 断片 (図 18 の矢頭で示した部分) を pGEM-3Zf(+) vector に組み込み, *sed* 遺伝子近傍の配列を決定した。その結果, 4,915 bp, 4,916 bp 及び 4,917 bp の塩基配列が得られた。4,915 bp の塩基配列は pTokyo11726, pTokyo12804 及び pTokyo13231 の *EcoRI* 断片で認められた。4,916 bp の塩基配列は pTokyo10539, pTokyo12261 及び pTokyo13057 の *EcoRI* 断片で認められた。4,917 bp の塩基配列は pTokyo12902 の *EcoRI* 断片で認められた。すべての *EcoRI* 断片には ORF が 3 つ存在していた。これら 3 つの ORF はそれぞれ *sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子と高い類似性が存在した。しかし, pTokyo11726, pTokyo12804 及び pTokyo13231 の *sed* 配列は, 開始コドンの “A” から数えて 514 番目の塩基 “A” が欠損しており, その結果フレームシフト変異による終止コドン “TAG” の出現が認められた (図 21)。この配列を持つ DNA 断片を変異型 *sed*

(*msed*) とする。一方で, pTokyo10539, pTokyo12261, pTokyo12902 及び pTokyo13057 における *sed* 配列は NCBI のデータベースに登録されている既知 *sed* の塩基配列 (アクセッション番号: KF007920.1) と 100%一致した。

#### 4. 定量的リアルタイム RT-PCR による *sed* 及び変異型 *sed* 遺伝子発現の検出

既知 *sed* と塩基配列が 100%一致する配列の DNA 断片を保有する供試 *S. aureus* 4 株 (Tokyo10539, Tokyo12261, Tokyo12902 及び Tokyo13057) において, *sed* 遺伝子の発現が認められた (図 22A)。*sodA* で補正した *sed* 遺伝子発現の程度は, 各株の SED タンパク質産生量と一致していた (図 19A)。一方で, SED 非産生株 (Tokyo11726, Tokyo12804 及び Tokyo13231) における *msed* 遺伝子発現も認められた。*sodA* を用いた補正後の値における遺伝子発現量は, これらの株間で有意な差は認められなかった ( $p>0.05$ , 図 22D)。内在性コントロールとして *ftsZ* 及び *rpoB* で補正した際にも, *sodA* 補正の場合と同様の *sed* 遺伝子と *msed* 遺伝子発現が認められた (図 22B, 22C, 22E 及び 22F)。

#### 考察

古典的 SEs がブドウ球菌食中毒の主要な原因であることはよく知られている [5, 20]。その一つである SED はブドウ球菌食中毒事例の原因毒素として同定される SEs の中で, 二番目もしくは三番目に

多いとされている [3]。 *S. aureus* は *sed* 遺伝子を持つプラスミドの伝播を通して、SED の産生能力を獲得すると推測される。また、現在までに知られている *sed* 遺伝子保有プラスミドは、pIB485-like plasmid に代表されるように、*selj*, *ser* 遺伝子など *sed* 遺伝子以外の SE/SEIs 遺伝子を保有するケースが多く存在する [2, 53]。本章では、ブドウ球菌食中毒 7 事例に由来する *sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子陽性 *S. aureus* 株が保有するプラスミドについて RFLP 解析を行った。pTokyo11726, pTokyo12804, pTokyo12902, pTokyo13057 及び pTokyo13231 の RFLP パターンは Omoe ら [53] の解析した pIB485-like plasmid の一種である p196E や p361 の RFLP パターンと一致した。また、pTokyo12261 の RFLP パターンは pIB485like-plasmid の一種である p1151 や pI7 のそれと一致した。pTokyo10539 の RFLP パターンは、他のプラスミドのそれと一致していなかったが、位置が異なる一本のバンドを除き、pIB485like-plasmid のそれと類似していた (図 18)。供試した食中毒事例由来 *S. aureus* 株が、pIB485-like plasmid もしくはその類似プラスミドを保有していたことから、食中毒の発生に關与する *sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子陽性 *S. aureus* 株は、本プラスミドが伝播することによってこれらの SE/SEIs 遺伝子を獲得することが推測された。

Tokyo13231 株を除く供試 *S. aureus* 6 株が、SEIJ と SER の両者を産生していた (図 19)。SER の産生量は、全ての *S. aureus* 株において 523 から 2925 ng/mL の範囲内であり (図 19C)、各株の総 SE/SEI 産生量中、最も高い割合もしくは二番目に高い割合を占めていた (図 20)。SER は、霊長類動物に対して嘔吐を引き起こすことが証明され、SER の食中毒への關与が示唆されている [57]。一方で、SEIJ

は霊長類動物での嘔吐活性が未だ確認されていない。しかし、SEIJは、嘔吐活性の強い古典的 SEs [31] である SEA（アミノ酸配列の類似性：64.6%）や SEE（63.4%）とアミノ酸配列の相同性があることから、SEIJ が他の SEs と同様に嘔吐活性を持っている可能性が考えられる。また、Omoe ら [56] はブドウ球菌食中毒の症状は単一のブドウ球菌が産生する古典的 SEs 及び新型 SEs の両者により誘起され、食中毒発症毒素量は各 SEs タンパク質の積算量が関係すると報告している。本章で分析した Tokyo13057 株は SER と SEIJ で総 SE/SEIs 産生量の 70%を占めており、これらの SEs が発症毒素量に達することに影響していることが考えられる。以上の事実に基づくと、本章で分析した菌株の由来であるブドウ球菌食中毒事例は、古典的 SEs が主要な要因ではあるが、SEIJ や SER も本疾病の発症に関して幾分かの役割を担っており、これらの SE/SEIs が存在するプラスミドの獲得が *S. aureus* 株の食中毒の起病性に関与した可能性が考えられる。

塩基配列解析により *sed* 遺伝子に 2 つのタイプの配列が存在することが明らかとなった。すなわち、既知 *sed* と塩基配列が 100%一致する完全長の *sed* 配列と変異の生じた *msed* 配列である。pTokyo10539, pTokyo12261, pTokyo12902 及び pTokyo13057 の各プラスミドは完全長の *sed* 配列を保持していた。しかし、pTokyo11726, pTokyo12804 及び pTokyo13231 の各プラスミドは *sed* 配列内で一塩基の欠損（開始コドンの“A”から 514 番目の塩基“A”）が認められた。その結果、フレームシフト変異による終止コドンの出現が生じていた（図 21）。このことから、pTokyo11726, pTokyo12804 及び pTokyo13231 が持つ *sed* 配列の翻訳は、途中で止まった短い配列を持つタンパク

質 (mSED) が産生される可能性が考えられる。msed の塩基配列をアミノ酸配列に変換すると、そのアミノ酸配列長は通常の SED タンパク質のそれと比較して C 末端側が 80 アミノ酸残基短くなった。このような msed 配列を持つプラスミドの報告は NCBI のデータベース上には、1963 年に病院の新生児室の看護師から分離された *S. aureus* 502A 株が保有する 502A plasmid のみが報告されているだけで (アクセッション番号: CP007455.1)、食中毒分離株に由来するものとしては初めての報告である。

多くの SEs は、嘔吐活性の他にスーパー抗原活性を有し、毒素性ショック症候群の発症に関与する。SEs タンパク質の嘔吐活性並びにスーパー抗原活性に関与する機能領域に関して複数の報告がある [34, 43, 66]。合成ペプチドを用いた解析により、SEA の 21-50 及び 81-100 残基が嘔吐活性及びスーパー抗原活性のそれぞれに重要であり、161-180 残基はスーパー抗原活性にのみ必要であることが明らかにされた [43]。また、突然変異誘発実験によって、SEA が MHC class II に結合するために必要なアミノ酸残基が、187 番のヒスチジン、225 番のヒスチジン及び 227 番のアスパラギン酸であることが同定された [34, 66]。また SED は、この MHC 結合領域が SEA に類似していることが知られている [34, 66]。これらの報告は、スーパー抗原活性に関して必須である MHC 結合領域が毒素分子の C 末端側に位置していることを示している。本章で明らかにした mSED は、C 末端側の 80 アミノ酸残基は欠損しているが、嘔吐活性に必要な N 末端側の領域の配列は保存されていた。すなわち、mSED は嘔吐活性を保持している可能性が考えられる。一方で、N 末端側の一つのアミノ酸変異により、嘔吐活性及びスーパー抗原活

性の両者が低下するという報告もある [26, 32]。従って、mSED タンパク質の嘔吐活性を検証する必要があり、今後の研究で明らかにしなければならない課題である。

*msed* 配列を持つ *S. aureus* 株において、*msed* 遺伝子の発現が認められた (図 22) が、mSED タンパク質産生量は、抗 SED 抗体を用いた従来の Sandwich ELISA では検出することができなかった (図 19A)。この原因として、1 つは mSED タンパク質が菌体外に分泌されていないことが考えられる。*S. aureus* などの真正細菌の場合、転写と翻訳はほぼ同時に起きることが知られている。*msed* 配列を持つ *S. aureus* 株において *msed* 遺伝子の転写を確認したことから、これらの菌体内には一時的に mSED タンパク質が存在することが推測されるが、不要なタンパク質と認識され菌体内で分解されている可能性がある。もう 1 つは、mSED タンパク質が菌体外に分泌されていた場合、mSED が SED とは異なる立体構造を持ち、抗 SED 抗体が認識することができないタンパク質であることが考えられる。SED タンパク質の持つ抗原決定基の詳細な解析は行われていない。SED の主要な抗原決定基が、アミノ酸の一次構造から形成されるものではなく、立体構造依存性であると仮定した場合、変異の生じた mSED は抗 SED 抗体によって検出することができない可能性がある。mSED の嘔吐活性の検証と同様に、mSED を認識する抗体を作製しその産生量を検出する手法を確立することが、mSED の食中毒への関与を検討する上で必要であり、今後の研究の展開が待たれる。

以上、本章では、食中毒由来 *S. aureus* 株が持つプラスミドの分子遺伝学的特性並びに本プラスミドに起因する食中毒起病性に関して新たな知見を得た。食中毒に関与するプラスミドは pIB485-like



plasmid であり, 本プラスミドを保有するブドウ球菌食中毒分離株の多くは, SEIJ 及び SER を産生していることが明らかとなった。このことは, *S. aureus* が本プラスミドの伝播により, 嘔吐活性を持つ SER やそれを持つ可能性が高い SEIJ の産生能を獲得し, 食中毒起病性を高めることを示唆する。また, SED が検出できないタイプに属する *S. aureus* 株が持つ pIB485-like plasmid には, SED 配列の C 末端部分の 80 アミノ酸残基を欠失する mSED 配列が存在し, それらの *S. aureus* 株は, *msed* 遺伝子を発現していることが明らかとなった。一方, 抗 SED 抗体を用いての検証からは, mSED タンパク質が菌体外に分泌されているかは明確にできず, mSED タンパク質が SE として食中毒の原因毒素になりえるか否か, 今後検討が必要である。



表 13. 本章で使用した菌株

菌株名	SE/SEIs 遺伝子型	由来
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Tokyo10539	<i>sed seg sei selj sem sen seo ser</i>	食中毒事例の患者糞便由来
Tokyo11726	<i>sea sed selj ser</i>	食中毒事例の患者糞便由来
Tokyo12261	<i>sea sed selj ser</i>	食中毒事例の推定原因食品由来
Tokyo12804	<i>sea sed selj ser</i>	食中毒事例の患者嘔吐物由来
Tokyo12902	<i>sea sed selj ser</i>	食中毒事例の患者嘔吐物由来
Tokyo13057	<i>sed seg sei selj sem sen seo ser</i>	食中毒事例の患者糞便由来
Tokyo13231	<i>sea sed selj ser</i>	食中毒事例の患者嘔吐物由来
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	—	Promega 社

太字はプラスミド関連 SE/SEIs 遺伝子を示す。

表 14. 本章で使用したプラスミド

プラスミド名	特徴	由来
pGEM-3Zf(+)	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	Promega 社
pGEM-T easy	Ap <sup>r</sup> , TA cloning vector	Promega 社
pTokyo10539	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo10539	本研究
pTokyo11726	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo11726	本研究
pTokyo12261	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo12261	本研究
pTokyo12804	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo12804	本研究
pTokyo12902	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo12902	本研究
pTokyo13057	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo13057	本研究
pTokyo13231	<i>S. aureus</i> plasmid purified from strain Tokyo13231	本研究
pG10539F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4916 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo10539	本研究
pG11726F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4915 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo11726	本研究
pG12261F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4916 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo12261	本研究
pG12804F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4915 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo12804	本研究
pG12902F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4917 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo12902	本研究
pG13057F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4916 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo13057	本研究
pG13231F	Ap <sup>r</sup> , pGEM-3Zf(+) with cloned 4915 bp <i>EcoRI</i> -fragment of pTokyo13231	本研究
pGTsed	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing <i>sed</i> ( <i>mseD</i> ) sequence (41 bp–425 bp)	本研究
pGTsoda	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing <i>sodA</i> sequence (71 bp–539 bp)	本研究
pGTftsZ	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing <i>ftsZ</i> sequence (53 bp–448 bp)	本研究
pGTspoB	Ap <sup>r</sup> , pGEM-T easy with cloned PCR product containing <i>rpoB</i> sequence (965 bp–1576 bp)	本研究

表 15. 本章で使用したオリゴヌクレオチド

目的	遺伝子名	オリゴ名	配列 (5'→3')	
TA-Cloning	<i>sed</i> or <i>mseed</i>	SED41F	CTAGTTTGGTAATAATCTCCTTTAAACG	
		SED425R	TTACCTTCGTGTGGAGTGACA	
	<i>soda</i>	SODA71F	TGGAATAATCACCATGACAGA	
		SODA539R	CCAAATGTAGTCAGGGCGTTT	
	<i>ftsZ</i>	FTSZ53F	GTGTAGGTGGTGGCGGTAAAC	
		FTSZ448R	CAGCAGCAGCTTGAGTTTGA	
	<i>rpoB</i>	RPOB965F	TTGAAATCAAACGCAACACAGC	
		RPOB1576R	ATCCAATGTTTGGTCCCCTCA	
	Quantitative RT-PCR	<i>sed</i> or <i>mseed</i>	SED291F	TTCAAAGAAGAAATGGCTCAACA
			SED425R	TTACCTTCGTGTGGAGTGACA
<i>soda</i>		SODA373F	GGTTCAGGTTGGGCTTGGT	
		SODA440R	TCTTGGTTTGGTGTAGTCACAATTC	
<i>ftsZ</i>		FTSZ315F	GGGTGGCGGAACCTGGTACT	
		FTSZ376R	CGCCCATTTCTTTTGGCAATT	
<i>rpoB</i>		RPOB1482F	ACGTGAACGTGCTCAAAATGG	
		RPOB1563R	TCCCTCAGGCGTTTCAATTG	

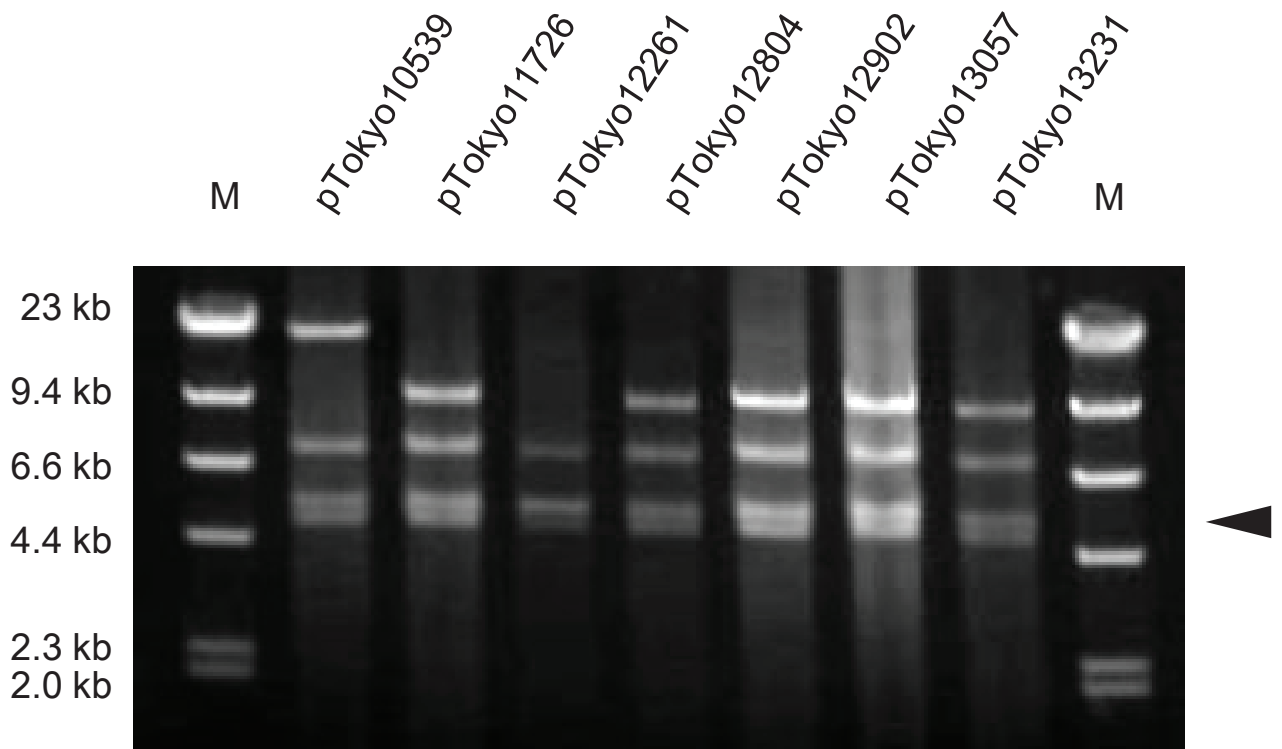
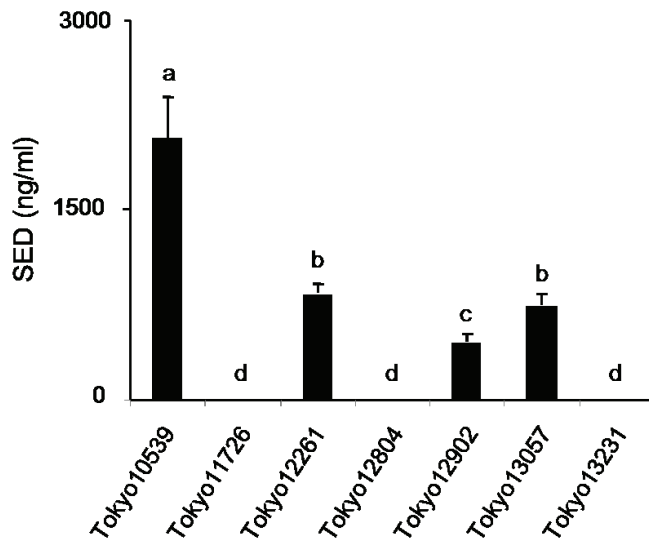


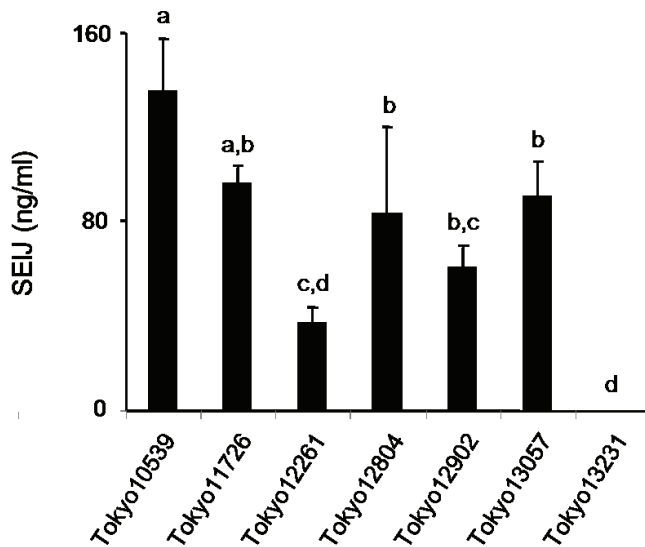
図 18. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離7株が保有するプラスミドの Restriction fragment length polymorphism解析

*sed*, *selj*及び*ser*遺伝子陽性 *S. aureus* 分離株が保有するプラスミドを精製し，制限酵素 *EcoRI*を用いて切断した。矢頭は*sed*, *selj*及び*ser*遺伝子が存在することが予測される *EcoRI*断片（約4.9 kbp）の位置を示す。M：DNAサイズマーカー

A



B



C

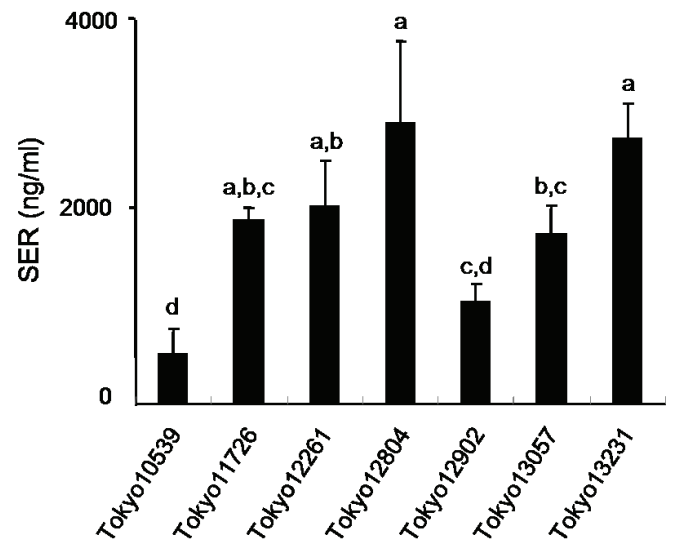


図 19. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離7株におけるプラスミド関連 Staphylococcal enterotoxin/Staphylococcal enterotoxin-like toxinの産生量

(A) SEDタンパク質, (B) SEIJタンパク質, (C) SERタンパク質の産生量をそれぞれ示す。実験は独立した3回の試行で実施した。各株の産生量は3回の平均値±標準偏差で示している。グラフ中のアルファベットは、それぞれの異なるアルファベット間で有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

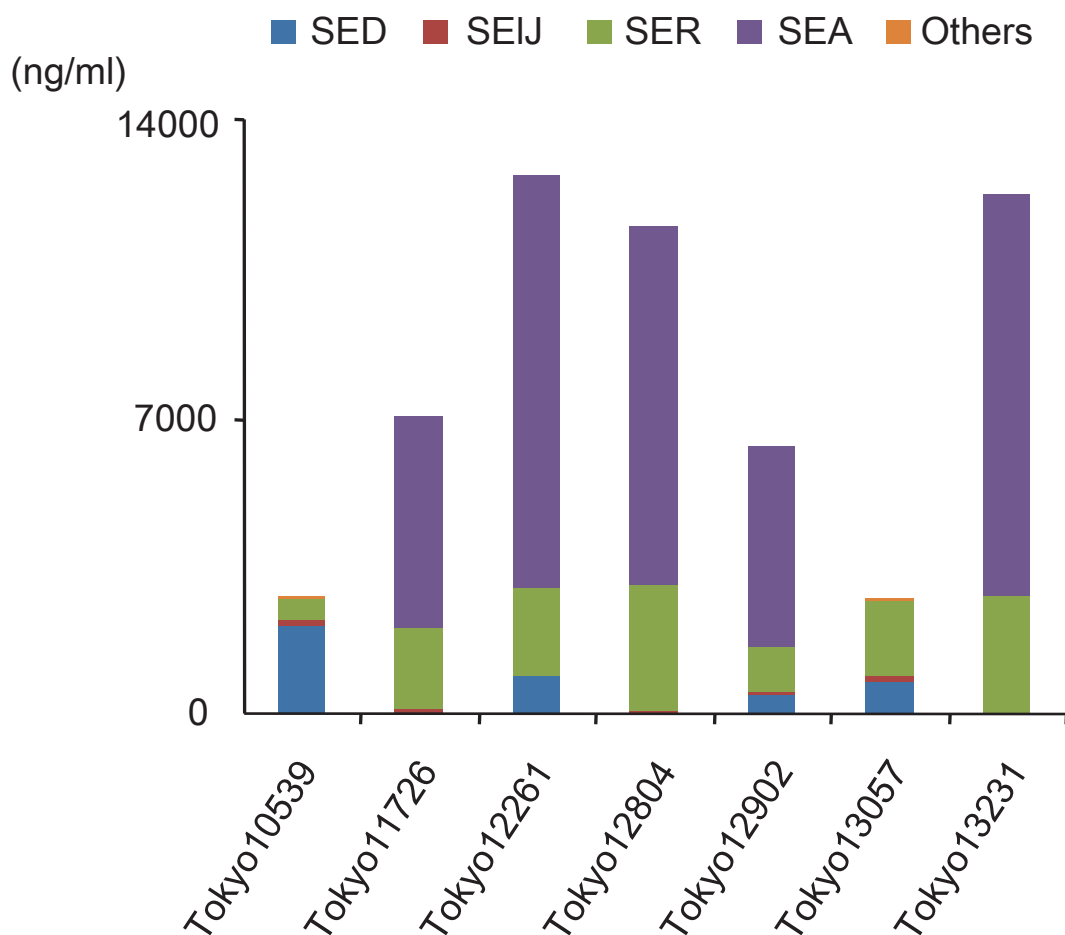


図 20. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離7株における Staphylococcal enterotoxin/Staphylococcal enterotoxin-like toxin (SE/SEI) タンパク質の総産生量と各種 SE/SEI タンパク質の産生割合

各 *S. aureus* 株が示す SE/SEIs 遺伝子型に対応する毒素タンパク質を Sandwich ELISA で測定した。実験は独立した3回の試行で実施した。それぞれの平均毒素濃度を合算し、各毒素型の割合を表示した。"Others"には、SEG, SEI, SEM, SEN及びSEOタンパク質の産生量を含む。

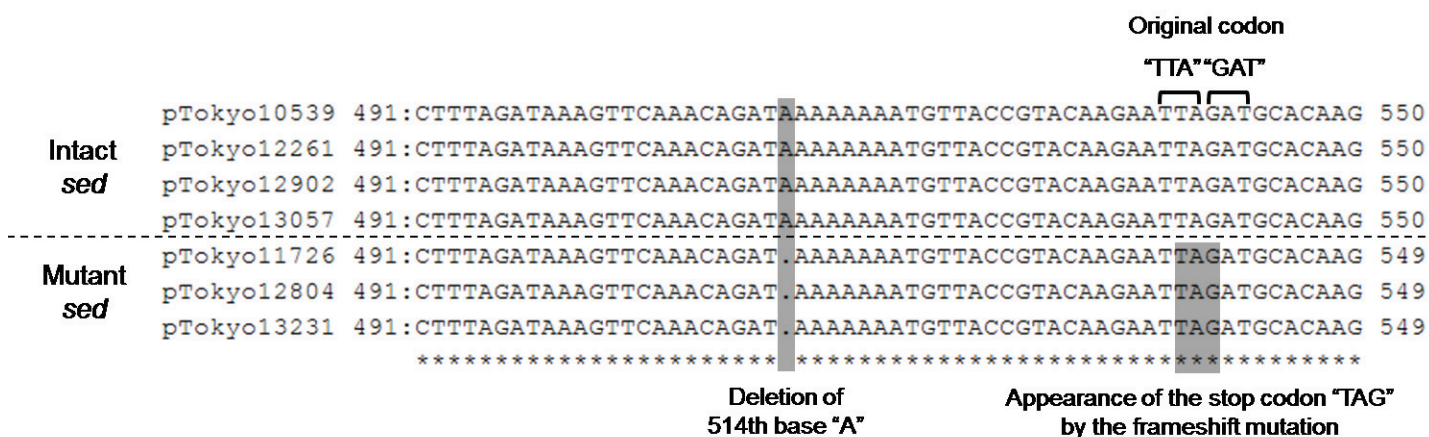


図 21. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離7株の持つプラスミド上の *sed* 配列と変異型 *sed* 配列の比較

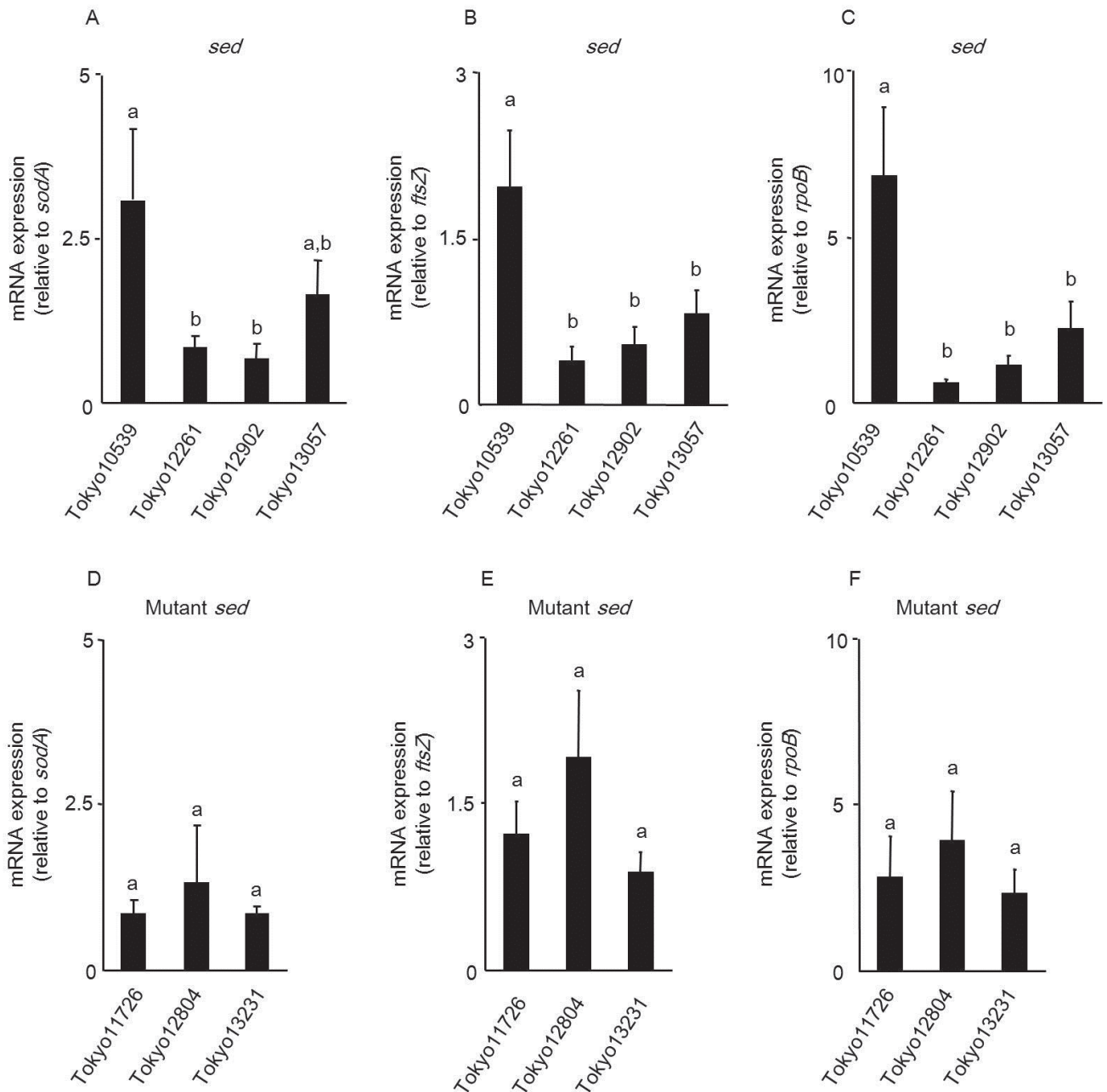


図 22. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来 *S. aureus* 分離7株における *sed* 遺伝子または変異型 *sed* 遺伝子発現量の比較

(A, B, C) 完全長の *sed* 配列を持つ *S. aureus* 株 (Tokyo10539, Tokyo12261, Tokyo12902 及び Tokyo13057) における *sed* 遺伝子の発現量 "A" は内在性コントロールとして *sodA*, "B" は *ftsZ*, "C" は *rpoB* 遺伝子を用い, それぞれの発現量で補正した値を示す。

(D, E, F) 変異型 *sed* 配列を持つ *S. aureus* 株 (Tokyo11726, Tokyo12804 及び Tokyo13231) における変異型 *sed* 遺伝子の発現量 "D" は内在性コントロールとして *sodA*, "E" は *ftsZ*, "F" は *rpoB* 遺伝子を用い, それぞれの発現量で補正した値を示す。実験は独立した3回の試行で実施した。各株の発現量は3回の平均値±標準偏差で示している。グラフ中のアルファベットは, それぞれの異なるアルファベット間で有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。



## 総括

ブドウ球菌食中毒は、*S. aureus* の産生する SEs の摂取により引き起こされる毒素型食中毒である。本食中毒は広く世界中で発生し、社会的関心の高い大規模な事例を起こし得る食品衛生学上重要な細菌性食中毒の一つである。近年、食中毒以外の疾病に関与する *S. aureus* に関して、分子疫学的手法を用いた遺伝学的特性の報告が数多くなされる中、食中毒由来 *S. aureus* の遺伝学的特性に関する報告は少なく、不明な点が多い。一方で、SE/SEIs 遺伝子の多くは可動性遺伝因子上に存在することが知られており、可動性遺伝因子が *S. aureus* の食中毒起病性の獲得に深く関与していると考えられている。すなわち、各種の可動性遺伝因子を同定しその分子遺伝学的特性を解析することが、*S. aureus* の食中毒病原体としての起病性を考察する上で非常に有益であると考えられる。本研究では、ブドウ球菌食中毒を誘発しやすい状態の *S. aureus* の遺伝学的特性を明らかにすること、また、ブドウ球菌食中毒発生に関与する可動性遺伝因子の分子遺伝学的特性を明らかにすることを目的に以下の項目を検討した。

第一章では、食中毒事例由来株について分子疫学的手法を含めた 4 種類の疫学解析を実施し、ブドウ球菌食中毒を誘発しやすい *S. aureus* の遺伝学的特性を明らかにした。食中毒由来 *S. aureus* 株は、MLST 法による分子疫学解析により 8 種類の CC に分類され、これら CC は食中毒以外の疾病やヒトの常在菌から分離される CC とは明らかに異なっていた。また、各 CC に属する *S. aureus* 株には、コアグラゼ型、SE/SEIs 遺伝子型、SE/SEIs 獲得に関連する可動性遺

伝因子の保有状況に関して特定の規則性があることを明らかにした。このことは、特定の CC 型，コアグララーゼ型，SE/SEIs 遺伝子型及び SE/SEIs 獲得に関連する可動性遺伝因子の保有型によって識別される遺伝学的特性を持つ *S. aureus* 株が，食中毒を誘発しやすいという疾病特異的な *S. aureus* の集団が存在することを示唆するものである。

第二章では，第一章で網羅的に解析した食中毒分離 *S. aureus* 株の中から，SEs をコードする 4 つの新規 SaPI (SaPITokyo12413, SaPITokyo11212, SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381) を同定し，その食中毒起病性並びに伝播性に関する分子遺伝学的特性に関して新たな知見を得た。新規 SaPI を保有する *S. aureus* 株は，既知の SEs 関連 SaPI を保有する対照株と比較して同等もしくは有意に多い SE 産生量を示し，食中毒起病性を持つことが示唆された。また，SaPI 伝播の一過程である“複製”に関与する複製開始タンパク質 (Rep) の機能解析の結果，SaPITokyo11212, SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381 は既知 SaPI と同様に Rep が持つヘリカーゼ活性を保持していることを確認した。しかし SaPITokyo12413 では，複製に関与する Rep や複製開始点が保存されていなかったため，SaPI を複製する能力を欠失していることが明らかとなった。この欠失が，SaPITokyo12413 の伝播能力の低下あるいは欠如の原因となっていると推測される。以上の結果は，SaPI は，それ自体の伝播能力によって，*S. aureus* 株に対し食中毒起病性の獲得といった分子遺伝学的特性の変化を起こす一方で，伝播能力を失っていくという独自の分子遺伝学的特性を保有していることを示唆するものである。

第三章では，食中毒事例由来 *S. aureus* 株が持つ可動性遺伝因子の

1 種であるプラスミドの分子遺伝学的特性並びに本食中毒起病性に関して新たな知見を得た。食中毒に関与するプラスミドは pIB485-like plasmid であり，本プラスミドを保有するブドウ球菌食中毒分離株の多くは，SEIJ 及び SER を産生していることが明らかとなった。このことは，pIB485-like plasmid の伝播が，食中毒の起病性を高めることを示唆する。また，SED が検出できないタイプに属する *S. aureus* 株が持つ pIB485-like plasmid 上には，SED 配列の C 末端部分の 80 アミノ酸残基を欠失する mSED 配列が存在し，それらの *S. aureus* 株は，*msed* 遺伝子を発現していることが明らかとなった。一方，抗 SED 抗体を用いての検証からは，mSED タンパク質が菌体外に分泌されているかは明確にできず mSED タンパク質が SE として食中毒の原因毒素になりえるか否か，今後の検証が必要である。

以上，本研究によって，ブドウ球菌食中毒の起病性の高い *S. aureus* の遺伝学的特性が明らかになった。また，*S. aureus* 株は今回同定したものを含め，多様な可動性遺伝因子の伝播を通じ，食中毒起病性を獲得すると考えられた。可動性遺伝因子は，病原体としての *S. aureus* の起病性に深く関与すると同時に，それぞれの菌株に特有の分子遺伝学的特性を付与している。本研究で示したような可動性遺伝因子の解析は，その結果を分子疫学解析に応用することでより詳細かつ正確な疫学的情報を得るために有用であると期待される。近年 NCBI のデータベースには新規の可動性遺伝因子の塩基配列が次々と登録されている。例えば *S. aureus* 由来のプラスミドは，全長配列の登録と部分的な配列の登録を合わせた場合，2014 年だけでも 100 種類を超える登録がなされている。本研究で解析した SaPI やプ

ラスミドは、多様性のある可動性遺伝因子のごく一部であり、未同定の可動性遺伝因子が存在する可能性は十分考えられる。従って、食中毒由来株の持つ可動性遺伝因子の同定とその分子遺伝学的特性を明らかにすることが、食中毒起病性 *S. aureus* をより詳細に理解するために重要であると考えられる。

今回得られた知見はブドウ球菌食中毒事例における分子疫学解析の基礎的な情報になるとともに、*S. aureus* の起病性を検討する上で有益な情報を提供するものである。これらの情報は、食中毒起病性 *S. aureus* が常在する場所や食中毒発生時の汚染経路の特定に有用であり、本情報を基に、食品の製造、輸送、販売の各現場や保健所などの行政機関に対して注意喚起や汚染領域の清浄化などの指導が可能となることから、ブドウ球菌食中毒の防止に貢献すると考える。

## 謝辞

本研究にあたり，終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました主指導教員である岩手大学農学部 鎌田洋一教授に深甚なる謝意を表します。実験系の構築，本稿作成にあたり多くの御指導を賜りました副指導教員である岩手大学農学部の橋爪一善名誉教授，村上賢二教授，岐阜大学応用生物科学部の杉山誠教授に深謝いたします。また，本稿作成にあたり有益な御助言を頂きました帯広畜産大学畜産学部の小川晴子教授，東京農工大学農学部の藤川浩教授に深謝いたします。

本研究の実施並びに本稿作成にあたり有益な御助言を賜りました東京都健康安全研究センター微生物部の甲斐明美博士，貞升健志博士，仲真晶子博士，久保田寛顕博士ならびに同食品微生物研究科の皆様深く感謝の意を表します。

論文の作成にあたり御助言を賜りました，岩手大学農学部の古濱和久教授，北里大学獣医学部の胡東良教授に心から感謝いたします。蛍光ヘリカーゼアッセイの御助言を賜りました，早稲田大学先進理工学部の常田聡教授，産業技術総合研究所の野田尚宏博士に心から感謝いたします。

本研究の実施及び解析にあたり多くの御助言および御協力をいただきました，研究室の先輩である岩手大学の小野久弥博士（現弘前大学大学院医学研究科助教），佐藤祐介博士（現自治医科大学医学部感染・免疫講座細菌学部門助教）に心から感謝いたします。

最後に，本研究へと導いて下さった岩手大学農学部の故重茂克彦教授に万謝申し上げ，ご冥福をお祈り申し上げます。

## 参考文献

- 1) Alouf, J. E. and Müller-Alouf, H. (2003). Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 429-440.
- 2) Argudín, M. Á., Mendoza, M. C. and Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2, 1751-1773.
- 3) Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., González-Hevia, M. A., Bances, M., Guerra, B. and Rodicio, M. R. (2012). Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2930-2935.
- 4) Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130, 33-40.
- 5) Balaban, N. and Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1-10.
- 6) Bergdoll, M.S., Borja, C.R. and Avena, R.M. (1965). Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J. Bacteriol.* 90, 1481-1485.
- 7) Bergdoll, M. S., Borja, C. R., Robbins, R. N. and Weiss, K. F. (1971). Identification of enterotoxin E. *Infect. Immun.* 4,

593-595.

- 8) Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- 9) Boguszevska-Chachulska, A. M., Krawczyk, M., Stankiewicz, A., Gozdek, A., Haenni, A. L. and Strokovskaya, L. (2004). Direct fluorometric measurement of hepatitis C virus helicase activity. *FEBS Lett.* 567, 253-258.
- 10) Borja, C. R. and Bergdoll, M. S. (1967). Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. *Biochemistry.* 6, 1467-1473.
- 11) Borja, C. R., Fanning, E., Huang, I. Y. and Bergdoll, M. S. (1972). Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. *J. Biol. Chem.* 247, 2456-2463.
- 12) Borst, D. W. and Betley, M. J. (1994). Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infect. Immun.* 62, 113-118.
- 13) Briani, F., Dehò, G., Forti, F. and Ghisotti, D. (2001). The plasmid status of satellite bacteriophage P4. *Plasmid.* 45, 1-17.
- 14) Cao, R., Zeaki, N., Wallin-Carlquist, N., Skandamis, P. N., Schelin, J. and Rådström, P. (2012). Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4942-4948.
- 15) Casman, E. P. and Bennett, R. W. (1963). Culture medium for the

- production of staphylococcal enterotoxin A. J. Bacteriol. 86, 18-23.
- 16) Casman, E. P., Bennett, R. W., Dorsey, A. E. and Issa, J. A. (1967). Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J. Bacteriol. 94, 1875-1882.
  - 17) Cha, J. O., Lee, J. K., Jung, Y. H., Yoo, J. I., Park, Y. K., Kim, B. S. and Lee, Y. S. (2006). Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. J. Appl. Microbiol. 101, 864-871.
  - 18) Dack, G.M., Cary, W.E., Woolpert, O. and Wiggers, H. (1930). An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic staphylococcus. J. Prev. Med. 4, 167-175.
  - 19) Derzelle, S., Dilasser, F., Duquenne, M. and Deperrois, V. (2009). Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food Microbiol. 26, 896-904.
  - 20) Dinges, M. M., Orwin, P. M. and Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16-34.
  - 21) Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. and Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008-1015.
  - 22) Evenson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S. and Bergdoll, M.



- S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 311-316.
- 23) Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Peacock, S. J., Smith, J. M., Murphy, M., Spratt, B. G., Moore, C. E. and Day, N. P. (2003). How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185, 3307-3316.
- 24) Fraser, J. D. and Proft, T. (2008). The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.* 225, 226-243.
- 25) Gilmour, M.W., Graham, M., Reimer, A. and Van Domselaar, G. (2013). Public health genomics and the new molecular epidemiology of bacterial pathogens. *Public Health Genomics.* 16, 25-30.
- 26) Harris, T. O. and Betley, M. J. (1995). Biological activities of staphylococcal enterotoxin type A mutants with N-terminal substitutions. *Infect. Immun.* 63, 2133-2140.
- 27) Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K. and Eguchi, M. (2010). Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2130-2139.
- 28) Hennekinne, J. A., Ostyn, A., Guillier, F., Herbin, S., Pruger, A. L. and Dragacci, S. (2010). How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins (Basel).* 2,

2106-2116.

- 29) Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L. and Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol. Rev. 36, 815-836.
- 30) Hennig, S. and Ziebuhr, W. (2010). Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. J. Bacteriol. 192, 4153-4163.
- 31) Hu, D. L., Omoe, K., Shimoda, Y., Nakane, A. and Shinagawa, K. (2003). Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). Infect. Immun. 71, 567-570.
- 32) Hu, D. L., Omoe, K., Sashinami, H., Shinagawa, K. and Nakane, A. (2009). Immunization with a nontoxic mutant of staphylococcal enterotoxin A, SEAD227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. J. Infect. Dis. 199, 302-310.
- 33) Hu, D. L., Maina, E. K., Omoe, K., Inoue, F., Yasujima, M. and Nakane, A. (2011). Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Tohoku J. Exp. Med. 225, 161-169.
- 34) Hu, D. L. and Nakane, A. (2014). Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. Eur. J. Pharmacol. 722, 95-107.

- 35) Igarashi, H. (1972). Staphylococcal enterotoxin D. Immunological identification with purified toxin. Jpn. J. Microbiol. 16, 483-491.
- 36) Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.
- 37) Ko, K. S., Lee, J. Y., Suh, J. Y., Oh, W. S., Peck, K. R., Lee, N. Y. and Song, J. H. (2005). Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. J. Clin. Microbiol. 43, 421-426.
- 38) Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357, 1225-1240.
- 39) Li, Z., Stevens, D. L., Hamilton, S. M., Parimon, T., Ma, Y., Kearns, A. M., Ellis, R. W. and Bryant, A. E. (2011). Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. PLoS One. 6, e27246.

- 40) Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E. and Mariuzza, R. and International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189, 2334-2336.
- 41) Lindsay, J. A., Ruzin, A., Ross, H. F., Kurepina, N. and Novick, R. P. (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 29, 527-543.
- 42) Lindsay, J. A. and Holden, M. T. (2006). Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics.* 6, 186-201.
- 43) Maina, E. K., Hu, D. L., Asano, K. and Nakane, A. (2012). Inhibition of emetic and superantigenic activities of staphylococcal enterotoxin A by synthetic peptides. *Peptides.* 38, 1-7.
- 44) Malachowa, N. and DeLeo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 3057-3071.
- 45) Maki, H. and Murakami, K. (1997). Formation of potent hybrid promoters of the mutant *ilm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179, 6944-6948.
- 46) Masuda, S., Tomida, Y., Ohta, H. and Takamiya, K. (2007). The critical role of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 in the

- blue-light sensing BLUF domain that controls AppA activity. *J. Mol. Biol.* 368, 1223-1230.
- 47) McCarthy, A. J., Witney, A. A. and Lindsay, J. A. (2012). *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2, 6.
- 48) Munson, S. H., Tremaine, M. T., Betley, M. J. and Welch R. A. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 66, 3337-3348.
- 49) Novick, R. P. (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 49, 93-105.
- 50) Novick, R. P. and Subedi, A. (2007). The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem. Immunol. Allergy.* 93, 42-57.
- 51) Novick, R. P., Christie, G. E. and Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541-551.
- 52) Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. L., Ueda, S. and Shinagawa, K. (2002). Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 857-862.
- 53) Omoe, K., Hu, D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and

- Shinagawa, K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71, 6088-6094.
- 54) Omoe, K., Hu D. L., Takahashi-Omoe H., Nakane A. and Shinagawa K. (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 191-198.
- 55) Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D. L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S., Watanabe, Y., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. (2005). Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun.* 73, 5540-5546.
- 56) Omoe, K., Hu, D. L., Ono, H. K., Shimizu, S., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K. and Imanishi, K. (2013). Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect. Immun.* 81, 3627-3631.
- 57) Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D. L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. (2008). Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* 76, 4999-5005.
- 58) Ono, H. K., Nishizawa, M., Yamamoto, Y., Hu, D. L., Nakane, A., Shinagawa, K. and Omoe, K. (2012). Submucosal mast cells in the gastrointestinal tract are a target of staphylococcal enterotoxin type A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64,

392-402.

- 59) Raj, H. D. and Bergdoll, M. S. (1969). Effect of enterotoxin B on human volunteers. *J. Bacteriol.* 98, 833-834.
- 60) Ruimy, R., Armand-Lefevre, L., Barbier, F., Ruppé, E., Coccojaru, R., Mesli, Y., Maiga, A., Benkalfat, M., Benchouk, S., Hassaine, H., Dufourcq, J. B., Nareth, C., Sarthou, J. L., Andremont, A. and Feil, E. J. (2009). Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191, 5577-5583.
- 61) Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- 62) Sakai, F., Takemoto, A., Watanabe, S., Aoyama, K., Ohkubo, T., Yanahira, S., Igarashi, H., Kozaki, S., Hiramatsu, K. and Ito, T. (2008). Multiplex PCRs for assignment of Staphylocoagulase types and subtypes of type VI Staphylocoagulase. *J. Microbiol. Methods.* 75, 312-317.
- 63) Sakwinska, O., Kuhn, G., Balmelli, C., Francioli, P., Giddey, M., Perreten, V., Riesen, A., Zysset, F., Blanc, D. S. and Moreillon, P. (2009). Genetic diversity and ecological success of *Staphylococcus aureus* strains colonizing humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 175-183.
- 64) Sato'o, Y., Omoe, K., Ono, H. K., Nakane, A. and Hu, D. L. (2013). A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Microbiol.*

Immunol. 57, 91-99.

- 65) Sato'o, Y., Omoe, K., Naito, I., Ono, H. K., Nakane, A., Sugai, M., Yamagishi, N. and Hu, D. L. (2014). Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. J. Clin. Microbiol. 52, 2637-2640.
- 66) Schad, E. M., Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Dohlsten, M., Kalland, T., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H. and Svensson, L. A. (1995). Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. EMBO J. 14, 3292-3301.
- 67) Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M. T., Lindqvist, R., Barker, G. C. and Rådström, P. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. 2, 580-592.
- 68) Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A. and Kawano, J. (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 38, 3746-3749.
- 69) Staphylococci and Staphylococcal Diseases. (1975). Chapter 9: Staphylococcal Epidemiology and Ecology In: Jeljaszewicz J, editor. Proceedings of III. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. pp. 935-940, 975-980, 995-1032. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York
- 70) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and



- Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- 71) Tani, H., Fujita, O., Furuta, A., Matsuda, Y., Miyata, R., Akimitsu, N., Tanaka, J., Tsuneda, S., Sekiguchi, Y. and Noda, N. (2010). Real-time monitoring of RNA helicase activity using fluorescence resonance energy transfer in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 131-136.
- 72) Thomas, D. Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M. L., Lina, G. and Vandenesch, F. (2006). Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74, 4724-4734.
- 73) Tranter, H. S. (1990). Foodborne staphylococcal illness. *Lancet.* 336, 1044-1046.
- 74) Ubeda, C., Barry, P., Penadés, J. R. and Novick, R. P. (2007). A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104, 14182-14188.
- 75) Ubeda, C., Maiques, E., Barry, P., Matthews, A., Tormo, M. A., Lasa, I., Novick, R. P. and Penadés, J. R. (2008). SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. *Mol. Microbiol.* 67, 493-503.

- 76) Ubeda, C., Tormo-Más, M. Á., Penadés, J. R. and Novick, R. P. (2012). Structure-function analysis of the SaPIbov1 replication origin in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. 67, 183-190.
- 77) Ushioda, H., Terayama, T., Sakai, S., Zen-Yoji, H., Nishiwaki, M. and Hidano, A. (1981). Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* and its application in routine work. In: Jeljaszewicz J, editor. *Staphylococci and staphylococcal infections*, Zentbl. Bakteriol. Suppl. 10. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer Verlag., pp. 77–83.
- 78) Waldron, D. E. and Lindsay, J. A. (2006). Saul: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J. Bacteriol.* 188, 5578-85.
- 79) Wattinger, L., Stephan, R., Layer, F. and Johler, S. (2011). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 455-464.
- 80) Wilson, G. J., Seo, K. S., Cartwright, R. A., Connelley, T., Chuang-Smith, O. N., Merriman, J. A., Guinane, C. M., Park, J. Y., Bohach, G. A., Schlievert, P. M., Morrison, W. I. and Fitzgerald, J. R. (2011). A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 7, e1002271.

- 81) Yan, X., Wang, B., Tao, X., Hu, Q., Cui, Z., Zhang, J., Lin, Y., You, Y., Shi, X. and Grundmann, H. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6637-6642.
- 82) Yarwood, J. M., McCormick, J. K., Paustian, M. L., Orwin, P. M., Kapur, V. and Schlievert, P. M. (2002). Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J. Biol. Chem.* 277, 13138-13147.
- 83) Zhang, L., Thomas, J. C., Miragaia, M., Bouchami, O., Chaves, F., d'Azevedo, P. A., Aanensen, D. M., de Lencastre, H., Gray, B. M. and Robinson, D. A. (2013). Multilocus sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, *Staphylococcus hominis*. *PLoS One.* 8, e66496.