

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08460

研究課題名(和文) 芽胞形成制御シグナルの同定と制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of sporulation and its signal in *Clostridium perfringens*

研究代表者

大谷 郁 (OHTANI, Kaori)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30377410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌は悪玉菌とよばれるが、ヒト腸内常在菌として存在している。ウェルシュ菌の病原性発揮の第1段階には芽胞が重要な役割を担っているが、その形成開始のメカニズムは不明な点が多い。本研究では芽胞形成に関与するセンサータンパク候補を同定し、そのセンサーの変異株では芽胞形成効率が低下し、腸管毒素遺伝子の発現も低下することが明らかとなった。また、腸内で共存する可能性のある酪酸菌との共培養により、酪酸菌と共存することでウェルシュ菌の芽胞形成効率が低下し、腸管毒素産生性も低下することが明らかとなり、異種の細菌からのシグナルを受けて環境に応じた遺伝子発現へと切り替えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens causes gas gangrene and gastrointestinal (GI) diseases in humans. Spores are important factors to cause diseases but the mechanism of how to start sporulation has not been identified. One of the sensor proteins to start the sporulation was identified in this research. The mutant strain of this sensor reduced the sporulation and its complemented strain recovered the sporulation rate. Moreover, Clostridium butyricum and C. perfringens were co-cultured in the sporulation condition. These bacteria are normal flora of human intestine and have possibility to communicate to each other. A decrease in sporulation rate of C. perfringens was found, furthermore, transcription of enterotoxin gene was also found to be reduced by the co-culture with C. butyricum. These data indicated that signals from C. butyricum control the gene expression in C. perfringens. This kind of communication of bacteria in the human intestine might be very important to maintain the bacteria balance.

研究分野：細菌学

キーワード：異種間情報伝達 芽胞形成

1. 研究開始当初の背景

芽胞形成グラム陽性嫌気性桿菌であるウェルシュ菌は多数の毒素を産生しその協調作用によってガス壊疽等の特徴ある病態を形成する。また、食中毒の原因菌としても知られる。

ウェルシュ菌の毒素産生調節は細胞間情報伝達に関わる *agr* システムとそのシグナルを感知する二成分制御系 *VirR/VirS* システムが行っており、特にガス壊疽の発症に関与すると考えられている多くの酵素や毒素遺伝子群は *VirR/VirS* システムの支配下であり、このシステムによって包括的に調節を受けることで効率よく毒素産生を行い、宿主組織を破壊してガス壊疽を引き起こしていると考えられている。ウェルシュ菌は芽胞形成菌であり、芽胞が傷口を汚染することによりガス壊疽を発症すると考えられている。また、本菌による食中毒は芽胞が食品中に混入することが第一段階となり、さらに食中毒を引き起こすエンテロトキシンは芽胞形成時のみ産生される。これらのことから、芽胞形成が病原性の発現に非常に重要な因子であると考えられている。芽胞形成が調節遺伝子 *virX* により抑制されており、*virX* 遺伝子はエンテロトキシンの産生にも抑制的に働いていることが近年明らかとなってきている。ウェルシュ菌の遺伝子発現調節機構は病原性に重要な部分が明らかになってきているものの、毒素産生や芽胞形成と環境因子の関係性、つまりどのような環境で芽胞になり、またはどのような環境で発芽し毒素を産生するかといった、外界環境と遺伝子発現の関係について未知の部分が多い。

本菌は、病原菌としてヒトにガス壊疽や食中毒等の病原性を発揮する一方で、ヒト腸内常在菌としても存在し、成人の約半数の腸内から検出される。本菌は、腸内常在菌としては“悪玉菌”として一般的によばれているが、“悪玉菌”とよばれながらも、自然淘汰されず腸内常在菌として存在できるのは、どのようなメカニズムであるのか、といった点については全く明らかとなっていない。

古くからウェルシュ菌の増殖が *Clostridium butyricum* (酪酸菌) により影響をうけるという知見があったものの、その詳細については全く明らかとなっていなかった。近年、ウェルシュ菌と酪酸菌を共培養する事により、ウェルシュ菌の増殖は変化しないものの毒素産生が抑制される事を明らかとなってきている。酪酸菌は一般に健康人の 10-20% のヒトの腸内に存在し、現在はプロバイオティクスとして広く用いられており、酪酸菌が産生する物質によりウェルシュ菌は腸内では毒素を産生せず、芽胞を形成するなどして腸内常在菌として定着できている可能性も考えられる。酪酸菌とウェルシ

ュ菌は同じ属の菌であり、また嫌気性菌であることから、腸内では比較的近い位置に存在することが考えられ、何らかのシグナルを交換している可能性が考えられている。

2. 研究の目的

ウェルシュ菌はヒト腸内において酪酸菌のみでなく他の細菌からのシグナルを受けることで遺伝子発現を変化させ、腸内に定着している可能性が考えられる。これまでの実験は毒素産生に注目をして行ってきたが、他の細菌と芽胞形成効率に着目した実験はこれまで行われていない。ウェルシュ菌は対数増殖期にのみ毒素産生を行い、静止期には毒素産生が抑制されることが知られており、芽胞形成を開始させるシグナルが毒素産生の抑制に何らかの関わりを持っている可能性が考えられる。しかし、毒素産生抑制から芽胞形成へと切り替わるメカニズムは未だ明らかとなっていない。本研究では、外界から、特に他の細菌(酪酸菌を中心に)や宿主組織と接触した時の芽胞形成に着目し、芽胞形成に影響を与えるシグナルとそれを感知するセンサーを同定する事を目的として研究を行い、その物質と毒素産生の関係性も明らかとする事を目的として研究を行う。さらに、この物質が他の細菌の毒素産生や芽胞形成に与える影響も明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)芽胞形成に関与する二成分制御系の同定を行うため、ガス壊疽株の全二成分制御系遺伝子変異株のマイクロアレイデータより、芽胞形成に影響を与える候補遺伝子を抽出した。その結果をもとに食中毒株を用いて変異株を作製し、芽胞形成効率の確認並びに遺伝子発現解析を行った。

(2)ウェルシュ菌芽胞形成調節に影響を与える因子を同定するため、まず酪酸菌とウェルシュ菌をメンブレンで隔てて共培養を行った。まず培地や培養条件の検討を行った。条件決定後、両菌の共培養を行い、芽胞形成効率の確認をコロニーカウントにより行った。その時のウェルシュ菌の毒素遺伝子の発現や、芽胞形成関連遺伝子の発現、特に芽胞形成調節遺伝子である *virX* 遺伝子の発現をノザン解析により検討した。

(3)二成分制御系変異株と酪酸菌の共培養を行い、その時の芽胞形成効率、芽胞形成調節遺伝子の発現を確認することで、センサータンパクのスクリーニングを行った。

4. 研究成果

ガス壊疽株の二成分制御系の全変異株を用いたマイクロアレイデータ解析の結果、芽胞

形成に関連する二成分制御系を2つ抽出し、食中毒株を用いてそれらの変異株の作製を試みた。このうち1つの二成分制御系については変異株を作製することができ、芽胞形成効率を確認した結果、変異株において、芽胞形成効率が野生株と比べて低下し、また、相補株においては、野生株と同等ではないものの、芽胞形成効率が回復した。この結果より、この二成分制御系が芽胞形成調節を行っていることが強く示唆された。また腸管毒素遺伝子の転写も変異株にて減弱することが明らかとなったが、その他の遺伝子発現パターンについては解析中であり、今後、このセンサーから芽胞形成に至るまでのネットワークを今後明らかとしていく。また、二成分制御系は通常、センサータンパクと転写調節因子の遺伝子がペアとなって存在するが、この二成分制御系はペアになっておらず、ゲノム情報より、そのペアとなる調節遺伝子候補を抽出した。現在、その変異株を作成中である。もう1つの二成分制御系に関しては変異株の作製がこれまでに完了していない。

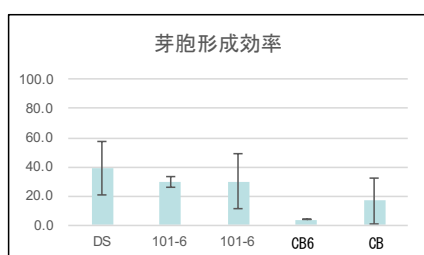


図1 共培養時の芽胞形成効率

ウェルシュ菌と酪酸菌との共培養を行い、芽胞形成効率を確認した結果、共培養することでウェルシュ菌の芽胞形成効率が低下すること(図1)、また芽胞形成時に産生される腸管毒素遺伝子の転写が減弱することが明らかとなり(図2)、酪酸菌から何らかのシグナルを受けることで、芽胞形成効率や腸管毒素遺伝子の発現に変化が出るものと考えられた。シグナルについては同定に至らなかったが、現在解析中である。この時シグナルを感知するセンサータンパクを同定するため、ガス壊疽株の二成分制御系変異株と酪酸菌を食中毒株と同様の方法で共培養し、その時の芽胞形成効率や芽胞形成調節遺伝子である *virX* の発現、芽胞形成に関与するシグマ因子の転写を指標として解析を行った。共培養を行っても芽胞形成効率が変化せず、これらの遺伝子発現に変化がない、つまり、酪酸菌からのシグナルを受け取ることができない変異株が複数見られたが、完全なセンサーの同定には至っていない。

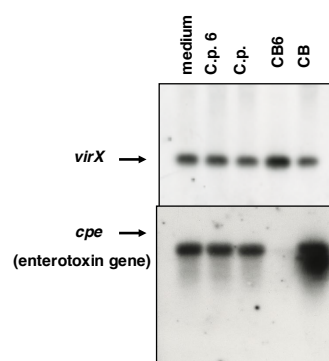


図2 共培養時の腸管毒素遺伝子の転写

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Adachi K, Ohtani K, Kawano M, Singh RP, Yousuf B, Sonomoto K, Shimizu T, Nakayama J. Metabolic dependent and independent pH-drop shuts down VirSR quorum sensing in *Clostridium perfringens*. *J Biosci Bioeng* 17 査読有 2018. 30903-30909 doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.019.
 - ② Ohtani K. Gene regulation by VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*(41) 査読有 2016. 5-9 doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.003
 - ③ Takehara M, T. Takagishi, S. Seike, K. Ohtani K, Kobayashi, K Miyamoto, T. Shimizu, M. Nagahama. *Clostridium perfringens* α -Toxin impairs innate immunity via inhibition of neutrophil differentiation. *Sci. Rep.* (6) 査読有 2016. 28192 doi: 10.1038/srep28192
- [学会発表] (計 6 件)
- ① 大谷 郁 細菌間コミュニケーションの視点で考える感染症とその治療 第9回 J感染症制御ネットワークフォーラム 2017年8月 仙台
 - ② 大谷 郁, 岡 健太郎, 高橋 志達 異種菌間細胞間情報伝達によるウェルシュ菌病原性

関連遺伝子発現調節機構の解析 第19回
日本臨床腸内微生物学会 2016年8月 杏
林大学(東京)

- ③ Ohtani, K., K. Oka, M. Takahashi, J.
Nakayama, T. Shimizu. Toxin gene
repression of *Clostridium perfringens* by
signal substance produced by *Clostridium*
butyricum. ASM Microbe 2016 2016年6月
ボストン(アメリカ)

- ④ 大谷 郁、岡 健太郎、高橋 志達 ウェルシ
ュ菌の異種菌間細胞間情報伝達による毒素
産生調節機構の解析 第90日本感染症学
会総会 2016年4月 仙台国際センター(仙
台)

- ⑤ 大谷郁、岡健太郎、田代康介、久原哲、高
橋志達、清水徹 ウェルシユ菌における毒素
産生ならびに芽胞形成調節機構の解析 日
本細菌学会総会2016年3月大阪国際交流
センター(大阪)

- ⑥ Kaori Ohtani. Gene regulation of *Clostridium*
perfringens toxins. 9th International
Conference on the molecular biology and
pathogenesis of the Clostridia 2015年9月
Freiburg, ドイツ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
大谷 郁 (OHTANI, Kaori)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30377410

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()