

令和元年6月14日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08783

研究課題名(和文) 芽胞形成・毒素産生環境の制御に焦点をあてたウェルシュ菌食中毒予防に関する基礎研究

研究課題名(英文) Research on factors regulating sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* causing food-borne illness

研究代表者

安木 真世 (YASUGI, Mayo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：40589008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌食中毒では芽胞形成が病気発症の主要イベントである。芽胞形成を促進する胆汁酸は、芽胞形成制御因子Spo0Aのリン酸化を促すことを明らかにした。更にリン酸化に関与する遺伝子を同定するためにランダムミュタジェネシス法を確立し、39の候補遺伝子を同定した。また、芽胞形成を抑制する因子として新たに酸化剤である硝酸塩の存在を明らかにした。更に本因子の作用点はSpo0Aの活性化阻害であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルシュ菌食中毒では芽胞形成が病気発症の主要イベントであり、その分子機序の解明を通じた病気発症の制御法の開発が期待される。本研究の学術的意義は、芽胞形成に関与する因子とその作用機序の一部を明らかにすることで、病気発症機序の理解に新たな視点を与えた点、ならびに宿主体内における病原微生物の生存戦略の一端の解明に繋がる基盤知見を創出した点にある。また、作用機序の解明は芽胞形成の制御を通じた食中毒の予防法の開発へと研究の応用が期待されるが、本研究はその基盤知見の創出に貢献した点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Sporulation in *Clostridium perfringens* causing food-borne illness is a key event for its pathogenesis because sporulation and production of enterotoxin are co-regulated under the signal cascade for sporulation. We found that bile salts induced sporulation by accelerating phosphorylation of Spo0A, master regulator of sporulation. To identify bacterial factor(s) for phosphorylation, we have established transposon based random mutagenesis and analyzed using next generation sequencer. We found 39 candidate genes that are possible to induce phosphorylation of Spo0A. We also found that an oxidant, nitrate inhibited sporulation by regulating Spo0A activation step (dimerization of Spo0A or binding to promoters of Spo0A-regulated genes).

研究分野：感染症学

キーワード：ウェルシュ菌 食中毒 芽胞形成 毒素産生 胆汁酸 レドックス Spo0A

1. 研究開始当初の背景

食品生産から流通過程の国際化・複雑化が進んだ現代社会において、食の安全性確保は日本国の重要課題である。食中毒も例外ではなく、危機管理を徹底する一方、制御・予防法の開発が望まれている。ウェルシュ菌は給食施設等で発生する大規模食中毒の原因菌である。日本国内での患者数は年間 1000 人を超え、細菌性食中毒の中では毎年 1~3 位である。長年、一過性の腹痛と下痢で経過するとみなされていたが、便秘のヒトでは重篤化し死に至る場合があることが明らかとなった (Bos et al, 2005)。老人ホームや病院など二次感染や重篤化が起りやすい施設での発生が散見されており、その予防・制御の重要性が伺える。

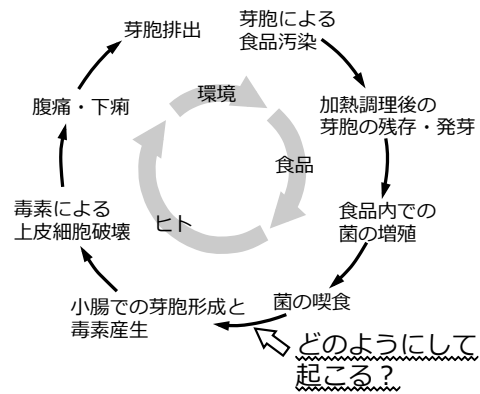


図1 ウェルシュ菌の感染環と本研究の着眼点

ウェルシュ菌の感染環は環境・食品・ヒトで構成される (図1)。従来、本食中毒の予防は食品に対する衛生管理に重点が置かれてきた。しかし本菌はヒトや動物の腸管の他、土壌、河川など環境に広く存在することから、食品の汚染防止や加熱・保存などの衛生管理だけでは限界が生じており、異なった視点からの予防・制御が緊要課題である。では感染環の中で他に予防・制御が可能なポイントは存在しないのか？

申請者はヒト腸管内におけるウェルシュ菌の動態に着目した。汚染食品の喫食により小腸に到達した本菌は芽胞を形成する。芽胞形成に伴って産生される腸管毒素が小腸上皮細胞を破壊し下痢が起こる (図1) (Li et al, 2016)。芽胞形成と毒素産生は遺伝子レベルで共制御されており芽胞形成は病原性発現のキーイベントである。しかし関与する環境因子ならびにその作用メカニズムのほとんどは未だ不明である。これらの解明は病気発症機序の理解に新たな視点を与えると共に食中毒の新規制御ポイントとして応用が期待される。

申請者は独自に確立した共培養モデル (腸管上皮細胞存在下で既知組成培地を用いて、本菌の芽胞形成を観察するモデル。従来の試験管培養に比べて、組成の変更が容易であり芽胞形成が安定的。Yasugi et al, 2015) を用いて、現在までに①胆汁酸が芽胞形成のマスターレギュレーターである Spo0A の活性化に作用して芽胞形成と毒素産生を増強すること、②芽胞形成は酸化(好気)条件下で抑制され、還元(嫌気)条件下で促進することを明らかにした。

2. 研究の目的

上記成果を基に更なる分子機序解明に向けて、(1)胆汁酸の芽胞形成促進メカニズムに関与する菌体遺伝子の同定、(2)レドックスの芽胞形成への作用メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)胆汁酸の芽胞形成促進メカニズムに関与する菌体遺伝子の同定

①Spo0A の活性化の本質はリン酸化と二量体化である。Phos-tag を用いて胆汁酸存在/非存在下におけるリン酸化 Spo0A の検出ならびに半定量を行った。

②過去に行ったマイクロアレイにおいて Spo0A の活性化前に発現変化があった遺伝子に注目し、遺伝子欠損株ならびに補完株 (欠損株に目的遺伝子を再導入し、表現型を野生株に復帰させる) を作製した。作製には相同組み換え法 (Sarker et al, 1999) を用いた。それら株を胆汁酸存在下で培養し、芽胞量の変化を評価した。

③ランダムミュータジェネシスには TraDIS 法 (トランスポゾンコードしたプラスミドを用いて変異体ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーを用いてゲノム中のどこにトランスポゾンが挿入されたか網羅的に調べる方法; van Opijnen et al, 2013) を採用した。ディフィシル菌のトランスポゾンプラスミド pRPF215 (Dembek et al, 2015) に Xylose-inducible *mazF* を挿入し、ウェルシュ菌トランスポゾンプラスミドを作製した。ウェルシュ菌食中毒株由来 SM101 株に上記プラスミドを導入し、クロラムフェニコール添加寒天培地を用いてプラスミド導入コロニーの選択を行った。コロニーを液体培地で培養後、エリスロマイシン、アンハイドロテト

ラサイクリン、キシロース添加寒天培地に全量を塗布し、形成されたコロニーを全て回収した。ライブラリー（コロニー数=3×10⁶ヶ）をFTG培地で一晚培養した菌液（Pre群）を胆汁酸存在／非存在下で培養した。加熱後寒天培地に全量を塗布し、発育したコロニーを全て回収した（Post群）。更に各群からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを断片化後、KAPA library preparation kitを用いて末端修復とA付加を行い、アダプターを結合させた。PCRは挿入トランスポゾンの末端領域を含んだプライマーと結合アダプター特異的プライマーを用いた。HiSeq3000でシーケンス後、全データからトランスポゾン配列を有しているものを抽出し、トランスポゾンを削除した配列をSM101株のゲノムへマッピングした。各遺伝子の必須度解析とPre-Post間におけるトランスポゾン挿入リード数の有意差検定にはBio::TraDIS pipeline (tradis_essentiality.Rならびに tradis_comparison.R)を使用した。胆汁酸による芽胞形成への関与が疑われる候補遺伝子に関しては②同様に変異株を作製し、芽胞量の変化を評価した。

(2) レドックスの芽胞形成への作用メカニズムの解明

酸化剤（硝酸塩）または還元剤（システイン、グルタチオン、硫化ナトリウム、チオグリコール酸）の投与による芽胞量の変化を評価した。芽胞形成への関与が認められた試薬に対して芽胞形成シグナルカスケードの作用部位を同定するため、菌の蛍光染色、芽胞形成関連遺伝子のmRNAレベルの変化、リン酸化Spo0A量の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) 胆汁酸の芽胞形成促進メカニズムに関与する菌体遺伝子の同定

①Phos-tagを用いたウェスタンブロット法により、胆汁酸添加／非添加におけるリン酸化Spo0Aの半定量を行った。胆汁酸添加時にリン酸化Spo0A量の有意な増加が認められたことから、胆汁酸はSpo0Aのリン酸化を促進することが明らかとなった。

②ウェルシュ菌食中毒分離株NCTC8239を用いたマイクロアレイの結果、3遺伝子（AC7_0229, A0092, A0093：それぞれhypothetical protein, glucose-1-phosphate adenyl transferase, phosphotransbutyrylaseをコード）がSpo0A活性化の前に発現上昇した。まずAC7_0229に注目した。変異体作製のため遺伝子改変可能なSM101株においてホモログCPR_0194を同定した。CPR_0194欠損株では芽胞量の変化が認められず、胆汁酸による芽胞形成への関与を示唆する結果は得られなかった。次にAC7_A0093に注目し、SM101株においてホモログCPR_0088を同定した。CPR_0088欠損株では芽胞量の減少が認められ、胆汁酸による芽胞形成の促進への関与が示唆された。しかし補完株において芽胞量が回復しなかったことから、今回作製した変異株では正しく評価できないことが明らかとなった。

これまでウェルシュ菌食中毒株で遺伝子操作可能な株はSM101株のみであった。発見した現象の普遍化の検証を可能にするためには複数の遺伝子改変可能な株が必要である。そこで食中毒分離株のスクリーニングを行い、遺伝子改変可能な株を1株(W4232株)発見した。更にNCTC8239株の有する制限酵素DptGの遺伝子欠損を行い、遺伝子改変可能な株を新たに樹立した。

③ランダムミュータジェネシスの実施のため、分与されたpRPF215を用いて変異体のライブラリーを作製したが、トランスポゾン挿入後に菌体内にプラスミドが残存した。そこでキシロース誘導性致死遺伝子mazFを挿入した改変プラスミド(研究代表者が独自に作製)を用いたところ、プラスミドの残存は検出限界以下となった。ライブラリー作製時の条件は既報(Dembek et al, 2015)に従い、液体培地でOD₆₀₀≥1になるまで培養し、アンハイドロテトラサイクリンとキシロースはそれぞれ0.1μg/ml、4%濃度で使用した。得られたコロニー総数は3.3×10⁶であった。Pre群を作製し、次世代シーケンスに供した結果、トランスポゾン挿入断片リード数は全体の50.9%、トランスポゾン平均挿入頻度は92.2bp毎

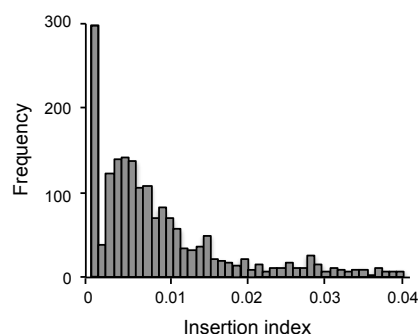


図2 各遺伝子のトランスポゾン挿入指数

であった。挿入断片リード数は PCR サイクル数に依存することから、PCR サイクル数の不足が示唆された。また過去には 97bp 毎の挿入頻度では挿入が飽和ではないとの報告があり、その原因として長時間の培養と不適切な選択条件が挙げられた。そこで培養選択条件ならびに PCR サイクル数を再検討し、新たにライブラリーを作製した。液体培地で $OD_{600}=0.6$ になるまで培養し、アンハイドロテトラサイクリンとキシロースをそれぞれ $0, 2 \mu\text{g/ml}$ 、6%濃度で使用した。得られたコロニー総数 2.6×10^6 を用いて Pre 群を作製した。更に qPCR で最適なサイクル数を検討後に PCR を行い、次世代シーケンスに供した。その結果、挿入断片リード数は全体の 84.4%、平均挿入頻度は 21.4bp 毎となった。従って以降の実験には本ライブラリーを用いた。Pre 群を胆汁酸存在下または非存在下で培養後、熱処理したサンプルを寒天培地で嫌氣的に培養した。胆汁酸添加群では培養 6~8 時間で顕著な芽胞形成が認められた。24 時間後には胆汁酸存在下、非存在下共に同等の芽胞形成が認められた。胆汁酸存在下における早期の芽胞形成に必須の遺伝子を選択するため、Post 群として胆汁酸添加 8 時間後（回収コロニー 2.1×10^6 ）のゲノム DNA を抽出した。更に対照として胆汁酸非添加ならびに添加 24 時間後（回収コロニー 9.0×10^5 ならびに 3.3×10^6 ）のゲノム DNA をそれぞれ抽出した。

次世代シーケンスの結果を SM101 のゲノムにマッピングし、トランスポゾンの挿入部位と挿入リード数を決定した。Pre 群における各遺伝子の挿入指数（トランスポゾン挿入部位の数/遺伝子鎖長）を算出したところ、二峰性を示した（図 2）ことから生存増殖のための必須遺伝子と非必須遺伝子の存在が示唆された。Tradis_essentiality.R を用いた結果、必須遺伝子、非必須遺伝子、その中間遺伝子の数はそれぞれ 1428、1108、199 ケと分類された。次に非必須遺伝子に注目し、胆汁酸存在下の芽胞形成時にトランスポゾン挿入リード数が有意に低下する遺伝子の選択を行った。Tradis_comparison.R の結果、培養後 8 時間における胆汁酸添加群でトランスポゾンの挿入が有意に低下する遺伝子は 549 遺伝子であった。そのうち 510 遺伝子は対照である胆汁酸非添加群、胆汁酸添加 24 時間群、またはその両方においても挿入が有意に低下した。従って胆汁酸依存性の早期の芽胞形成時に必須の遺伝子候補は 39 遺伝子であった（図 3）。候補遺伝子の中から Spo0A にリン酸を供与し得る 2 つの histidine kinase 遺伝子に注目し、その欠損株を作製後芽胞量の変化を評価した。両遺伝子とも欠損株においては芽胞形成率が著しく低下したことから、胆汁酸依存性芽胞形成に関与する菌体因子である可能性が示唆された。今後変異株を用いて更に解析を進めることで胆汁酸依存性芽胞形成に必須の遺伝子が明らかになることが期待される。

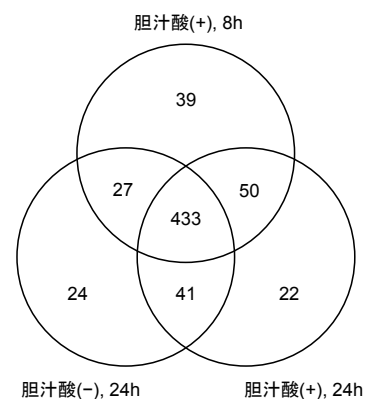


図3 各培養条件において芽胞形成に必要な候補遺伝子数

(2) レドックスの芽胞形成への作用メカニズムの解明

酸化剤である硝酸塩が芽胞形成を抑制すること、さらに Spo0A-regulated genes の発現を抑制することを明らかにした。一方、リン酸化 Spo0A の量に有意な変化は認められなかった。以上の結果から、硝酸塩は Spo0A の二量体化を抑制する、または活性化した Spo0A の Spo0A-regulated gene プロモーターへの結合を阻害する可能性が示唆された。また硝酸還元の間産物である亜硝酸塩と一酸化窒素も芽胞形成を制御することを示した（図 4）。一方、本研究で用いた還元剤はいずれも芽胞形成への影響を示さなかった。これらのことから、酸化還元現象は芽胞形成に対し普遍的に影響するものではないことが示唆された。

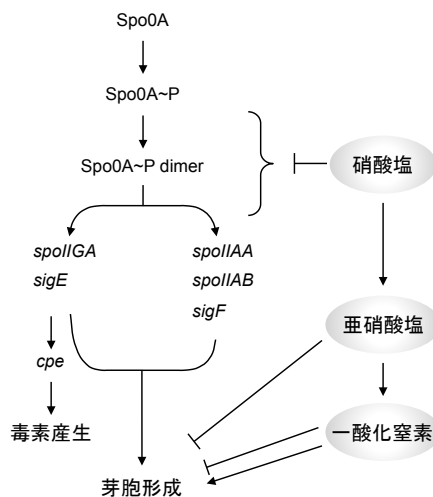


図4 硝酸塩の芽胞形成制御ポイント

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Wakabayashi Y, Nariya H, Yasugi M, Kuwahara T, Sarker MR, Miyake M, An enhanced green fluorescence protein (EGFP)-based reporter assay for quantitative detection of sporulation in *Clostridium perfringens* SM101, Int J Food Microbiol, 2019, 291:144-50, 査読あり, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.015.
2. Sakanoue H, Yasugi M, Miyake M, Effect of sublethal heat treatment on the later stage of germination-to-outgrowth of *Clostridium perfringens* spores, Microbiol Immunol, 2018, 62:418-24, 査読あり, doi:10.1111/1348-0421.12598.
3. Miyake M, Kohda T, Yasugi M, Sakanoue H, Hirata S, Spores of anaerobic bacteria; characteristics and their behaviors during restoration from damaged status, 食品科学工学会誌, 2018, 65:142-7, 査読なし, doi:10.3136/nskkk.65.142
4. Sakanoue H, Nakano T, Sano K, Yasugi M, Monma C, Miyake M, Adherence of *Clostridium perfringens* spores to human intestinal epithelial Caco-2 cells, FEMS Microbiol Lett, 2018, 365, 査読あり, doi:10.1093/femsle/fny016.
5. Yasugi M, Otsuka K, Miyake M, Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strain NCTC8239, Microbiol Immunol, 2016, 60:657-68, 査読あり, doi:10.1111/1348-0421.12437.
6. Yasugi M, Okuzaki D, Kuwana R, Takamatsu H, Fujita M, Sarker MR, Miyake M, Transcriptional profile during deoxycholate-induced sporulation in a *Clostridium perfringens* isolate causing foodborne illness, Appl Environ Microbiol, 2016, 82:2929-42, 査読あり, doi:10.1128/AEM.00252-16.

[学会発表] (計 24 件)

1. 安木真世、ウェルシュ菌食中毒株の芽胞形成に関与する因子とそのメカニズム解析、微生物制御研究センターシンポジウム 2019、2019 年
2. Yasugi M, A restriction-modification system associated with phosphorothioation of DNA in *Clostridium perfringens*, 11th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia, 2019 年
3. 安木真世、A restriction system associated with phosphorothioation of DNA in *Clostridium perfringens*、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年
4. 安木真世、胆汁酸によるウェルシュ菌の芽胞形成・毒素産生増強機序の解明、第 64 回トキシシンポジウム、2017 年
5. Yasugi M, Deoxycholate induced sporulation by facilitating Spo0A phosphorylation in *C. perfringens*, 10th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of Clostridia, 2017 年
6. Yasugi M, Deoxycholate-induced sporulation by facilitating Spo0A phosphorylation in *Clostridium perfringens*, Lorne Infection and Immunity Conference 2017, 2017 年
7. 安木真世、Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strain NCTC8239、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年
8. 安木真世、ウェルシュ菌の腸管内増殖・毒素産生調節、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年
9. 安木真世、Deoxycholate induced sporulation by facilitating Spo0A phosphorylation in *Clostridium perfringens*、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年
10. Yasugi M, Cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* isolates that cause food poisoning or no-foodborne gastrointestinal diseases, 9th International conference on the molecular biology and pathogenesis of the Clostridia, 2015 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pub/>

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：中村 昇太

ローマ字氏名：(NAKAMURA, shota)

研究協力者氏名：成谷 宏文

ローマ字氏名：(NARIYA, hirofumi)