

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07018

研究課題名(和文) 転写後制御を介した嫌気性細菌集団の機能的分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Functional differentiation of anaerobic bacterial biofilms by post-transcriptional regulation

研究代表者

尾花 望 (Obana, Nozomu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：00722688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では嫌気性細菌集団の転写後制御を介した環境適応機構の理解を目指した。ウェルシュ菌は温度(宿主内37°C 環境中25°C)に応答して、転写リードスルーの制御により細胞外マトリクス遺伝子の発現を調節し、バイオフィルムの形態を変化させることを明らかにした。さらにバイオフィルム中の細胞は、25°Cに応答して、シアリダーゼ遺伝子など宿主成分の利用に關与する遺伝子のmRNA安定性が増加し、その発現が劇的に上昇することが明らかとなった。ウェルシュ菌は温度を認識し、転写後制御によって、バイオフィルム形態と栄養利用性を調節することによって、迅速に各環境に適応して生存していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

偏性嫌気性細菌は我々ヒトと深く關与している。一部の偏性嫌気性細菌は食中毒および院内感染や慢性感染を引き起こす起因菌(ウェルシュ菌、ディフィシル菌)であり、さらに近年腸内細菌叢はヒトの健康と深く關与することが明らかとなりつつあるが、その多くは偏性嫌気性細菌から構成される。一方で、嫌気性細菌のバイオフィルム研究例は限られており、さらに1細胞レベルの遺伝子発現・不均一性の詳細な研究例はほぼない。本申請は、これまで困難とされていた嫌気性細菌の一細胞遺伝子発現解析を実施し、その環境適応能力と病原性との關連の一端を明らかにした。本成果は医学的・基礎細菌学的観点からも大きな意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the mechanisms of environmental adaptation through post-transcriptional regulation in anaerobic bacterial biofilms. We found that in response to temperature (37°C in the host to 25°C in the environment), *Clostridium perfringens* regulate the expression of extracellular matrix genes through transcriptional read-through regulation, resulting in changes in biofilm morphology. Furthermore, we found that gene expression involved in utilizing host components, such as sialidase genes, was up-regulated by stabilization of mRNA in response to 25°C. *C. perfringens* could survive by recognizing temperature and rapidly adapting to each environment by regulating biofilm morphology and nutrient availability through post-transcriptional regulation.

研究分野：分子微生物学

キーワード：バイオフィルム 不均一性 偏性嫌気性細菌 ウェルシュ菌 転写後制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は単細胞であるが、実環境中では集団であるバイオフィルムを形成し生存している。たとえモノクローナルな細胞から構成されるバイオフィルムであっても、その内部では様々な表現型を有した細胞が存在し、このような細胞の機能分化・表現型不均一性は集団全体の環境適応や生残性に寄与することが明らかとなっている。偏性嫌気性細菌はヒトと深く関与しており、一部の嫌気性細菌は食中毒および院内感染や慢性感染を引き起こす起因菌(ウェルシュ菌、ディフィシル菌)である。さらに近年腸内細菌叢はヒトの健康と深く関与することが明らかとなりつつあるが、その多くは偏性嫌気性細菌から構成される。このような偏性嫌気性細菌集団中でも、細胞機能分化機構が病原性や環境残存性に重要であると考えられるが、研究例は非常に乏しい。嫌気性細菌による感染症予防・治療法の開発には、そのバイオフィルムと不均一性形成の制御機構の解明が大きな課題である。

2. 研究の目的

嫌気性細菌のバイオフィルム研究や薬剤耐性に関する研究は、バイオフィルム量や抗生物質耐性を定量するのみの例が多い。その理由として、遺伝子改変技術が限られていることや一細胞を計測する技術が乏しいことが挙げられる。特にクロストリジウム属やその近縁種は、病原細菌や腸内常在細菌を含み、そのバイオフィルム形成・薬剤耐性は感染症・宿主の健康に深く関与すると考えられる。しかし、そのバイオフィルム中の1細胞レベルの遺伝子発現の詳細な研究例はほぼない。嫌気条件下では蛍光発色団形成に酸素を必要とする GFP などの蛍光タンパク質を通常使用することができず、これが偏性嫌気性菌における研究の障壁となっている。

本研究では嫌気性細菌にも適応可能なレポーターシステムを利用し、これまで困難とされていた嫌気条件一細胞解析を実施し、嫌気性細菌バイオフィルム形成機構にアプローチすることとした。これによって嫌気性細菌が形成するバイオフィルムの環境応答機構とその耐性化・定着化機構の詳細が明らかになり、嫌気性細菌バイオフィルム研究の基盤構築および感染症の予防及び産業面の発達に寄与する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウェルシュ菌の温度に応答した環境適応戦略

嫌気蛍光タンパク質を用いて細胞外マトリクス遺伝子レポータープラスミドを作製した。レポータープラスミドを導入した野生株を培養し、セルソーターによって細胞集団中より細胞外マトリクス遺伝子発現が ON および OFF の集団を分取した。各亜集団 (5×10^6 細胞) より RNA を抽出し、RNA-seq 解析に用いた。

(2) ディフィシル菌における新規抗生物質耐性遺伝子の同定

バイオインフォマティクス解析によって薬剤耐性に関連する遺伝子候補を同定した。同定した遺伝子に関してディフィシル菌の遺伝子破壊株およびレポーター株を作製し、抗生物質耐性能および薬剤に対する遺伝子発現量を解析した。

(3) ミュータンス菌における集団中の一部の細胞死に関与する遺伝子の同定

ミュータンス菌を培養し、Sytox Green を用いて死細胞を蛍光染色した。セルソーターを用いて生細胞と死細胞を分取し、各亜集団 (1×10^7 細胞) より RNA を抽出し、RNA-seq 解析に用いた。標的遺伝子の欠損株を作製し、死細胞および細胞外 DNA 量の測定および、共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルム構造とその内部の死細胞の局在を解析した。

4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌の温度に応答した環境適応戦略

これまでの研究において、食中毒やガス壊疽の起因菌であるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、温度 (37°C : 宿主内 \rightarrow 25°C : 環境中) に応答してバイオフィルムマトリクス遺伝子の発現を調節することにより、バイオフィルム形態を変化させることが明らかとなっている (Obana et al. 2020)。本菌のバイオフィルムマトリクス遺伝子は集団中で二峰性の不均一な発現を示す。しかし、その不均一性の制御および形成メカニズムは不明であった。これを明らかにするために、バイオフィルムマトリクス遺伝子発現が ON および OFF の亜集団をセルソーターによって分取し、RNA-seq 解析を実施したところ、細胞外マトリクス遺伝子とその下流の遺伝子群が同時に発現変動していることが明らかになった。さらに詳細な解析の結果、マトリクス遺伝子下流の二成分制御遺伝子への転写リードスルーが、マトリクス遺伝子発現調節に必要であることが明らかとなった。

また、温度に応答して変動している遺伝子群を RNA-seq 解析によって網羅的に同定したところ、シアリダーゼ遺伝子など宿主成分の利用に関与する遺伝子が環境中温度 (25°C) で発現上昇することが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子の発現は RNA ヘリカーゼである CshA を

介した転写後制御によって調節されていることが明らかとなった。

ウェルシュ菌は温度を認識することによって宿主内外環境を認識し、バイオフィーム形態および栄養利用性を調節することによって各環境に適応していると考えられた。また、転写後制御が発現調節を媒介することにより、より迅速に環境への応答を加納していると予想された。

(2) ディフィシル菌における新規抗生物質耐性遺伝子の同定

薬剤耐性菌は人類にとって大きな脅威のひとつであり、これを制御するためには、薬剤耐性機構の理解が必要となる。ARE-ABCF は、抗菌薬に対する耐性の発現に係るタンパク質で、多くの細菌が有している。しかし、それぞれの生物で見いだされる ARE-ABCF 遺伝子配列は多様であり、その多様性と薬剤耐性の関連については十分に解明されていなかった。

ディフィシル感染症 (*Clostridioides difficile* infection: CDI) は、抗菌薬使用などによりディフィシル菌が増殖して常在腸内細菌叢が攪乱され、下痢などを発症する感染症である。本研究ではディフィシル菌が持つ ARE-ABCF 遺伝子 (*cplR*) が、リンコサミド系とプレウロムチリン系の抗菌薬に対する薬剤耐性を付与することを明らかにした。また、ディフィシル菌が *cplR* と同時に、可動性因子であるトランスポゾン上にコードされる薬剤耐性遺伝子 *ermB* を持つことによって、相乗的にリンコサミド系薬剤に対する耐性が上昇することを発見した。さらに *cplR* 遺伝子の発現は、抗菌薬に应答して誘導されること、およびその誘導は転写後制御機構によって媒介されることを明らかにした (Obana et al. 2023)。CDI は、ディフィシル菌が高い抗菌薬耐性を持つために発生するもので、多くの場合、抗菌薬の投与によって発生し、慢性感染や院内感染の原因となる。特にリンコサミド系抗菌薬の投与は、ディフィシル感染症のリスクファクターの一つとして知られており、ARE-ABCF およびその遺伝子発現制御機構を標的とした予防・治療薬の開発が期待される。

(3) ミュータンス菌における集団中の一部の細胞死に関与する遺伝子の同定

ミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*) はスクロース (砂糖) に应答して強固なバイオフィームを歯面に形成し、バイオフィーム中の細菌に由来する乳酸発酵によって歯面の脱灰が引き起こされる。つまり虫歯 (う蝕) はバイオフィームが媒介する疾患の代表例である。これまでの研究でバイオフィーム中の底面に局在する一部の細胞において細胞死が引き起こされ、死細胞から放出される細胞外 DNA がバイオフィーム形成を促進することを明らかにしてきた (Nagasawa et al. 2020)。一方で、集団中の一部の細胞でのみ細胞死が誘導されるメカニズムは不明であった。

本研究では死細胞を特異的に染色する蛍光試薬によって集団中の死細胞をラベルし、セルソーターによって集団中の生細胞と死細胞を分取した。RNA-seq 解析によって生細胞と死細胞の遺伝子発現を比較することによって細胞死に関連する遺伝子の同定を目指した。RNA-seq 解析の結果、推定バクテリオシン遺伝子が死細胞で高発現していることが明らかになった。この遺伝子の破壊株ではバイオフィーム中の死細胞の出現が抑制され、また細胞外 DNA の放出も減少することが明らかになった。本研究の結果より、この推定バクテリオシン遺伝子は新規の細胞死に関連する遺伝子であることが示された (Nagasawa et al. 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagasawa Ryo, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of a Novel Gene Involved in Cell-to-cell Communication-induced Cell Death and eDNA Production in Streptococcus mutans	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME22085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Obana Nozomu, Takada Hiraku, Crowe-McAuliffe Caillan, Iwamoto Mizuki, Egorov Artyom A, Wu Kelvin J Y, Chiba Shinobu, Murina Victoria, Paternoga Helge, Tresco Ben I C, Nomura Nobuhiko, Myers Andrew G, Atkinson Gemma C, Wilson Daniel N, Hauryliuk Vasili	4. 巻 51
2. 論文標題 Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmIR2, Ard1 and CplR	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4536 ~ 4554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Abe Kimihiro, Kato Hiroko, Hasegawa Yuta, Yamamoto Tatsuya, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 68
2. 論文標題 Visualization and characterization of spore morphogenesis in Paenibacillus polymyxa ATCC39564	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 79 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2021.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Nobuhide, Abe Kimihiro, Akagi Sachiyo, Kitamura Mayu, Shiraishi Yoshitake, Yamaguchi Aki, Yutani Masahiro, Amatsu Sho, Matsumura Takuhiro, Nomura Nobuhiko, Ozaki Noriyuki, Obana Nozomu, Fujinaga Yukako	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane Vesicles Derived From Clostridium botulinum and Related Clostridial Species Induce Innate Immune Responses via MyD88/TRIF Signaling in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.720308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kimihiro, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 23
2. 論文標題 Autolysis mediated membrane vesicle formation in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 2632 ~ 2647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 尾花 望、奥田 真由、福田 真嗣、野村暢彦
2. 発表標題 腸内細菌由来メンブレンベシクルを用いた宿主免疫誘導と腸内細菌叢への影響
3. 学会等名 第27回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾花 望、高田 啓、野村 暢彦、Gemma C. Atkinson, Vasili Hauryliuk
2. 発表標題 <i>Clostridioides difficile</i> における新規抗生物質耐性遺伝子ABC因子の同定
3. 学会等名 第37回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nozomu Obana
2. 発表標題 Bacterial membrane vesicles as a potential platform for gut microbiota control technology
3. 学会等名 Tsukuba Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田良亮、尾花望、野村暢彦
2. 発表標題 ウェルシュ菌の温度に依存した遺伝子発現制御による環境適応戦略の解明
3. 学会等名 第37回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryosuke Fukuda, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura
2. 発表標題 Temperature-dependent gene regulation for environmental adaptation in <i>Clostridium perfringens</i>
3. 学会等名 BACELL223
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾花望
2. 発表標題 細菌が能動的に産生する細胞外膜小胞
3. 学会等名 第36回日本バイオフィルム学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾花望
2. 発表標題 Environmentally regulated heterogeneity shapes bacterial biofilms
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾花望
2. 発表標題 Gut bacteria-host interactions through bacterial membrane vesicles and their applications
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nozomu Obana, Hiraku Takada, Nobuhiko Nomura, Gemma C. Atkinson, Vasili Hauryliuk
2. 発表標題 Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance of Clostridia
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nozomu Obana
2. 発表標題 Gut bacterial membrane vesicles-host interactions and its applications
3. 学会等名 EMBO workshop BMV: Biogenesis, functions and medical applications（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾花 望
2. 発表標題 微生物集団のイメージングで解き明かす多様な生存戦略
3. 学会等名 第104回日本細菌学会関東支部総会 2021年インターラボセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田真由、尾花 望、奥脇響、中尾 龍馬、泉福 英信、野村 暢彦
2. 発表標題 Effects of mucosal immunization of gut bacterial MVs on humoral immunity and gut microbiota
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田真由、尾花 望、奥脇響、中尾 龍馬、泉福 英信、野村 暢彦
2. 発表標題 腸内細菌由来メンブレンベシクルによる宿主免疫を介した宿主微生物叢制御
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川大、尾花望、伊藤菜々子、宮野泰征、相沢慎一、野村暢彦
2. 発表標題 海洋細菌が形成する金属腐食性バイオフィルムにおけるマルチコピーなフラジェリン遺伝子の役割
3. 学会等名 第35回日本バイオフィルム学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田良亮、尾花望、野村暢彦
2. 発表標題 ウェルシュ菌の温度依存的な <i>iol</i> オペロン発現制御による環境適応機構の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース：細菌の薬剤耐性化の原因となる新たな因子とその発現メカニズムの発見
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20230327141500.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------