

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580449

研究課題名(和文) ウエルシュ菌に起因する鶏壊死性腸炎の新規病原因子 NetB の病原性発現機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of pathogenic mechanisms of new pathogenic factor NetB from *Clostridium perfringens* that causes avian necrotic enteritis.

研究代表者

向本 雅郁 (Mukamoto, Masafumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：80231629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：netB保有ウエルシュ菌は我が国でも広く存在し、健康鶏にも感染していることが明らかとなった。netBは接合性プラスミド上に存在するが、容易に伝播するものではなく、同一地域に蔓延するnetB保有株は単一ないし少数であった。NetBはニワトリが属するキジ目や一部の鳥類に限定された非常に特異性の高い毒素活性を有する孔形成毒素であった。NetBは、標的細胞の非ラフト領域において、細胞膜のコレステロールの関与無しに結合し、膜の流動性の影響を受けず近傍のモノマー同士が重合しオリゴマーを形成することが明らかとなり、NetBの細胞への結合から孔形成までの一連の分子動態の一部が解明された。

研究成果の概要(英文)：It was clear that strains of possessing netb in *C. perfringens* type A were widely distributed in Japan and were infectious in healthy chickens. Though netb exist on a conjugative plasmid, netb was not easily transferred among cells and strains possessing netb that are rampant throughout the same areas were single or a small number. NetB is a pore forming toxin that possessed high specific pathogenic activities against the order of pheasants containing chickens. NetB was bound with non-raft regions on target cell membranes without participation of cholesterol. NetB polymerized among neighboring monomer molecules formed oligomer formation. In this study I made a part of molecular movement from binding to cells to pore formation of NetB clear.

研究分野：獣医衛生学、獣医感染症学

キーワード：細菌毒素 腸炎 ニワトリ 感染症 ウエルシュ菌 NetB

1. 研究開始当初の背景

鶏壊死性腸炎起因菌である *C. perfringens* は、通常、土壌や家畜・家禽の腸管内容物から常在菌として分離される。鶏において、本菌は、通常、盲腸内に多く存在するが、飼育環境や給与飼料等の影響による腸内細菌叢の攪乱が原因で小腸内において増殖することで本病を発生させる。小腸内はガス壊疽菌特有のガス充満により膨張し、産生される病原因子により腸粘膜に壊死がみられ、偽膜形成や脱落による腸壁の菲薄化がおこる。過去30年以上にわたって、鶏壊死性腸炎の病原因子は *C. perfringens* から産生される α 毒素(phospholipase C)であると考えられてきた。しかし、2006年 keyburn らにより、 α 毒素を産生しない *C. perfringens* 変異体でも壊死性腸炎を発症することから、 α 毒素が鶏壊死性腸炎にとっての必須の病原因子ではないことが明らかとなった。¹⁾ 2008年には壊死性腸炎分離菌から β 毒素と38%の相同性を有する新規の蛋白毒素が発見され、NetB (Necrotic Enteritis Toxin B-like)と命名された。²⁾ NetB 遺伝子(*netb*)は *C. perfringens* A型菌のみが保有しており、保有菌のほとんどは鶏の糞便、飼料および飼育環境より分離され、他の動物種からはほとんど分離されていない。*netb* をノックアウトした *C. perfringens* を鶏に感染しても壊死性腸炎は発症せず、ノックアウト株に *netb* を再導入すると発症することから、NetB は鶏壊死性腸炎発症のための必須の病原因子であることが明らかとなった。NetB は分子量 33kDa の蛋白として菌体外に分泌される。細胞膜上で複数個の毒素分子が集合し、高分子複合体(オリゴマー)として孔を形成し膜を破壊する細胞壊死毒素(孔形成毒素)であることは明らかとなっている。

2. 研究の目的

(1) *netB* 保有 *C. perfringens* の疫学的解析

近年、アメリカ合衆国やカナダ、オーストラリア、ヨーロッパ各国において NetB 産生 A 型菌が分離されており、本菌は世界に広く分布していることが知られているが、我が国における分布状況を示す報告はない。また、*netB* 保有菌と非保有菌の生化学的性状の違いは未だ明らかにされていない。国内で得られた検体試料より *C. perfringens* を分離し、主要毒素遺伝子および *netB* の保有の有無を調べるとともに、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子の比較および薬剤感受性の比較を行い、菌の性状を解析した。

(2) NetB の病原性および細胞膜上における分子動態の解析

NetB は孔形成毒素に分類されるが、その受容体分子や、結合後のオリゴマー形成機構などは未だ解明されていない。また、単量体およびリポソーム膜上で形成された七量体の結晶構造は明らかとなっているが、実際の細胞膜上でオリゴマー形成を証明した報告はない。国内分離菌より NetB を精製し、種特異性ならびに受容体への結合や細胞膜上でのオリゴマー形成に至る動態を分子レベルで解析した。

3. 研究の方法

(1) 菌分離と PCR による毒素型別と *netB* 保有の有無

壊死性腸炎と診断された家きんや家畜またはペンギンの糞便を卵黄加カナマイシン含有 CW 寒天培地で、嫌気条件下において 37°C で一晚培養した。卵黄反応陽性のコロニーを釣菌し、PCR により毒素型別と *netB* 保有の有無を解析した。

(2) PFGE 法による系統解析

被験菌を情報により DNA を分離し、PFGE 後、UPGMA 法によりバンドパターンを解析し、系統樹を作成した。

(3) NetB の精製

菌体を TPG 培地で、37°C で 36 時間静置培養した後、培養液より Q Sepharose™ Fast Flow および TOYOPEARL® SP-650M (TOSOH) の 2 種類のイオン交換クロマトグラフィーにより、精製毒素を調製した。

(4) NetB 感受性試験

①赤血球感受性試験

培養上清または精製 NetB を使用し、各種赤血球と 96 well マイクロプレート内で混合し、37°C 1 時間反応後、ヘモグロビンの吸光度を測定し評価した。

②細胞感受性試験

各種細胞をそれぞれの最適細胞数になるように増殖用培地に懸濁し、96 well 細胞培養用マイクロプレート (IWAKI) に 100 μ l ずつ分注した後、37°C で一晩インキュベートした。2 倍階段希釈した NetB 溶液を 4 well ずつ各 100 μ l 添加し、37°C で一晩インキュベートした。CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) を各 well に 20 μ l ずつ添加し、37°C で 1 時間反応させ、ホルマザン産物の吸収波長である 490 nm における吸光度を測定した。

(5) 細胞膜上のコレステロール除去

5 mM メチル- β -シクロデキストリン含有培養液を LMH 細胞に添加した。37°C で 30 分間インキュベートし、細胞膜上のコレステロールを除去した。コレステロールの除去はコレステロール測定キットを用いて確認した。

(16) Toxin Overlay assay

LMH 細胞を、1% Triton X-114 で可溶化後、懸濁液をショ糖密度勾配超遠心で分離し、得られた分画を試料に、SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写した。転写膜を 10 μ g/ml に調製した NetB 溶液と室温で 1 時間反応させた。その後、抗 NetB 抗体、酵素標識 2 次抗体と反応させ、イムノブロッティングを行った。

4. 研究成果

(1) PCR 法による型別と *netB* の保有状況

A~E 農場の壊死性腸炎と診断されたニワトリ 5 羽の糞便からはそれぞれ CNEOP001 株、CNEOP002 株、CNEOP003 株、CNEOP004 株、CNEOP005 株を分離した。近畿地方の F 農場の健全なニワトリ 10 羽の糞便からはそれぞれ IKH121-21 株、IKH121-24 株、IKH121-42 株、IKH121-52 株、IKH121-53 株、IKH121-61 株、IKH121-72 株、IKH121-73 株、IKH121-74 株、IKH121-75 株を分離した。上記 15 菌株と壊死性腸炎と診断されたウシ、ブタ、カラス、ペンギンの糞便分離株および SNE1201 株、CP-23 株の 68 菌株について型別を行ったところ、すべての株が 4 つの主要毒素 (α 、 β 、 ϵ 、 ι) 遺伝子のうち α 毒素遺伝子のみを保有する A 型の *C. perfringens* であった。そのうち、ニワトリから分離された CNEOP001 株、CNEOP002 株、CNEOP004 株、IKH121-21 株、IKH121-24 株、IKH121-52 株、IKH121-53 株、IKH121-73 株、IKH121-75 株が *netB* を保有していた。

(2) PFGE 法による系統解析

毒素産生能を比較した 11 菌株について、PFGE 法による系統解析を行った。同じ農場の健全鶏から分離され *netB* を保有する IKH121-21 株、IKH121-52 株、IKH121-73 株、IKH121-75 株は同一の型に分類された (Fig. 1)。一方、同農場由来で *netB* をもたない IKH121-42 株は、上記 4 株との相同性が 61.5% であった。異なる農場の壊死性腸炎発症鶏から分離され *netB* を保有する CNEOP001 株、CNEOP002 株、CNEOP004 株はすべて別の型に分類され、その相同性は CNEOP001 株と CNEOP002 株が 69.6%、CNEOP001 株と CNEOP004 株が 58.3%、CNEOP002 株と CNEOP004 株が 80% であった。また、健全鶏から分離され *netB* を保有する 4 株と CNEOP001 株との相同性は

58.3%、CNEOP002 株との相同性は 80%、CNEOP004 株との相同性は 76.9%であった。ペンギン由来の CNEOP005 株と豚由来の SNE1201 株、牛由来の CP-23 株については、

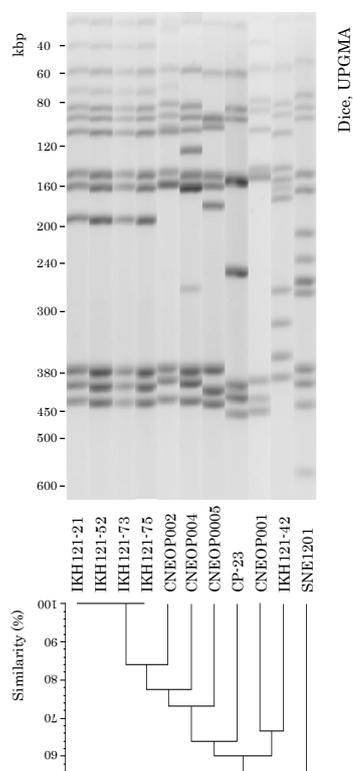


Fig. 1. PFGE analyses of 11 *C. perfringens* isolates.

CNEOP005 株が比較的鶏由来の株に近縁であり、次いで CP-23 株が近く、SNE1201 株がもっとも離れた型に分類された。

複数農場の壊死性腸炎発症鶏および健常鶏の糞便より *netB* 保有菌が分離されたことから、*netB* 保有 *C. perfringens* は我が国にも分布しており、健常鶏にも感染していることが明らかとなった。*netB* 非保有菌が壊死性腸炎発症鶏からも分離されたことから、NetB 以外にも壊死性腸炎発症に個体の状態や飼育環境など別の関連因子が存在するものと推察される。

netB は約 82 kb の接合性プラスミド上に存在するため、異なる株間で比較的容易に水平伝播が起こり得ると考えられている。したがって、同一地域においてもプラスミドの伝播により *netB* が導入された様々な株が分離される可能性が考えられる。しかし、今回の PFGE 法による系統解析の結果、同じ農場の健

常鶏由来で *netB* を保有している IKH121-21 株、IKH121-52 株、IKH121-73 株、IKH121-75 株の 4 株は同一の型に分類された (Fig. 2)。この結果から、本農場においては *netB* を含むプラスミドが複数の菌株に伝播したのではなく、単一の *netB* 保有株が同一農場で拡がったと推察される。一方、同農場由来の *netB* を保有していない IKH121-42 株は、上記 4 株との相同性が 61.5%と低値を示した (Fig. 2)。このことは、上記 4 株と同一の型の株からプラスミドが脱落して *netB* 遺伝子を欠損したのではなく、もとより *netB* 遺伝子を保有していない株が存在したものと考えられる。これらのことから、*netB* を含む接合性プラスミドは容易に伝播するものではなく、同一地域に蔓延する *netB* 保有株は単一ないし少数である可能性が示唆された。また、今回分離した *netB* 保有菌が 4 つの型に分類されたという結果より (Fig. 1)、地域により異なる *netB* 保有株が存在していることも明らかとなった。

(3) NetB に対する動物種間による赤血球および株化細胞の感受性の違い

NetB に対する感受性を調べるため、各種動物の赤血球を用いて溶血試験を行い、50%溶血量 (HU_{50}) を算出した (Table 1)。鳥類の赤血球で最も感受性が高かったのは、キジ目のホロホロチョウ (HU_{50} : 0.14 $\mu\text{g/ml}$) で、次いで同じくキジ目のニワトリ (HU_{50} : 0.23 $\mu\text{g/ml}$) であった。最も感受性が低かったのはキングペンギン (HU_{50} : 17 $\mu\text{g/ml}$) で、次いでコサギ (HU_{50} : 11 $\mu\text{g/ml}$) であった。哺乳類の赤血球で最も感受性が高かったのは、ラット (HU_{50} : 1.8 $\mu\text{g/ml}$) で、次いでウサギ (HU_{50} : 3.3 $\mu\text{g/ml}$)、であった。最も感受性が低かったのはウマ (HU_{50} : 32 $\mu\text{g/ml}$) で、次いでマウス (HU_{50} : 29 $\mu\text{g/ml}$) であった。

Table 1. Sensitivities of erythrocytes from various animal species to NetB.

A. Erythrocytes from Aves		B. Erythrocytes from mammals	
Species	HU ₅₀ (μg/ml)*	Species	HU ₅₀ (μg/ml)*
Chicken	0.23	Mouse	29
Guinea fowl	0.14	Rat	1.8
Mandarin duck	0.32	Rabbit	3.3
Black swan	1.1	Dog	5.1
Rock pigeon	4.1	Swine	3.5
Crow	2.3	Bovine	12
Grus leucogeranus	3.5	Horse	32
Grey crowned crane	3.6		
Great cormorant	0.68		
Egretta garzetta	11		
King penguin	17		

*HU₅₀ refers to the concentration of NetB required for 50% hemolysis.

また、各種細胞株を用いて細胞傷害試験を行い、50%細胞致死量 (EC₅₀) を算出した (Table 2)。ニワトリ肝臓由来 LMH 細胞は著しく高い感受性を示した (EC₅₀: 0.63 μg/ml)。ニワトリ胎児由来 CEF 細胞は LMH 細胞の感受性の約 1/14 であった (EC₅₀: 8.7 μg/ml)。IEC-6 細胞 (EC₅₀: 18 μg/ml)、3Y1 細胞 (EC₅₀: 33 μg/ml)、MDBK 細胞 (EC₅₀: 31 μg/ml) はさらに感受性が低く、CRFK 細胞、MDCK 細胞、Vero 細胞、P3U1 細胞、C2C12 細胞、L929 細胞、Caco-2 細胞に関しては NetB 濃度 50 μg/ml においても 50%の細胞致死を起こさなかった。

Table 6.

Sensitivities of cell lines derived from tissues and organs of various animal species to NetB.

Cell line	Origin	EC ₅₀ (μg/ml)*
LMH	Chicken hepatoma	0.63
CEF	Chick embryo fibroblast	8.7
IEC-6	Rat small intestine	18
3Y1	Rat fibroblast	33
MDBK	Bovine kidney	31
CRFK	Feline kidney	>50
MDCK	Canis kidney	>50
Vero	Monkey kidney	>50
P3U1	Mouse myeloma	>50
C2C12	Mouse myoblast	>50
L929	Mouse connective tissue	>50
Caco-2	Human colon	>50

*EC₅₀ refers to the concentration of NetB required for 50% cytotoxicity.

(4) 細胞膜上における NetB モノマー分子およびオリゴマー分子の局在

NetB のモノマー分子およびオリゴマー分

子の細胞膜上での局在を解析するため、LMH 細胞に NetB を反応させ、界面活性剤を用いて溶解し、ショ糖密度勾配超遠心にて分画後、抗 NetB 抗体を用いてイムノブロットングを行った。また、局在の指標として、ラフトのマーカーであるカベオリンの抗体によるイムノブロットングも同時に行った。NetB のモノマー分子およびオリゴマー分子は、カベオリンが存在するラフト画分よりさらに比重の大きな分画に局在することが確認された (Fig. 2)。また、モノマー分子とオリゴマー分子は、同一画分に存在していた。

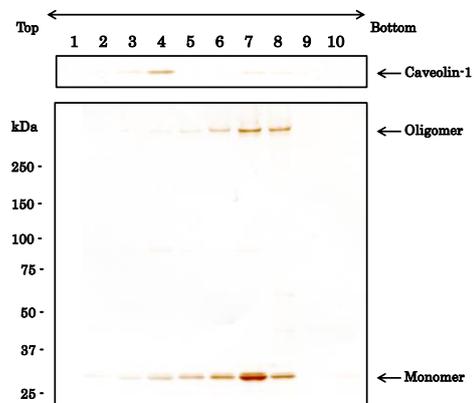


Fig. 2. Association of oligomerized NetB with cholesterol-rich microdomains (rafts). Lanes 1 to 10, fractions from the top to bottom of the gradient.

(5) コレステロールを除去した LMH 細胞への NetB の結合性およびオリゴマー形成能

NetB の結合やオリゴマー形成への細胞膜のコレステロールの関与を解析するため、LMH 細胞に MCD を作用させコレステロールを除去した。除去後、NetB を反応させ、界面活性剤を用いて溶解し、遠心分離にて可溶性画分と不溶性画分に分画後、抗 NetB 抗体を用いてイムノブロットングを行った。MCD 未処理の細胞のコレステロール濃度は 130 μg/ml で、MCD を作用させた細胞は 30 μg/ml であり、MCD 処理によりコレステロールが除去されたことが確認された (Fig. 3)。イムノブロットングの結果、コレステロールを除去した細胞においても、NetB のモノマー分子およびオリゴマー分子が検出された。

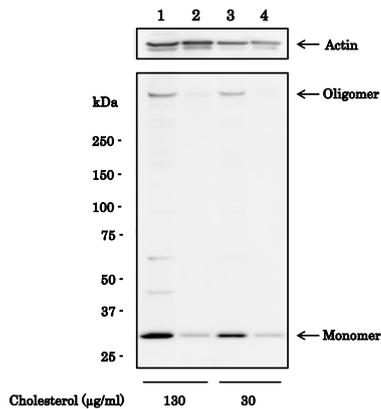


Fig. 3. The effect of MCD treatment on NetB oligomerization. Lane 1 and 2: MCD untreated. Lane 3 and 4: MCD treated. Odd number: supernatants, even number: pellets.

(6) NetB 受容体の局在

LMH細胞のNetB受容体の局在を解析するため、細胞を界面活性剤で溶解し、ショ糖密度勾配超遠心で分画した後、toxin overlay assayを行った。また、局在の指標として、抗カベオリン抗体によるイムノブロッティングも行った。その結果、NetBと結合すると考えられる約60 kDa、53 kDa、47 kDa、40 kDaの分子が、非ラフト画分に検出された (Fig. 4)。

孔形成毒素の多くは、その毒性発現機構に細胞膜上のラフトと呼ばれる領域が関与している。ラフトとは、コレステロールや糖脂質、スフィンゴミエリンに富む流動的な領域であり、そこには多くの生理活性物質の受容

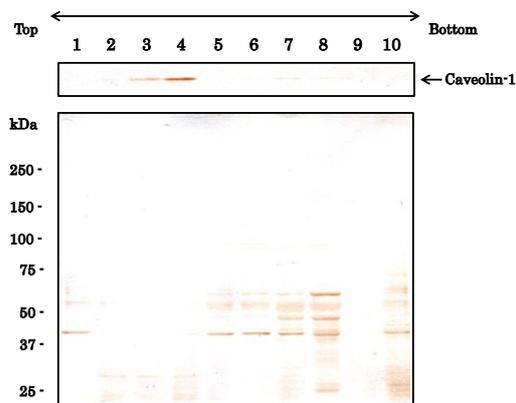


Fig. 4. Binding of NetB to LMH cell, detected by the toxin overlay assay. Lanes 1 to 10, fractions from the top to bottom of the gradient.

体やGタンパク質などが存在している。NetBのモノマー分子およびオリゴマー分子のLMH細胞における局在を解析したところ、両分子

は非ラフト領域の同一画分に存在した (Fig. 2)。そのことから、NetBは細胞に結合後、膜の流動性を利用してラフトに集合しオリゴマー化するのではなく、非ラフト領域で重合しオリゴマーを形成すると考えられる。また、*C. septicum*の α 毒素や*C. perfringens*の θ 毒素、*S. aureus*の α 毒素は、毒性発現機構に標的細胞膜のコレステロールが関与しているため、それを除去することにより結合性やオリゴマー形成能が減少する。一方、NetBは、標的細胞へのモノマー分子の結合やオリゴマーの形成に、細胞膜のコレステロールの関与はみられなかった (Fig. 2)。さらに、LMH細胞上のNetB受容体分子の局在の解析を行った結果、NetBと結合する分子が非ラフト領域に存在した (Fig. 4)。これらの結果から、NetBは標的細胞への結合からオリゴマー形成までの一連の分子動態を、細胞膜のコレステロールの関与無しに、一貫して非ラフト領域で迎ると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

第87回日本細菌学会総会 (2014年3月26日～28日, 東京)

「鶏壊死性腸炎原因菌 (*C. perfringens*) が産生する孔形成毒素 NetB の細胞傷害機構の解析」中谷光輝、幸田知子、向本雅郁 (大阪府立大学・院・生命環境)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向本 雅郁 (MUKAMOTO, Masafumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 80231629