

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660232

研究課題名(和文) 感染性下痢症発症に関与する消化管因子の同定と動物モデル系開発への応用

研究課題名(英文) Identification of a factor responsible for the development of infectious diarrhoeal diseases.

研究代表者

三宅 眞実 (Miyake, Masami)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：10251175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌の病原性を制御する宿主因子を同定することを目的として、マウス糞便抽出液がウェルシュ菌芽胞形成・毒素産生にどのような影響を与えるかについて調べた。結果として、糞便抽出液中にウェルシュ菌の芽胞形成・毒素産生を強く抑制する因子が存在することが明らかになった。抑制因子の性状等を調べたところ、抽出液に含まれる酵素が培養液組成を変化せしめ、結果として代謝性の芽胞形成抑制が生じたことが明らかになった。本成果は食事の難消化性多糖や消化管内のフローラ構成によりウェルシュ菌食中毒の発症が左右される可能性を示しており、新しい食中毒制御開発へ至る礎になるかもしれないと考えている。

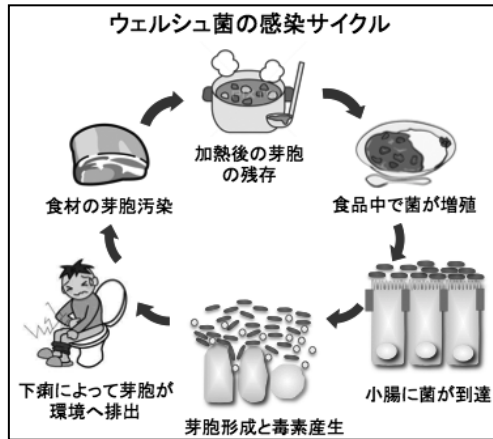
研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens is a Gram-positive, spore-forming bacillus and is a causative agent of foodborne disease in human. The major clinical symptom of the disease is diarrhea, which is caused via the action of an enterotoxin, CPE. Because CPE production is co-regulated with sporulation process, we explored a possibility that a factor that suppresses sporulation can be a prophylactic agent of the food-borne disease. As a result, we find an activity that inhibits the sporulation in the mouse fecal contents. Characterization of the inhibitory activity revealed that an enzyme, which decomposes components in growth medium, is involved in the inhibition. The results suggest that diet, nutrients, digestive enzymes of host and/or microbiota origins should take parts in the complicated regulation of virulence expression of C. perfringens.

研究分野：細菌学

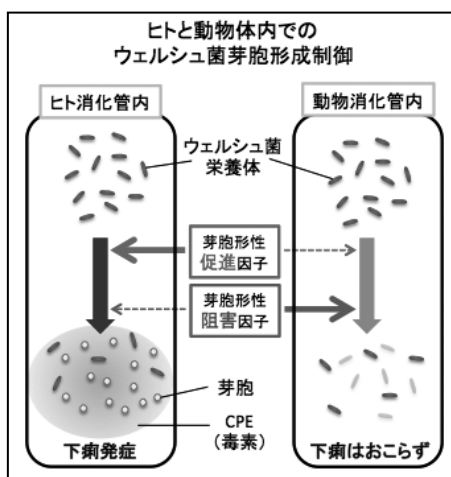
キーワード：糖代謝 芽胞形成 でんぷん アミラーゼ エンテロトキシン 病原性

1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌はグラム陽性の芽胞形成性嫌気性桿菌で、ヒトの集団食中毒の原因菌として知られる。ウェルシュ菌食中毒では食品に含まれる生菌が大量に摂取された後、これが小腸内に達して芽胞を形成、同時に産生されるエンテロトキシン（以下、CPE）の作用により下痢を発症する（下図）。



このようにヒト消化管内には潜在的にウェルシュ菌を芽胞形成へと導く圧力が存在し、これがウェルシュ菌下痢症発症に大きく関与すると考えられる。一方、ウサギ、マウスなど多くの小動物消化管内では「ウェルシュ菌が十分芽胞形成しない」（Uzal and McClane, *Microb. Infect.* 14:1009-1016, 2012）。モルモット消化管内にはウェルシュ菌の芽胞形成を阻害する物質の存在が示唆されており（日本細菌学雑誌 43:917-926, 1988）、これが動物種による感受性の違いを決定する一要因と思われる。しかしこの物質に関する情報は乏しく未だ同定には至っていない（下図）。



申請者らは、病原細菌が消化管内で何を刺激として感知して、どんなメカニズムで病原性発現に至るのかを解明するため、培養腸管上皮細胞上でウェルシュ菌の芽胞形成・毒素産生を誘導できる *in vitro* 感染実験系を開発した（特願 2012-181901）。こ

の実験系を利用すれば動物の消化管内の芽胞形成阻害物質等を同定できる。また近年、炎症性腸疾患の制御分子メカニズムが次々と解明された結果（Chinen et al. *Nat. Commun.* 2:190, 2011、Pott and Hornef. *EMBO Rep.* 13:684, 2012）、おそらくこれまで予想されなかったほど多彩な物質やプロセスが消化管生理に深く関与することが明らかにされている。本研究では、これら最新知見に独自開発の実験系を組み合わせることにより、上記の動物由来芽胞形成抑制因子を同定し、さらにこれを通過点として、ウェルシュ菌食中毒を再現する小動物感染モデルの開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究ではまず、動物の消化管に存在すると思われる芽胞形成阻害物質を同定する。そしてこの物質が芽胞形成を阻害するメカニズムを解明する。

消化管内では、複雑な上皮-免疫システムが管腔内の腸内細菌叢と相互作用しつつ、不必要な炎症反応を抑制して腸の恒常性を保っている。そんな消化管内でウェルシュ菌は CPE を産生し、激しい腸炎症状を誘発する。この複雑なシステムの中、菌が感知する病原因子発現刺激は何で、発現抑制因子は何なのか。またそれら刺激・因子に応答し、発現に至るシグナル伝達はどのような仕組みなのか。本研究の成果はウェルシュ菌食中毒の感染動物モデルの確立のみならず、感染症の宿主特異性の問題や、消化管生理の本質の解明に寄与すると期待できる。また、動物種間で感受性が異なる「宿主特異性」のメカニズムも、物質レベルで明らかにできると期待される。

3. 研究の方法

(1) 材料

ウェルシュ菌は食中毒臨床分離株に由来する SM101 株を用いた。宿主細胞として Caco-2 細胞を用い、DMEM 培地に 10% 牛胎児血清を添加した培地で細胞を維持した。マウス糞便抽出液は以下のように調整した：4~6 週齢の ddY マウスの糞便を飼育ケージから回収し、これを使用まで -80℃ で保存した。重量を測定後、5 倍量（重量/体積）の滅菌 MilliQ 水を加え、ボルテックスで均一に懸濁した。9,000×g、20 分間、4℃ で遠心後、遠心上清をポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過した。これをさらに 100,000×g で 90 分間、4℃ で遠心し、再度 0.45 μm のフィルターでろ過したものを糞便抽出液（MFE）とした。

(2) 芽胞形成率の測定

ウェルシュ菌ストック溶液を Fluid Thioglycollate 培地に接種、37℃ で一晚嫌気培養した。これを 1,610×g で 10 分間遠心して菌体を回収し、リン酸緩衝液で 2 回洗浄の後に DMEM(SS)-DCA 培地（グルコ

ース不含 DMEM 培地に 0.4% 溶性デンプンに加え、さらにデオキシコール酸を 25 μ M 添加した培地)に懸濁した。この菌懸濁液 180 μ l に被検液 20 μ l を加え、96 穴マイクロプレート内で 24 時間、37°C で嫌気培養した。培養液 5 μ l をスライドガラス上へ採取、これを位相差顕微鏡下で観察してその形態より芽胞形成率を算出した。

(3) 芽胞形成抑制物質の性状解析

糞便抽出液を、分画分子量特性の異なる様々な限外濾過膜で分画し、分画液の芽胞形成抑制活性を定量した。また分画溶液を 95°C、70°C、50°C、室温で 20 分間加温し、加温後の検体を添加した培地での芽胞形成抑制率を算出した。また、芽胞形成抑制物質を添加した培地のグルコースの濃度の変化は、グルコース CII-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

(4) 芽胞形成関連遺伝子発現量の定量

ウェルシュ菌からの RNA 抽出は、RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN 社) を用いた。RNA 量を分光光度計にて測定した後、DNase 処理、RNA の逆転写を行った。得られた cDNA を Power STBR Green PCR Master Mix (Life Technologies 社) と、*spo0A*、*sigE*、*cpe* 各遺伝子に対するプライマーを用いて、定量的 PCR を行った。得られた結果は、培養開始時 (0 時間) に対する発現量の増加率として表した。

定量的PCRに用いたプライマー

プライマー	配列
<i>spo0A</i> -F	CATGCTATAGAGGTTGCTTG
<i>spo0A</i> -R	GAGTTTGTGGTTTACCCTT
<i>sigE</i> -F	TACTGGTGTAGGAGTTGAGG
<i>sigE</i> -R	CTTGATGCATAGGTTGCAAG
<i>cpe</i> 798-F	CGTTCTTCTAACTCATACCCCTGG
<i>cpe</i> 798-R	CTCCATCACCTAAGGACTGTTC

(5) CPE 蛋白質の検出

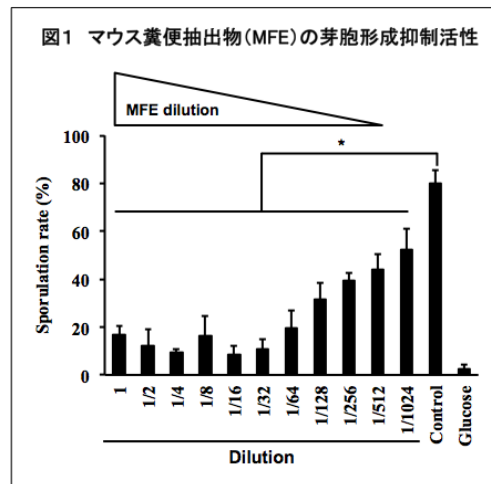
培養上清中に産生された CPE はイムノブロットングで検出した。菌の培養上清をポアサイズ 0.22 μ m のフィルターでろ過し、これを常法に従って SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。分離した蛋白質を polyvinylidene fluoride 膜へ転写、抗 CPE ウサギ抗体を用いて CPE を検出した。

4. 研究成果

過去に、モルモット腸内容にウェルシュ菌の芽胞形成を抑制する因子があると報告されている (日本細菌学雑誌 43:917-926, 1988)。これを受け、動物腸内容に同様の活性があるか調べた。最も得やすい検体としてマウス糞便を調べたところ、その糞便抽出液中に、ウェルシュ菌の芽胞形成を抑制する活性があることを確認した。抑制活性は濃度依

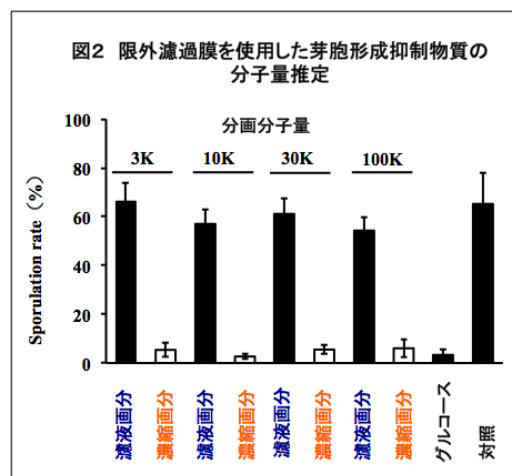
存性で、最大 1,000 倍希釈しても有意な芽胞形成抑制活性を示していた (図 1)。

図1 マウス糞便抽出物(MFE)の芽胞形成抑制活性



本活性の物性を知るために、活性を担う物質の分子量を、限外濾過膜の通過性から推測した。分画分子量が 100 キロダルトン (kDa)、30 kDa、10 kDa、3 kDa の限外膜を使用したところ、すべての膜で抑制活性は保持画分 (濃縮画分) に検出され、膜を素通りする濾液画分には抑制活性は認められなかった (図 2)。従って抑制活性を担う物質は分子量 10 万以上の物質であると考えられた。

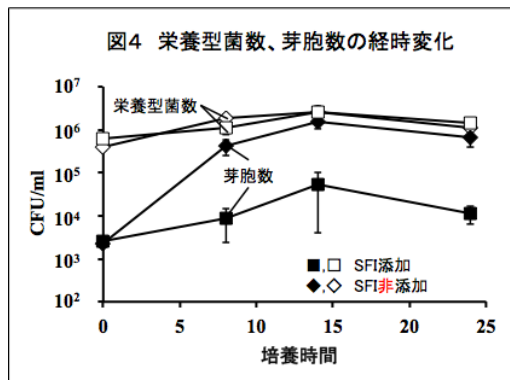
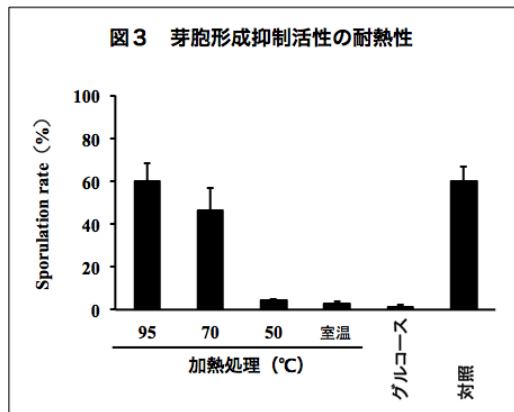
図2 限外濾過膜を使用した芽胞形成抑制物質の分子量推定



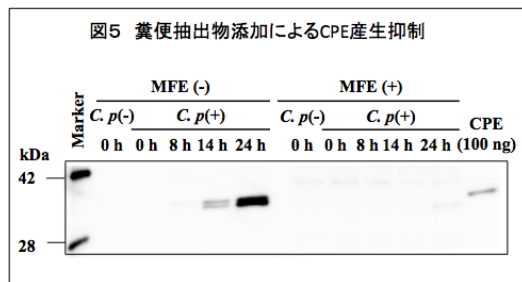
次に抑制活性が加熱処理で失活するか調べた。その結果、70°C 以上で 20 分間加熱すると活性は失われることがわかった (図 3)。この結果、芽胞形成抑制物質は易熱性の物質であり、図 2 の結果と合わせて考えると、蛋白質や糖鎖から成る高分子である可能性が示唆された。

芽胞形成抑制物質の作用機序を考えたとき、これが菌の増殖そのものを阻害して、その結果として見かけ上芽胞形成率の低下を引き起こしているだけという可能性も否定できない。そこでウェルシュ菌の増殖から芽胞形成へ至る過程を経時的に追跡し、芽胞形成抑制物質が菌の増殖に影響を与えている

か調べた。なお、既に芽胞形成抑制活性は分子量 100,000 以上の画分に回収されることが明らかとなったため (図 2)、分画分子量 100 kDa の限外濾過膜で保持される分画を芽胞形成阻害画分 (spore-formation inhibitor, SFI) と呼び、この SFI を実験に用いた。結果として、糞便抽出物はウェルシュ菌の増殖そのものには有意な影響は与えておらず、調べた全過程において糞便抽出物非添加条件と同じ程度の増殖能を有することが確認された (図 4)。

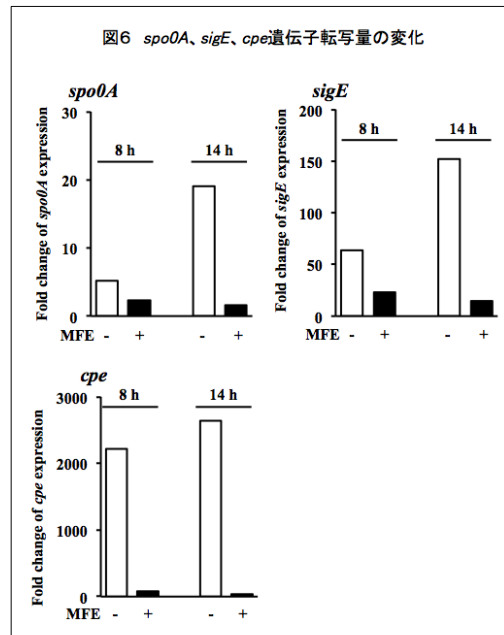


前述したように芽胞形成過程は CPE 産生過程と連関しており、芽胞形成が阻害される条件下では CPE 産生も阻害される。そこで次に、糞便抽出液を添加した条件下で CPE 産生も阻害されるのかについて検討した。その結果、糞便抽出物添加により芽胞形成が抑制されるのに伴い (図 4)、培養上清中に検出される CPE の量も低下していることを確認した (図 5)。



以上の結果から、マウス糞便に存在する芽胞形成抑制因子、SFI は、ウェルシュ菌の増

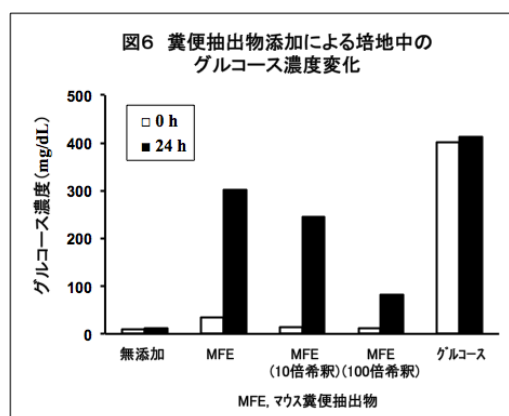
殖には影響せず、菌が芽胞を形成し CPE 産生に至るシグナル伝達系を特異的に阻害している可能性が疑われた。そこでこれを確認するために、芽胞形成に必修のマスター・レギュレーター Spo0A と、その下流にあるシグナル分子 SigE、そして CPE の 3 者の遺伝子転写量を逆転写定量的 PCR で調べた。その結果、糞便抽出物 (MFE) 非存在下では、培養後 8 時間および 14 時間後の各遺伝子の発現量は、0 時間におけるそれと比し数十から数千倍に上昇していたが、糞便抽出物を添加すると、それらの上昇が有意に抑えられることが明らかになった。



以上の結果、糞便抽出物あるいは SFI は、芽胞形成に必須の転写因子 spo0A の活性化を阻害し、結果として芽胞形成阻害及び CPE 産生抑制を引き起こしていることが明らかとなった。

これらの結果を総合的に考察すると、マウス糞便中に存在する SFI は、分子量 100,000 以上の易熱性物質で、ウェルシュ菌の増殖を阻害せず、ウェルシュ菌が芽胞を形成する際に必要となるシグナル伝達系を特異的に抑制することで、その作用を発揮していると考えられた。この情報より既知の芽胞形成抑制因子を文献的に調査すると、これはグルコースの作用と類似していることが明らかになり、本 SFI の活性発現にグルコースが何らかの形で関与している可能性が疑われた。そこで実験に用いた培地の組成が、糞便抽出物の添加により変化するかどうか調べた。その結果、糞便抽出物 (MFE) 添加により培地中のグルコース濃度が 0.3% 程度まで上昇すること、そのグルコース上昇効果は加える MFE の濃度依存性であることが明らかになった (図 7)。グルコースをこの培地に 0.3% の濃度で加えるとウェルシュ菌の芽胞形成が阻害されることから (結果は示していない)、SFI の作用

の本質は培地中のグルコース濃度上昇を引き起こすことにあると推察された。



本実験に使用した培地 (DMEM(SS)-DCA) はグルコースを含まず代わりに糖原として溶性デンプンを 0.4% 含む。ウェルシュ菌は自身の持つアミラーゼ活性でデンプンを徐々に分解し、産生されたグルコースを利用して増殖すると考えられる。おそらく糞便抽出物には宿主由来のアミラーゼが存在し、これが溶性デンプンを速やかに分解することで培地中グルコース濃度の急激な上昇を引き起こし、高濃度のグルコースが Spo0A の活性化を阻害したものと想像された。これを確認するためにアミラーゼの阻害剤、アカルボースを培地中に添加すると、MFE 添加によるグルコース濃度上昇が阻害された。また同時にアカルボース添加は菌の増殖も阻害したことから、ウェルシュ菌のアミラーゼもアカルボース感受性で、菌アミラーゼの阻害は菌の増殖を阻害することも明らかにした (データは示していない)。これらの結果から、SFI はマウス糞便中のアミラーゼで、これが培地中グルコース濃度を上昇させることで、本実験系では芽胞形成を阻害したものと結論付けられた。

糞便中のアミラーゼの由来について考察するため無菌マウスの糞便を入手し同様に実験に供したところ、無菌マウス糞便にも同様の芽胞形成阻害活性が確認できた。この結果は、糞便中のアミラーゼが腸内細菌由来ではなく、おそらくマウスすい臓由来のものが下部消化管に到達し、活性を保持したまま糞便中に混入していることを示している。動物の消化管では無数の腸内細菌叢が特徴的な生態系を形成しており、食餌由来あるいは宿主組織由来の物質を代謝しつつ、互いに相互作用していると考えられる。難消化性の多糖が下部消化管に到達すると、これを分解する腸内細菌によりオリゴ糖まで分解される可能性があり、さらにグルコースまで分解し利用するためにアミラーゼは利用されているのかもしれない。これは腸内細菌が増殖する上でも何らかの役割を演じている可能性があり、アミラーゼを含む糖代謝酵素が腸内環境恒常性を調節する上でどのような働きを

しているかを考えると非常に興味深い。ウェルシュ菌食中毒の際に難消化性多糖が感染の場に存在すると、腸内細菌やアミラーゼの作用により産生されたグルコースが局所的に濃度上昇し、芽胞形成に抑制的に働く可能性は否定できない。本研究の結果は、消化管内の糖代謝が、感染症の発症に影響を与える可能性を具体的に示した 1 例として評価できる。今後動物モデルを確立してこの可能性についてさらに追及することが重要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Miyake, M. et al, A digestive enzyme in intestine may control the enterotoxin production by *Clostridium perfringens*, 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 日、長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)
- ② Miyake, M. et al, Identification of a substance in mouse feces that suppresses sporulation of *Clostridium perfringens*, The 9th International Symposium on the molecular biology and pathogenesis of *Clostridia*, 2015 年 9 月 7 日~11 日、Hotel Schloss Reinach (Freiburg-Munzingen, Germany)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 眞実 (MIYAKE, Masami)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10251175

(2) 研究分担者

安木 真世 (YASUGI, Mayo)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40589008

(3) 連携研究者

サーカー、マフーツ

(SARKER, Mahfuzer R.)
米国オレゴン州立大学
研究者番号：なし

(3) 研究協力者
三宅 達彦 (MIYAKE, Tatsuhiko)