

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860467

研究課題名(和文)食中毒起因ウェルシュ菌発症の引き金となる芽胞形成・毒素産生の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Research on environmental factors inducing sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* food poisoning strains

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(系)・助教

研究者番号：40589008

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)：ヒト腸管上皮細胞株存在下でウェルシュ菌を培養する *in vitro* 実験モデルでは芽胞形成時に産生される腸管毒素依存性に宿主細胞傷害が起こることが明らかとなった。この現象は食中毒の病態とよく一致しており、現行の試験管培養法に比べ生体で起きる現象をより反映できるモデルとして応用が期待される。胆汁酸の芽胞形成促進メカニズムを解明するため菌体DNAマイクロアレイを行い、胆汁酸は芽胞形成マスターレギュレーター *spo0A* の活性化(リン酸化～二量体化)に関与することが示唆された。芽胞形成を制御する環境因子として新たにレドックス反応、無機塩の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxicity of the intestinal epithelial cell line was exclusively dependent on enterotoxin production during sporulation in a *Clostridium perfringens* food poisoning strain in *in vitro* co-culture model. These observations are consistent with the phenomenon in the intestinal tract during food poisoning. This model would be a useful tool for investigation of food poisoning by *C. perfringens*. In order to elucidate the mechanisms how bile salts induce sporulation, we performed microarray analysis of *C. perfringens*. The results suggest that bile salts accelerate sporulation via *Spo0A* activation. We also found the newly sporulation-regulating factors: redox status and an inorganic salt.

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

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典型原因菌であり、日本国内での食中毒年間事例数第4位、事例あたりの患者数第1位、また欧米では年間事例数第2位と報告されている。近年、老人ホームや病院の給食施設など、二次感染が懸念される事例が報告されており、その予防・制御の重要性は医学・公衆衛生学上明らかである。従来、ウェルシュ菌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、河川など環境にも広く存在するため、食品の汚染防止や加熱・保存など衛生管理だけでは限界がある。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？

ウェルシュ菌は汚染食品の喫食により小腸に到達し、その後芽胞を形成する。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、下痢が起こることが明らかとなっている(図1)。一連の流れの中で発症には 10^6 個以上の生菌を摂取する必要があること、毒素産生は芽胞形成に引き続いて起こること、毒素による細胞破壊メカニズム、毒素が症状の最重要因子であることは多数報告されている。一方、腸管毒素産生の前段階として必須過程である芽胞形成に関しては菌体周囲環境の悪化に伴うとされているが、その詳細メカニズムには未だ不明な点が多い。芽胞形成に関与する腸管因子ならびにその作用メカニズムを解明することができれば、その制御を通して腸管毒素の産生抑制が期待され、ひいてはウェルシュ菌食中毒予防へ応用できる可能性がみえてくる。このような発想の下、芽胞形成・毒素産生の制御に焦点を当てた食中毒の新たな予防法への展開を最終目的とし研究を開始した。

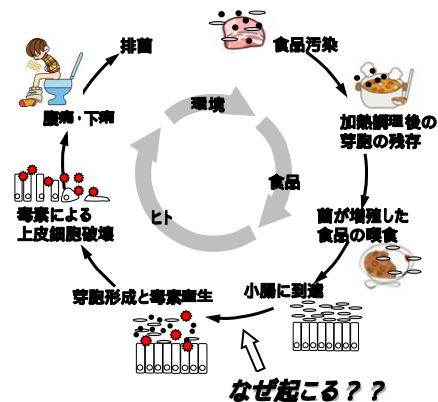


図1 ウェルシュ菌の感染環と本研究の着眼点

古くから芽胞形成に関する研究は宿主

細胞非存在下で行われていた。しかし腸管内で起こる芽胞形成ならびに毒素産生には腸内環境そして宿主細胞の存在を無視することはできない。研究代表者所属研究室では、*in vitro*実験モデルとしてヒト腸上皮細胞株存在下におけるウェルシュ菌の培養実験系ならびに芽胞形成・毒素産生系を確立させた(特許出願済; 特願 2012-181901)。

また、古くから芽胞形成を制御する因子の研究は行われており、これまでに糖、胆汁(酸)、テオフィリン、ペプトン、酸が同定された。しかしグルコースが CcpA を介し芽胞形成を抑制するという報告を除いてそれら因子の芽胞形成制御メカニズムは明らかではない。研究代表者らは上記 *in vitro* 実験モデルを用いて、胆汁酸ならびにデンプンが芽胞形成の促進因子であること、またグルコースが抑制因子であることを再確認した。

芽胞形成菌であるバシラス属では芽胞形成のトランスクリプトーム解析が進んでおり、芽胞形成における菌体遺伝子のシグナルカスケードが明らかとなっている。一方でウェルシュ菌が属するクロストリジウム属では未だカスケードの全体像が把握できておらず、研究代表者がターゲットとするウェルシュ菌を用いた芽胞形成に関するトランスクリプトーム解析は皆無であった。

2. 研究の目的

病原性発揮に深く関与する芽胞形成ならびに腸管毒素産生の制御を基にしたウェルシュ菌食中毒の予防法へと研究を展開することを将来的に目指す。そのうち本研究期間においては *in vitro* 実験モデルを用いて、芽胞形成・毒素産生メカニズムの分子生物学的解析さらには消化管環境因子の芽胞形成への作用メカニズムの解明を目的とした。具体的には(1) 確立した *in vitro* 実験モデルの性状解析、(2) 芽胞形成の促進因子である胆汁酸存在下における菌体遺伝子のトランスクリプトーム解析ならびに作用メカニズムの解明、(3) 芽胞形成を促進または抑制する環境因子のさらなる探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト腸管上皮細胞株存在下でウェルシュ菌を培養する *in vitro* 実験モデルを用いて、ウェルシュ菌食中毒株の芽胞形成・毒素産生時の宿主細胞への影響を評価した。また腸管毒素遺伝子欠損株を作出し(図2)野生株と比較した。欠損株作出には Targetron 法 (Sigma 社) を利用した。(2) 食中毒由来 NCTC8239 株を胆汁酸存在下・非存在下において培養し、芽胞形成・毒素産生に至るまで経時的にサンプルを回収しマイクロアレイを行った。アレイチップはアジレントテクノロジー株式会社のカスタムアレイデザインツール(eArray)を利用した。またマイクロアレイの実施は大阪大学微生物病

研究所内感染症 DNA チップ開発センターに依頼した。胆汁酸存在下で発現が有意に増加または低下する遺伝子を特定し、胆汁酸が芽胞形成のどのステージ、どの菌体遺伝子に作用しているのかを評価し、作用メカニズムの解明を目指した。(3) 芽胞形成は菌体周囲環境の悪化が要因であることに着目し、様々なストレス(酸化ストレスならびに飢餓ストレス)の芽胞形成への関与を評価した。また DMEM 培地と RPMI 培地における芽胞形成率の顕著な差に注目し芽胞形成に關与する因子の探索を行なった。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験モデルにおいて、ウェルシュ菌食中毒由来 NCTC8239 株または SM101 株を培養時、芽胞形成・腸管毒素産生に伴って宿主細胞傷害が観察された。腸管毒素遺伝子(*cpe*)欠損株では芽胞形成時においても細胞傷害は認められず、*cpe* 補充株(発現プラスミドとして *cpe* 遺伝子導入)で野生株同様細胞傷害性は復帰した(図3)。従って今回用いた食中毒株の芽胞形成時に認められる宿主細胞傷害は、腸管毒素依存性であることが明らかとなった。本モデルはウェルシュ菌の芽胞形成、毒素産生ならびに上皮細胞傷害の観察が一度に可能であり、またこれらの現象は食中毒の病態によく一致している。現行の試験管を用いた培養実験に比べ生体で起きている現象をより反映できるモデルとして、応用が期待される。

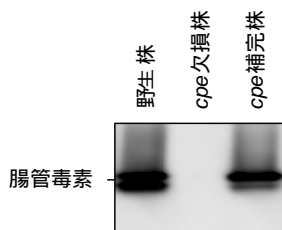


図2 変異株の作出

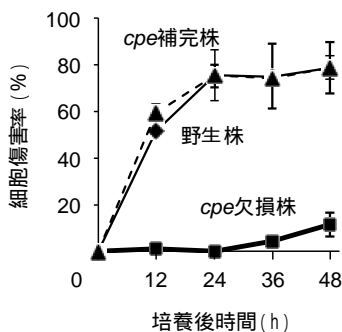


図3 変異株の細胞傷害性

(2) 胆汁酸が芽胞形成・腸管毒素産生を促進するメカニズムを解明するため、胆汁

酸存在下・非存在下でウェルシュ菌食中毒由来 NCTC8239 株の *in vitro* 実験を行い、芽胞形成時の菌体 DNA マイクロアレイを行った。対照に対し、4 倍以上または以下の発現変化があったものを抽出し有意差検定を行った。2778 遺伝子中 315 遺伝子が胆汁酸添加により有意な発現上昇を、1 遺伝子が有意な発現低下を示した。NCBI データベースを基に芽胞形成関連遺伝子のみを抽出し発現変化を評価したところ、胆汁酸添加時芽胞形成のマスターレギュレーター *spo0A* の発現に有意差はなかった一方、その下流遺伝子群では有意に発現が増加した。また *spo0A* 欠損株では胆汁酸添加時においても芽胞形成は誘導されなかった。*spo0A* は転写・翻訳後、リン酸化ならびに二量体化を受け(活性化)、下流遺伝子のプロモーターに結合し、その発現変化をもたらすことが知られている。これらのことから胆汁酸は Spo0A タンパク質の活性化に關与することが示唆された。*spo0A* 下流遺伝子に先駆けて発現変化した遺伝子群を胆汁酸応答遺伝子の候補とし変異株の作出を試みた。Targetron 法では変異株は得られなかったため現在相同組換え法にて変異株の作出を行っている。今後候補遺伝子が胆汁酸の応答遺伝子であるか精査が必要である。

(3) 酸化ストレスとして好気培養または過酸化水素添加培地で培養を行ったところ、菌の死滅に先行して芽胞形成の抑制が認められた。一方還元剤であるアスコルビン酸投与時には、芽胞形成の促進が認められた。従ってレドックス反応が芽胞形成の制御に關与することが示唆された。栄養飢餓の1つであるグルコース飢餓時には芽胞形成の促進が認められた。これは既報論文の結果とよく一致していた。アミノ酸飢餓を誘導するため、セリンヒドロキサメートを用いた実験を行ったが、濃度依存性に生菌数の顕著な減少が認められ、芽胞形成への関与の評価に至らなかった。そこでアミノ酸飢餓時に一般的に起こる緊縮応答において重要である *relA* 遺伝子に着目し、その変異株を作出した。現在変異株の芽胞形成への影響を評価中である。DMEM 培地で確認された芽胞形成・腸管毒素産生は RPMI 培地添加により抑制された。RPMI 培地成分である無機物 A 添加時においても同様に抑制された。RPMI 培地から無機物 A を除去すると芽胞形成が回復した。従って無機物 A は芽胞形成ならびに腸管毒素産生を抑制する新たな因子であることが明らかとなった。

今後これら因子が芽胞形成の制御に關与するか精査すると共にその作用メカニズムの解明を行うことでウェルシュ菌食中毒株の芽胞形成制御メカニズムの一端が明らかになることが期待される。

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1件)

(1) Yasugi M, Sugahara Y, Hoshi H, Kondo K, Talukmer PK, Sarker MR, Yamamoto S, Kamata Y, Miyake M, In vitro cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* isolate carrying a chromosomal cpe gene is exclusively dependent on sporulation and enterotoxin production, *Microbial Pathogenesis*, in press, 査読有り
DOI:10.1016/j.micpath.2015.04.003

〔学会発表〕(計8件)

(1) 安木真世、星英之、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実、*Clostridium perfringens* 食中毒株はヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 と共培養時、芽胞形成に伴って細胞傷害性を示す、第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)、2015 年 3 月 26~28 日

(2) 三宅眞実、三宅達彦、安木真世、山本茂貴、鎌田洋一、A digestive enzyme in intestine may control the enterotoxin production by *Clostridium perfringens*、第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)、2015 年 3 月 26~28 日

(3) Yasugi M, Hoshi H, Okuzaki D, Yamamoto S, Kamata Y, Sarker MR, Miyake M, Bile acids accelerate sporulation via Spo0A activation in *Clostridium perfringens*、奈良県立新公会堂(奈良県奈良市)、2014 年 9 月 23~26 日

(4) 菅原祐樹、星英之、山本茂貴、鎌田洋一、Sarker MR、三宅眞実、安木真世、In vitro 感染実験モデルを用いたウェルシュ菌エンテロトキシンの役割の解明、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、大阪府立大学(大阪府堺市)、2014 年 9 月 18~19 日

(5) 長澤俊範、中尾元幸、石原陽子、幸田知子、安木真世、小崎俊司、三宅眞実、黄砂を含む粉塵からボツリヌス菌を検出するための基礎検討、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、大阪府立大学(大阪府堺市)、2014 年 9 月 18~19 日

(6) 安木真世、星英之、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実、*Clostridium perfringens* 食中毒株の胆汁酸による芽胞形成促進メカニズム、第 87 回日本細菌学会総会、タワーホール船堀(東京都江戸川区)、2014 年 3 月 26~28 日

(7) Yasugi M, Hoshi H, Yamamoto S, Kamata Y, Miyake M, The impact of bile acid on the sporulation of *Clostridium perfringens* in vitro infection model, 8th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia, Palm Cove,

Australia, 2013 年 10 月 22~26 日

(8) Miyake M, Hoshi H, Kondo K, Yasugi M, Yamamoto S, Katama Y, An in vitro model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection, 8th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia, Palm Cove, Australia, 2013 年 10 月 22~26 日

〔図書〕(計1件)

(1) 安木真世 他、文永堂出版、獣医公衆衛生学 I、2014、323(p154~156)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pub/Veterinary_Public_Health/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号：40589008