

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450096

研究課題名(和文) クロストリジウム属におけるトキシン-アンチトキシンシステムの生理学的意義の解明

研究課題名(英文) The role of clostridial T-A system

研究代表者

鈴木 基生 (Suzuki, Motoo)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80457340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Segmented filamentous bacteria (SFBs)は腸管粘膜に付着する孢子形成性の難培養菌である。SFBは腸管免疫系、特にTh17を誘導する役割を果たすことで近年注目されているが、SFBを無菌マウス内で継体することによりTh17への誘導が見られなくなるという現象を発見した。SFBはマウス内で継体することによってTh17を誘導できないSFB菌株が選択されているのではないかと推測された。そこで、単一クローンのSFBを分離するため、SFB孢子をマウスの糞便から精製する方法を確立した。精製孢子を限界希釈して無菌マウスに接種することにより、SFB菌株を単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Segmented filamentous bacteria (SFBs) are non-culturable spore-forming bacteria, tightly attaching to the intestinal epithelial cells. SFBs play crucial roles in the maturation of gut immune function, especially the induction of Th17 lymphocytes. However, we found the phenomenon that Th17-induction of SFBs was not detected by repeating fecal passages in germ-free mice. We suspected that Th17-uninducible SFB strain was selected from multiple clones, since we observed many single nucleotide polymorphisms in DNA sample obtained for whole-genome sequencing analysis. To clarify the effect of each SFB strain on Th-17 induction, we attempted to isolate single-clone SFB. We have established the method for purifying spores from feces of SFB-gnotobiotic mice. Furthermore, we have isolated single-clone SFB by inoculating the diluted purified spore into germ-free mice.

研究分野：腸内細菌

キーワード：SFB

1. 研究開始当初の背景

“Bacterial suicide”とも呼ばれるトキシン-アンチトキシン(T-A)システムは、トキシンの毒性を中和するアンチトキシンが同一オペロン上に存在しているが、ある特定の状況でアンチトキシンが分解され、トキシン過剰になり生育できなくなるシステムである。研究が最も進展している大腸菌の *mazEF* システムでは、*mazF* 遺伝子は直上流の *mazE* 遺伝子とオペロンを形成しており、通常は MazF と MazE は複合体を形成して正常な生育を保っている。しかし、アミノ酸飢餓などのストレスを認識するとその応答としてオペロンの発現が増大し、さらに MazE がプロテアーゼによって分解されるため、MazF が単独で作用できるようになる。この MazF は 1 本鎖 RNA 中の 3 塩基 ACA を認識して切断する RNase であり、ほぼ全ての mRNA が分解されるため、タンパク合成が阻害されて生育が停止する。

申請者は *mazEF* システムが実際は “Bacterial suicide” ではなく、休眠状態によりストレスをやり過ごすためのシステムであり、転写、翻訳等の細胞機能は維持していることを明らかにしている。さらに、この休眠状態の細胞を利用し、ACA 配列を保持しない遺伝子を発現させることにより目的タンパク質のみを生成させる Single Protein Production (SPP) system を構築することに成功し、Nature Protocols 誌、Molecular Cell 誌に成果を発表した。このシステムは NMR によるタンパク質の構造解析での目的タンパク質のラベリングにも有効であり、タカラバイオでも製品化されている。

T-A システムについての研究はそのほとんどが大腸菌を研究対象として進められており、病原菌での報告はほとんどなく、病原性との関わりについては不明である。結核菌において、その長い潜伏期間との相関を明らかにすることを目的として *mazF* ホモログの研究が行われたが、標的となる RNA 配列が明らかになったのみで、進展はしていない。また、申請者は偽膜性大腸炎の原因菌である *ディフィシル菌* の MazF ホモログ(MazF-cd)は過剰発現によって近縁のウエルシュ菌の生育を停止させること、RNA 中の 5 塩基 UACAU を認識して切断することを既に結果として明らかにし、成果を発表した (図 1)。

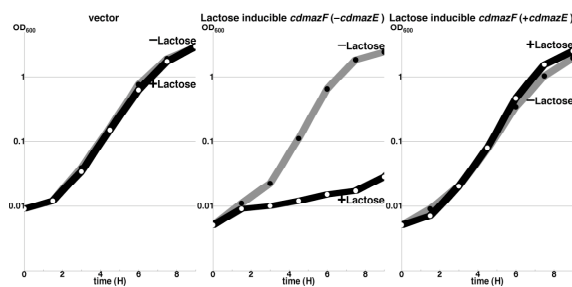


図 1 MazF-cd, MazE-cd の発現による生育への影響

2. 研究の目的

偽膜性大腸炎に対する新規薬剤の開発を最終目的として、MazF-cd の生理的機能と抗生物質ストレスへの応答メカニズムを解明することを目標とする。また、クロストリジウム属に特異的な新規の T-A システムを探索することにより、ウエルシュ菌の食中毒予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ディフィシル菌 T-A システムの解析

抗生物質存在下で発現量が増大するディフィシル菌の T-A システムを検索し、欠失変異株及び過剰発現株を構築してトキシン A 及びトキシン B 産生量を野生型株と比較し、偽膜性大腸炎との相関を解析する。また、*mazEF* システムのクロストリジウム属における生理的役割を発現誘導系及び欠失変異株を利用して生化学的解析により解明する。

ディフィシル菌による偽膜性大腸炎の病原因子はトキシン A 及びトキシン B であるが、5%前後の頻度で A-B+株が分離されており、トキシン B のみで偽膜性大腸炎を引き起こすことが可能と考えられる。MazF-cd が認識する TACAT 配列の出現頻度は単純計算では 1024 塩基に 1 ヶ所であるが、トキシン A の遺伝子 *tcdA* では 8133 塩基中 TACAT は 12 ヶ所とやや多いくらいであるのに比べ、トキシン B の遺伝子 *tcdB* には 7101 塩基中 TACAT は 4 ヶ所と非常に少ない。抗生物質によるストレス応答により *mazF* の発現を増大させて休眠状態となったディフィシル菌は、抗生物質による作用を受けないままトキシン B を積極的に生成することによって偽膜性大腸炎を引き起こす可能性を考えている。そこで、*mazEF* を欠失したディフィシル菌を構築し、抗生物質存在下でのトキシン B 産生量を野生型株と比較する。

ディフィシル菌は分子遺伝学的な手法での解析が難しいため、まずはウエルシュ菌での実験系を確立する。ウエルシュ菌は形質転換等の操作が比較的簡単ではあるものの、これまで目的遺伝子の発現制御系は構築されておらず、低レベルの発現でも毒性を示す T-A システムの Toxin 遺伝子を導入することはできなかった。そこで、複数の発現誘導系を構築し、Toxin 及び Antitoxin を個別に独立して発現させるシステムを構築する。また、ウエルシュ菌の遺伝子ノックアウト技術は既に確立しており、*mazEF* 欠失株を構築する。

(2) クロストリジウム属特異的な新規 T-A システムの探索

*cphA*、*cphB* 及び *cphBA* の発現系と遺伝子破壊株を構築し、*cph* オペロンをクロストリジウム属に特異的な新規の T-A システムと見なせるのか検討し、芽胞形成、発芽との相関を解析する。さらに、シアノフィチンの合成分解系を標的とした食品添加物を検索し、ボツリヌス菌やウエルシュ菌による食中毒の新たな

な予防法を開発することを目指す。シアノフィチンは藍藻類が飢餓時に利用する栄養備蓄物質として見出されたアスパラギン酸とアルギニンのポリマーである。ボツリヌス菌やウェルシュ菌ではシアノフィチンの合成酵素遺伝子 (*cphA*) 及び分解酵素遺伝子 (*cphB*) がオペロンを形成し、芽胞からの発芽に関与する遺伝子群に隣接していることをゲノム解析から見出した。アミノ酸プールとしてシアノフィチンを合成する CphA を芽胞での休眠状態に導くトキシン、CphB を平常時は CphA が合成したシアノフィチンを分解してトキシンの毒性を中和するアンチトキシンと見なすと、*cph* オペロンは T-A システムとも考えられる。本研究では *cph* オペロンをクロストリジウム属に特異的な新規の T-A システムと見なせるのか検討しつつ、芽胞形成、発芽との相関を解析する。そして、研究期間中にボツリヌス菌やウェルシュ菌による食中毒の新たな予防法の開発を目指す。

*cphA*、*cphB* 及び *cphBA* それぞれの発現系を構築し、他の T-A システムと同様、*cphA* の過剰発現がウェルシュ菌の生育を阻害するのか、*cphB* を同時に発現することにより *cphA* の過剰発現による毒性を中和するのか確かめる。それぞれの過剰発現が生育時のアミノ酸要求性、芽胞の形成率、芽胞からの発芽率、腸管毒素産生性、マウス腸管内での生存や毒素産生量などに及ぼす影響を解析する。さらに、複合体形成など合成酵素と分解酵素の相互作用があるのか調べる。

腸管毒素を産生し、食中毒事例より分離された SM101 株において *cphA*、*cphB* 及び *cphBA* それぞれの遺伝子破壊株を作製する。野生株と破壊株において芽胞の形成率、芽胞からの発芽率、腸管毒素産生性、マウス腸管内での生存や毒素産生量などを比較する。SFB のマウスへの接種によらない培養法を確立し、ウェルシュ菌での解析によって得られた結果を参考にアミノ酸要求性、芽胞形成、発芽などの SFB への影響を解析する。

#### 4. 研究成果

Segmented filamentous bacteria (SFBs) は腸管粘膜に付着する孢子形成性の難培養菌である。SFB は腸管免疫系、特に Th17 を誘導する役割を果たすことで近年注目されているが、SFB を無菌マウス内で継体することにより Th17 への誘導が見られなくなるという現象を発見した。SFB は宿主の免疫を刺激することで最近になって注目を集めている菌であり、当初の研究対象として計画していたウェルシュ菌からこの SFB を中心とした研究に方針を変更した。

SFB は全ゲノム配列の決定の際に多くの変異が見つかっており、無菌マウス内での継体では、Th17 を誘導できる SFB は生育しにくく、複数の SFB 菌株から Th17 を誘導できない菌株が選択されて多数を占めるようになって

いるのではないかと推測された。そこで、SFB の Th17 誘導能が菌株によって異なっているのかを明らかにするために単一クローンの SFB を分離することを試みた。

まず、SFB 胞子をマウスの糞便から精製する方法を、ウログラフィン密度勾配遠心法などの手法を用いて、夾雑物や栄養細胞を除くことにより確立した。SFB は難培養菌であるため、人工培地での培養による菌株の分離は難しく、分離したクローンはマウス内で増殖させる必要があった。そのため、精製胞子がマウス内で発芽、生育することを確認し、無菌マウスに接種する胞子を限界希釈することにより、複数の SFB 菌株を分離することに成功した。

今後、Th17 誘導能などを解析し、それぞれの菌株を比較することにより、SFB が Th17 を誘導する分子メカニズムの解明が期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

鈴木基生 ; 今大路治之 ; 桑原知巳 マウス腸内難培養菌の孢子精製 日本遺伝学会第 86 回大会 2014 年 9 月 17~19 日 長浜バイオ大学 滋賀県長浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 基生 (SUZUKI, Motoo)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：80457340

(2) 研究分担者

桑原 知巳 (Kawahara, Tomomi)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：60263810

中山 治之 (NAKAYAMA, Haruyuki)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：80294669

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )