

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860281

研究課題名(和文) クロストリジウム属細菌におけるIV型線毛を介した温度依存的な付着制御の解析

研究課題名(英文) Temperature-dependent attachment regulation via type IV pili in Clostridia

研究代表者

尾花 望 (OBANA, Nozomu)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00722688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： ウェルシュ菌は芽胞のみならず微生物集合体であるバイオフィルムを形成することによって種々の環境ストレスに耐性を獲得している。本研究の微生物の細胞外構造体であるIV型線毛が本菌のバイオフィルム形成やバイオフィルム形態制御および基質への付着性に関与することが明らかとなった。IV型線毛遺伝子の発現は温度によって制御されており、宿主体内温度ではその発現が増強し、付着活性が増す一方で、低温条件下ではその発現が減少し、バイオフィルムマトリクス産生が増強することによってストレス耐性能が上昇した。つまり、本菌は外界の温度を感知して、IV型線毛の発現を厳密に制御することによって環境適応していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Clostridium perfringens survives antibiotic treatment or oxidative stress through the formation of biofilms or spores, but the environmental and regulatory factors involved in the biofilm formation remain unclear. Here, we observed that temperature regulates C. perfringens biofilm morphology. At 37°C, C. perfringens adhered to the substrate surface and formed a flat, thin biofilm. However, at 25°C, this bacterium did not adhere and produced a threadlike extracellular matrix, forming a viscous, thick biofilm. Adhered-biofilm formation requires pila2, which encodes a component of type IV pili (TFP). TFP expression was activated at 37°C. These results indicate that the morphology of C. perfringens biofilm is dependent on temperature through the differential production of extracellular matrix and the activity of TFP. Here, we demonstrated that the morphological change of the biofilms via TFP activity could play an important role in the pathogenesis of this organism.

研究分野：分子微生物学

キーワード：クロストリジウム属細菌 バイオフィルム IV型線毛 温度変化

1. 研究開始当初の背景

(1) クロストリジウム属細菌と IV 型線毛による付着制御

IV 型線毛は最も広い細菌種が有する線毛であり、近年、グラム陽性偏性嫌気性芽胞形成性桿菌であるクロストリジウム属細菌 (*Clostridium*)でも発見され、本属細菌の付着性に関与することが予想された (Varga et al. 2006. *Mol. Microbiol.*)。クロストリジウム属細菌における IV 型線毛の制御は、感染症の予防及び治療法の開発といった医学面に加え、バイオリアクターを用いたエネルギーや有用物質の生産技術の発展といった産業面にも貢献するものと考えられる。しかし、クロストリジウム属細菌の付着やグラム陽性菌における IV 型線毛に関する研究は少ないのが現状である。

(2) 温度変化による線毛制御

病原細菌における重要な感染シグナルの一つとして温度変化が挙げられる。つまり、細菌が環境中に存在する場合、外界の温度は常温である 25°C 以下である場合が多い一方、宿主の体内に侵入した場合、37°C 程度に上昇する。このような温度変化によって毒素をはじめとした病原性因子は制御されることが多く知られている。これまでにクロストリジウム属細菌のモデルであるウェルシュ菌において、IV 型線毛の主要構成成分である pilin をコードする *pilA2* 遺伝子の発現が 37°C において上昇し、さらに本菌の非生物性基質に対する付着性が向上することを見出した。従ってウェルシュ菌は感染時に繊毛を積極的に生産することで宿主細胞に付着及び定着をして、毒素を産生することで病原性を発揮すると考えられ、温度依存的な線毛制御は本属細菌の病原性の制御の観点から重要といえる。

2. 研究の目的

本研究では感染シグナルである温度変化に応答した IV 型線毛の制御機構を明らかにする。線毛は細菌が有する細胞外構造であり、病原細菌が宿主に感染する第一段階である付着に重要な因子である。これまでにグラム陽性偏性嫌気性病原細菌において IV 型線毛が付着性やバイオフィーム形成に重要であることを見出した。さらにその IV 型線毛は外界の温度に応答して、付着活性が変化することも見出している。温度変化とは細菌が動物への感染が成立した際の環境変化と類似していることから、温度依存的な IV 型線毛制御機構の詳細を明らかにすることによって、細菌の線毛及び付着を標的とした将来的な感染予防法や治療法の開発の研究基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

(1) IV 型線毛 Pilin をコードする *pilA2* mRNA 切断因子の同定

IV 型線毛の主要構成成分をコードする *pilA2* 遺伝子は 3 つの線毛関連遺伝子と共にオペロンとして転写されるが、転写後に *pilA2* mRNA のみが切り出され、蓄積する。一般的に転写後制御機構は、転写段階の制御よりも迅速にそして正確に発現量の調節が可能であるとされ、線毛の制御重要であると考えられる。真正細菌では RNA 切断には特定のリボヌクレアーゼ (RNase) が関与している。ウェルシュ菌ゲノム情報をもとに推定 RNase をコードする遺伝子を探索し、これらの遺伝子欠損株を作成する。いくつかの RNase は生育に必須であり、その遺伝子欠損株の作成は困難とされる。そこで、ラクトース誘導型のプロモーターを用いることでウェルシュ菌の生育に必須な遺伝子のノックダウン (KD) 株を作成する。

(2) 温度依存的な IV 型線毛制御とバイオフィーム形成の関連

多くの細菌で IV 型線毛とバイオフィーム形成には深い関連が示されている。IV 型線毛とバイオフィーム形成の関連性を解析する。IV 型線毛遺伝子およびバイオフィーム形成に関与する遺伝子の欠損株を用いて 37°C 及び 25°C 条件下におけるバイオフィーム形態及び構造を解析する。バイオフィーム構造観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いることによってバイオフィームの 3 次元構造をとらえる。さらに、付着能が欠失している *pilA2* 遺伝子欠損株を用いてマイクロアレイ解析を行い、付着能欠如に付随する遺伝子発現変動を解析する。これらの解析によって付着とバイオフィーム形成の関連性を空間的に且つ遺伝子レベルでも解明する。これにより、本属細菌のストレス耐性獲得機構の一つであるバイオフィームに関する理解を深める。

4. 研究成果

(1) 温度依存的なバイオフィーム構造変化

ウェルシュ菌バイオフィーム形態が温度変化 (37°C から 25°C) に応答して【付着型】(図 1) から【薄膜型】(図 2) へと劇的に変化することを見出した。バイオフィームは細菌の抗生物質及び酸化ストレス耐性に関与することから、ウェルシュ菌バイオフィームの形態変化は本菌の病原性との深い関連が示唆される。以上のことから、ウェルシュ菌は宿主体内のような高温条件 (37°C) では線毛を産生して、積極的に宿主細胞に付着して攻撃する一方、宿主から排出された場合は低温条件 (25°C) を感知し、付着をやめ、細胞外マトリクスを産生して酸素ストレスに対応していると考えられる。

(2) IV 型線毛は付着型バイオフィーム形成に関与する

IV 型線毛の構成成分である Pilin をコードする *pilA2* 遺伝子の欠損株を作成し、バイオフィームの形成実験を行ったところ、*pilA2*

欠損株では培養温度に関係なく薄膜型バイオフィルムを形成することが明らかとなった。つまり、IV型線毛による付着はバイオフィルムの構造に大きく影響を与えていることが示唆された。マイクロアレイ解析およびトランスポゾン変異株のスクリーニングを行い、薄膜型バイオフィルムを構成する細胞マトリクス産生に必須な遺伝子を同定した。この遺伝子欠損株では種々のストレスに対する耐性が低下したことから、同定した遺伝子は本菌のストレス耐性に深く寄与すると考えられる。さらに *pilA2* 遺伝子欠損株のマイクロアレイ解析の結果、温度に関係なく上記のバイオフィルムマトリクス遺伝子の発現が増強することが明らかになった。つまり、IV型線毛の形成が周囲の環境に応答したバイオフィルムマトリクス遺伝子の発現制御およびバイオフィルム構造の決定に寄与することが示唆された。

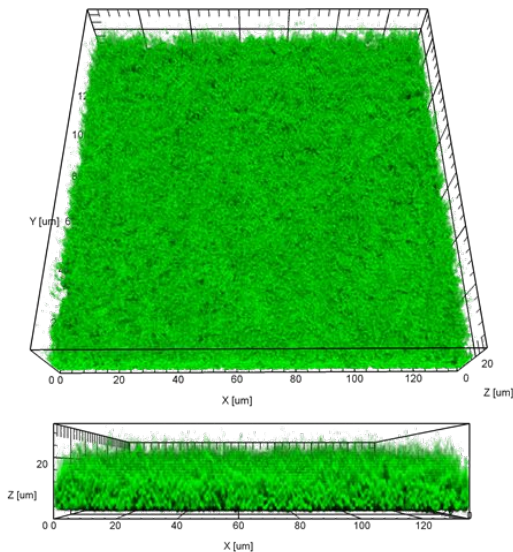


図1. 付着型バイオフィルムの3次元構造

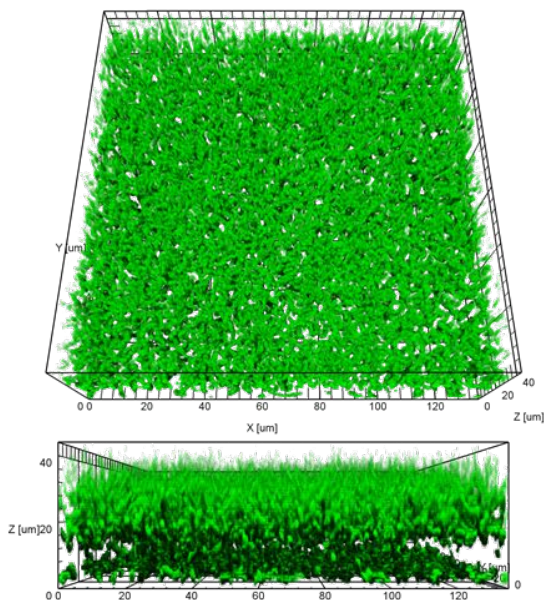


図2. 薄膜型バイオフィルムの3次元構造

(3) *pilA2* 遺伝子の転写後制御機構の解明

RNAの転写後制御にはリボヌクレアーゼ (RNase) が関与することが知られている。ウェルシュ菌ゲノム情報より、RNA分解や切断に寄与すると予想される遺伝子を抽出し、その遺伝子のKD株を作成した。エンドリボヌクレアーゼをコードすると予想される *rny* 遺伝子のKD株を作成したところ、KD条件では本菌の生育が減衰したところから、*rny* がコードする RNase Y は本菌の生育に寄与すると考えられた。さらに *rny* KD株を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、ウェルシュ菌の遺伝子発現のおよそ1割が RNase Y に影響を受けることが明らかとなり、本菌のRNAターンオーバーに関与することが明らかとなった。また、RNase Y KD条件では *pilA2* の発現が減少したことから、転写後における *pilA2* mRNAの切断およびその蓄積に関与することが判明した。さらに RNase Y の発現量に応じて本菌の付着量が増加することが明らかとなり、RNase Y を介した *pilA2* mRNAの蓄積がIV型線毛の形成および本菌の付着の制御機構の一つであることが示唆された。

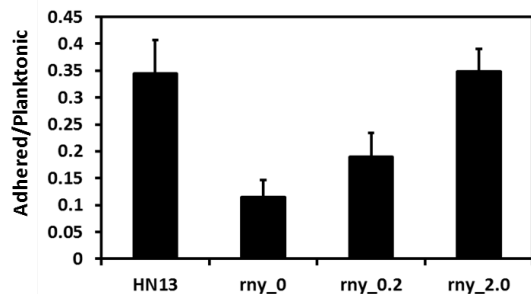


図3. 野生株 (HN13) および *rny* KD 株 (*rny*) の付着量の解析。数字は *rny* 遺伝子発現の誘導剤添加量を示す (mM)。

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6件)

1. 稲葉知大、尾花望、清川達則、吉田圭太郎、佐々文洋、尾形敦、野村暢彦 (2016) 集団が生み出す新たな微生物挙動～集団微生物学の勧め ソフトドリンク技術資料、177、411-433. 査読無
2. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1), 7-12. 査読有
3. Nakao, R., Kikushima, K., Higuchi, H., Obana, N., Nomura, N., Bai, D., ... & Senpuku, H. (2014). A novel approach for purification and selective capture of membrane vesicles of the periodontopathic bacterium,

- Porphyrromonas gingivalis: membrane vesicles bind to magnetic beads coated with epoxy groups in a noncovalent, species-specific manner. PloS one, 9(5), e95137. 査読有
4. 稲葉知大、清川達則、尾花望、豊福雅典、八幡穰、野村暢彦「集団微生物学のすすめ～バイオフィルムとその解析技術」(2014)化学と生物、52(9)、594-601. 査読有
 5. Obana, N., Nakamura, K., & Nomura, N. (2014). A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature. Journal of bacteriology, 196(8), 1540-1550. 査読有
 6. Yamamoto, T., Obana, N., Yee, L. M., Asai, K., Nomura, N., & Nakamura, K. (2014). SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces nonA transcription on the prophage SP8 region of the *Bacillus subtilis* genome. Journal of bacteriology, 196(3), 693-706. 査読有

〔学会発表〕(計10件)

1. 尾花望、中尾龍馬、永山恭子、泉福英信、野村暢彦(2016) Immunoactive membrane vesicles are actively produced by the Gram-positive clostridial pathogen、第89回日本細菌学会、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
2. 尾花望(2015)グラム陽性菌が能動的に作る膜小胞(メンブランベシクル)と宿主への作用、日本乳酸菌学会2015年度秋期セミナー(招待講演)昭和女子大学(東京、世田谷区)
3. Nozomu Obana, Kouji Nakamura, Nobuhiko Nomura (2015) An extracellular self-assembling protein coating the *Clostridium perfringens* biofilm (2015) 7th ASM Conference on Biofilms (国際学会) Chicago, IL, US
4. 尾花望、中村幸治、野村暢彦(2015) ウェルシュ菌の外界の環境に応答したバイオフィルム形態制御、第29回日本バイオフィルム学会、ホテル竹島(愛知県蒲郡市)
5. 尾花望、中尾龍馬、中村幸治、泉福英信、野村暢彦(2015) グラム陽性細菌のメンブランベシクルと動物細胞への作用、日本農芸化学会2015年度大会(招待講演)岡山大学(岡山県岡山市)
6. 尾花望、中村幸治、野村暢彦(2015) ウェルシュ菌バイオフィルム構造形成に必要な細胞外マトリクスタンパク質、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)

7. 尾花望、中村幸治、野村暢彦(2015) ウェルシュ菌バイオフィルムマトリクスオペロンの同定、第9回日本ゲノム微生物学会年会、神戸大学(兵庫県神戸市)
8. 尾花望、中村幸治、野村暢彦(2014) 外界の温度に対するウェルシュ菌バイオフィルム形態変化、日本農芸化学会関東支部2014年度支部大会、埼玉大学(埼玉県さいたま市)
9. 尾花望、中村幸治、野村暢彦(2014) 芽胞形成細菌における環境中の温度に応答したバイオフィルム形態変化、環境微生物系学会合同大会2014、アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)
10. Nozomu Obana, Kouji Nakamura, Nobuhiko Nomura (2014) A sporulation factor and multiple orphan kinases control the morphological changes of *Clostridium perfringens* biofilms in response temperature, AMS general meeting 2014(国際学会), Boston, America

〔図書〕(計1件)

1. 豊福雅典、尾花望、野村暢彦(2016) 微生物相互作用を利用した複合系バイオフィルムの制御、月刊バイオインダストリー2016年3月号

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾花望(OBANA, Nozomu)
筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号: 00722688