

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：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14858

研究課題名(和文)芽胞バイオロジー ―芽胞の新たな生物学的意義を探る―

研究課題名(英文)Biology of bacterial spores -exploring a new biological significance of bacterial spores-

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・教授

研究者番号：10251175

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)：ウェルシュ菌芽胞の細胞接着を分子レベルで解析することで、芽胞の知られざる生物機能を明らかにすることを目指した。

腸管上皮細胞Caco-2とウェルシュ菌を共培養し、細胞へ接着した芽胞数をCFU法で定量化したところ、菌の増殖に伴い形成された芽胞が細胞へ順次接着することが示唆された。そこで芽胞を分離調製しCaco-2細胞へ作用させたところ、定量的に有意な細胞接着が確認され、また形態学的にも多数の芽胞が細胞表面に接着することが、透過型・走査型電子顕微鏡により確認できた。芽胞と細胞接着には定着因子とレセプターの結合が介在する可能性が示唆されたが、この点は今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：We have tried to evaluate the adherence of *Clostridium perfringens* to human intestinal epithelial cells. In this study, we established an in vitro adherence assay and examined the adherence of spores of *C. perfringens* to human intestinal Caco-2 cells. Adherences of spores both of strain SM101 (a derivative of FBI strain NCTC8798) and of strain NCTC8239 (FBI strain) were observed within 15 minutes, and reached plateau at 60 min after inoculation. Scanning Electron microscopy and transmission electron microscopy revealed tight association of spores on the surface of Caco-2 cells. On the other hand, the adherence of vegetative cells both of the strains could not be confirmed by the same procedures. The results suggest that *C. perfringens* spores adhere to intestinal epithelial cells in vivo, although its biological significance remains to be determined.

研究分野：細菌学

キーワード：細胞接着 レセプター 定着因子 発芽 エンテロトキシン

1. 研究開始当初の背景

(1) ある種の細菌は、生存に望ましくない環境に置かれたとき「芽胞」へ変化する。芽胞は厚い芽胞壁に被われた粒子で、熱や乾燥、化学物質に対する耐性が強い。芽胞は悪環境で生き残った後、次に増殖に適した環境に移動し再び発芽・増殖する。

(2) ヒトや動物に病原性を持つ芽胞形成菌は、宿主体内で芽胞化することが特徴として挙げられる。環境に十分量の芽胞を排出するためには体内で十分芽胞を形成する時間が必要で、そのため宿主内で停留するための定着因子を必要とする。また環境に出た芽胞が再び宿主に感染するためには、芽胞が食品のような「ベクター」に結合する必要がある。しかしこれまで定着や吸着を可能にする定着因子/接着因子はまったく明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、感染成立における芽胞の意義を実験的に証明するため、食中毒の原因となるウェルシュ菌を使って次の2点を明らかにする。まず消化管への定着の有無を実験モデルで確認する。次に芽胞が細胞へ接着する際に関与する因子を特定する。これら分子の存在を明らかにすることで、芽胞の多機能性を証明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 芽胞の細胞接着の確認

① 共培養系での接着

ウェルシュ菌 (SM101 株) の前培養液を Caco-2 を培養した培養したウェル内に接種、CO₂ インキュベータ内で培養した。経時的に培養上清中の栄養型菌数と芽胞数を CFU 法で計測すると共に、細胞を洗浄後回収して、付着した栄養型菌数、芽胞数を算出した。

② 調製芽胞の接着

Duncan Strong 培地で培養した菌液から polyethylene glycol を用いた 2 層分配法にて芽胞を分離、これを滅菌超純水に懸濁して芽胞溶液とした。Caco-2 細胞培養液へこれを加え、経時的に細胞を洗浄、洗浄後の細胞を回収して、付着芽胞数を CFU 法で計測した。

(2) 芽胞の接着像の電子顕微鏡観察

① 走査型電子顕微鏡観察

ウェルシュ菌あるいは芽胞を作用させた細胞は、洗浄後、グルタルアルデヒドで前固定、オスミウム酢酸で後固定し、脱水、乾燥、蒸着を経て観察した。

② 透過型電子顕微鏡

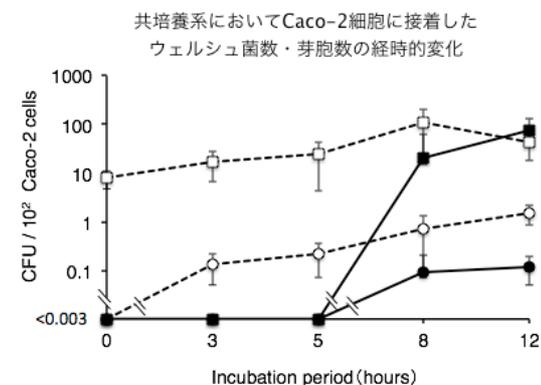
ウェルシュ菌あるいは芽胞を作用させた細胞は洗浄後、グルタルアルデヒド-ルテニウムレッドで前固定、オスミウム酢酸で後固定したのち、脱水、包埋して、定法に従い染色して顕微鏡観察を行なった。

4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌の細胞への接着の定量

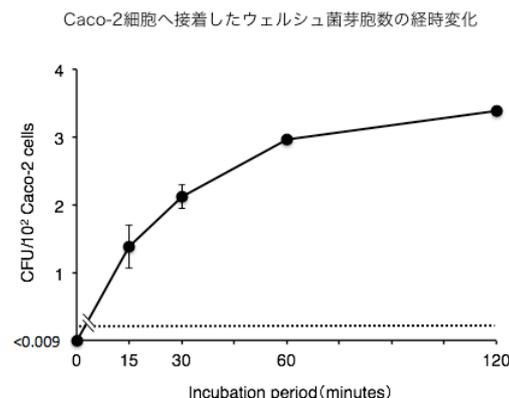
① 共培養系での細胞接着

共培養系ではウェルシュ菌は培養液中で増殖し、培養 8 時間後には芽胞を形成した。細胞へ接着した栄養型菌は培養 3 時間目から検出され、時間の経過とともにその数は増加した。芽胞も培養 8 時間目から細胞へ接着した数が検出され、時間の経過とともにその数は増加した。しかし、培養 12 時間を経過すると、芽胞形成に伴い産生されたエンテロトキシンの影響により細胞が障害を受け、それ以降の計測はできなかった。検出された付着菌数を定量化すると、栄養型菌数、芽胞数ともに、細胞へ接着した数は最大で Caco-2 細胞 10² あたり 0.1~1 個で、その数はあまりに少なかった。



② 調製芽胞の細胞接着

調製芽胞を Caco-2 細胞へ作用させたところ (MOI=0.5)、経時的に細胞接着が認められた。その数は作用 1 時間後に最大に達し、Caco-2 細胞 10² あたり 4 個程度であった。

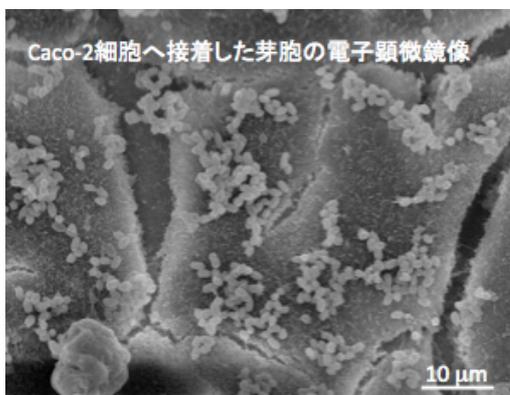


一方、光学顕微鏡下で確認した細胞接着芽胞数は 1 細胞あたり少なくとも 10 を超えると見積もられたため、この結果は芽胞の接着数を正しく反映していないと考えられた。そこで、細胞へ接着した栄養型菌、芽胞を電子顕微鏡で確認することにした。

(2) 接着芽胞の電子顕微鏡観察

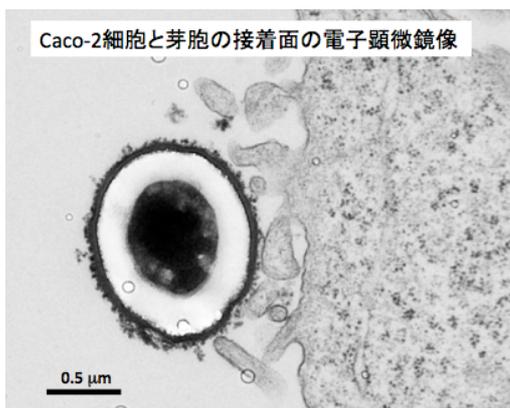
① 走査型電子顕微鏡

調製芽胞を Caco-2 に作用させ (MOI=5)、走査型電子顕微鏡で観察すると、細胞表面に多数の芽胞が接着している像が認められた。



② 透過型電子顕微鏡

調製芽胞を Caco-2 に作用させ (MOI=5)、透過型電子顕微鏡で観察すると、細胞表面に多数の芽胞が接着している像が認められた。芽胞と細胞の接着面は Caco-2 細胞から伸びた微絨毛様構造が直接接触しているように見えた。



(3) 考察

今回の研究により、ウェルシュ菌芽胞が腸管上皮細胞株 Caco-2 と直接接着することが電子顕微鏡レベルで明らかになった。このように、ウェルシュ菌芽胞が腸管上皮細胞へ接着することを電子顕微鏡レベルで形態学的に示した研究は、知る限りこれまで報告されていなかった。今回の研究成果により、使用した菌株の芽胞表面には exosporium 層は存在せず、おそらく coat 蛋白が直接細胞表面蛋白と結合しているか、芽胞表面の疎水性が、細胞膜の疎水性脂質と相互作用している可能性が疑われる。本研究で使用した菌株が Caco-2 細胞へ付着することを示唆する先行研究によると、この芽胞と細胞の結合に疎水性は大きく関与しないと報告している。考え併せると、芽胞表面には接着因子が存在し、細胞上のレセプターと結合している可能性が強く示唆される。今後、これら因子について同定し、結合の生物学的意義について解明

することが望まれる。

走査型電子顕微鏡観察の結果、細胞には多数の芽胞が結合していることが示されたにもかかわらず、CFU 法による定量化ではわずかな芽胞の存在しか検出できなかった。これは、細胞へ接着した芽胞は何らかの原因により発芽増殖することが抑制されている可能性を示唆する。今後この点も追求して芽胞と腸管上皮細胞との相互作用の全体像について理解することが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

① Mayo Yasugi, Keisuke Otsuka, and Masami Miyake. Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strain NCTC8239. *Microbiology and Immunology*. 査読あり. Vol.60. No.10. 2016. pp.657-668. DOI: 10.1111/1348-0421.12437.

② Mayo Yasugi, D Okuzaki, Reiko Kuwana, H Takamatsu, M Fujita, Mahfuzur R. Sarker, and Masami Miyake. The transcriptional profile during deoxycholate-induced sporulation in a *Clostridium perfringens* isolate from foodborne illness. *Applied and Environmental Microbiology*. 査読あり. Vol.82. No.10. pp.2929-2942. 2016. DOI: 10.1128/AEM.00252-16.

③ Mayo Yasugi, Yuki Sugahara, Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Prabhat K. Talukdar, Mahfuzur R. Sarker, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. *In vitro* cytotoxicity induced *Clostridium perfringens* isolate carrying a chromosomal cpe gene is exclusively dependent on sporulation and enterotoxin production. *Microbial Pathogenesis*. 査読あり. Vol.85. 2015. pp.1-10. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.04.003.

④ Dung Quynh Le, Aya Morishita, Shiho Tokonami, Tomoaki Nishino, Hiroshi Shiigi, Masami Miyake, and Tsutomu Nagaoka. Voltammetric detection and profiling of isoprenoid quinones hydrophobically transferred from bacterial cells. *Analytical Chemistry*. 査読あり. Vol.87. No.16. 2015. pp.8416-8423. DOI: 10.1021/acsanchem.5b01772.

[学会発表] (計 16 件)

①Hideyo Sakanoue, Chie Monma, Mayo Yasugi, Takashi Nakano, Kouichi Sano, Masami Miyake. Adherence of *Clostridium perfringens* spores to human intestinal epithelial cells Caco-2、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19 日～21 日、仙台国際センター (宮城・仙台)

②Mayo Yasugi, Masami Miyake、Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strain NCTC8239、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19 日～21 日、仙台国際センター (宮城・仙台)

③Shotaro Hirata, Mayo Yasugi, Masatoshi Nakatsuji, Takashi Inui, Masami Miyake、The effects of the bile acid analogs on the sporulation of *Clostridium perfringens* food poisoning isolates、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19 日～21 日、仙台国際センター (宮城・仙台)

④家久保可奈子、入江通子、三宅眞実、安木眞世、栄養枯渇ストレスがウェルシュ菌芽胞形成に及ぼす影響、第 69 回日本細菌学会関西支部総会、2016 年 11 月 19 日、大阪市立大学 (大阪・大阪)

⑤Shotaro Hirata, Mayo Yasugi, Masami Miyake、The effects of bile acid analogs on the sporulation of *Clostridium perfringens* food poisoning isolates、The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology、30 Sep-2 Oct, 2016、Taipei (Taiwan)

⑥Masami Miyake, Tatsuhiko Miyake, Mayo Yasugi, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata、Identification of a substance in

mouse feces that suppresses sporulation of *Clostridium perfringens*、9th International Conference on the molecular biology and pathogenesis of the Clostridia、07-11 Sept, 2015、Freiburg (Germany)

⑦Mayo Yasugi, Yuki Sugahara, Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Prabhat K. Talukdar, Mahfuzur R. Sarker, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, Masami Miyake、*In vitro* cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* isolate carrying a chromosomal *cpe* gene is enterotoxin-dependent、9th International Conference on the molecular biology and pathogenesis of the Clostridia、07-11 Sept, 2015、Freiburg (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)

6. 研究組織

(1) 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・教授
研究者番号：10251175

(2) 研究分担者

安木 眞世 (YASUGI, Mayo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：40589008

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Mahfuzur R. Sarker

坂野上 英世 (SAKANOUÉ, Hideyo)