

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08822

研究課題名（和文）クロストリジウム・ディフィシル（CD）の環境適応機構の解明

研究課題名（英文）Environmental adaptation mechanisms of *Clostridium difficile* (CD)

研究代表者

齋藤 良一（SAITO, Ryoichi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00581969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：クロストリジウム・ディフィシル（CD）は国際的脅威となる下痢症等のCD感染症を引き起こす。申請者は、ヒト大腸内で多くを占めるデオキシコール酸（DCA）が濃度依存的にCDの増殖と毒素産生を抑制することを見出した。また、貧栄養下においてDCAはCDの芽胞形成を抑制するが、その機序として芽胞殻構成タンパク質群の機能低下が関わることを明らかにした。また、CDはラクトバチルス・レイチマーニイにより毒素産生、アミノ酸代謝、シグナル伝達、膜輸送等に関わる遺伝子発現に影響を及ぼすことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD感染症は先進国に加え、近年は途上国でも増加が認められるため、世界的に注視すべき重要な感染症である。本研究により、CDの環境適応機構で最も重要な発芽・芽胞形成に関わる生理学的機構や臨床にも有益な毒素産生機構の基盤情報を提供できた。これらの成果は、上記の機構に関わる主要タンパク質の機能解析等を通して、CD感染症の新たな治療戦略や感染対策についても貢献できる可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：*Clostridium difficile* causes a spectrum of symptoms, ranging from mild diarrhea to severe pseudomembranous colitis and even death. *C. difficile* infection (CDI) is a well-known cause of health-care-associated infectious diarrhea related to the disruption of the indigenous intestinal microbiota due to prolonged drug treatment. We found that: DCA inhibited efficient *C. difficile* vegetative growth in a dose-dependent manner; DCA regulated toxin production under vegetative growth conditions by repressing *tcdB* expression; DCA reduced *C. difficile* sporulation efficiency via *spo0A* downregulation; and DCA downregulated spore coat-related genes. Furthermore, we also demonstrated that *Lactobacillus leichmannii* strain ATCC 7830 impacted the *C. difficile* gene expressions such as toxin production, amino acid metabolism, and membrane transport.

研究分野：細菌学、感染症

キーワード：クロストリジウム・ディフィシル デオキシコール酸 芽胞 毒素 ラクトバチラス属 環境適応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クロストリジウム・ディフィシル (CD) は、抗菌薬等の暴露を通して腸管内微生物叢共生バランスが破綻した際に栄養型 CD が増殖し、産生する毒素 (TcdA、TcdB など) によって下痢症、偽膜性大腸炎などの CD 感染症を惹起する。一方、CD 感染症患者腸管内における CD 生活環には胆汁酸等が関与することが知られる。近年、本菌に対する様々な遺伝子破壊株作製法が開発されたことから、CD がヒト体内を含む環境に適応する仕組み、特に発芽・芽胞形成機構が明らかにされつつある。しかし、大腸内に大量に存在する胆汁酸が発芽・芽胞形成に及ぼす影響は不明な点が多い。また近年、動物実験にてラクトバシラス属細菌の一部が、CD の毒素産生を抑制することが報告されているが、双方の関係性については依然として不明な点が多く存在する。一方、細菌はアミノ酸の欠乏など様々な環境に応じて、多くの遺伝子の発現調節を行う。この緊縮応答に関わる主要な因子は、RelA-SpoT ホモログ (RSH) ファミリーであり、CD が有する RSH ファミリーの RelA も発芽・芽胞形成や病原性発現調節に関与すると考えられるが、未だ詳細は不明である。これまで申請者は、CD の遺伝子型により毒素産生能および発芽・芽胞形成能が異なる可能性を見出し、データを集積する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、CD 感染症の診断や治療、感染対策に資する基盤データを得るため、CD の様々な環境に対する適応性を分子レベルで解析することを目的とする。その問題解決のため、ヒト大腸内で優位な二次胆汁酸のデオキシコール酸 (DCA) またはラクトバシラス属細菌が影響を及ぼす CD 遺伝子群をゲノム発現解析により網羅的に同定する。また大きな変動を示す遺伝子は、複数の CD 株を用いることで遺伝子型との関係性を明らかにする。さらに CD の緊縮応答時に起こる発芽・芽胞形成、病原性に関わる機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) DCA により影響を受ける CD 遺伝子群の網羅的解析

菌株は、TcdA、TcdB およびバイナリートキシン産生株 (ATCC BAA1870、臨床分離株) と毒素非産生株 (ATCC 700057) を使用した。CD の栄養型解析用の BHIS 液体培地 (富栄養条件) および芽胞解析用液体培地 (貧栄養条件) に DCA を添加し、一定期間嫌気培養した後、各培地における生育、毒素産生量、芽胞形成率等を解析した。次に、芽胞形成時に DCA により影響を受ける CD 遺伝子群をトランスクリプトーム解析にて網羅的に同定した。

(2) ラクトバシラス属細菌により影響を受ける CD 遺伝子群の解析

菌株は、潰瘍性大腸炎患者で検出頻度が高いラクトバチルス・レイチマーニイ (ATCC 7830 株; L17830 株) と健常者で検出されるラクトバシラス・ファーメンタム (ATCC 9338 株; Lf9338 株) を使用した。それらを MRS 液体培地で嫌気培養後、一定量の菌液から 0.22 μm フィルターで濾過した濾液を BHIS 液体培地に添加した。その液体培地で ATCC BAA1870 株を嫌気培養後、CD の毒素産生に及ぼす影響を解析した。同時に培養後の菌体から全 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析にて網羅的な CD ゲノム発現解析を行い、L17830 または Lf9338 株の培養上清で影響を受ける CD 遺伝子群を同定した。

(3) relA 遺伝子破壊株の作製

近年使用されるゲノム編集法を CD に応用し、relA 遺伝子破壊株を作製することを目的とした。CD-大腸菌 CRISPR-Cas9 ベクターの構築において、guide RNA の設計は CRISPRdirect にて行った。さらに相同組換え修復用の遺伝子は relA 遺伝子 ORF 外の両端 1 kb を CRISPR-Cas9 ベクターに組込んだ。このベクターを大腸菌 CA434 株に導入後、その形質転換体を用いて接合により

CD630 株に導入した。その後、Cas9 の発現を誘導し *relA* 遺伝子破壊株を選択した。

4 . 研究成果

(1)DCA 含有培地で培養を行った結果、DCA は濃度依存的に栄養体の増殖を抑制した。また、細胞傷害性試験では DCA が培養上清中の毒素産生量を減少させ、毒素遺伝子 *tcdB* 遺伝子の発現低下を認めた。さらに、DCA は貧栄養下で芽胞形成率を低下させ、芽胞形成遺伝子 *spo0A* の発現を抑制した。これらの結果において、*tcdB* 遺伝子発現量は CD 遺伝子型による差が確認された。一方、貧栄養下で培養した遺伝学的に異なる CD 2 株 (ATCC BAA1870 株、臨床分離株) についてトランスクリプトーム解析を行った結果、2 株に共通して 8 遺伝子が DCA によって発現が抑制された。これらのうちの 5 つが芽胞殻構成タンパク質をコードする遺伝子であったことから、DCA は芽胞殻構成タンパク質の機能低下を通して芽胞の成熟過程を阻害することが示唆された。以上の結果の一部は論文にて報告した (Usui et al. Heliyon. 2020)。

(2) Lf9338 株と ATCC BAA1870 株の混合培養上清は、ATCC BAA1870 株の単独培養上清と比して Vero 細胞に対する細胞毒性はほぼ同じであるため、Lf9338 株は CD 毒素産生に影響を及ぼさないことが確認された。しかし、LI7830 株と ATCC BAA1870 株の混合培養上清は、ATCC BAA1870 株の単独培養上清と比して Vero 細胞に対する細胞毒性を低下させたため、LI7830 株は CD の毒素産生性を減弱させることが示唆された。またトランスクリプトーム解析の結果、ATCC BAA1870 株の毒素産生、アミノ酸代謝、シグナル伝達、膜輸送に関わる遺伝子などが、LI7830 株培養上清により影響を受けることを見出した。

(3) *relA* 遺伝子破壊株の作製のため、CD での発現に最適化した Cas9 や *relA* 遺伝子を標的とする guide RNA、相同組換え修復用の遺伝子等を組み込んだゲノム編集用 CD-大腸菌ベクターを構築し、それらが大腸菌から CD へ導入する方法を確立した。しかし、*relA* 遺伝子破壊株が得られないことから、今後、新たな部位を標的とした guide RNA を用いてベクターを再構築し、*relA* 遺伝子破壊株を作製する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Okada Yuta, Okugawa Shu, Ikeda Mahoko, Kobayashi Tatsuya, Saito Ryoichi, Higurashi Yoshimi, Moriya Kyoji	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic diversity and epidemiology of accessory gene regulator loci in <i>Clostridioides difficile</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/acmi.0.000134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Usui Yukino, Ayibieke Alafate, Kamiichi Yuko, Okugawa Shu, Moriya Kyoji, Tohda Shuji, Saito Ryoichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Impact of deoxycholate on <i>Clostridioides difficile</i> growth, toxin production, and sporulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03717 ~ e03717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Usui Yukino, Nukui Yoko, Koike Ryuji, Tohda Shuji, Saito Ryoichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of a <i>Clostridioides difficile</i> Sequence Type 97 Strain Belonging to Hypervirulent Clade 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00245-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okada Yuta, Yagihara Yuka, Wakabayashi Yoshitaka, Igawa Gene, Saito Ryoichi, Higurashi Yoshimi, Ikeda Mahoko, Tatsuno Keita, Okugawa Shu, Moriya Kyoji	4. 巻 2
2. 論文標題 Epidemiology and virulence-associated genes of <i>Clostridioides difficile</i> isolates and factors associated with toxin EIA results at a university hospital in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1099/acmi.0.000086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Ryoichi, Usui Yukino, Ayibieke Alafate, Nakajima Jun, Prah Isaac, Sonobe Kazunari, Aiso Yoshibumi, Ito Shiori, Itsui Yasuhiro, Hadano Yoshiro, Nukui Yoko, Koike Ryuji, Tohda Shuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Hypervirulent clade 2, ribotype 019/sequence type 67 Clostridioides difficile strain from Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gut Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1186/s13099-019-0336-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 齋藤良一	4. 巻 45
2. 論文標題 アウトブレイク時の保菌者検査Clostridioides (Clostridium) difficile.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 39 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Ryoichi, Talukdar Prabhat K., Alanazi Saud S., Sarker Mahfuzur R.	4. 巻 164
2. 論文標題 RelA/DTD-mediated regulation of spore formation and toxin production by Clostridium perfringens type A strain SM101	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 835 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.000655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Alanazi Saud, Alnoman Maryam, Banawas Saeed, Saito Ryoichi, Sarker Mahfuzur R.	4. 巻 73
2. 論文標題 The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of Clostridium perfringens type A in laboratory medium and chicken meat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 311 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fm.2018.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Yuta Okada, Yuka Yagihara, Yoshitaka Wakabayashi, Gene Igawa, Ryoichi Saito, Yoshimi Higurashi, Mahoko Ikeda, Keita Tatsuno, Shu Okugawa, Kyoji Moriya.
2. 発表標題 Clinical features, molecular epidemiology, and virulence-associated genes of <i>Clostridioides difficile</i> isolates in patients at a University Hospital in Japan.
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukino Usui, Yuko Kamiichi, Shu Okugawa, Ryoichi Saito.
2. 発表標題 Impact of deoxycholate on the growth, toxin production, and spore formation of <i>Clostridioides difficile</i> .
3. 学会等名 The 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井雪乃, 上市裕子, 奥川 周, 東田修二, 齋藤良一
2. 発表標題 デオキシコール酸に対する <i>Clostridioides difficile</i> の代謝調節
3. 学会等名 第49回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井雪乃, 上市裕子, 内田のぞみ, 奥川 周, 園部一成, 東田修二, 齋藤良一
2. 発表標題 デオキシコール酸が <i>Clostridioides difficile</i> の増殖能、毒素産生能および芽胞形成能に与える影響
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井雪乃, 上市裕子, 内田のぞみ, 奥川 周, 園部一成, 東田修二, 齋藤良一
2. 発表標題 Clostridium difficileの増殖、毒素産生および芽胞形成に対する胆汁酸の影響
3. 学会等名 第55回関甲信支部・首都圏支部医学検査学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Nukui, Y. Aiso, T. Chino, R. Saito, C. Tani, J. Nakajima, K. Sonobe, S. Tohda, R. Koike
2. 発表標題 Molecular epidemiological analysis of Clostridium difficile that caused an outbreak in a Japanese hospital
3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryoichi Saito, Prabhat K. Talukdar, Saud S. Alanazi, Mahfuzur R. Sarker
2. 発表標題 RelA/DTD-mediated regulation of spore formation and toxin production by Clostridium perfringens type A strain SM101
3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saud Alanazi, Maryam Alnoman, Saeed Banawas, Ryoichi Saito, Mahfuzur R. Sarker
2. 発表標題 The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of Clostridium perfringens type A in laboratory medium and chicken meat
3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryoichi Saito, Mahfuzur R. Sarker
2. 発表標題 The Clostridium perfringens RelA and DTD control sporulation
3. 学会等名 The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----