

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10580

研究課題名(和文) 芽胞形成・毒素産生環境の制御に焦点をあてたウェルシュ菌食中毒予防に関する基礎研究

研究課題名(英文) Research on factors and underlying mechanisms regulating sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* causing food-borne illness

研究代表者

安木 真世 (YASUGI, Mayo)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授

研究者番号：40589008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸は芽胞形成制御因子Spo0Aのリン酸化を促すことで芽胞形成を増強する。本研究では胆汁酸によるSpo0Aリン酸化に関与する細菌因子の同定を試みた。ランダムミュータジェネシス法で同定されたヒスチジンキナーゼ遺伝子の変異株の作製を試みたが、相同組換え法では適切な変異株を得ることができず、評価につながらなかった。酵母2ハイブリッド法で同定された遺伝子Aの変異株を作製し評価した結果、遺伝子Aはspo0Aの転写を正に制御して芽胞形成を増強することが明らかとなった。遺伝子Aの芽胞形成への関与を示唆した研究は世界でも例がなく、ウェルシュ菌の芽胞形成機序の理解につながる重要な新規知見と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルシュ菌食中毒では芽胞形成が病気発症の主要イベントであり、その分子機序の解明を通じた病気発症の制御法の開発が期待される。本研究の学術的意義は、芽胞形成に関与する因子とその作用機序の一部を明らかにすることで病気発症機序の理解に新たな視点を与えた点、ならびに宿主体内における病原微生物の生存戦略の一端の解明につながる基盤知見を創出した点にある。また作用機序の解明は芽胞形成の制御を通じた食中毒の予防法の開発へと研究の応用が期待されるが、本研究はその基盤知見の創出に貢献した点で社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Bile salts induce *Clostridium perfringens* sporulation by accelerating phosphorylation of Spo0A, master regulator of sporulation. Herein, we tried to identify the bacterial factor(s) for bile salts-induced Spo0A phosphorylation. Homologous recombination-induced mutants of histidine kinase gene identified by random mutagenesis did not work and therefore we could not evaluate the role of the gene on phosphorylation of Spo0A. Gene A identified by yeast-two-hybrid assay induced sporulation through enhancing spo0A transcription. Gene A may be a transcriptional regulatory factor of spo0A.

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 Spo0A

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原因菌である。日本国内での患者数は年間 1000 人を超え、細菌性食中毒の中では毎年 1~3 位である。長年、一過性の腹痛と下痢で経過するとみなされていたが、便秘のヒトでは重篤化し死に至る場合があることが明らかとなった (Bos et al, 2005)。老人ホームや病院など二次感染や重篤化が起こりやすい施設での発生が散見されており、その予防・制御の重要性が伺える。

ウェルシュ菌の感染環は環境・食品・ヒトで構成される (図 1)。従来、本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、河川など環境に広く存在することから、食品の汚染防止や加熱・保存などの衛生管理だけでは限界が生じており、異なった視点からの予防・制御が緊要課題である。

研究代表者はヒト腸管内におけるウェルシュ菌の動態に着目した。汚染食品の喫食により小腸に到達した本菌は芽胞を形成する。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 (図 1) (Li et al, 2016)。芽胞形成と毒素産生は遺伝子レベルで共制御されており芽胞形成は病原性発現のキーイベントである。しかし関与する環境因子ならびにその作用メカニズムのほとんどは未だ不明である。これらの解明は病気発症機序の理解に新たな視点を与えると共に食中毒の新規制御ポイントとして応用されることが期待される。

研究代表者は独自に確立した共培養モデル (腸管上皮細胞存在下で既知組成培地を用いて、本菌の芽胞形成を観察するモデル。従来の試験管培養に比べて、組成の変更が容易であり芽胞形成が安定的。Yasugi et al, 2015) を用いて、胆汁酸が芽胞形成のマスターレギュレーターである Spo0A のリン酸化 (活性化) を促すことで芽胞形成と毒素産生を増強することを世界で初めて明らかにした (Yasugi et al, 2016)。

2. 研究の目的

胆汁酸自体には Spo0A に供与でき得るリン酸が存在しないことから、胆汁酸と Spo0A リン酸化の間には別の細菌因子の存在が示唆される。Spo0A は細菌のシグナル伝達に際し、ヒスチジンキナーゼからリン酸の供与を受けて活性化するとされている。長年ウェルシュ菌の Spo0A リン酸化機序は不明であったが、2019 年に Spo0A のリン酸化に関与するヒスチジンキナーゼ遺伝子が同定された (Freedman et al, 2019)。しかし Spo0A リン酸化に関与する他の遺伝子の存在は明らかではなく、未だウェルシュ菌 Spo0A リン酸化機序の全容は明らかではない。

そこで本研究では、胆汁酸による芽胞形成の更なる分子機序解明に向けて、胆汁酸が Spo0A のリン酸化を促進する際に関与する細菌因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ランダムミュータジェネシス法による候補遺伝子の選定と変異株作製

① 過去に行ったランダムミュータジェネシス法 (菌染色体上にランダムにトランスポゾンを導入することで作製された変異株ライブラリーを使用) において、早期の胆汁酸依存性芽胞形成に必須の遺伝子候補として 39 遺伝子を同定した。その中から本研究で評価する遺伝子を選定した。
 ② 選定遺伝子の遺伝子欠損株ならびに補完株 (欠損株に目的遺伝子を再導入し、表現型を野生型に復帰させる) を作製した。作製には相同組換え法 (Sarker et al, 1999) を用いた。作製した変異株を胆汁酸存在下で培養し、芽胞量の変化を評価した。

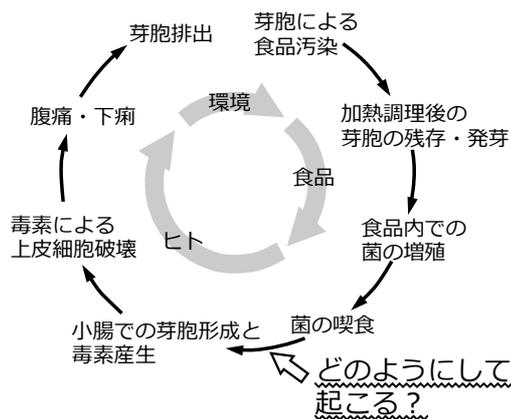


図1 ウェルシュ菌の感染環と本研究の着眼点

どのようにして起こる？

(2) 酵母 2 ハイブリッド (Y2H) 法による Spo0A と相互作用するタンパク質の同定と変異株作製
 ① 酵母は PJ49-6A 株を、Prey プラスミドには pGAD/SM101 ライブラリーと pGAD/str. 13 ライブラリーを、Bait プラスミドには pBDC/*spo0A* レシーバードメインを使用して、スクリーニングを実施した。選択培地でコロニーを形成した陽性クローンから Prey プラスミドのライブラリー部位を PCR で増幅後サンガー法にて塩基配列を決定した。相当する遺伝子を blastp にて同定した。同定された遺伝子を Prey ベクターに挿入し再度 Y2H 法にて Spo0A との相互作用を確認した。酵母ならびに pGAD/ライブラリーは研究協力者 (広島大学) から分与された。スクリーニング方法は上記研究協力者が実績をあげた方法 (Nariya et al, 2005) に準拠した。
 ② Spo0A は特定のヒスチジンキナーゼによりリン酸化を受ける可能性が高い。ウェルシュ菌はいくつかの機能未知のヒスチジンキナーゼ遺伝子を有している。ここでは Prey プラスミドとして pGAD/各ヒスチジンキナーゼ遺伝子を作製し、スクリーニング法と同様に Y2H 法を行った。
 ③ 同定遺伝子の遺伝子欠損株ならびに補完株を作製した。作製には相同組換え法を用いた。作製した変異株を芽胞形成培地で培養し、芽胞量、芽胞形成関連遺伝子の発現量、リン酸化 Spo0A 量を評価した。

4. 研究成果

(1) ランダムミュータジェネシス法による候補遺伝子の選定と変異株作製

ランダムミュータジェネシス法で同定された 39 候補遺伝子の中に、2 つのヒスチジンキナーゼ遺伝子 (CPR_0195 と CPR_0449) が含まれていた。Spo0A は特定のヒスチジンキナーゼによりリン酸化を受ける可能性が高い。そこでこれら 2 遺伝子に注目し、遺伝子変異株を作製した。

CPR_0195 の欠損株作製後、胆汁酸培地にて芽胞形成を評価した。胆汁酸添加培地と非添加培地の両群において、野生株と比較して欠損株では培養 8 時間後の芽胞量が低下した。これらの結果から CPR_0195 は早期の芽胞形成に関与すると考えられた。しかし本現象は胆汁酸の有無に関わらず認められたことから、CPR_0195 は胆汁酸非依存性の芽胞形成シグナル伝達機構に属していることが示唆された。CPR_0195 は、2019 年に Spo0A リン酸化に関与するヒスチジンキナーゼ遺伝子であることが報告された (Freedman et al, 2019) が、その報告では胆汁酸を含まない芽胞形成培地が用いられた。このことから CPR_0195 は胆汁酸依存性の芽胞形成シグナル経路に属しないと推察された。一方、補完株では芽胞が形成されず表現型が野生型に復帰しなかった。従って欠損株で確認された芽胞形成の低下が CPR_0195 によるものかを結論づけることはできなかった。

CPR_0449 欠損株作製後、芽胞形成培地を用いて継代した。10 代継代したが芽胞は形成されなかったことから、CPR_0449 は芽胞形成に関与する可能性が示唆された。しかし補完株において、芽胞量が回復しなかったことから、標的遺伝子以外に変異が起こった可能性が示唆された。従って今回作製した変異株では CPR_0449 の芽胞形成への関与を正しく評価できないことが明らかとなった。

(2) 酵母 2 ハイブリッド (Y2H) 法による Spo0A と相互作用するタンパク質の同定と変異株作製

pGAD/SM101 ライブラリーを用いて 2 回、ならびに pGAD/str. 13 ライブラリーを用いて 1 回スクリーニングを行った。各スクリーニングサイズ (酵母コロニー数) は 17, 150, 000、23, 650, 000、そして 31, 700, 000 であった。選択培地においてコロニーを形成した 158 クローンから 4 遺伝子 (遺伝子 A, B, C, D) が Spo0A と相互作用する候補タンパク質遺伝子として同定された。それら 4 遺伝子をそれぞれ Prey ベクターに挿入し、Spo0A との相互作用を確認した結果、タンパク質 A が Spo0A と相互作用する遺伝子として同定された (図 2)。

Spo0A はヒスチジンキナーゼからリン酸を供与される可能性が高い。上記スクリーニング法ではヒスチジン

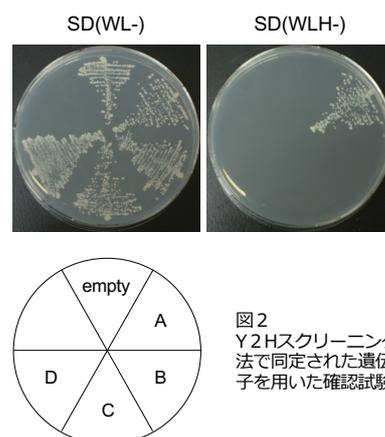


図 2
Y2Hスクリーニング法で同定された遺伝子を用いた確認試験

キナーゼ遺伝子は候補遺伝子とならなかった。そこでヒスチジンキナーゼ遺伝子を Prey ベクターに挿入し、Spo0A との相互作用を確認した。ウェルシュ菌 SM101 食中毒株が有する機能未知の 8 ヒスチジンキナーゼ遺伝子 (CPR_0195, CPR_1023, CPR_1055, CPR_1316, CPR_1493, CPR_1728, CPR_1953, CPR_1954) をそれぞれ Prey ベクターに挿入し、Y2H 法を行った。いずれの酵母においてもウェスタンブロット法にてヒスチジンキナーゼの発現が認められず、本手法では各ヒスチジンキナーゼと Spo0A の相互作用の有無を判断することはできなかった。

以上の結果を踏まえて、スクリーニング法で同定された機能未知の遺伝子 A に注目し、芽胞形成への関与を評価するために変異株を作製した。芽胞形成培地を用いた培養の結果、遺伝子 A 欠損株では野生株ならびに補完株と比較して有意な芽胞量の低下が認められた (図 3)。

従って遺伝子 A は芽胞形成に関与することが明らかとなった。次に芽胞形成への関与メカニズムを明らかにするために芽胞形成関連遺伝子の発現を確認した。その結果、遺伝子 A 欠損株では野生株ならびに補完株と比較して芽胞形成マスターレギュレーター *spo0A* と芽胞関連シグマ因子 *sigF* の発現が有意に減少した。更に各変異株を用いてリン酸化 Spo0A 量を定量した。いずれの株においてもリン酸化 Spo0A 量に有意な変化は認められなかった。以上の結果から遺伝子 A は Spo0A のリン酸化に関与する遺伝子ではなく、*spo0A* の発現に関与する、特に *spo0A* と *sigF* の転写を正に制御することが示唆された。*spo0A* と *sigF* は共にウェルシュ菌の芽胞形成開始の必須の遺伝子であることが知られている。他のクロストリジウム属では転写調節因子 SigH が *spo0A* や *sigF* の発現を正に制御することが報告されているが、ウェルシュ菌では SigH 依存性の *spo0A* や *sigF* の発現調節に関する報告がなく他の制御遺伝子の存在が伺える。遺伝子 A はウェルシュ菌の芽胞形成における新規転写調節因子である可能性が見いだされた。

本研究において、胆汁酸による Spo0A リン酸化に関与する細菌因子の存在を明らかにすることはできなかった。しかし *spo0A* の転写を正に制御する遺伝子 A の存在を見出した。遺伝子 A の芽胞形成への関与を示唆した研究は世界でも例がなく、嫌気性細菌の芽胞形成機序の理解につながる重要な新規知見と考えられた。

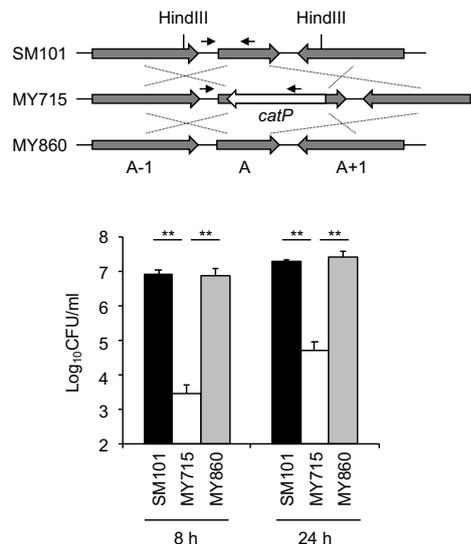


図3 遺伝子A変異株の芽胞形成への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasugi M, Motooka D, Nakamura S, Miyake M	4. 巻 61
2. 論文標題 Phosphorothioation of foreign DNA influences the transformation efficiency in <i>Clostridium perfringens</i> NCTC8239	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2019.102085	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 櫻井研輔、関本訓士、西木の実、安木真世、三宅眞実
2. 発表標題 発芽阻害物質がウェルシュ菌芽胞に及ぼす作用の解析
3. 学会等名 日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasugi M, Motooka D, Nakamura S, Miyake M
2. 発表標題 A restriction-modification system associated with phosphorothioation of DNA in <i>Clostridium perfringens</i>
3. 学会等名 11th international conference on the molecular biology and pathogenesis of the Clostridia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安木真世
2. 発表標題 ウェルシュ菌食中毒株の芽胞形成に関与する因子とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 微生物制御研究センターシンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakabayashi Y, Nariya H, Yasugi M, Kuwahara T, Miyake M
2. 発表標題 Development of a fluorescence protein-based reporter assay for quantitative detection of sporulation in <i>Clostridium perfringens</i> SM101
3. 学会等名 Proteins and peptides conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関本訓士、櫻井研輔、安木真世、三宅眞実
2. 発表標題 ライブセルイメージングを用いたシュガーエステルによる芽胞菌静菌メカニズムの解明検討
3. 学会等名 第68回缶詰ビン詰レトルト食品協会技術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅眞実、関本訓士、西木の実、櫻井研輔、安木真世
2. 発表標題 ウェルシュ菌芽胞の発芽阻害剤とライブ・セル・イメージングによる阻害過程の解析
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyake M, Yasugi M
2. 発表標題 Regulation of sporulation-germination cycle of a food-borne pathogen, <i>Clostridium perfringens</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学 大学院獣医学研究科 獣医公衆衛生学教室
<https://www.omu.ac.jp/vet/pub/>

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
研究協力者	中村 昇太 (NAKAMURA Shota)		
研究協力者	元岡 大祐 (MOTOOKA Daisuke)		
研究協力者	成谷 宏文 (NARIYA Hirofumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	Jiao Tong University			
オーストラリア	Monash University			

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Oregon State University			
英国	The University of Sheffield			