

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22288

研究課題名(和文)環状ペプチドクオラムを用いた腸内細菌の新奇共生戦略

研究課題名(英文)New aspect of bacterial quorum signal for commensalism in gastrointestinal tract

研究代表者

中山 二郎(Nakayama, Jiro)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40217930

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、ウエルシュ菌のクオラムペプチド(AIP)のチオラクトン構造が、補体のC3分子にも共通して存在することから、チオラクトンが補体分子あるいは補体C3の標的分子と反応して、補体の攻撃を阻止している可能性を考えた。実際に、AIP欠損株(TS230株)は、血清中での生存率が著しく低下していた。しかし、本現象はAIPの添加で回復することがなく、AIPの欠損以外の要因が疑われた。その一つとして、TS230株では細胞内セカンドメッセンジャーであるcyclic di-GMP量が減少しており、特殊なペリクルバイオフィルムを形成するなどの影響で血清への感受性が高まっているという新たな可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クオラムセンシングとは多くの細菌が有する細胞密度依存的に遺伝子発現を制御する機構のことである。ウエルシュ菌やその近縁種ではチオラクトン構造を有する環状のペプチドを自己誘導因子としてクオラムセンシングをオンにする。我々はその環状ペプチドが人体感染時に免疫系から回避するのにも機能しているのではないかと考えた。実際に、自己誘導因子を作製できない変異株は血清中で僅か10秒で死滅した。しかし、この実験に自己誘導因子を加えてもこの現象は同様に起こり、この変異株ではセカンドメッセンジャーの現象が起きていた。クオラムセンシングとセカンドメッセンジャーの間のクロストークという新たな可能性が示唆され興味もたれる。

研究成果の概要(英文): Autoinducing peptide (AIP) involved in quorum sensing of *Clostridium perfringens* has thiolactone structure that is also observed C3 molecule of host complement system. Therefore, we suspected whether the thiolactone reacts with molecule on the bacterial cell surface that was targeted by opsonization of complement system. Indeed, AIP-lacking mutant was not able to survive in the serum. However, this phenomenon could not be rescued by adding AIP, suggesting other mechanism for the phenotype of TS230 highly sensitive to serum. In this context, we found that TS230 forms pellicle biofilm which may be caused by the lack of cyclic di-GMP known as an intracellular second messenger. We are now interested in the cross-talk between AIP-mediated quorum sensing and cyclic-di-GMP mediated control system.

研究分野：応用微生物学

キーワード：クオラムセンシング ウエルシュ菌 チオラクトンペプチド 自己誘導ペプチド 補体 diguanylate cyclase cyclic di-GMP

1. 研究開始当初の背景

生物はフェロモン、クオルモン、ホルモンのようなシグナル分子を用いて、個体間や細胞間の情報伝達を高度に成立させている。その背景には、シグナル分子とその受容体の共進化があり、無数に共存するシグナル分子から特定のシグナルのみを感知し、適材適所に応答する高度なシステムが完備している。これまでの生命科学においては、この正規の受容体を通してのシグナル分子の作用に関する研究が盛んに行われ、個々の生命体でのシグナル分子とその伝達機構の多くが解明された。しかし地球上ではすべての生物が他の生命体と共生・寄生関係の中で生きており、ある生命体のシグナル分子が共生・寄生関係の中で共に生きる生命体に対してのシグナル伝達系と相互作用し、共生関係を制御する例も多いと考えられる。クオルモンのような同種菌間にて働くために進化してきたシグナル分子が、共生系の成立のために宿主とのクロストークのシグナルとしての機能を併せ持つように分子進化してきた事実を実証できれば、これと同様の進化をたどってきた分子とその機能による現象は他にも自然界では多く存在すると考えられ、これに続く例が多く発見されていくものと期待される。

応募者らはこれまでに、日和見感染菌として腸内に生息する、腸球菌、ブドウ球菌、デフィシル菌、ウェルシュ菌や、有益常在菌として生息する、乳酸桿菌、酪酸菌などに注目してクオルモンとそれにより活性化されるクオラムセンシングの研究を行ってきた。しかし、その研究の過程で、次の結果と事実と遭遇し、クオルモン分子が全く別の機能を併せ持っているのではないかと考えるようになった。まず、チオラクトン型のクオルモンには構造安定性が極めて悪く培養液中に検出できないものが多い。なぜ、そのような不安定な構造のものをわざわざ細胞間コミュニケーションシグナルとして生産しているのだろうかという疑問を持った。そして、そのチオラクトン部位と類似の分子構造がヒト免疫系の補体タンパク質にも存在し、それらの補体タンパク質はチオラクトン部位を持って病原菌の細胞表層分子と反応し、オプソニン化という病原菌に補体系の攻撃対象であることを示す記しを付す、という事実から、クオルモン分子のチオラクタムも同様な反応性を持つのではないだろうかという疑問に至った。また、申請者のこれまでの研究の一環として、クオルモンのインヒビターを天然物からランダムスクリーニングした結果、動物ホルモンの受容体アンタゴニストでクオルモンの受容体アンタゴニストとして働く例が見出された。つまり、クオルモンとヒトのホルモンが双方の受容体を介してクロストークする可能性が示唆された。以上より、クオルモンペプチドが本来の機能に加えて、宿主細胞や菌体表層成分あるいは補体分子と反応し、補体からの攻撃を回避している可能性や、宿主の種々受容体と相互作用してホルモン様の作用を示す可能性があるのではないかと強く感じるようになった。

以上、応募者は、グラム陽性菌の環状クオルモン分子が、全く別の宿主とのクロストークシグナルとしての機能を併せ持っているということに確信に近いものを感じており、是非、本挑戦的研究を得て、それを実証したいと考えるに至った。

2. 研究の目的

クオルモンとは単細胞生物である微生物が細胞間のコミュニケーション“クオラムセンシング”に用いるシグナル分子のことで、これにより菌密度依存的に特定の遺伝子の発現を同調させ、同種菌による集団行動を制御している。申請者らは、グラム陽性菌のクオルモンに興味を持ち、これまで研究を進展させてきた。グラム陽性菌では、チオラクトンあるいはラクトン構造を有する環状ペプチドをクオルモンとして使用するものが多く、ゲノムデータベースを検索すると、保

有菌種は500種近くに上り、ペプチドシーケンスのバリエーションは1000種近くに上る。つまりグラム陽性細菌では、これらのチオラクトンペプチドを用いて、種特異的なクオラムセンシングを自在に展開していると想像される。特に、これらのグラム陽性細菌の多くは、ヒト腸内にて多岐にわたり常在するファーミキューテス門の細菌が多く、超高密度に数百種の細菌がひしめき合うと言われるヒト腸管内にて、この環状クオルモンを用いたクオラムセンシングは重要な働きをしていると考えられる。しかし、これらは構造安定性が極めて悪く培養液中に検出できないものが多く、また、そのチオラクトン部位と類似の分子構造がヒト免疫系の補体タンパク質にも存在し、さらには、動物ホルモンの受容体アンタゴニストが同様にクオルモンの受容体アンタゴニストとして働くものが多々ある。以上の事実より、クオルモンペプチドが本来の同種菌間のコミュニケーションシグナルとしての機能に加えて、宿主細胞や菌体表層成分あるいは補体分子と反応し、補体からの攻撃を回避している可能性や、宿主の種々受容体と相互作用してホルモン様の作用を示す可能性を有するのではないと考えられる。本研究では、上記の2点を実験的に検証することを計画している。本研究が成就すれば、細菌の共生戦略の知識として教科書の一ページが加わり、また、医学界、産業界に新たな微生物制御戦略を提示されるものと期待される。

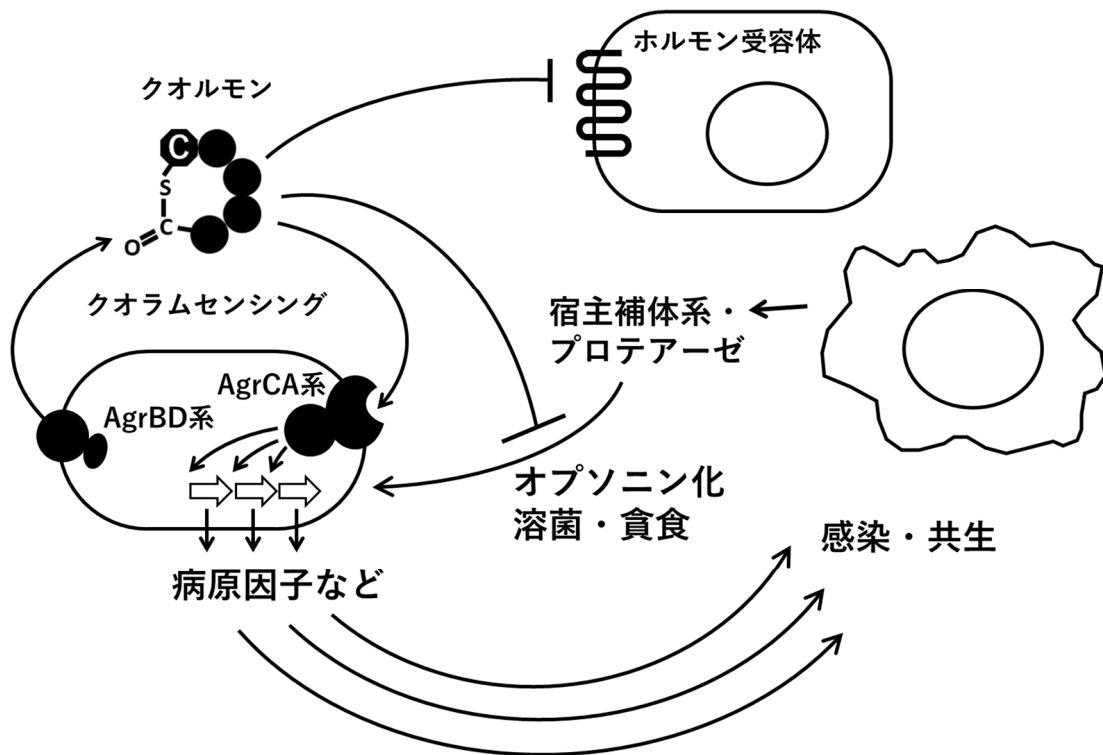


図. グラム陽性細菌のクオルモンによる宿主 - 細菌間クロストークの解明

3. 研究の方法

3.1. *Clostridium perfringens* における自己誘導ペプチドを介した宿主免疫回避能の解析

まず、*C. perfringens* の血清培養を行った。*C. perfringens* 13株(野生株)、TS230株(AIP非合成株)の菌体を洗浄後、 $2-3 \times 10^6$ CFU/mL に調整し、細胞懸濁液: ヒト血清=1:3の割合で混合したものを37°Cで10秒間、30分間、1時間培養を行った。その後、血清中に残存する生菌数を希釈平板培養法により計測した。ここで、補体活性の存在を示すポジティブコントロールとして、*E. coli* DH5株を用いた。また、TS230株の表面に1 μM, 10 μMのAIPを結合させた

後に同様の方法で血清培養を行い、AIP 添加によって生菌数が上昇するか調べた。

3.2. ELISA 法による *C. perfringens* 菌体表面への AIP 結合量の定量

次に、ELISA を用いて *C. perfringens* 13 株、TS230 株の表面に結合する補体 C3b 量を測定し比較した。13 株、TS230 株および AIP を結合させた TS230 株に、10 % (v/v) となるように C8 欠損ヒト血清を反応させ、補体 C3b を菌体表面に結合させた。その後、抗 C3 抗体 (1 次抗体) および HRP (horse radish peroxidase) 標識 IgG (2 次抗体) を添加して結合させたのち、HRP 基質を添加して 10 分間反応させた。最後に、2 % シュウ酸溶液を添加して発色反応を停止させた後、410 nm で吸光度を測定した。

3.3. RNAseq による 13 株と TS230 株の遺伝子発現比較解析

両株を TSF 培地にて対数増殖期中期まで培養した後、全 RNA を抽出し、cDNA を作製した後、イルミナ社 HiSeq にてシーケンス解析を行った。得られたデータを Rookhopper ソフトウェアにより比較解析し、両株間で発現量に差のある遺伝子を抽出した。

3.4. cyclic-di-GMP の機能解析

13 株および TS230 株を BHI 液体培地にて培養した。対数増殖期中期にあたる本培養 2 時間目から定常期に相当する 8 時間目において、1.5 時間ごとに c-di-GMP の抽出を行った。抽出した c-di-GMP を LC-MS/MS (LCMS-8050) により定量分析し、CFU 測定の結果で補正することで、1 細胞当たりの c-di-GMP 量を算出した。

4. 研究成果

C. perfringens の血清培養においては、野生株 (13 株) は 30 分間かけて生菌数が最少となったが、AIP 欠損株 (TS230 株) の場合、血清中で 10 秒間反応した時点で既に同等の生菌数の減少が見られた。つまり AIP 欠損株は血清中で速やかに死滅することが示された (図 1)。しかし、TS230 株に AIP を添加しても、その生存性が回復することはなかった。つまり、*C. perfringens* の AIP 合成株 (13 株) が、血清中で AIP 非生産株に比べて遥に長い生存性を示す理由として、AIP が *C. perfringens* の細胞表層に結合し、オプソニン化を阻害し、補体の攻撃を回避しているという作業仮説を立証するには至らなかった。

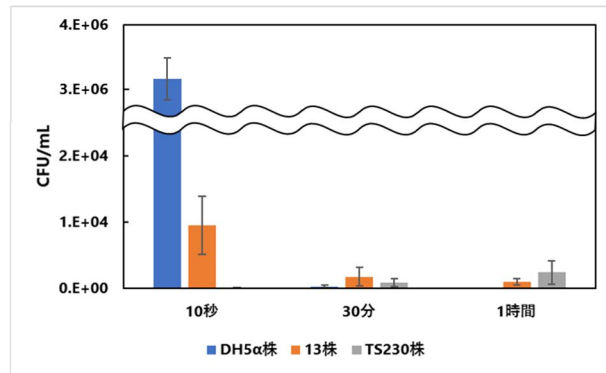


図 1. 血清培養後の血清中における生菌数

実際に、ELISA による補体 C3b の菌体結合量を解析した結果、13 株と TS230 株の間に有意な差は確認できなかった。また、TS230 株に AIP 100 μM 添加した場合において、有意差はなかったものの、コントロール群より高い吸光度を示す傾向が見られ、予想に反して、AIP が補体の結合を促進している可能性が示唆された。しかし、その機構については現時点では不明であり、更なる実験と考察が求められる。

よって、TS230 株の血清感受性については、AIP の欠損以外の要因の関与も検討すべきと考えられる。そこで、我々は、TS230 株と 13 株の遺伝子発現を RNAseq により網羅的に解析した。底結果、TS230 株においては、AI-2 合成遺伝子と SpaH/EbpB family LPXTG-anchored major pilin

などの細胞表彰蛋白質
 遺伝子の発現が増加し
 ていることが明らかと
 なった。TS230 株は、表
 現型として、特有のバ
 イオフィーム形態であ
 るペリクルバイオフィ
 ムを形成する。TS230
 株にて欠損させた AIP
 合成遺伝子である
agrBD の下流には
 diguanylate cyclase
 が存在し、cyclic

COG	Name	Product	QS log2
-	sortase		8.78
-	cell wall surface anchor protein		8.02
-	surface protein		6.32
purH	formyltransferase/IMP cyclohydrolase		3.74
adeC	adenine deaminase		2.93
-	S-adenosylhomocysteine nucleosidase		2.62
purA	adenylosuccinate synthetase		2.16
purB	adenylosuccinate lyase		1.43
hprT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase		0.82
cpdB	2', 3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase		0.73
nrdF	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta		0.69
ycgJ	UbiE/COQ5 family methyltransferase		4.38
metB	cystathionine beta-lyase		4.60
cysK	cysteine synthase		4.55
luxS	S-ribosylhomocysteinase		4.49

di-GMP の濃度が劇的に減少している

ことも判明した。Cyclic di-GMP は細胞内セカンドメッセンジャーとして注目されており、cyclic-di-GMP を媒介したシグナル伝達系により、細胞表層タンパク質を中心に複数の遺伝子発現が制御され、特徴的なペリクルバイオフィームを形成し、血清中における生存性が悪化していることが示唆される。

以上の研究結果より、チオラクトンペプチドをオートインデューサー(AIP)とするクオラムセンシング系が、宿主血清中の攻撃回避に直接関与しているという我々の作業仮説を指示する結論に至ることはできなかったが、一

方、AIP 合成遺伝子のすぐ下流にコードされる、diguanylate cyclase により細胞内量が調節される cyclic di-GMP がペリクルバイオフィームなどの細胞形態の変化を誘導し、それが血清中での生存に大きく影響を与えていることが示唆された。

大変興味深いことに、今回研究対象としたウエルシュ菌 (*C. perfringens*) に限らず、*Clostridium* 属細菌では、チオラクトンペプチド AIP の合成遺伝子群 (*agrBD*) に近接して cyclic di-GMP 遺伝子がコードされていることが多く、この 2 つの調節系間にクロストークが存在することも想定され、今後の研究テーマとして注目していきたい。

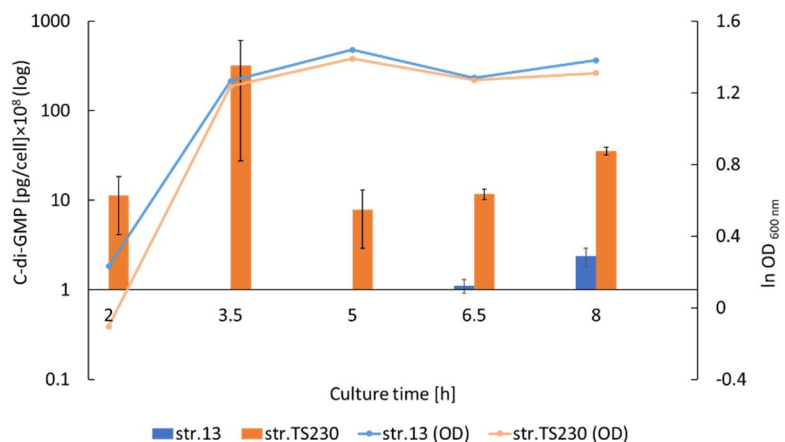


図 4. 13 株と TS230 株中の cyclic di-GMP 量

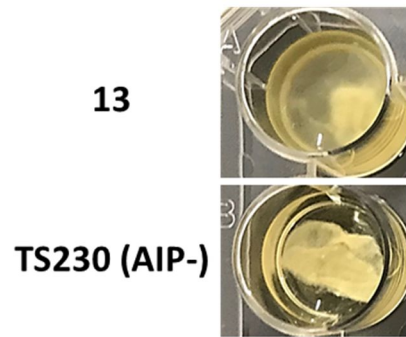


図 3. TS230 株のペリクルバイオフィーム

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Littlewood Sean, Tattersall Helena, Hughes Charlotte S., Hussain Rohanah, Ma Pikyee, Harding Stephen E., Nakayama Jiro, Phillips Jones Mary K.	4. 巻 594
2. 論文標題 The gelatinase biosynthesis activating pheromone binds and stabilises the FsrB membrane protein in <i>Enterococcus faecalis</i> quorum sensing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 553 ~ 563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13634	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤瞭, 重岡愛莉, 本田香代, 安達桂香, 大谷郁, 中山二郎
2. 発表標題 <i>Clostridium perfringens</i> のagrBDノックアウト変異株におけるペリクル状貫フィルム形成の分子機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重岡愛莉, Basit Yousuf, 東聖也, 岡健太郎, 高橋志達, 中山二郎
2. 発表標題 <i>Clostridium</i> 属細菌におけるagr制御系の機能解析
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田香代, 安達桂香, 永尾潤一, 田中芳彦, 大谷郁, 中二郎
2. 発表標題 <i>Clostridium perfringens</i> における自己誘導性ペプチドを介した宿主免疫回避能の解析
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山二郎
2. 発表標題 環状ペプチドホルモンを介する腸内細菌と宿主のクロストークの可能性
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究分担者	田中 芳彦 (Tanaka Yoshihiko) (00398083)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	

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		
英国	ノッティンガム大学		