

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390081

研究課題名（和文）ガス壊疽菌の病原性に関与する調節 RNA 分子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of regulatory sRNAs involved in the pathogenicity of gas-gangrene related bacteria

研究代表者

清水 徹 (SHIMIZU TOHRU)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80235655

研究成果の概要（和文）：大震災などの自然災害において多くのガス壊疽患者を発生させるウェルシュ菌は、複雑な遺伝子発現調節機構により多種の病原因子の発現を調節している。本研究では、ウェルシュ菌において発現されている新規の sRNA 分子を多数同定し、その中には本菌のグローバル調節系によって発現調節を受けている RNA が存在することを明らかにした。さらに既知の調節 RNA である virX の機能解析を行い、virX が毒素産生調節のみならず、ウェルシュ菌食中毒の原因となる腸管毒素の産生に関与する芽胞形成をも制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Clostridium perfringens* is a causative agent for gas gangrene and controls toxin production via complex regulatory networks. In this study, we identified many novel sRNAs in *C. perfringens* and showed that some of the sRNAs are also regulated by a major regulatory system for toxin production. Furthermore, we found that one of the sRNAs, virX is involved in the regulation of spore formation which turns into production of enterotoxin for food poisoning.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：病原細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ウェルシュ菌、調節 RNA 分子、ガス壊疽、食中毒、芽胞（孢子）

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性芽胞形成性嫌気性桿菌、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は多様な毒素・酵素を産生し、ヒトのガス壊疽や食中毒を引き起こす重要な病原菌である。その生息域は広範であり、ヒト・動物の腸内常在菌として存在するほか、世界中の土壌中に芽胞の

形で存在する。そのため、大地震などの自然災害では土壌中のウェルシュ菌芽胞が外傷から感染して筋肉・結合組織においてガス壊疽を引き起こし、多くの場合は四肢切断などの治療を行わないと確実に死に至る重篤な感染症の原因となっている。

このようなウェルシュ菌感染症は、本菌が産生するさまざまな毒素・酵素が、ヒト体内

のそれぞれの標的に作用して活性を發揮し、その協調作用の結果として総合的にガス壊疽という特徴ある病態を形成することが知られている。例えば、フォスホリパーゼ C 活性を持つ α 毒素や細胞膜に孔形成を行う θ 毒素は、筋肉細胞などの細胞膜を破壊しその内容物を放出させる。放出されたタンパク、核酸などはウェルシュ菌が分泌するプロテアーゼやヌクレアーゼなどによって分解され、菌の増殖のための栄養として使われる。

さらにウェルシュ菌の病原遺伝子発現に関しての特徴は複数の転写調節 RNA 分子の関与であり、VirR/VirS システムの下流には VR-RNA という転写調節 RNA が関与しており、 α 毒素や κ 毒素を含む多数の病原性関連遺伝子群を転写レベルで調節している事が明らかになっている。また、VirR/VirS システムとは別の経路で毒素遺伝子の発現を調節する遺伝子 *virX* を同定し、本遺伝子が転写調節 RNA として機能している事を明らかにしている。その他にもいろいろな転写調節 RNA 分子が本菌の病原性発現に関与していることが明らかになりつつあり、ウェルシュ菌の転写調節 RNA 分子による病原性発現調節機構の解明が、本菌の病原性発現メカニズムを理解する上で非常に重要と考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまで発見された転写調節 RNA 分子の他に、病原性調節に関与する RNA 分子をゲノム内に探索し、タンパクをコードしない領域で短い RNA が転写されている領域を同定し、さらにその領域から転写される RNA がウェルシュ菌の病原遺伝子発現に関与するかどうかを検討し、本菌に存在する転写調節 RNA による制御ネットワークを明らかにすることを目的とする。さらに期間内に余裕があれば、これまでに分かっている VirR/VirS システムなどとの関連性を検討し、最終的にはこれらの制御ネットワークを標的とした病原性発現抑制法の開発につながる基礎的データを得ることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) ウェルシュ菌ゲノムにおける IGR の同定

ウェルシュ菌ゲノムに存在する比較的長くタンパクをコードしていない遺伝子間領域(intergenic region, IGR)を PC 解析により選び出し、未知の sRNA 候補とする。

(2) ノザンハイブリダイゼーションによる sRNA 転写領域の同定。

ウェルシュ菌 strain 13 の全 RNA を培養

時間ごとに抽出し、選別した IGR の領域の DNA プローブを用いてノザン解析を行い、低分子 RNA の転写が見られる IGR 領域をスクリーニングする。

(3) グローバル調節系の sRNA 発現への関与

転写が見られた sRNA の発現への VirR-VirS システムや VR-RNA の関与を調べるため、それぞれの変異株を用いてノザン解析を行い、sRNA の転写量の変化を解析する。

(4) *virX* の芽胞形成への関与

virX 変異株を食中毒株である SM101 にて作製し、野生株と *virX* 変異株における芽胞形成性を DS 培地を用いて検討し、芽胞形成に関与するシグマ因子遺伝子群の発現の変化をノザン解析で調べ、さらに腸管毒素の産生をノザン解析およびウェスタンブロット解析にて調べる。

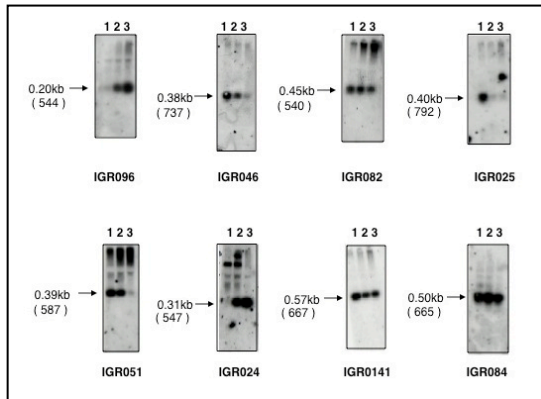
4. 研究成果

ウェルシュ菌のゲノムから選別された 144 の IGR における低分子 RNA の探索を行った。まず 144 のすべての IGR を増幅する PCR 用のプライマーを設計し、委託合成を行った。これらの 144 のプライマーセットを用いて、ウェルシュ菌染色体 DNA を鋳型とした PCR により IGR DNA の増幅を行い、それらの DNA をアルカリフォスファターゼにより標識し、DNA プローブを作製した。ウェルシュ菌野生株から培養 2, 3, 4 時間後の全 RNA を調製し、作製した IGR プローブによりノザンハイブリダイゼーションを行い、RNA の転写の有無を確認していったところ、全部で 144 の IGR 領域の中で明らかに転写産物が認められたのは 53 領域であった。このハイブリダイゼーション実験を計二回行ったところ、すべての結果が一致し、再現性が認められた。転写されている RNA のサイズを計測すると、約 50 base から 500 base の長さを持つ低分子 RNA であることが判明した。これらの RNA サイズはすべて IGR の長さより短いことが確認され、明らかに IGR の中から転写される RNA (IGR-RNA) であることも確認された。

この IGR-RNA の転写が見られた IGR の DNA 配列を再度解析してみると、該当領域にはタンパク質ヲコードする領域 (ORF) が存在しない事も確認され、IGR-RNA はいわゆる低分子 RNA として機能している可能性が高い、と推測された。

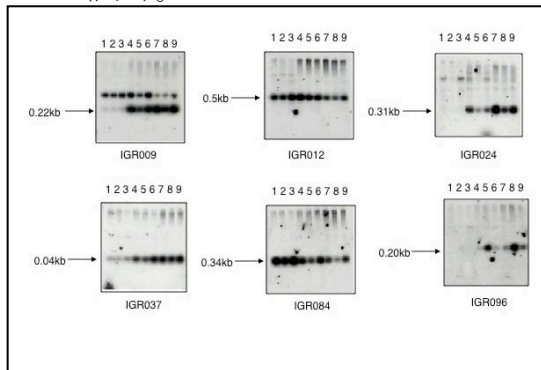
さらに、培養開始からの時間経過による増減 (増殖時期による IGR-RNA 発現量の変化) の解析も行い、IGR-RNA の発現パターンは、培養時間の経過とともに増加していくもの、

減少していくもの、増加から減少へと時期により変化するもの、など多様な発現パターンを持つことが示唆された (図 1)。



(図 1)

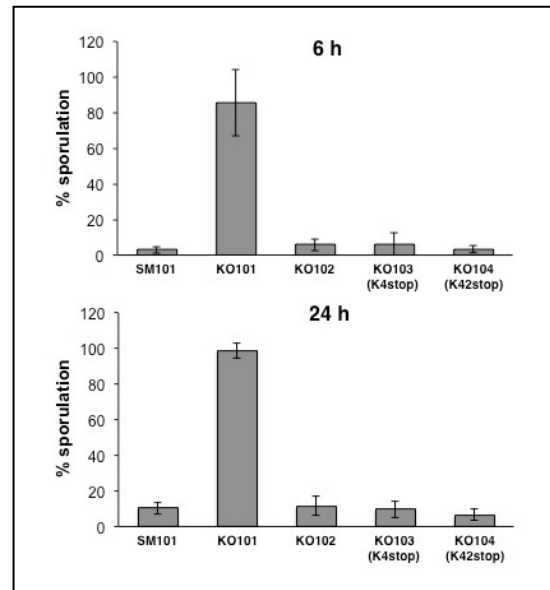
引き続き、IGR から転写される低分子 RNA の発現調節パターンを解析するため、これまでに知られている調節システムである二成分制御系 VirR/VirS や転写調節 RNA である VR-RNA、*virX* の変異株を用いて、これらの調節システムと IGR 領域の低分子 RNA (IGR-sRNA) との関連を野生株と制御遺伝子変異株から調製した RNA を用いるノザン解析により調べた結果、20 の IGR-sRNA の発現が VirR/VirS 調節系により正または負に転写調節されていることが明らかになった (図 2)。



(図 2)

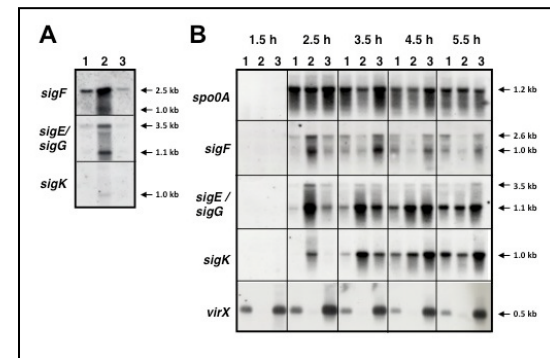
すでに知られている調節 RNA の *virX* はウェルシュ菌の主要な毒素の産生を正に調節しているが、*virX* がウェルシュ菌の芽胞形成に与える影響を調べるために食中毒株である SM101 株を用いて *virX* の変異株を作製した。野生株と *virX* 変異株の芽胞形成性をダンカン・ストロング培地を用いて比較した結果、*virX* 変異株において著明に芽胞形成性が増加していることが明らかとなった (図 3)。このことは、*virX* は通常の培養ではウェルシュ菌の芽胞形成を強く抑制していることを示唆しており、*virX* による遺伝子発現調節がウェルシュ菌の増殖様式に大

きく関与していることが推測された。



(図 3)

また *virX* 変異株では、通常ウェルシュ菌の芽胞形成時に発現される *sigF*, *sigG/sigE*, *sigK* などのシグマ因子の遺伝子の発現も著しく増加しており (図 4)、*virX* はこれらのシグマ因子の発現を抑制することでウェルシュ菌の芽胞形成を抑制していることが明らかになった。

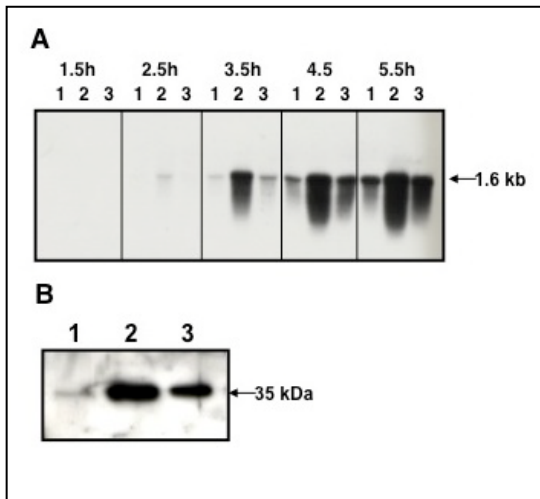


(図 4)

また、*virX* 変異株における腸管毒素 (CPE) の遺伝子発現と毒素タンパク発現を調べたところ、野生株と比較して *virX* 変異株では両者ともに増加しており (図 5)、*virX* は芽胞形成を制御することにより、腸管毒素の産生をも制御し、ガス壊疽だけではなくウェルシュ菌の食中毒にも関与するグローバルな調節 RNA 分子であることが判明した。

本研究により、ウェルシュ菌には多数の調節 RNA 分子が存在し、それらの一部は本菌の病原性を制御するグローバル制御系 (VirR/VirS, *virX* など) により調節されているものも含まれていることが判明し、本菌

の病原性調節に密接に関与する調節 RNA 分子の存在が強く示唆された。



(図 5)

さらに、本菌の調節 RNA の 1 つである virX 遺伝子の解析により、virX がウェルシュ菌の芽胞形成を強く抑制していることが明らかになった。このことは、ウェルシュ菌の生存のためにはまず増殖することが必須であり、芽胞形成は著しい環境の変化の時にのみ行なわれ、そのドラスティックな変化をコントロールしているのが virX であると推察される。

今後は、今回発見されたさまざまな調節 RNA の病原性調節への関与を解析し、また virX の抑制を解除し芽胞形成へ進む時の環境因子などのメカニズムなどをさらに解析していくことにより、ウェルシュ菌に存在する多種の調節 RNA 分子間の調節ネットワークの詳細を明らかにする必要がある。このことにより、ガス壊疽や食中毒などのウェルシュ菌感染症に対する新たな治療法の開発も可能になると期待される。

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 4 件)

① Ohtani, K., Hirakawa, H., Paredes-Sabja, D., Tashiro, K., Kuhara, S., Sarker, M., Shimizu, T. Unique regulatory mechanism of sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*, J. Bacteriol., 査読有, in press.

② Yuan, Y., Ohtani, K., Yoshizawa, S., Shimizu, T. Complex transcriptional regulation of citrate metabolism in *Clostridium perfringens*, Anaerobe, 査読有, 18, 2012, 48-54.

DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.09.004

③ Andre, G., Haudecoeur, E., Monot, M., Ohtani, K., Shimizu, T., (他 2 名), Global regulation of gene expression in response to cysteine availability in *Clostridium perfringens*, BMC Microbiol, 査読有, 10, 2010, 234.

DOI: 10.1186/1471-2180-10-234

④ Ohtani, K., Hirakawa, H., Tashiro, K., Yoshizawa, S., Kuhara, S., Shimizu, T. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*, Anaerobe, 査読有, 16, 2010, 258-264.

DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.10.003

[学会発表] (計 6 件)

① 大谷 郁, Huyen Hoang, 清水 徹. Novel regulatory mechanism for spore formation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18 日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県)

② Ohtani, K., Hirakawa, H., Paredes-Sabja, D., Tashiro, K., Kuhara, S., Sarker, M., Shimizu, T. Nove; regulatory mechanism for spore formation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*, 7th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia, 2011, 11. 25-29, Iowa State Center (Ames, Iowa, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 徹 (SHIMIZU TOHRU)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80235655

(2) 連携研究者

大谷 郁 (OHTANI KAORI)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30377410