

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590520

研究課題名(和文)芽胞形成をターゲットとしたウェルシュ菌病原性の包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of pathogenesis targeted sporulation of *C. perfringens*

研究代表者

大谷 郁(Ohtani, Kaori)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30377410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌の病態形成には芽胞が重要である。毒素産生からどのようなシグナルをうけて芽胞形成に移行する一連の流れを同一株で研究するために新たな株KZ119株を同定した。KZ119株にて様々な変異株を作成した結果より、既知の調節系によりKZ119株でも遺伝子の発現が調節されていることが明らかとなったが、細胞毒性を調べた結果、KZ119株には未知の病原因子が存在することが示唆された。また、マイクロアレイデータの解析により、芽胞形成調節遺伝子virXの発現に複数の二成分制御系が複関与することが示唆され、これらの二成分制御系が何らかのシグナルを受け取ることで芽胞形成を調節している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：*C. perfringens* causes clostridial myonecrosis (gas gangrene) and gastrointestinal (GI) diseases in humans. *C. perfringens* spores are considered as the infectious morphotypes for both diseases. Despite the importance of spore formation in *C. perfringens* pathogenesis, the detailed mechanism and regulation of sporulation has not yet been defined. Here KZ119 was selected to analyze both of regulatory mechanism of toxin genes and sporulation. Cytotoxicity analysis showed that KZ119 has stronger cytotoxicity than strain 13. And also cytotoxicity assay using mutant strains showed there might be unknown virulence factor in KZ119. So the virulence factor might have important its pathogenesis. From the analysis of virX mutant of KZ119, it was identified that virX is negative regulator for sporulation. Microarray data showed there are several two-component systems that has a possibility to regulate virX. Now we are constructing the mutant strains of these two-component systems.

研究分野：細菌学

キーワード：芽胞 毒素産生 遺伝子発現調節機構

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性嫌気性桿菌であるウェルシュ菌は多数の毒素を産生しその協調作用によってガス壊疽等の特徴ある病態を形成する。また、本菌は芽胞を形成し、食中毒の原因菌としても知られる。本菌による感染症は、傷口を芽胞が汚染したり、芽胞に汚染された食品を食べることにより始まる。また、食中毒の原因となるエンテロトキシンは、芽胞形成時にのみ産生されることが報告されていることから、本菌の感染症の成立に芽胞は非常に重要であると考えられる。芽胞は、耐薬品性や耐熱性に優れており、一度、食品中や傷口、医療器具等と汚染してしまうと、それを完全に除去することは困難である。従って、芽胞形成メカニズムを解析することは、芽胞をターゲットとした感染症予防の手がかりをつかむために重要であると考えられるが、芽胞形成の調節メカニズムは不明な点が多い。ウェルシュ菌によるガス壊疽は、まず、芽胞が外界から傷口に入り込み、その芽胞がヒトの体内で増殖に適した条件になると発芽し、毒素産生を開始することにより引き起こされると考えられる。ウェルシュ菌の毒素産生調節は二成分制御系 VirR/VirS システムによって行われていることが明らかとなっている。しかし、これまでの研究では、2つのウェルシュ菌感染症の初期には芽胞が1つの重要な鍵となっていると考えられているにもかかわらず、対数増殖期に産生される毒素産生調節、いわゆるガス壊疽に関連する毒素遺伝子群の解析と、静止期におこる芽胞形成の解析は全く切り離されて考えられ、毒素産生を停止し芽胞形成に至る過程の研究や、芽胞から発芽して再び毒素産生を開始する過程についてはほとんど研究が進んでいない。特に芽胞形成の引き金となるシグナルについては、世界的にみても研究が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

まず、これまでの研究では、毒素産生調節機構を解析する株と、芽胞形成調節機構を解析する株は、それぞれ別々の株を用いて行われてきたため、毒素産生から芽胞形成までの一連の流れを研究することはできなかった。そこで、1つの株を用いて毒素ならびに芽胞形成の制御システムの研究を可能にすることを目的とした。株が選定できれば、その株を用いて、既知の遺伝子調節機構を確認し、さらには、未知の芽胞形成の調節機構を詳細に解析することを目的として研究を行った。また、毒素産生から芽胞形成への移行メカニズム、特に芽胞形成をはじめるときのシグナル物質を明らかとし、本菌による感染症の新たな治療、予防法の手がかりをつかむことを目的とした。

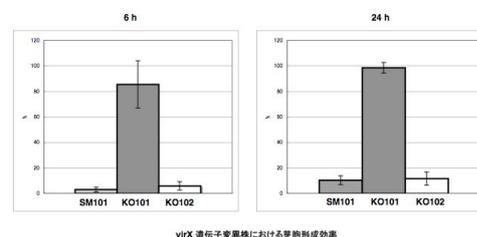
3. 研究の方法

まず、一つの株を用いて毒素産生と芽胞形成

の両方を解析するために、ウェルシュ菌保存株、約 200 株の染色体を調整し、毒素遺伝子のプライマーを用いて PCR を行い、ほぼすべての毒素遺伝子をもつ株を確認した。ほぼ全ての毒素遺伝子をもつ株に対して、熱を加えた後にプレートに塗布し、形成されたコロニーをカウントして芽胞形成効率を確認、さらに、形質転換効率を確認して解析に用いる株を選定した。この株については毒素遺伝子の発現をノザン解析により確認し、遺伝子変異株を相同組み換え法により作製した。変異株の毒素遺伝子発現をノザン解析により、また細胞毒性をマウス筋肉細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 食中毒株 SM101 株を用いた実験よりウェルシュ菌において、芽胞形成は *virX* 遺伝子によって負に調節されていることが明らかとなった。本菌の芽胞形成は、他の芽胞形成菌であるバシラス属と比べて、その形成効率が悪いということが知られているが、*virX* 遺伝子はバシラス属に存在しないことから、芽胞形成効率の違いはこの *virX* 遺伝子が一つの要因であることが示唆された。また、*virX* 遺伝子は、ガス壊疽に関連すると考えられる毒素遺伝子群を転写レベルで正に調節することから、*virX* 遺伝子がオンとなっている時は、芽胞形成が抑制され、毒素遺伝子を正に調節することで、栄養を獲得し効率よく増殖できることが考えられた。芽胞形成と毒素産生の芽胞形成時にのみ産生されるエンテロトキシンの産生も *virX* 遺伝子によって行われていることが明らかとなった。この調節は複数のシグマ因子の転写調節を通して行われていることが明らかとなった。さらに *virX* 遺伝子は芽胞形成の鍵となる *spo0A* 遺伝子も負に調節しており、このことにより芽胞形成を負に調節していることが明らかとなった。



(2) 芽胞形成の解析に用いた食中毒株 SM101 株は多くの毒素遺伝子を欠くことから、ウェルシュ菌の保存株の染色体を PCR にてスクリーニングにし、ガス壊疽株 strain13 とほぼ同じセットの毒素遺伝子をもつ株を選定し、その株の芽胞形成効率と形質転換効率を確認した結果、KZ119 株が毒素遺伝子群、芽胞

形成効率、形質転換効率ともにすぐれ、この株を用いて今後の解析を行うこととした。

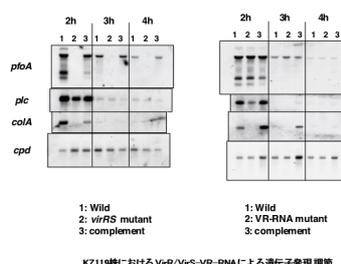
(3) KZ119 株を使用するにあたり、この株のゲノム配列の決定を行った。この株は、ゲノム配列の解析からもガス壊疽株 strain 13 とほぼ同じセットの毒素遺伝子を持つことが確認されたが、strain13 にはない δ -毒素遺伝子を保有していることが明らかとなった。また、 α -毒素遺伝子は2つ存在することが明らかとなった。現在2つ目の α -毒素遺伝子についてはその活性を検討中である。

(3) KZ119 株の毒素遺伝子の転写を確認したところ、strain13 とほぼ同様の発現パターンを示したが、 δ -毒素遺伝子の転写はグルコースの添加で抑制されることが明らかとなり、比較的栄養の乏しい培地で培養したときのみ発現されることが明らかとなった。

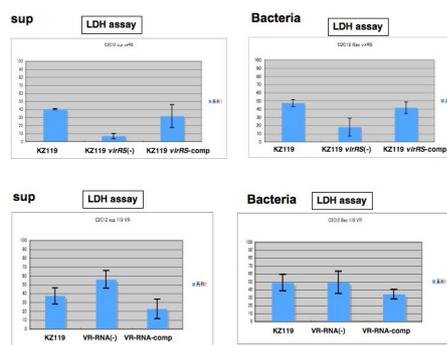
(4) KZ119 株の病原性をオーストラリアモナッシュ大学との共同研究により動物実験を用いて検討した。その結果、この株はゲノム配列が決定しているガス壊疽株 strain13 よりも強毒株であることが明らかとなった。

(5) 病原性の判定を行うために、これまでは動物実験を共同研究により行ってきたが、より簡易に病原性の強弱の判定をするために、細胞培養により病原性の簡易判定を行う系を確率した。細胞を用いるにあたり、マウス筋肉細胞 C2C12 とヒト由来 HeLa 細胞を用いて細胞毒性の検討を行い、ガス壊疽株 strain13 ならびに弱毒株を比較として用いて病原性の判定を行うことが可能となった。KZ119 株は strain 13 よりも強い細胞毒性を示し、この結果は、動物実験と一致することを確認した。

(6) KZ119 株を用いて既知の毒素産生調節遺伝子について、変異株ならびに相補株の作製を行った。その結果、ガス壊疽株 strain13 と同様、毒素遺伝子群は VirR/VirS-VR-RNA カスケードによって調節されていることが明らかとなったが、対数増殖期の α -毒素遺伝子 *plc* の転写調節は strain 13 と比べて KZ119 では弱く、変異株においても転写がかなり残ることが明らかとなった。逆に κ -毒素遺伝子 *colA* の調節は strain 13 よりも強く、KZ119 株の変異株において転写はほとんど見られなくなった。KZ119 株に特有の δ -毒素遺伝子については、このシステムで調節されず、未知の調節遺伝子で調節されている可能性が示唆された。



(5) これらの変異株を用いてマウス筋肉細胞 C2C12 に対しての細胞毒性を確認した結果、VirR/VirS 変異株では、培養上清、菌体を加えた場合どちらも野生株と比べて細胞毒性が低下したのに対し、VR-RNA 変異株の培養上清を加えた場合は、KZ119 株と比べて細胞毒性が増強された。この結果より、KZ119 株においては VirR/VirS システムによって制御されない未知の何らかの因子が、細胞毒性に関与している可能性が示唆された。今後は、これらの株を用いた動物実験も行い、細胞毒性と動物実験の結果が一致するかも確認する予定である。また、未知の病原因子についても解析していく予定である。



変異株の細胞毒性

(6) 芽胞形成調節遺伝子である *virX* 遺伝子の変異株を作製し、芽胞形成効率を確認した結果、KZ119 株においても食中毒株 SM101 と同様、*virX* 遺伝子変異株は芽胞形成効率が上昇し、*virX* 遺伝子が芽胞形成を負に調節していることが明らかとなった。現在、相補株を作製している。

(7) 二成分制御系遺伝子の変異株のマイクロアレイ実験の解析により、複数の二成分制御系が *virX* 遺伝子の転写調節に関与していることが示唆され、これらの二成分制御系が外界の何らかのシグナルを受け取ることで、*virX* 遺伝子の転写を調節し、芽胞形成を調節している可能性が示唆された。現在、これらの二成分制御系遺伝子の変異株を作製中である。

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 5 件)

① Kaori Ohtani, Tohru Shimizu, 2014. Regulation of toxin gene in *Clostridium perfringens*. Research in Microbiology. 査読あり S0923-2508(14)00190-9

10.1016/j.resmic.2014.09.010

② Ohtani, K., H. Hirakawa, D. Paredes-Sabja, K. Tashiro, S. Kuhara, M. R. Sarker,

T. Shimizu. 2013. Unique regulatory mechanism of sporulation and enterotoxin production in *C. perfringens*. J. Bacteriol. 査読あり 195(12):2931-2936 10.1128/JB.02152-12

[学会発表] (計 5 件)

① 大谷 郁 Gene regulation by inter- and intra-cellular signalling in *Clostridium perfringens*. 第 87 回 日本細菌学会総会 2014 年 3 月 27 日 タワーホール船橋 (東京・江戸川区)

② 大谷 郁 Analysis of newly identified toxin gene regulator in *Clostridium perfringens*. The 8th international Meeting of the Molecular Genetics and Pathogenesis of the Clostridia. 2013.10. 23. Palm Cove (オーストラリア)

③ 大谷 郁 ウェルシュ菌 KZ119 株の毒素産生調節の解析 日本細菌学会中部支部総会 2013 年 10 月 18 日 ホテル竹島 (愛知・蒲郡)

④ 大谷 郁 ウェルシュ菌における芽胞形成ならびにエンテロトキシン産生調節機構の解析. 第 86 回 日本細菌学会総会 2013 年 3 月 20 日 幕張メッセ (千葉・千葉市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 郁 (OHTANI Kaori)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：30377410

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：