

Analysis of regulatory networks of toxin production in *Clostridium perfringens*

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/20640

【総説】

ウェルシュ菌病原性発現メカニズムの解明 ～最近の進歩～

Analysis of regulatory networks for toxin production in *Clostridium perfringens*

金沢大学医薬保健研究域医学系細菌感染症制御学
(微生物学)

大 谷 郁

はじめに

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、グラム陽性、嫌気性、大型の桿菌であり、様々な環境に耐えるために芽胞を形成し、高温や低栄養等様々な厳しい環境化では芽胞を形成して、いわゆる休眠状態に入る。そして、芽胞は増殖に適した条件になると再度発芽し増殖を開始する。本菌の増殖速度は非常に速く、最適条件では10分に1回分裂するといわれている。

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 (gas gangrene) などの特徴ある病態を形成する。また、食物に混入した芽胞が不十分な加熱調理で発芽し、体内に取り込まれると再度体内で芽胞を形成し、その過程において産生される腸管毒素 (enterotoxin) により食中毒の起因菌ともなる。2009年3月に発生した中国・四川大地震時には多数のガス壊疽患者が発生し、各メディアにも大きくとりあげられ、大災害時など負傷しても救助の遅れるような場合は大きな問題となる。食中毒についても毎年症例が報告され、発生件数は他の食中毒におよばないものの、学校給食や仕出し弁当等が原因となる事が多いため、集団感染となり患者数は毎年1位を占める。通常は一晩程度の下痢で完治するが、高齢者においては死に至る事もある。

ウェルシュ菌のガス壊疽は他の多くの細菌による感染症と異なり、1つの原因毒素によって引き起こされるものではなく、多くの酵素や毒素がそれぞれの標的を効率よく確実に破壊、分解する事で成立するものである。このため毒素や酵素を効率よく産生するためには複雑な発現調節ネットワークが存在する事が推測される。ウェルシュ菌の病原性発現のための遺伝子調節ネットワークを明らかにする事は、ウェルシュ菌によるガス壊疽発症のメカニズムを明らかとする事につながり、ウェルシュ菌感染症を防ぐために非常に重要であると考えられるが、世界的に見て研究がそれほど進展していないのが現状である。

ウェルシュ菌のゲノム解析

ウェルシュ菌 strain 13の全ゲノム配列は2002年に我々の研究室で決定された(図1)、その結果より、ウェルシュ菌は多くのアミノ酸合成遺伝子を欠いており、その生存のためには外界からアミノ酸を取り入れる事が必須であると考えられた。アミノ酸合成遺伝子の多くは欠損しているが、ゲノム上にはコラゲナーゼやヒアルロニダーゼ等、多くの毒素や酵素遺伝子が存在している事が明らかとなり、感染した場合はこれらの酵素遺伝子や毒素を用いて宿主の組織を破壊し、そこからアミノ酸等の栄養を取り入れる事が予想された。

本菌のゲノムの特徴としては、様々な酵素や毒素遺伝子等、

病原因子と考えられる遺伝子群が染色体上に散在し、いわゆる pathogenicity island (病原島) を形成していないことがあげられる (図2)。一般に多くの病原細菌においては病原因子がある一定の領域に限られて存在し、pathogenicity islandを形成している。これらの多くは、プラスミド上に存在したり、トランスポゾンやインサーションシーケンスといった可動性の因子がその周辺に存在すること、またその領域のDNA配列のGC含量が他の染色体領域と異なる事からも、外来性に獲得されたと推測されている。しかし、ウェルシュ菌染色体上にはpathogenicity islandも存在せず、病原遺伝子の周辺には、外来からその遺伝子を獲得したという目印となるべきトランスポゾンやインサーション配列等は見つかっていない。このことから、このように多くの酵素や毒素遺伝子を進化の過程でどのように獲得したのか、それとも、もともと保持していたものなのかは明らかではないが、このような事実は細菌の進化を理解するうえで重要なものかもしれない。

ウェルシュ菌の細胞内シグナル伝達機構

1. VirR/VirS-VR-RNA カスケードによる調節ネットワーク

細菌は、外界の環境を感知するためのシステム、二成分制御系を有し、センサータンパクが外界の何らかのシグナルを感知すると、その情報を細胞内にあるレスポンスレギュレーターに

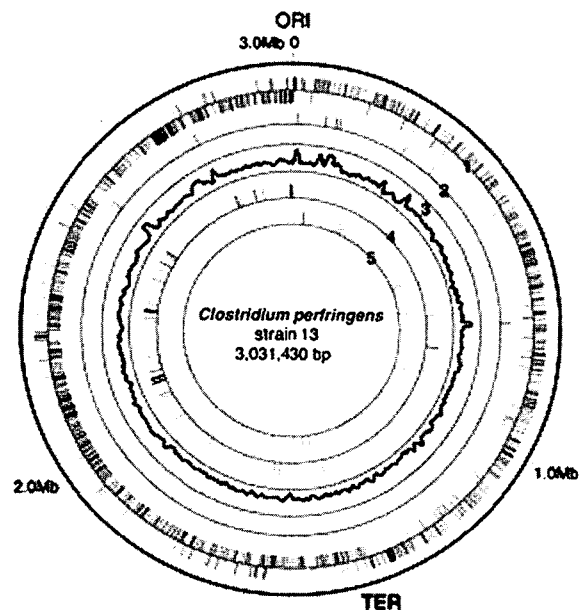


図1. ウェルシュ菌のゲノム

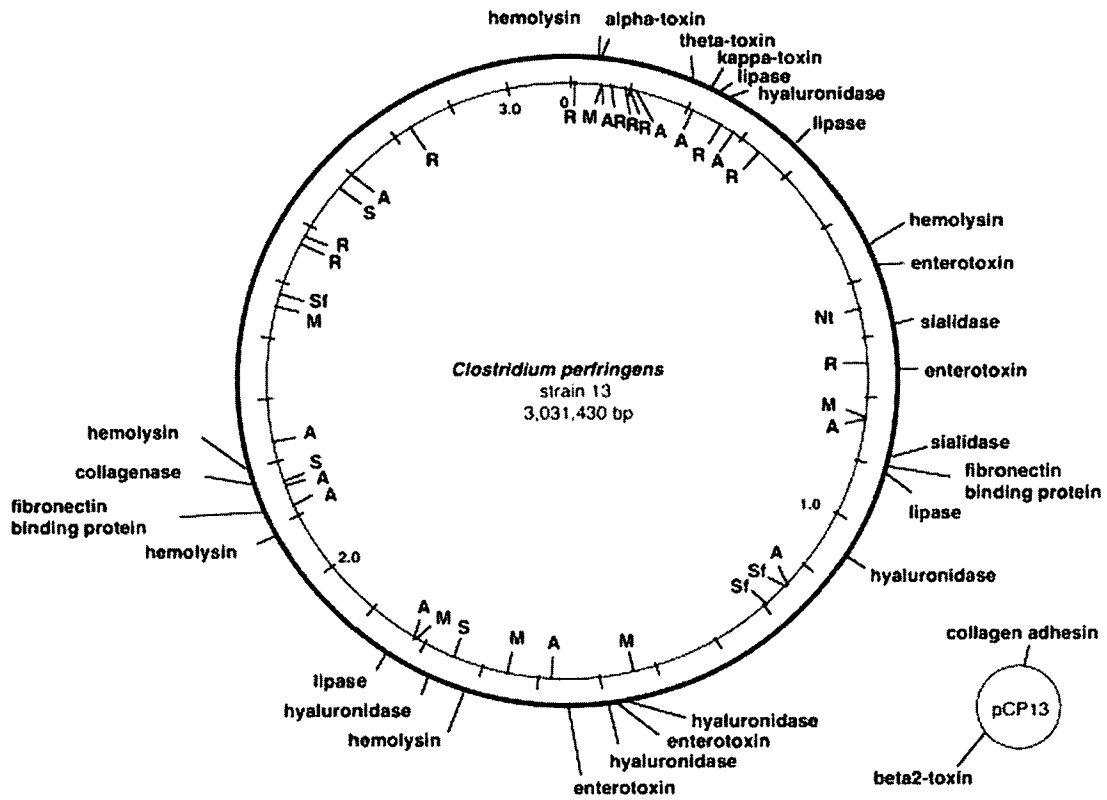


図2. 病原性関連遺伝子の染色体上での位置

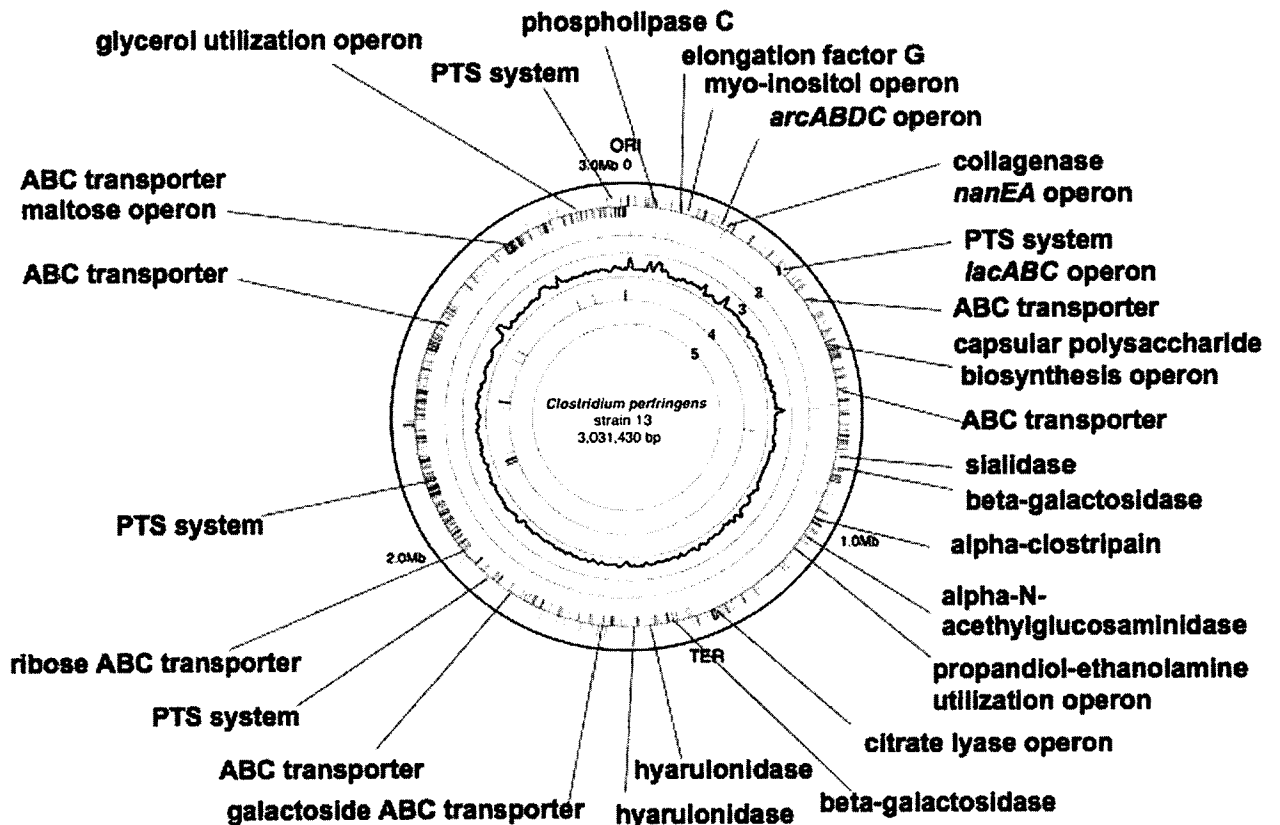


図3. VirR/VirS-VR-RNA regulonの染色体上の位置

リン酸化を介して伝達し活性化する。活性化されたレスポンスレギュレーターは様々な遺伝子のプロモーター領域に結合して、遺伝子の転写発現を調節する。全ゲノム配列の解析により、ウェルシュ菌のゲノム上には28の二成分制御系が存在する事が明らかとなったが、このうちの1つであるVirR/VirSシステムが病原性発現に重要な役割を果たしている。

センサータンパクであるVirSは細胞膜上に存在し、外界の環境を感知して細胞内にそのシグナルをリン酸化により細胞内に伝達する。VirSによって活性化(リン酸化)されたレスポンスレギュレーターであるVirRは様々な遺伝子の転写調節を行うが、ゲノム解析以前に、ガス壊疽形成に重要であると考えられている溶血毒素であるパーフリンゴリジンO(θ -毒素)、ホスフォリパーゼC(α -毒素)、コラゲナーゼ(κ -毒素)遺伝子(それぞれ*pfoA*, *plc*, *colA*)の転写を正に調節している事が明らかとなっていた。またVirRは調節RNAであるVR-RNAの転写調節を行っており、VR-RNAが二次的調節因子としてはたらい α -毒素遺伝子、 κ -毒素遺伝子の転写を調節する事が明らかとなっていた。マイクロアレイを用いた野生株、VirR/VirS変異株ならびにVR-RNA変異株の遺伝子発現解析により、この遺伝子発現ネットワークに含まれる遺伝子群は147遺伝子(21のオペロンを含む)である事が明らかとなり(図3)、その中には病原性遺伝子のみでなく、毒素や酵素によって分解された低分子の物質を取り入れるための輸送系の遺伝子や、それを代謝しエネルギーを産生するための遺伝子群を調節している事が明らかとなった⁹⁾。このことより、VirR/VirSシステムは宿主組織を効率よく破壊し、それらを菌体内へと取りこみ、それをエネルギーに換えていくといった、菌の生存に非常に重要なグローバル調節システムである事が示唆された(図4)。

VirR/VirSシステムは、多くの染色体上の遺伝子を調節するだけでなく、プラスミド上の遺伝子も転写レベルで調節している事が明らかとなった⁹⁾。ウェルシュ菌strain 13は約54 kbの大きさのプラスミドを保持しており、このプラスミド上にはコラーゲンへの結合に関与すると考えられるコラーゲンアドヘジン遺伝子(*cna*)や、細胞毒である β -毒素と類似の活性をもつ β 2-毒素(*cpb2*)が存在する。VirR/VirSシステムはこれらの遺伝子を転写レベルでそれぞれ負と正に調節している事が明らかとなった⁹⁾。このように染色体上に存在する調節システムが、通常外来から獲得する事の多いプラスミド上の遺伝子をも調節しているという事実は非常に興味深く、どのようにプラスミド上の遺伝子が染色体上の調節系に組み込まれたかということも進化の過程を理解するうえで重要な手がかりとなりうるかもしれない。

2. 調節RNA *virX*による調節

*virX*遺伝子は、毒素非産生変異株に染色体ライブラリーを形質転換し、毒素産生を回復させる遺伝子としてクローニングされた52アミノ酸をコードする遺伝子である。この遺伝子も欠失変異株の作製により、 α -、 θ -、 κ -毒素遺伝子の転写を正に調節する事が明らかとなった⁹⁾。さらに、この遺伝子領域にポイントミューテーションでタンパクの翻訳が停止するようなストップコドンを導入しても、その調節活性は保持される事から、*virX*による転写調節はタンパクによるものではなく、RNAそのものが活性を持つ事が明らかとなった⁹⁾。これにより、ウェルシュ菌においてはVR-RNAと*virX*の少なくとも2つの調節RNAが存在することが明らかとなり、さらに多くの調節RNAの存在

が示唆されていたが、近年VirR結合配列をもつ2つの遺伝子*virU*、*virT*も調節RNAであることが明らかとなっている⁹⁾。ウェルシュ菌において多種の調節RNAが病原性の調節に関与していることは非常に興味深く、病原細菌における転写調節RNAの重要性についても今後研究を進めていく価値があると思われる。

また、マイクロアレイの解析により、*virX*遺伝子は毒素以外の多くの遺伝子発現調節に関与している事が明らかとなっており、今後の解析が期待される。

ウェルシュ菌の細胞外情報伝達(クオラムセンシング)による調節機構

1. *agr*システムによる毒素産生調節

一般に細菌には、自らが産生し細胞外に分泌した物質(細胞間情報伝達物質)の濃度を感知し、その濃度が閾値を超えると遺伝子発現のスイッチがオンまたはオフとなるクオラムセンシング(quorum sensing)システムが存在する。このシステムは、細胞間情報伝達物質の濃度(つまり菌の濃度)が閾値を超えないと調節機能を発揮しないため、菌が増殖し菌密度が高くなる事が重要、つまり細菌が集団行動をとるためのシステムであると考えられている。グラム陽性菌では短いペプチドが細胞間情報伝達物質として働くことが報告され、特に黄色ブドウ球菌に

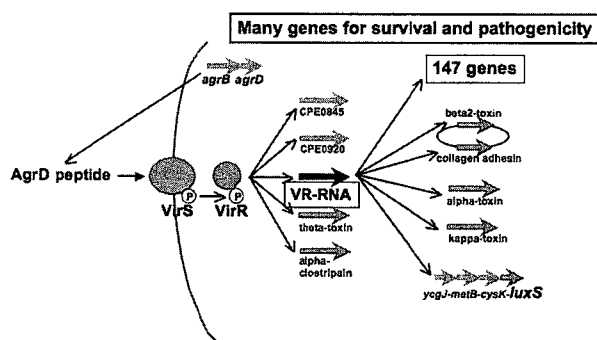


図4. VirR/VirS-VR-RNA調節ネットワーク

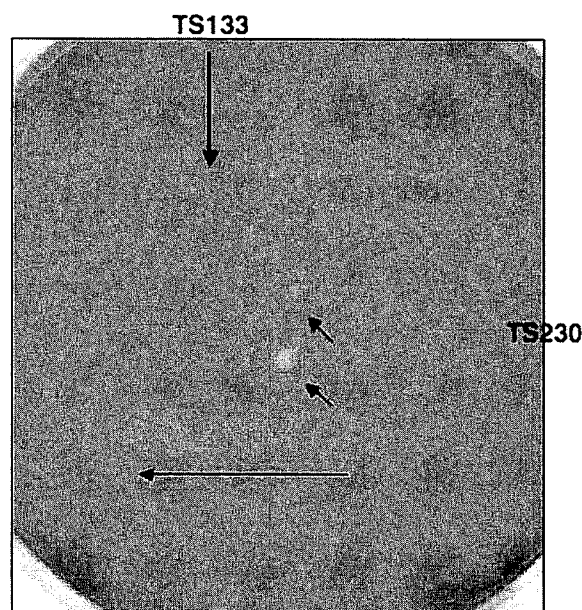


図5. 画線培養による毒素産生回復

おける *agr* システムにおいて研究が進んでいる⁷⁾。ウェルシュ菌にもゲノム上にこの *agr* システムのうち、ペプチドの産生に関わる *agrD* 遺伝子と相同性を示す遺伝子が存在する事が明らかとなり、この遺伝子のウェルシュ菌での役割を明らかとするため、欠失変異株を作製した。その結果、*agrD* 変異株では θ -毒素がほとんど産生されなくなったが、他の *agrD* を正常に持つ毒素非産生株と交差画線培養すると溶血毒素を産生した (図5)。この株の遺伝子発現をノザン解析により調べた結果、 α -、 θ -、 κ -毒素遺伝子の転写は *agrD* によって正に調節されている事が明らかとなった⁸⁾(図6)。また、この変異株に野生株の培養上清を加えて15分インキュベーションすることで、 α -、 θ -、 κ -毒素遺伝子の転写が回復する事から、*agrD*より産生された物質が細胞外に分泌され、それがシグナルとなって毒素遺伝子の転写調節を行っている事が明らかとなった。さらに*agrD*遺伝子と*virS*遺伝子の両遺伝子変異株を作製した結果、この変異株は野生株の培養上清を加えても毒素遺伝子の転写が増強しない事か

ら、VirS が *agrD* より産生されたシグナル物質のセンサータンパクの1つであることが強く示唆された⁸⁾。

このシステムは前述のように黄色ブドウ球菌の *agr* システムと相同性を示しているものの、本菌の毒素産生調節は増殖のごく初期 (対数増殖初期) に行われ、毒素産生・分泌も同時期に最も盛んとなる。この現象は、多くの栄養を外界から取り入れ、活発に増殖しなければならないウェルシュ菌にとっては、最適のシステムであると考えられるが、通常クオラムセンシングとは、黄色ブドウ球菌における *agr* システムのように菌密度が高くなった時に働く調節機構であるので、本菌の *agr* システムは他の菌の *agr* システムとは異なった性質を持つものと考えられる。本菌の増殖後期である静止期の培養上清中には、毒素産生を抑制する何らかの物質が存在する事が示唆されており⁸⁾、これらの抑制物質と *agr* システムの関係を今後明らかにしていく事は非常に重要であると考えられる。また、黄色ブドウ球菌や他の *agr* システムを有する細菌間での情報伝達が存在するのかどうか、例えば黄色ブドウ球菌の *agr* 領域から産生されるシグナル物質がウェルシュ菌の遺伝子発現に影響を及ぼすかどうかといった点については現在検討中であるが、このような調節機構がもし存在すれば、シグナル物質は細胞外に分泌されることから、グラム陽性菌全般による感染症治療に新たな可能性が見いだされると考えられる。

2. オートインデューサー 2 (AI-2) による毒素産生調節

前述の細胞間情報伝達システムはグラム陽性菌のみに共通のシステムであるが、さらに細菌にはグラム陽性菌、陰性菌に共通の細胞間情報伝達システムが存在する。このシステムは、もともとグラム陰性菌である *Vibrio harvey* の発光に関する研究より明らかとなったもので、発光を調節する細胞間情報システムとして報告された。このシステムでは *luxS* 遺伝子から産生されるオートインデューサー (AI-2) が細胞外に分泌されて、それを細菌が感知することで、遺伝子発現制御を行う。ウェルシュ菌にもゲノム解析の結果より染色体上に *luxS* 遺伝子が存在することが明らかとなった。そこで本菌の培養上清中にAI-2が存在するかを確認するため、*Vibrio harvey* の発光を誘導する事ができるかを確認した。その結果、ウェルシュ菌の培養上清を加えると発光が誘導され (図7)、本菌の *luxS* 遺伝子も *Vibrio* 属のAI-2と同様の物質を産生している事が示唆された。この遺伝子のウェルシュ菌内での役割を明らかとするため *luxS* 遺伝子変異株を作製した結果、ウェルシュ菌において *luxS* 遺伝子は α -、 θ -、 κ -毒素遺伝子の転写を正に調節していることが明らかとなった⁹⁾。さらにこの *luxS* 遺伝子変異株に野生株の培養上清を加えてインキュベーションする事で、毒素遺伝子の転写が回復する事より、*luxS* 遺伝子産物は細胞外に分泌されて遺伝子発現調節を行っている事が明らかとなった⁹⁾。

このように、グラム陰性菌と陽性菌に共通の細胞間情報伝達が存在する事は、多くの菌種間で細胞間情報伝達が存在する可能性を示唆しており、多くの細菌が混在する腸内環境や混合感染時など、お互いの出すシグナルにより様々な遺伝子発現の変化が起こっているかもしれない、今後の重要な検討課題である。

培養細胞によるウェルシュ菌毒素遺伝子発現の誘導

ウェルシュ菌は産生する毒素によりA-Eの5つの型に分類され、A型菌はこれまで述べたようにヒトにガス壊疽を起こすが、その一方でC型菌はヒトに壊死性腸炎を引き起こす。このC型菌を腸管由来であるCaco-2細胞に感染させると、感染させない

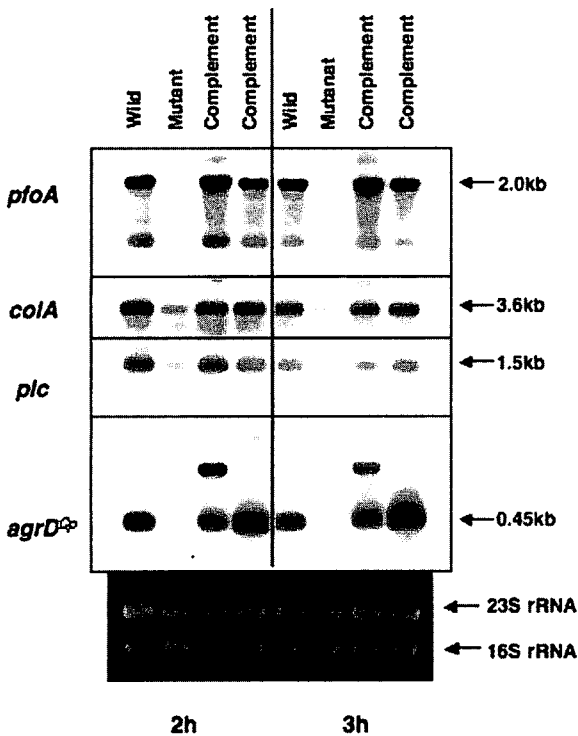


図6. *agr*変異株における毒素遺伝子の転写調節

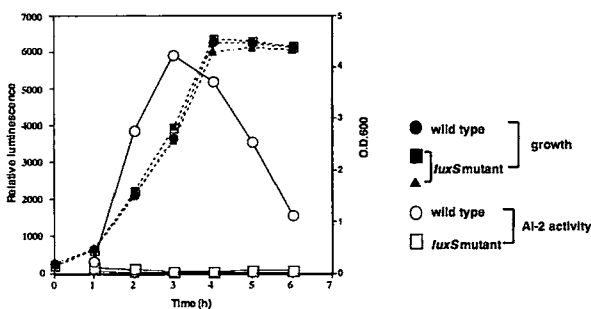


図7. ウェルシュ菌培養上清中のAI-2活性

ときと比べて θ -毒素遺伝子や α -毒素遺伝子の転写が増強する事が明らかとなった¹⁰⁾。また、VirS 変異株をCaco-2細胞に感染させても、これらの遺伝子の転写が増強しない事から、VirSは感染時に、何らかのシグナルを細胞から受け取る事により毒素遺伝子の転写を調節していると考えられる。

このようにC型菌においてもVirR/VirS は病原性発現に重要であると考えられ、A型菌を用いたこのような感染時の遺伝子発現解析は行われていないものの、A型菌でも同様の制御システムが働くと考えられ、ウェルシュ菌が宿主からどのようなシグナルを受け取っているのかを明らかにしていく事も宿主-病原菌相互作用を解明するために重要である。

ま と め

本稿では、ウェルシュ菌の毒素発現調節を中心にして述べてきたが、ここに述べた研究結果は、ウェルシュ菌、さらには病原細菌による感染症の新たな治療法の手がかりをつかむために重要であると考えられる。現在の細菌による感染症治療は抗菌薬に頼ったものであり、そのために耐性菌の出現や菌交代症などといった問題が多く出現している。この問題を解決するには菌を死滅させるのみの抗菌薬を新たに開発するのではなく、細菌の毒素産生を阻害し病原性を抑制しながら細菌と共存していく治療を開発していくことが、新たな感染症対策として必要ではないかと考えられ、そういった観点からも、ウェルシュ菌における毒素産生調節ネットワーク、特に細胞間情報伝達物質による毒素産生調節ネットワークをさらに解析し、様々なシグナル物質を同定してその拮抗剤を探るなどしていく事が必要とされるであろう。

謝 辞

本稿執筆にあたり、今までご指導いただいた金沢大学医薬保健研究域医学系細菌感染症制御学前教授であり、現金沢大学長である中村信一先生、細菌感染症制御学教授である清水徹先生に心より御礼申し上げます。また本研究の遂行にご協力いただいた教室員の方々にも深く感謝いたします。

文 献

- 1) Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annu. Rev. Microbiol. 52: 333-360, 1998
- 2) Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, and Hayashi H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 996-1001, 2002
- 3) Ohtani K, Hirakawa H, Tashiro K, Yoshizawa S, Kuhara S, and Shimizu T. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. Anaerobe, 2009
- 4) Ohtani K, Kawsar HI, Okumura K, Hayashi H, and Shimizu T. The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. 222: 137-141, 2003
- 5) Ohtani K, Bhowmik SK, Hayashi H, and Shimizu T. Identification of a novel locus that regulates expression of toxin genes in *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. 209: 109-114, 2002
- 6) Okumura K, Ohtani K, Hayashi H, and Shimizu T. Characterization of genes regulated directly by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 190: 7719-27, 2008
- 7) Muir TW. Turning virulence on and off in staphylococci. J Pept Sci 9: 612-9, 2003
- 8) Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, and Shimizu T. Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 191: 3919-27, 2009
- 9) Ohtani K, Hayashi H, and Shimizu T. The luxS gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol. Microbiol. 44: 171-179, 2002
- 10) Vidal JE, Ohtani K, Shimizu T, and McClane BA. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. Cell Microbiol, 2009