

Studies on quorum sensing and self-quorum quenching in *Clostridium perfringens*

安達, 桂香

<https://hdl.handle.net/2324/2236303>

出版情報：九州大学, 2018, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 安達 桂香

論文題名 : Studies on quorum sensing and self-quorum quenching
in *Clostridium perfringens*
(*Clostridium perfringens* におけるクオラムセンシングおよび
自己クオラムクエンチングに関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

病原菌 *Clostridium perfringens* は偏性嫌気性グラム陽性細菌であり、土壌や下水、動物体内など環境中に広く生息している。本菌は抗生物質投与などによる宿主側の変化により腸内で異常増殖して腸炎を引き起こし、創傷から感染して筋壊死やガス壊疽を引き起こす。これらを誘発する病原性因子の発現は、自己誘導性ペプチド(AIP_{Cp})をシグナルとした VirSR 二成分制御系 (VirSR TCS) を介する agr-like quorum sensing (QS) により制御されている。ところが、溶血性毒素遺伝子 *pfoA* の発現は一過的であり、対数増殖期中期にピークを迎えた後、著しく低下することが確認された。このことから、本菌は自身の AIP_{Cp}-QS 機構を自ら阻害する self-quorum quenching (sQQ) 機構を有することが推測された。本研究は、*C. perfringens* における AIP_{Cp}-QS-sQQ 機構の実態解明を目的として遂行された。

まず、*C. perfringens* strain 13 を嫌気条件下 37°C で培養し、*pfoA* 発現を経時的に定量解析した。その結果、*pfoA* 発現量は対数増殖期中期に最大値に達した後、対数増殖期後期には急速に低下した。このことから定常期の培養液中には sQQ 誘導因子が蓄積していることが予想されたため、定常期培養液上清 (SPCS) を用いて sQQ 誘導因子の諸性質解析を行なった。その結果、sQQ 誘導因子は非タンパク質性の低分子高極性酸性物質であることが判明し、本菌の一次代謝産物である酢酸と酪酸が sQQ 誘導因子であることが推測された。そこで、これらの有機酸とそのナトリウム塩をサンプルとして sQQ 活性測定を行なった。その結果、有機酸添加区では濃度依存的に強い sQQ 活性が確認されたが、pH 低下を伴わない有機酸ナトリウム添加区では sQQ 活性が確認されなかった。また、無機酸でも pH 低下が伴うことで強い sQQ 活性が確認された。更に本菌を pH コントロール条件下で培養した結果、sQQ が回避され、通常培養時よりもおよそ 10 倍高い *pfoA* 発現量が確認された。よって、本菌が有する sQQ 誘導因子は「酸性物質」というよりも「酸性物質の蓄積に伴う pH 低下」であることが判明した。

次に、sQQ の作用機序を解明するため、合成 AIP 存在下にて、RNA 合成阻害剤リファンピシンと SPCS の作用を比較した。その結果、*pfoA* は SPCS 添加によりリファンピシン添加と同様に 10 分間の菌体インキュベーションでほぼ完全に消滅したことから、SPCS の sQQ の作用機序は *pfoA* の転写誘導の遮断であると推定された。

また、中性 (pH 7.0) または酸性 (pH 5.7) に調整した TSF 培地にて *C. perfringens* strain 13 を培養し、毒素分子 PFO と PLC の活性を経時的に定量解析した。その結果、活性レベルでも酸性条件下にてこれらの毒素生産が抑制されていることが示された。

最後に、AIP_{Cp}-QS-sQQ における網羅的遺伝子ネットワークを解明するため、strain 13 とその AIP 合成遺伝子欠損株 strain TS230 を用いて、QS による発現変動および酸による発現変動を RNA-seq を用いて網羅的に解析した。その結果、病原性遺伝子、糖輸送および代謝、イオン輸送、

莢膜多糖（CPS）生合成の関連遺伝子は QS 誘導時に発現増加し、酸により発現低下した。病原性遺伝子に関しては、VirSR TCS の直接的制御下にある遺伝子が AIP_{Cp}-QS-sQQ に強い影響を受けることを RT-qPCR と RNA-seq の両方の発現定量解析において確認した。更に、糖代謝および菌体膜と AIP_{Cp}-QS-sQQ 機構の関連性を解析するため、strain 13 と strain TS230 における糖トランスポーター遺伝子 *gutA* の発現量、糖消費量および有機酸生産量、バイオフィーム形成能を経時的に比較解析した。その結果、*agrBD* 遺伝子の欠損により *gutA* 発現能の低下、酢酸生産速度の遅延、バイオフィーム形状の変化が生じ、AIP_{Cp}-QS が糖代謝および菌体膜合成に関与していることが示唆された。一方、酸性条件下ではクエン酸リアーゼ、F₀F₁ タイプ ATP 合成酵素、シャペロンなどの遺伝子発現が増加しており、酸性ストレス耐性を誘導していることが示唆された。総じて、本菌は QS 誘導時に糖代謝や毒素および CPS 生産を積極的に行なって宿主への攻撃態勢をとる一方、sQQ 誘導時には環境ストレスに対する防御態勢をとる。すなわち、本菌は AIP_{Cp}-QS-sQQ 機構により周囲の環境に併せて自己の遺伝子発現を巧みに調節することで、効率的な感染を実現することが示唆された。

以上、本研究は *C. perfringens* の sQQ 誘導因子の特定に至った初めての研究であり、pH 低下という非常に単純な方法により本菌の sQQ が誘導されること、AIP_{Cp}-QS-sQQ 機構によって環境変化と連動した効率的な感染を実現することを示した。また、本研究は AIP_{Cp}-QS-sQQ 機構を標的とした病原菌 *C. perfringens* の感染制御の新たな可能性を示しており、臨床応用に繋がることが期待される。