

2020 年 7 月 31 日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

温度に応答して自らを保護する食中毒細菌集団

研究成果のポイント

1. 国内での患者数第 3 位の食中毒細菌であるウェルシュ菌が、宿主の体温より低い温度に応答して自らを繊維状タンパク質（細胞外マトリクス^{注1}）で覆い、酸素および抗生物質に対する耐性を向上させることで、強固な集団（バイオフィーム）を形成することを発見しました。
2. バイオフィーム中では、マトリクスを生産する細胞と生産しない細胞が役割分担して生存していることがわかりました。
3. バイオフィームマトリクスに着目したバイオフィーム除去法および食中毒や感染症の予防・治療法の開発が期待されます。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 尾花 望 助教と生命環境系 野村 暢彦 教授らの研究グループは、食中毒細菌であるウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）のバイオフィーム（集団）に抗生物質・酸素耐性をもたらす細胞外マトリクスタンパク質を発見しました。

細菌はバイオフィームを形成して生存しています。これは細菌にとっては環境中を生き抜く生存戦略の一つですが、環境中に残存した病原細菌が人間に感染して疾患を引き起こす可能性があるため、バイオフィームの性質を理解し防除することが重要です。本研究グループは、ウェルシュ菌が繊維状のタンパク質（マトリクス）を生産することによって、酸素や抗生物質に対する耐性を向上させ、強固なバイオフィームを形成することを発見しました。また、繊維状タンパク質が生産できないウェルシュ菌は酸素や抗生物質に対する耐性が低くなることがわかりました。

一般的に病原細菌は、宿主（ヒト、動物）の体内温度（約 37℃）に応答して病原性を調節していることが知られています。しかしながらウェルシュ菌の場合、宿主体内よりも低い温度に応答して繊維状タンパク質を豊富に産生していることがわかりました。また、ウェルシュ菌のバイオフィーム中には、繊維状タンパク質を生産する細胞と生産しない細胞が共存していることを見いだしました。これらのことから、酸素があると生育できないウェルシュ菌は温度を介して、酸素が豊富な宿主の外部環境を認識し、バイオフィーム形成を調節していること、さらにバイオフィーム内で役割分担しつつ、集団として生存していることが示唆されました。

本研究の成果は、2020 年 7 月 31 日付「npj Biofilms and Microbes」で公開される予定です。

* 本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト（研究期間：2015～2020 年度）の一環で実施されました。

研究の背景

ウェルシュ菌は腸内悪玉細菌や食中毒の原因細菌として知られており、2019年度の日本国内の食中毒総患者数における原因の第3位にランクしています（厚生労働省食中毒統計資料）。ウェルシュ菌は酸素がある環境では生育できない偏性嫌気性細菌^{注2)}ですが、自然界に広く分布しています。刻々と変化する環境下で細菌が生存するための生活様式の一つにバイオフィルムがあります。細菌の集団であるバイオフィルムは、細菌が分泌する細胞外高分子物質（EPS）から成る細胞外マトリクスによって覆われて、化学的・物理的攻撃から保護されており、この作用によって、バイオフィルムを形成していない浮遊性細胞に比べて、様々なストレスに対する耐性が100倍以上高められています。ウェルシュ菌のような腸内病原細菌が形成するバイオフィルムは、疾患を引き起こす原因となる可能性があるため、そのEPSマトリクスを理解し制御することが課題となっています。

研究内容と成果

本研究では、ウェルシュ菌が25℃で形成する弾性の高い膜状のバイオフィルムに着目し、膜状のバイオフィルムに必要な遺伝子を探索しました。その結果、細胞外に分泌されるタンパク質をコードする遺伝子が、バイオフィルム形成に必須であることを発見しました。BsaAと名付けたこのタンパク質は、細胞の外で重合（ポリマー化）しており、膜状のバイオフィルム形成に必須のEPSであることを明らかにしました。また、BsaAポリマーは界面活性剤や強酸に曝しても壊れない非常に強固な構造であることを発見しました（図1）。BsaAポリマーを作れないウェルシュ菌は膜状のバイオフィルムを形成できず、酸素と抗生物質に対する耐性が低下しました（図2）。

また、BsaAポリマーは、宿主体内の温度である37℃よりも低温の25℃でウェルシュ菌が生育した場合に豊富に生産されることがわかりました。嫌気蛍光レポーター^{注3)}株を用いて、細菌1細胞あたりの*bsaA*遺伝子発現を解析したところ、その発現は不均一であり、ウェルシュ菌バイオフィルム中にはBsaAポリマーを生産する細胞と生産しない細胞が存在していました。また、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィルム中の遺伝子発現の局在を可視化したところ、BsaAポリマー生産細胞がBsaAポリマー非生産細胞の上部を覆うように存在すること、繊維状BsaAポリマーマトリクスがバイオフィルム上部を覆っていることを見いだしました（図3）。宿主の腸管内は酸素がない嫌気的条件である一方、宿主の外は嫌気性細菌の生育を阻害する酸素が豊富に存在する環境です。偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌は、宿主体内の37℃より低い温度を認識することで、集団の内部で役割分担をしつつ、酸素が豊富な宿主の外部環境に適応するために、膜状のバイオフィルムを形成していると考えられます。

今後の展開

本研究により、偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌が宿主の体外に排出されたときの生存戦略の一つが明らかになり、ウェルシュ菌が引き起こす食中毒の予防や、嫌気性細菌が形成するバイオフィルムに関連した感染症の予防や治療に役立つと期待されます。また、嫌気性腸内細菌が、複数の特性を持った不均一な細胞集団から成るバイオフィルムを形成することが明らかになりました。腸内細菌叢（腸内フローラ）を形成する細菌の多くは偏性嫌気性細菌ですが、嫌気性腸内細菌叢が体外に排出された後、どのように生存するのかはよくわかりません。細胞集団の不均一性は感染症の難治化や耐性化と深く関わることから、本研究成果は、嫌気性の腸内細菌に関わるヒトの病気の理解や予防、治療にもつながる可能性があります。

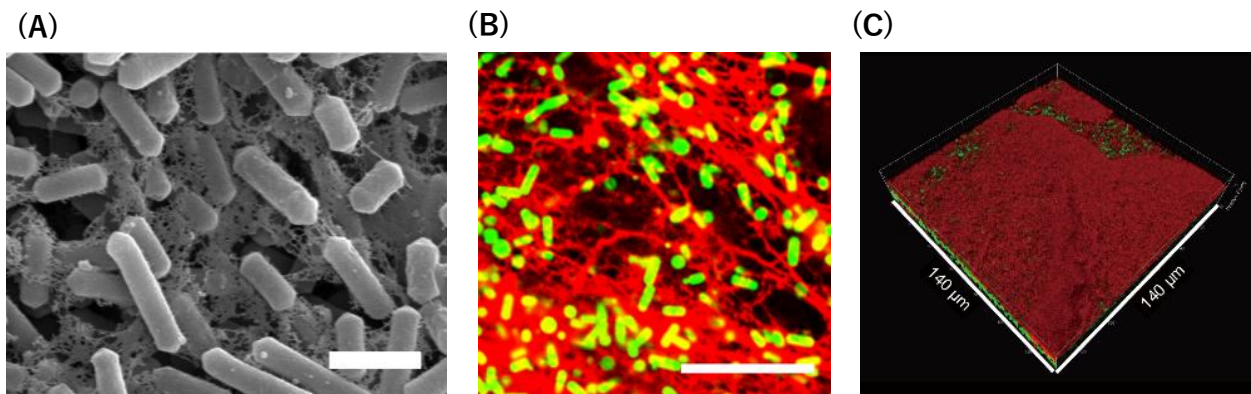


図1. ウェルシュ菌が生産する繊維状 EPS マトリクス (BsaA ポリマー)。(A) ウェルシュ菌が形成する膜状バイオフィルムの走査型電子顕微鏡画像。スケールバーは 2 μm を示す。(B, C)ウェルシュ菌が形成する膜状バイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡画像。2 次元画像 (B) と 3 次元画像 (C) を示す。蛍光染色した細胞と BsaA タンパク質をそれぞれ緑と赤で表示。スケールバーは 20 μm を示す。

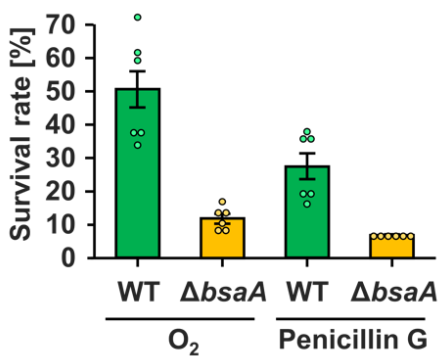


図2. 繊維状 EPS 遺伝子のストレス耐性に対する影響。酸素もしくは抗生物質 (ペニシリン G) に 20 時間暴露した後の生存率の測定。BsaA ポリマーを作れないウェルシュ菌は膜状のバイオフィルムを形成できず、酸素と抗生物質に対する耐性が低下した。WT: 野生株。 $\Delta bsaA$: 繊維状 EPS 遺伝子欠損株。

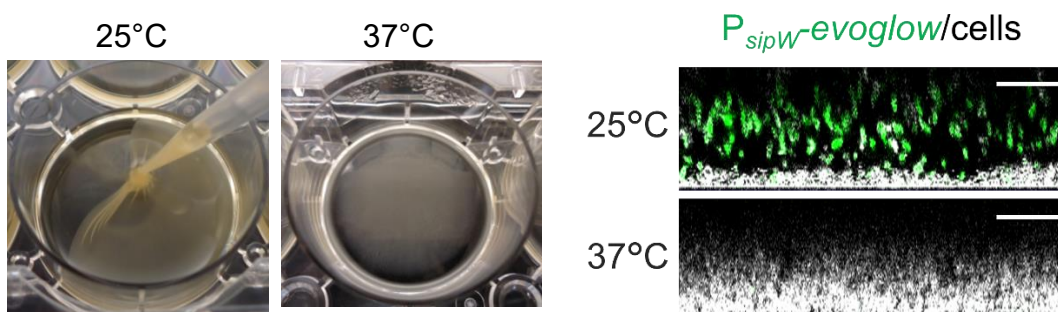


図3. バイオフィルム中の繊維状 EPS (BsaA ポリマー) 生産細胞の空間分布。(左図) 異なる温度で形成させたバイオフィルム。25°Cでは厚く弾性に富んだ膜状のバイオフィルムを形成する。(右図) 異なる温度で形成したバイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡観察結果。横から見た断面図を示す。繊維状 EPS 生産細胞を緑、全細胞を白で表示。スケールバーは 20 μm を示す。

用語解説

注1) 細胞外マトリクス

バイオフィーム中の非細胞性の構成成分であり、細胞外高分子物質 (Extracellular polymeric substance: EPS) から成る。EPS は主にタンパク質、DNA および多糖から成り、バイオフィームの構造維持や機能に重要や役割を果たす。

注2) 偏性嫌気性細菌

嫌気性細菌とは生育に酸素を必要としない細菌のことであり、さらに偏性嫌気性細菌とは大気レベルの酸素に暴露されると死滅する細菌のことを指す。

注3) 嫌気蛍光レポーター

発現を可視化したい目的遺伝子の下流に、蛍光タンパク質遺伝子 (例: 緑色蛍光タンパク質 GFP) をつなげることによって、その遺伝子の発現と同調して細胞が蛍光を発する。このようにして作製した細胞を蛍光レポーターと呼び、顕微鏡観察と組み合わせることによって 1 細胞レベルの遺伝子発現の解析が可能となる。しかし、GFP など、よく使われる蛍光タンパク質は、蛍光を発するために酸素を必要とするため、嫌気環境下では使用できない。本研究では嫌気条件でも蛍光を発する嫌気蛍光タンパク質を応用することによって、嫌氣的に形成されたバイオフィーム中の 1 細胞レベルでの遺伝子発現解析を可能とした。

掲載論文

- 【題 名】 Temperature-regulated heterogeneous extracellular matrix gene expression defines biofilm morphology in *Clostridium perfringens*
(温度によって調節される不均一な細胞外マトリクス遺伝子発現がウェルシュ菌バイオフィーム形態を決定する)
- 【著者名】 Nozomu Obana, Kouji Nakamura, Nobuhiko Nomura
- 【掲載誌】 npj Biofilms and Microbes (DOI: 10.1038/s41522-020-00139-7)

問い合わせ先

【研究に関すること】

尾花 望 (オバナ ノゾム)

筑波大学 医学医療系 助教

Tel: 029-853-3213

Email: obana.nozomu.gb[at]u.tsukuba.ac.jp

野村 暢彦 (ノムラ ノブヒコ)

筑波大学 生命環境系 教授

Tel: 029-853-6627

Email: nomura.nobuhiko.ge[at]u.tsukuba.ac.jp

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

Tel: 029-853-2040

Email: kohositu[at]un.tsukuba.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel: 03-5214-8404

Email: jstkoho[at]jst.go.jp

【JSTの事業に関すること】

内田 信裕（ウチダ ノブヒロ）

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

Tel: 03-3512-3528

Email: eratowww[at]jst.go.jp