

論文概要

目的：

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、ヒトや家畜に下痢やガス壊疽 (gas gangrene) などの重篤な感染症を引き起こす病原細菌である。その病原因子は多様な毒素と酵素であり、それらの協調的な作用によって、特徴ある病態を形成する。ウェルシュ菌は多種・多様な病原因子遺伝子を染色体上に分散してコードしているが、それらの遺伝子の発現には二成分制御系システムである VirR/VirS (VirR; レスポンスレギュレーターと VirS; センサータンパク) が深く関与している。VirR/VirS システムは α -毒素遺伝子 (*pfoA*)、 β -毒素遺伝子 (*colA*)、 ϵ -毒素遺伝子 (*plc*) の発現をグローバルに調節していることがすでに報告されているが、*C. perfringens* strain13 の全ゲノム塩基配列が決定されて、さらに多くの病原関連遺伝子が VirR/VirS により転写段階で調節されているらしいことが判った。それらには、 α -クロストリパインと高い相同性をもつ CPE0846、DNase 遺伝子と相同性のある CPE1368、さらに機能不明な新しい遺伝子 CPE0845、CPE0920 などがある。本研究では、これらの新規遺伝子の構造と機能を明らかにし、VirR/VirS システム (レギュロン) による発現調節の機構について解析した。

対象と方法：

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) strain 13 の野生株、*virR* 遺伝子変異株 TS133、TS133 に *virR/virS* 遺伝子をプラスミドで相補した株の 3 菌株を主たる供試菌とした。各遺伝子の構造および発現解析には、CPE0845 (*virT*)、CPE0846 (*ccp*)、CPE0920 (*virU*)、CPE1368 (*cadA*) 遺伝子の PCR 産物をプローブとして用い、主としてノザン法により解析した。また、*cadA* については VR-RNA 変異株 TS140 を供して、ノザン解析を行った。ゲノム情報から VirR 結合配列をもつ新たな 3 遺伝子が見出されたが、その

調節機構の解明にはプライマーエクステンション解析および、ゲルシフトアッセイ法を用いた。さらに、*virT*、*ccp*、*virU* 遺伝子の機能を明らかにするため、変異株、過剰発現株を作製し、ノザン法による解析および培養上清を用いて活性などの測定を行った。*cadA* の機能解析は、変異株や精製した CadA リコンビナントタンパクを用いて行った。

結果：

機能未同定であったそれぞれの遺伝子は、アミノ酸配列検索、ゲノム比較法、活性などから、CPE0846 を Clostridial Cystein Protease (*ccp*) と、CPE1368 を Clostridial cell wall Anchoring DNase A (*cadA*) と命名した。Ccp は細胞外に分泌されており、細胞外分泌型のプロテアーゼの 1 つである -クロストリパインとして機能していることが明らかとなった。CadA については *cadA* 変異株である TS193 では DNase 産生性が減弱したことから、CadA は DNase 活性をもつことが示唆され、精製したリコンビナントタンパクを用いたアッセイの結果からも、CadA は DNase 活性を有することが確認された。

遺伝子 *virT* (CPE0845)、*ccp* (CPE0846)、*virU* (CPE0920) は、VirR の結合モチーフの検索から見出されたものであるが、これらの発現調節の解析では、*virT*、*ccp*、*virU* は対数増殖期中期に当たる培養開始後 2 時間に最も高く発現されており、VirR/VirS システムによって、転写レベルで正の調節が行われていることが判った。プライマーエクステンション解析およびゲルシフトアッセイでは、VirR 結合配列モチーフを有するこれらの遺伝子 (*virT*、*ccp*、*virU*) は非常に保存性の高いプロモーター配列構造をもっており、VirR タンパクがそのモチーフに特異的に結合することで、直接的に転写制御をしていることが確認された。一方 *cadA* の発現は、VR-RNA の転写制御を介して VirR/VirS システムにより転写レベルで抑制されることが明らかとなった。

virT 変異株、*virU* 過剰発現株を用いたノザン解析では、VirR/VirS レギュロンの一

員として *virT* 遺伝子が負の制御（ネガティブレギュレーター）として、一方 *virU* 遺伝子が正の制御（ポジティブレギュレーター）として機能し、VirR/VirS システムによる遺伝子調節で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらには、部位特異的変異導入解析の結果から *virT*、*virU* 遺伝子が共に VR-RNA のような機能性 RNA をコードすることが示唆された。

考察：

virT、*ccp*、*virU* のプロモーター配列は VirR 結合配列をはじめ、多くの特徴が一致している。この他の *vrr*、*pfoA* も VirR 結合配列をもっており、これら 5 遺伝子のプロモーターの構造は厳密に保存され、VirR が特異的に結合することにより VirR/VirS システムから直接的に正の転写制御をおこなわれていることが明らかとなった。*virT* と *virU* 遺伝子はネガティブ、あるいはポジティブレギュレーターとしての制御遺伝子であるが、他の遺伝子の転写への影響は、VirR/VirS システムあるいは VR-RNA の場合ほど顕著ではなかった。このことは、VirT-、VirU-RNA が VirR/VirS によって制御されている遺伝子発現のバランスを維持するような働き、いわば微調整を行うような働きを司っていて、外部環境のわずかな変化に対応して、ウェルシュ菌の生存や増殖に貢献しているのではないかと考えられる。

酵素活性の測定結果より、Ccp、CadA はそれぞれタンパク分解酵素、DNase として機能することが明らかとなった。ウェルシュ菌は、TCA サイクルに関与する全ての酵素およびアミノ酸生合成を行う酵素が欠落しているため、本菌が宿主内で生存するためには、宿主からの積極的に栄養（特にアミノ酸）を獲得しなければならない。Ccp、CadA は、他の菌体外酵素である、フォスホリパーゼ、コラゲナーゼ、シアリダーゼなどとともに、宿主の細胞や組織を分解することにより、本菌の宿主内での生存のために必須であり、それが結果的に宿主へ病原性をもたらすことになったと推察される。このことは、ウェルシュ菌ではいわゆるヒトに対する病原遺伝子が、病原遺伝子島を

形成することなく、パラログとして染色体に組み込まれているという事実とともに、本菌の寄生性、ヒトとの共進化の機構を解明するために、重要な知見である。

結論：

ウェルシュ菌のゲノム情報から新たに同定された VirR 結合配列をもつ 3 遺伝子 (*virT*、*ccp*、*virU*) が VirR/VirS システムによって正の転写調節を受けること、そして VirT、VirU が調節 RNA 分子として VirR/VirS レギュロンの転写制御に関与することを明らかにした。ウェルシュ菌の新規病原性因子候補、システインプロテアーゼと DNase をコードする *ccp*、*cadA* 遺伝子の機能を初めて解明した。今後は *virT*、*virU* が他の遺伝子発現へ如何なる影響をおよぼすか、DNA マイクロアレイ解析によりさらに詳細に検討する予定である。