

称号及び氏名 博士（獣医学） 細見 晃司

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 **B**型ボツリヌス菌の芽胞形成に関する研究

論文審査委員
主査 向本 雅郁
副査 三宅 眞実
副査 山崎 伸二

論文要旨

諸言

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) はグラム陽性偏性嫌気性桿菌で耐熱性芽胞を形成し、土壌や河川などの環境中に広く分布している。本菌はボツリヌス神経毒素 (*Botulinum neurotoxin*, **BoNT**) を産生し、ヒトや動物にボツリヌス症を引き起こす。**BoNT** は抗原性の異なる **A** 型~**G** 型に分類されており、国内では主に **A**、**B**、**E** 型菌による食餌性ボツリヌス症及び **A**、**B** 型菌による乳児ボツリヌス症の発生が報告されている。ボツリヌス菌は芽胞を形成し、自然界の厳しい環境に耐えながら生存している。芽胞は食品内や1歳未満の乳児の腸管内など、増殖に適した環境に置かれると、発芽、増殖し、毒素を産生する。ボツリヌス症のリスク要因は、ボツリヌス菌が産生し、高い致死活性を有する神経毒素だけでなく、耐熱性を有する芽胞も重要な要因の1つである。しかし、ボツリヌス菌の芽胞形成や発芽の分子機構はこれまでにほとんど解明されていない。本研究では、**B** 型ボツリヌス菌の芽胞形成機構を分子レベルで解明することを目的として、日本国内で発生した乳児ボツリヌス症患者由来 **B** 型菌 **111** 株を用いて、芽胞形成期における遺伝子発現解析及び芽胞形成関連因子の機能解析を行った。

第1章 継代培養により芽胞形成能が低下する B 型ボツリヌス菌 (111 株) の性状解析

枯草菌の芽胞形成は、①栄養増殖の停止、②不等分裂、③エンガルフメント、④コルテックス、⑤スポアコート形成、⑥コア内の脱水・不活性化、⑦母細胞の融解による芽胞の遊離と段階的に進行する。この段階的な形態変化は、芽胞形成期に特異的に機能する転写制御因子 (**Spo0A** や **SpoIID** など) やシグマ因子 (**SigF**、**SigE**、**SigG**、**SigK** など) によって厳密に制御されている。枯草菌は栄養源の枯渇などの芽胞形成開始シグナルを感知すると、ヒスチジンリン酸化酵素 (**KinA** や **KinB** など) を活性化し、**Spo0A** をリン酸化する。リン酸化 **Spo0A** は *sigF* や *sigE* の転写を誘導する。不等分裂後に **SigF** 及び **SigE** は活性化され、**SigF** はフォアスポア内、**SigE** は母細胞内で機能する。エンガルフメント後にフォアスポア内で **SigG**、母細胞内で **SigK** が働き、スポアコートが形成され、芽胞が成熟する。**SpoIID** は **SigE** に依存して発現し、*sigK* の転写を活性化し、芽胞形成後期の形態変化を促進する。しかし、枯草菌においても芽胞形成を開始するための環境応答システムは未だに解明されていない。

本章では、まず B 型ボツリヌス菌の芽胞形成における形態変化を観察し、枯草菌で機能が明らかな芽胞形成遺伝子の発現について解析した。また、継代培養が B 型ボツリヌス菌の芽胞形成能に与える影響について検討した。

B 型ボツリヌス菌は枯草菌と同様に段階的な形態変化 (不等分裂、エンガルフメント、スポアコート形成など) を経て耐熱性芽胞を形成することが明らかとなった。各遺伝子の発現解析から、枯草菌と同様に B 型ボツリヌス菌においても **Spo0A**、**SigF**、**SigE**、**SpoIIE** は芽胞形成の初期に、**SigG**、**SigK**、**SpoIID** は芽胞形成の後期に働くと考えられる。B 型菌 111 株を継代培養することで、芽胞形成能が低下した菌 (111 Δ2) が出現した。111 Δ2 は耐熱性が著しく低下しており、不等分裂などの芽胞形成期に特徴的な形態が観察されなかった。さらに *sigF*、*sigE*、*spoIIE* の発現が有意に低下していたことから、111 Δ2 は **Spo0A** のリン酸化が障害されていると考えられる。そこで、**Spo0A** リン酸化酵素の候補として 4 つのヒスチジンリン酸化酵素 (**CBB2_0315**、**CBB2_0318**、**CBB2_1026**、**CBB2_2275**) を選出し、各遺伝子の発現解析を行った結果、111 Δ2 では **CBB2_1026** の発現量が有意に低いことが明らかとなり、**CBB2_1026** が B 型ボツリヌス菌の芽胞形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第2章 B 型ボツリヌス菌 111 株の全ゲノム解析

本章では、B 型ボツリヌス菌 111 株及び 111 Δ2 の全ゲノム配列を決定し、比較することで芽胞形成能の低下の原因を探究し、B 型ボツリヌス菌の芽胞形成に関与する未知の分子の探索を試みた。

111 株のゲノムは、**3,901,300 bp** の染色体及び **265,575 bp** のプラスミド (**pCB111**)

で構成されていた。111 株と 111 Δ2 の比較ゲノム解析の結果、染色体上に 103 カ所の変異が見つかり、111 Δ2 には、プラスミド pCB111 の配列は存在しなかった。しかし、第 1 章の継代培養において、プラスミドが脱落しているが、芽胞形成能を有している菌が複数分離されたことから、プラスミド pCB111 は 111 株の芽胞形成に関与していないと考えられる。

染色体上の遺伝子変異のうち、多くはアミノ酸変異を伴わない同義置換であった。アミノ酸変異を伴う非同義変異は 11 個の CDS で見つかり、その中の 3 つの CDS は、アミノ酸をコードしたコドンが終止コドンに変わるナンセンス変異として見つかった。ナンセンス変異が生じた遺伝子の機能予測を行ったところ、CBB2_1444 は Conserved hypothetical protein、CBB2_2258 は Flagellin motor switch protein FliM、CBB2_2914 は Hypothetical protein であった。

111 Δ2 で変異が見つかった遺伝子の機能解析は、B 型ボツリヌス菌における Spo0A リン酸化の分子機構や枯草菌においても未解明な芽胞形成を開始するための環境応答システムの解明に繋がると考えられる。

第 3 章 B 型ボツリヌス菌における芽胞形成関連遺伝子の機能解析

本章では、B 型ボツリヌス菌の芽胞形成初期に関わるシグマ因子 (SigF 及び SigE) 及び転写制御因子 SpoIIID の機能を解析すること、芽胞形成に関与するヒスチジンリン酸化酵素を同定することを目指した。さらに、第 2 章で示唆された Flagellar motor switch protein FliM の芽胞形成への関与について検討した。

ClosTron 法を用いて、B 型ボツリヌス菌 111 株の各遺伝子の破壊株を作製した。sigF 及び sigE の破壊株では、不等分裂は観察されたが、エンガルフメントは観察されず、耐熱性芽胞の形成は認められなかった。spoIIID の破壊株では、sigK の転写が抑制されており、耐熱性芽胞の形成率が有意に低下していた。枯草菌の spoIIID の転写は SigE に誘導されるが、B 型ボツリヌス菌では spoIIID の転写に SigE は必須ではなく、SigF が必須であることが明らかとなった。B 型ボツリヌス菌と枯草菌の間で、SpoIIID の機能はよく保存されているが、spoIIID の転写制御には違いがあることが示唆された。

ヒスチジンリン酸化酵素 CBB2_0315、CBB2_0318、CBB2_1026、CBB2_2275 のすべての破壊株において、耐熱性芽胞の形成率が有意に低下した。特に CBB2_1026 の破壊株では、不等分裂していない栄養型細胞が多く観察され、耐熱性芽胞の形成率の低下が顕著であった。さらに sigF、sigE、spoIIE の発現量が有意に低下していたことから、Spo0A のリン酸化が抑制されていると考えられた。また、CBB2_0315、CBB2_0318、CBB2_1026、CBB2_2275 のリン酸化活性部位のアミノ酸配列の相同性が高いことから、ヒスチジンリン酸化酵素 CBB2_0315、CBB2_0318、CBB2_1026、CBB2_2275 は Spo0A のリン酸化酵素であることが示唆された。

fliM を単独で破壊しても 111 株の芽胞形成に影響しなかった。**FliM** は B 型ボツリヌス菌の芽胞形成に関与していないと考えられる。

結論

1. B 型ボツリヌス菌は枯草菌と同様に、段階的な形態変化を経て耐熱性芽胞を形成することが明らかとなった。シグマ因子 **SigF** 及び **SigE** は芽胞形成過程のエンゲルメントに必須であり、転写制御因子 **SpoIIID** は *sigK* の転写を活性化し、芽胞形成後期の形態変化を促進することが示された。
2. 枯草菌とは異なり、B 型ボツリヌス菌では、*spoIIID* の転写に **SigE** は必須ではなく、**SigF** が必須であることが明らかとなった。
3. B 型ボツリヌス菌の芽胞形成に関与するヒスチジンリン酸化酵素 **CBB2_0315**、**CBB2_0318**、**CBB2_1026**、**CBB2_2275** を同定した。これらのヒスチジンリン酸化酵素は **Spo0A** のリン酸化に関与すると考えられる。
4. B 型ボツリヌス菌 111 株を継代培養することで、芽胞形成能が低下した菌 (111 Δ2) を分離し、111 株及び 111 Δ2 の全ゲノム配列を決定した。111 Δ2 は、**Spo0A** のリン酸化に異常が生じたため、芽胞形成を開始できないと考えられる。

審査結果の要旨

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) はグラム陽性偏性嫌気性桿菌で耐熱性芽胞を形成し、土壌や河川などの環境中に広く分布している。本菌はボツリヌス神経毒素 (**Botulinum neurotoxin**, **BoNT**) を産生し、ヒトや動物にボツリヌス症を引き起こす。**BoNT** は抗原性の異なる A 型~G 型に分類されており、国内では主に A、B、E 型菌による食餌性ボツリヌス症及び A、B 型菌による乳児ボツリヌス症の発生が報告されている。ボツリヌス菌は芽胞を形成し、自然界の厳しい環境に耐えながら生存している。芽胞は食品内や 1 歳未満の乳児の腸管内など、増殖に適した環境に置かれると、発芽、増殖し、神経毒素を産生する。ボツリヌス症のリスク要因は、高い致死活性を有する毒素だけでなく、耐熱性を有する芽胞も重要な要因の 1 つである。しかし、ボツリヌス菌の芽胞形成や発芽の分子機構はこれまでにほとんど解明されていない。本研究では、B 型ボツリヌス菌の芽胞形成機構を分子レベルで解明すること

を目的として、日本国内で発生した乳児ボツリヌス症患者由来 **B** 型菌 111 株を用いて、芽胞形成期における遺伝子発現解析及び芽胞形成関連因子の機能解析を行い、以下の成果を得た。

第 1 章では、**B** 型ボツリヌス菌の芽胞形成における形態変化と遺伝子発現および継代培養が **B** 型ボツリヌス菌の芽胞形成能に与える影響について検討した。**B** 型ボツリヌス菌は枯草菌と同様に段階的な形態変化（不等分裂、エンガルフメント、スポアコートの形成など）を経て耐熱性芽胞を形成することが明らかとなった。各遺伝子の発現解析から、枯草菌と同様に **B** 型ボツリヌス菌においても **Spo0A**、**SigF**、**SigE**、**SpoIIE** は芽胞形成の初期に、**SigG**、**SigK**、**SpoIIID** は芽胞形成の後期に働くと考えられた。**B** 型菌 111 株を継代培養することで、芽胞形成能が低下した菌（111 Δ2）は耐熱性が著しく低下しており、不等分裂などの芽胞形成期に特徴的な形態が観察されなかった。さらに **sigF**、**sigE**、**spoIIE** の発現が有意に低下していたことから、111 Δ2 は **Spo0A** のリン酸化が阻害されていると考えられた。そこで、**Spo0A** リン酸化酵素の候補として 4 つのヒスチジンリン酸化酵素（**B0392**、**B0396**、**B1169**、**B2990**）を選出し、各遺伝子の発現解析を行った結果、111 Δ2 では **B1169** の発現量が有意に低いことが明らかとなり、**B1169** が **B** 型ボツリヌス菌の芽胞形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第 2 章では、**B** 型ボツリヌス菌 111 株および 111 Δ2 の全ゲノム配列を決定し、比較することで芽胞形成能の低下の原因を探究し、**B** 型ボツリヌス菌の芽胞形成に関与する未知の分子の探索を試みた。111 株のゲノムは、3,901,300 bp の染色体および 265,575 bp のプラスミド（**pCB111**）で構成されていた。111 株と 111 Δ2 の比較ゲノム解析の結果、染色体上に 103 カ所の変異が見つかり、111 Δ2 には、プラスミド **pCB111** の配列は存在しなかった。しかし、111 Δ2 を得る過程で分離されたプラスミド脱落株の一部は芽胞形成能を有していたことから、プラスミド **pCB111** は 111 株の芽胞形成に関与していないと考えられた。染色体上の遺伝子変異のうち、多くはアミノ酸変異を伴わない同義置換であった。アミノ酸変異を伴う非同義変異は 11 個の **CDS** で見つかり、その中の 3 つの **CDS** では、アミノ酸のコドンが終止コドンに変わるナンセンス変異が見つかった。しかし、いずれの **CDS** も芽胞形成とは無関係の遺伝子であった。

第 3 章では、**B** 型ボツリヌス菌の芽胞形成初期に関わるシグマ因子（**SigF** 及び **SigE**）と転写制御因子 **SpoIIID** の機能解析および芽胞形成に関与するヒスチジンリン酸化酵素の特定を行った。**Clostron** 法を用いて、**B** 型ボツリヌス菌 111 株の各遺伝子破壊株を作製した。**sigF** および **sigE** の破壊株では、不等分裂は観察されたが、エンガルフメントは観察されず、耐熱性芽胞の形成は認められなかった。**spoIIID** の破壊株では、**sigK** の転写が抑制されており、耐熱性芽胞の形成率が有意に低下していた。枯草菌の **spoIIID** の転写は **SigE** に誘導されるが、**B** 型ボツリヌス菌では **spoIIID** の転写に **SigE** は必須ではなく、**SigF** が必須であることが明らかとなった。ヒスチジンリン酸化酵素 **B0392**、**B0396**、**B1169**、**B2990** のすべての破壊株において、耐熱性芽胞の形成率が有意に低下した。特に **B1169** の破壊株では、不等分裂していない栄養型細胞が多く観察され、芽胞形成率の低下が顕著であった。さらに **sigF**、**sigE**、**spoIIE**

の発現量が有意に低下していたことから、**Spo0A** のリン酸化が抑制されていると考えられた。また、**B0392**、**B0396**、**B1169**、**B2990** のリン酸化活性部位のアミノ酸配列の相同性が高いことから、ヒスチジンリン酸化酵素 **B0392**、**B0396**、**B1169**、**B2990** は **Spo0A** のリン酸化酵素であることが示唆された。

以上、本研究はボツリヌス **B** 型菌の芽胞形成において *spoIIID* 遺伝子の転写制御に枯草菌と異なる分子機構が存在することを示した。全ゲノム解析より芽胞形成に関与するヒスチジンリン酸化酵素を同定し、本酵素が **Spo0A** のリン酸化を活性化することで芽胞形成を開始することを明らかにした。これらの成果は **B** 型ボツリヌス菌において未解明な芽胞形成開始の環境応答メカニズムの解明、さらにはボツリヌス症を含むクロストリジウム感染症やボツリヌス食中毒の発症メカニズムの解明に繋がり、医学、獣医学の発展に貢献するものである。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。