

ウェルシュ菌ゲノムにおける病原性調節ネットワークの包括的解析

●清水 徹

筑波大学基礎医学系

研究の目的と進め方

ウェルシュ菌はグラム陽性嫌気性桿菌であり、様々な毒素を産生しヒトにガス壊疽や食中毒などの感染症を引き起こす。すでにウェルシュ菌の全ゲノム配列が決定され、3,031,430bpの染色体と54,311bpのプラスミドを持つことが明らかとなり、それぞれの遺伝子のアノテーション作業が完了した。本研究では、ウェルシュ菌ゲノム情報から抽出した約20の新規病原遺伝子候補や枯草菌に存在しない機能未知遺伝子群などについて、これらの遺伝子の発現をマイクロアレイなどの方法を用いて包括的に解析することにより、本菌の病原性の解析を行うことを主たる目的とした。

2001年度の研究の当初計画

(1)ウェルシュ菌ゲノム情報から検索した病原遺伝子候補の解析

ウェルシュ菌ゲノム塩基配列データからすでに同定されているヘモリジン、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、腸管毒素、などの病原因子となりうる遺伝子(約20遺伝子)について、その発現調節機構を解析する。

(2)枯草菌と類似性のない機能不明遺伝子の解析

ウェルシュ菌ゲノム情報より枯草菌の遺伝子と類似性のない機能不明遺伝子群を同定後、マイクロアレイフィルター等を作製し個々の遺伝子の発現制御を検討し、機能不明遺伝子が本菌の病原性に関与する可能性を検討する。

2001年度の成果

(1)ウェルシュ菌全ゲノム配列の決定

ウェルシュ菌の全ゲノム塩基配列を決定し、同じClostridium属の非病原菌である*C.acetobutylicum*のゲノムと比較して報告した。

(2)ウェルシュ菌の病原因子発現調節機構の解析

当初計画(1)にあるように本菌の病原因子の発現調節機構の解析を行い、新たに毒素遺伝子を調節する機能RNA(VR-RNA)の存在を明らかにした。このVR-RNAはウェルシュ菌の二成分制御系VirR/VirSにより正に発現調節されるRNAで、その変異株の解析より本菌のalpha-およびkappa-毒素遺伝子の転写を調節する二次的調節因子であることが判明した。さらにVR-RNAはそれがコードしているペプチドではなく、RNA自身が毒素遺伝子の転写調節に関与することが明らかとなった。本研究により、ウェルシュ菌における転写調節RNAの存在が明らかとなり、本菌には複雑な病原因子産生調節機構が存在することが示唆された。

(3)ウェルシュ菌マイクロアレイの作成

当初計画(2)の準備として、ウェルシュ菌ゲノムのマイクロアレイを作成した。ウェルシュ菌の全ORF(2,660個)の特異的部分をPCRで増幅し、大腸菌に全てクローニング後、PCRにてDNA断片を作成しスライドガラスにスポットした。予備的な実験によると、ウェルシュ菌のVirR/VirSシステムにより少なくとも100以上の遺伝子が正または負に調節されていることが示唆されている。

国内外での成果の位置づけ

国内・国外を通じてウェルシュ菌のゲノム配列決定は初めてであり、今後他の病原性Clostridium属菌のゲノム解析に大いに有用であると考えられる。また、マイクロアレイを作成したことは本菌の病原遺伝子発現調節機構の解明に非常に有効な手段を提供するものと考えられ、国内・国外の研究者との共同研究も期待できる。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

2001年度はゲノム解析を主として行ったため、マイクロアレイの作成若干遅れることとなり、当初計画(2)の進行が十分ではなかった。

今後の課題

作成したウェルシュ菌マイクロアレイをいかに活用して本菌の病原性調節機構の解明を進めていくか、が今後の重要な課題である。

成果公表リスト

- 202181341
Shimizu, T., S. Ohshima, K. Ohtani, T. Shimizu, and H. Hayashi : Genomic map of Clostridium perfringens strain 13. Microbiol. Immunol. 45 : 179-189(2001).
- 202181351
Shimizu, T., Ohshima, K., Ohtani, K., Hoshino, K., Honjo, K., Hayashi, H., and Shimizu, T : Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in Clostridium perfringens. System. Appl. Microbiol. 24 : 149-156(2001).
- 202181358
Shimizu, T., Yaguchi, H., Ohtani, K., Banu, S., and Hayashi, H. : Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. Mol. Microbiol. 43 : 257-265(2002).
- 202181409
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).

