ウェルシュ菌における毒素産生調節

清水 徹

筑波大学 基礎医学系 微生物学講座
〒305 つくば市天王台1-1-1

〔受理: 1995年4月19日〕

ガス壊疽の起因菌、ウェルシュ菌は多種の毒素を産生し、これら毒素の協調的作用によりその特徴ある病態を形成すると考えられる。近年、分子生物学的手法の進歩によりこれらの毒素遺伝子が次々とクローン化される中で、本菌における毒素遺伝子の発現調節機構の解析も進んできた。これまでに毒素産生の調節遺伝子として、 θ -毒素の産生を正に調節する *pfoR* 遺伝子、多種の毒素をグローバルに調節する二成分制御系に属する *virR-virS* 遺伝子が発見され、また、 α -毒素遺伝子の発現を調節すると思われる調節因子の存在などが明らかとなっている。その他の調節系として、ウェルシュ菌の産生する低分子物質が関与すると思われる毒素産生調節機構の存在も示唆されている。ウェルシュ菌の病原性については未だに混沌としているのが現状であるが、これらの調節遺伝子、あるいは調節機構がどのように結びついて毒素産生が調節されているのかを明らかにすることは、本菌の病原性を解明する上でのもう一つのアプローチとして重要と考えられる。

I. はじめに

ガス壊疽の起因菌として知られるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は多種類の毒素を産生し、これら毒素の協調的作用によってその特徴ある病態を形成すると考えられている。つまり、単一の毒素による作用ではその病態全てを説明できず、むしろ多種の外毒素が毒素群として作用することでガス壊疽という感染症を惹起すると考えられている。むしろさまざまな宿主側の要因もウェルシュ菌感染症の病態に関わっていると考えられるが、寄生体が宿主内で多種類の外毒素を同時に産生して病態を形成することは、化膿性菌の病態

を考える上で重要な所見である。このように協調的に作用する毒素群はウェルシュ菌において無秩序に産生され、ガス壊疽という病態を惹起するか、それとも個々の病原性因子がある種の統括的な機構で発現の調節がなされているのか、を解明することが筆者の興味の中心であり、本稿の主題である。

分子生物学の進歩にともなってウェルシュ菌の病原性遺伝子の研究が急速に進み、ほとんどの毒素遺伝子がクローン化されその構造が明らかになりつつある。しかし、病原性遺伝子の発現調節の研究はまだ始まったばかりであり、本稿ではこれまでに明らかになっているウェルシュ菌の病原因子の発現調節について概説し、その知見にもとづいて発現調節のモデルを提示し、今後の研究の方向を考察したいと思う。

Tohru SHIMIZU

Regulation of the Toxin Production in *Clostridium perfringens*

Department of Microbiology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305

II. ウェルシュ菌における病原因子産生調節の解析

1) a 物質の発見

1973年に東ら (1) がウェルシュ菌 PB6K 株において興味深い事実を報告している。それは、ニトロソグアニジン処理により分離したウェルシュ菌の θ -毒素非産生株の間にはある相補性があり、その相補によって非産生株からの毒素産生性が回復するという事実である。ある特定の変異株同士を同じプレート上にて交叉画線培養を行うと、交叉した場所に溶血が観察され、どちらか一方の変異株が θ -毒素産生能を回復したことが観察された。この相補性によって θ -毒素非産生株を二つのグループに分け、 θ -毒素の産生を回復する株を b-型、交叉画線培養によって b-型の菌に θ -毒素を産生させる株を a-型と命名した。この現象は菌同士の直接の接触のみならず、少し離れたコロニー同士やセロハン膜を介しても起こることから、a-型の菌から何らかの物質（セロハン膜を透過する分子量の）が産生され、それを b-型の菌が受容することで b-型の菌は毒素産生能を回復するのではないかと推察した。すなわち、b-型の菌は θ -毒素の産生を刺激する物質が欠如し、a-型の菌は θ -毒素構造遺伝子に変異を起こしているために、表現型 (phenotype) として θ -毒素非産生株となっていると仮説をたて、 θ -毒素産生を刺激する物質を a 物質と命名した。

a 物質は θ -毒素の産生を指標として発見されたが、その後この物質がウェルシュ菌の他の毒素、コラゲナーゼ (κ -毒素)、プロテアーゼ (λ -毒素)、血球凝集素 (HA) の産生をも相補することが見いだされた (2)。つまり b-型の菌は a 物質の刺激によってこれら 4 種類の毒素の産生能を同時に回復することが明らかとなった。このことにより、a 物質は毒素の産生を統括的 (グローバル) に調節する因子であろうと推測され、ウェルシュ菌において初めて毒素産生の調節機構が存在することを示唆したものである。

a 物質についてその精製や性状の解析が試みられているが、なお明らかにされていない。しかしながら、今川ら (3) が a 物質の部分精製を行った結果、その性状は、1) 活性が非常に不安定で

あり、一定性がないこと、2) 低温保存中に活性が上昇する、など特異な物質であるらしいという。現在までのところ、a 物質についてはその物性、分子構造や分子量なども明らかになっておらず、a 物質の毒素産生調節機構についての遺伝学的背景は全く不明である。

a 物質という低分子物質がウェルシュ菌の多種の毒素産生を刺激するという事実は、非常に興味深い現象である。とくに、最近になって *Vibrio fischeri*、緑膿菌、腸球菌などにおいて、菌体から分泌される低分子物質（ホモセリンラクトン誘導体、小分子ペプチドフェロモンなど）がシグナルとなり、菌の病原因子産生、発光や接合などをコントロールしていることが報告され、明らかに細胞間情報伝達 (cell to cell communication) が存在することが示されたからである (4, 5)。筆者らの研究室においても、 θ -毒素変異株を分離し、東らの相補性実験を追試したところ、ウェルシュ菌 strain 13 においても全く同じ現象が見られた。 θ -毒素産生変異株同士が交叉したところのみ明らかに溶血が観察され、おそらくは a 物質が細胞間で伝授され、一方の変異株で θ -毒素の産生能が回復することが確認された (図 1)。ウェルシュ菌の病原因子発現の調節にこのような細胞間情報伝達が存在することは、本菌の感染症成立機構を考える上で新たな概念の導入が必要である

図 1. ウェルシュ菌 θ -毒素変異株による溶血相補性

表1. クローン化されたウェルシュ菌の毒素遺伝子

毒 素	機能他	遺伝子	文 献
α -毒素	ホスホリパーゼ C	<i>plc</i>	6, 7, 8, 9, 10
β -毒素	致死・壊死毒	<i>cpb</i>	11
ϵ -毒素	致死・壊死毒	<i>etx</i>	12
ι -毒素	ADP-リボシラーゼ	Ia, Ib	13
θ -毒素	パーフリンゴリジン O, 溶血毒	<i>pfoA</i>	14, 15, 16
κ -毒素	コラゲナーゼ, ゼラチナーゼ	<i>colA</i>	17
シアリダーゼ			18
エンテロトキシン	腸管毒	<i>cpe</i>	19, 20

ことを示唆するとともに、本菌に情報伝達系 (signal transduction system) による毒素産生調節機構が存在することを示唆している。

2) θ -毒素産生を調節する *pfoR* 遺伝子の同定

ウェルシュ菌の毒素遺伝子は次々にクローニングされ、数多くの毒素の遺伝子構造とタンパクの一次構造が明らかとなった (表1)。これらの毒素遺伝子の構造解析から、転写制御の機構が存在する可能性が指摘されているが、実際に証明されている例は少ない。筆者らはウェルシュ菌の θ -毒素 (perfringolysin O) 遺伝子 (*pfoA*) を大腸菌にクローニングした際に、その上流に *pfoA* 遺伝子の発現を正に調節する領域が存在することを見いだした (14) (図2)。この領域には1つのオー

ブンリーディングフレーム (open reading frame ; ORF) が存在し、塩基配列より推測されたペプチドには DNA 結合タンパクの特徴であるヘリックス・ターン・ヘリックスや, SPXX, TPXX などのモチーフが見られた。この調節領域を欠失させると、*pfoA* 遺伝子の発現が約 1/20 に低下したことから、この領域に *pfoA* 遺伝子の発現を正に調節する遺伝子が存在すると推論し、この調節遺伝子を *pfoR* と命名した。*pfoR* 遺伝子は343アミノ酸をコードする完全な遺伝子構造を持つことより、この遺伝子はトランス作用性の調節遺伝子と考えられた。*pfoR* 遺伝子と *pfoA* 遺伝子を別々のレプリコン上へのせ、大腸菌内でトランス作用性を調べたところ、*pfoR* の *pfoA* に対する顕著な活

図2. *pfoR* 遺伝子のデリーションによる解析

性促進効果は観察されなかった。ところが、同一レプリコン上で *pfoR* と *pfoA* 遺伝子の相対的位置を逆にすると、わずかではあるが有意に活性促進効果が観察された (図2)。この促進の効果は *pfoR* と *pfoA* 遺伝子の距離に反比例していたことから、*pfoR* 遺伝子はトランス作用性であるが、効率の良い活性化を行うためには標的遺伝子の近傍に存在することが不可欠であると結論した (シス優性活性化, *cis-dominant activation*)。また、*pfoR* と *pfoA* 遺伝子の間には多数のパリンドローム構造やダイレクトリピートが存在し、これらの構造が *pfoR* 遺伝子のコードする調節タンパクの結合部位であると考えられた。

pfoR 遺伝子は、ウェルシュ菌ではじめて実験的に証明された外毒素産生を制御する遺伝子であり、 θ -毒素の産生を調節する遺伝子として本菌の病原性に深く関わっているものと思われる。

3) 二成分制御系に属する *virR-virS* 遺伝子

ウェルシュ菌の遺伝子解析が他の菌より遅れていた理由の一つは、本菌を用いた遺伝子操作が困難であったことである。しかし、形質転換が可能なウェルシュ菌 (*C. perfringens* A 型 13株) が発見され、また、いわゆるシャトルベクター—ウェルシュ菌より分離されたプラスミドに大腸菌の複製開始部位を挿入したプラスミド (pJIR418)—が開発されたことにより、ウェルシュ菌における遺伝子操作が可能となってきた (21)。

θ -毒素遺伝子 (*pfoA*) の発現調節機構を調べるために、ニトロソグアニジン処理によってウェルシュ菌 13株の θ -毒素変異株を作製した (22)。 θ -毒素による溶血が観察されない変異株計 12株を分離し、それぞれに *pfoA* 遺伝子を挿入したプラスミド (pTS608) をエレクトロポレーション (electroporation) によって形質転換し、溶血活性の発現を調べた。その結果、溶血能を獲得した変異株と発現しないものとの二つのグループに分かれた。一方のグループ (SI107) は pTS608 の形質転換により明らかに溶血活性を回復し、他方のグループ (SI112) は溶血活性を回復しなかったことから、SI107 には θ -毒素構造遺伝子の変異、また、SI112 には θ -毒素遺伝子の調節遺伝子の変異があるものと推論し、これを検証するために SI112 へウェルシュ菌染色体ライブラリーを

形質転換し、溶血が回復する株をスクリーニングした。10,000株のうち 4 株に溶血の回復が見られ、これらの株には全て同じサイズの染色体断片が挿入されていた。この株から得られたプラスミド pBT404 の挿入断片を解析し、 θ -毒素遺伝子の発現を調節する領域の全塩基配列を決定したところ、この領域には 1 つの ORF が存在した (図3)。この ORF は 246 アミノ酸をコードしており、推測されるアミノ酸配列に対する相同性検索の結果、予測されるタンパクは細菌の二成分制御系のレスポンスレギュレーター (response regulator) と非常に相同性が高かった。そこでこの遺伝子は環境の変化にともなって θ -毒素遺伝子の発現を調節する二成分制御系のレスポンスレギュレーター遺伝子と考え、*virR* 遺伝子と命名した。

virR 遺伝子は、さらに詳しく調べてみると、少なくとも θ -毒素、 κ -毒素 (コラゲナーゼ)、血球凝集素 (HA) の 3 種の病原因子の産生を正に調節していることが明らかとなり、また、*virR* 遺伝子のみをノックアウトした変異株 (TS133) の解析においても同様の結果が得られ、*virR* 遺伝子はウェルシュ菌の病原性をグローバルに調節する遺伝子であろうと推察した。また、それらの調節は転写レベルで行われ、*virR* 遺伝子産物がそれぞれの遺伝子のプロモーターを直接活性化している可能性が考えられた。

細菌内の情報伝達を司るの二成分制御系は、外界からの刺激 (環境変化) を感知するセンサーの役割をし、それ自体がヒスチジinkinase の活性を持つ分子と、センサーにより感知された情報を細胞内に伝えるレスポンスレギュレーターとの 2 種のタンパク分子から成り立つ場合が多く、リン酸化のカスケード反応でシグナルを細胞内に伝達する情報伝達機構を形成している (23)。pBT404 上にクローン化された染色体断片には *virR* 遺伝子のすぐ下流に一部塩基配列が重複してもう一つ ORF が存在し、筆者らが塩基配列を決定した範囲ではこの ORF のコードするタンパクは非常に疎水性が高く、また疎水性部分の C 末端側にある親水性の部分にヒスチジン残基をコードする部分が存在したため、この ORF が二成分制御系のセンサーであるヒスチジinkinase をコードする可能性が高いと思われた。オースト

図3. *virR-virS* 遺伝子
制限酵素の略称 P, *Pst*I ; Hc, *Hinc*III ; Bg, *Bgl*II ; Hd, *Hind*III ; E, *Eco*RI.

ラリアの Lyristis ら (24) はトランスポゾン *Tn916* を用いた変異株の解析から、この *virR* の下流に存在する ORF が *Tn916* の挿入によって変異した株でも、多種の毒素の産生が見られなくなると報告した。この ORF を *virS* 遺伝子と命名し、タンパクの相同性より二成分制御系のヒスチジンキナーゼを持つ分子をコードしていると結論した (図3)。彼らの解析によると、*virS* の変異によって θ -毒素、シアリダーゼ、プロテアーゼの産生がほとんど見られなくなり、また、 α -毒素の産生も有意に減弱していたという。このことから、ウェルシュ菌の α -毒素の産生調節には *virR-S* 遺伝子以外に、 θ -毒素などの制御機構とは異なった制御機構も関与していると推論している。同時に、彼らはウェルシュ菌 *virS* 変異株をマウスの筋肉に接種しその病原性を調べたところ、明らかに *virS* 変異株においてその病原性が減弱していたと報告している。このことは *virR-S* 遺伝子がさまざまな毒素産生を調節することによって、本菌の病原性 (ガス壊疽) に深く関わっていることを示唆している。

ウェルシュ菌にも、環境の変化にともなって病

原性遺伝子を制御する二成分制御系の調節遺伝子、*virR-S* が存在することが明らかとなり、また、*virR-S* 遺伝子がグローバルに複数の病原性遺伝子を調節していることから、これらの遺伝子が本菌の感染成立機構にも重要な役割を果たしているものと考えられる。

4) α -毒素遺伝子の調節機構

ウェルシュ菌の毒素産生に関わる調節遺伝子、*pfoR* や *virR-S* 遺伝子が発見されてきたが、本菌の主要な病原性毒素である α -毒素 (25) の産生調節系は、Lyristis らは *virR-S* 遺伝子が α -毒素の産生調節に一部関わっていると報告しているが、まだ明らかとなっていない。

α -毒素産生の調節については、Toyonaga ら (26) が α -毒素遺伝子 (*plc*) のプロモーター上流の解析を報告している。それによると、*plc* 遺伝子の上流には DNA ベンディング (DNA bending) に関わる (dA)5-6 の繰り返し配列 (リピート) が3個存在し、これらのリピートを2個欠失させると α -毒素の産生が著しく上昇したことから、この DNA ベンディングを形成する配列が *plc* 遺伝子の発現を負に調節していると推論している。

図4. *plc* 遺伝子に結合する A 型および C 型菌のタンパク
(Katayama et al. 1993 を改変)

つづいて、Katayama ら (27) は α -毒素の産生が低い C 型ウェルシュ菌から *plc* 遺伝子をクローニングし大腸菌内で発現させると、A 型の *plc* 遺伝子による α -毒素の産生量と同程度であることから、ウェルシュ菌においては *plc* 遺伝子以外の何らかの因子によって、 α -毒素の産生性の差が規定されていると推論した。そこで A 型および C 型菌の菌体内タンパクを用いたゲルシフトアッセイ (gel shift assay) により、*plc* 遺伝子のプロモーター部位を含む断片と *plc* 遺伝子のコーディング領域とに結合するタンパクの存在を調べた。その結果、コーディング領域に結合するタンパクは A 型菌にのみ存在し (図 4)、このコーディング領域への DNA 結合タンパクがウェルシュ菌の菌型による α -毒素産生量の差に関与しているとともに、*plc* 遺伝子の発現量を調節する調節因子である可能性が高いと考察している。

これらの一連の研究結果より、特異的に α -毒素の産生を調節する機構が存在することが明らかとなったが、まだ DNA 結合タンパクの遺伝子などは同定されておらず、今後の研究の進展が期待される。

III. まとめ一点と点をつなぐもの

これまでに明らかとなったウェルシュ菌における病原因子の産生調節機構について概観してみたが、これらの実験事実の点を線で結んでみると以下のような一連の制御機構が考えられる (図 5)。

二成分制御系の *virR-S* 遺伝子からそれぞれレスポンスレギュレーターである VirR タンパクとヒスチジinkinナーゼ活性を有する VirS タンパクが産生される。センサーである VirS は膜に局在し、外界の環境変化に応答し ATP を消費して自らをリン酸化する。VirS は細胞質内に存在するおそらくは可溶性のタンパク VirR をリン酸化することで情報を伝達し、リン酸化された VirR は転写促進因子として θ -毒素、 κ -毒素、血球凝集素、シアリダーゼ、プロテアーゼ、そして一部 α -毒素などの産生を促進するのであろう。いずれにせよ、これらの毒素の産生によってウェルシュ菌は病原性を発揮し、毒素群の協調的作用によって筋肉・結合組織の壊死というガス壊疽の病態を形成するのであろう。

以上が現在までに明らかにされている点を線で結んだ推論であるが、まだまだ不明な点が多い。

図 5. 現在考えられるウェルシュ菌の毒素産生調節機構

VirS が感知する刺激は何か？ 各毒素遺伝子はリン酸化を受けた VirR によって直接活性化されるのか、それとも VirR が他の未知の調節遺伝子を介して間接的に毒素遺伝子を調節しているのか？ VirR と *pfoR* 遺伝子との関係は？ a 物質はこの調節系のどこに関与しているのか？ などこれから解明していかなければならない問題が残されている。いくつかの調節遺伝子が同定されたり、あるいはその存在が示唆されている段階において、次の問題は個々の因子の相互作用、いわゆる「遺伝子調節ネットワークの形成」であろう。*pfoA* 遺伝子は VirR によって活性化された *pfoR* 遺伝子産物を介して調節されているらしいこと、コラゲナーゼ遺伝子 (*colA*) は *pfoA* 遺伝子とは異なった系で VirR に調節されているらしいこと、a 物質の産生には *virR-S* 遺伝子は関与していないが、a 物質による毒素産生調節と *virR-S* 遺伝子による調節とは非常に類似点が多く、どこかでこの二つの調節系が交わっている可能性が高いことなどが示唆されている。

ウェルシュ菌の病原性因子産生の調節機構の解析はまだ始まったばかりであり、ここに述べた事項も研究の進展によっては変更を余儀なくされることがあるかも知れないが、現時点でのウェルシュ菌毒素産生調節に関する情報を整理することで今後の研究の進展に寄与できればと考える。

文 献

- Higashi, Y., Chazono, M., Inoue, K., Yanagase, Y., Amano, T., Shimada, K. (1973): Complementation of theta toxinogenicity between mutants of two groups of *Clostridium perfringens*. Biken J. **16**, 1-9.
- Imagawa, T., Tatsuki, T., Higashi, Y., Amano, T. (1981): Complementation characteristics of newly isolated mutants from two groups of strains of *Clostridium perfringens*. Biken J. **24**, 13-21.
- Imagawa, T., Higashi, Y. (1992): An activity which restores theta toxin activity in some theta toxin-deficient mutants of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Immunol. **36**, 523-527.
- Clewell, D.B., Weaver, K.E. (1989): Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. Plasmid **21**, 175-184.
- Kaiser, D., Losick, R. (1993): How and why bacteria talk each other. Cell **73**, 873-885.
- Leslie, D., Fairweather, N., Pickard, D., Dougan, G., Kehoe, M. (1989): Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with a *Bacillus cereus* phospholipase C. Mol. Microbiol. **3**, 383-392.
- Okabe, A., Shimizu, T., Hayashi, H. (1989): Cloning and sequencing of a phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **160**, 33-39.
- Saint-Joanis, B., Garnier, T., Cole, S.T. (1989): Gene cloning shows the alpha toxin of *Clostridium perfringens* to contain both sphingomyelinase and lecithinase activities. Mol. Gen. Genet. **219**, 453-460.
- Titball, R.W., Hunter, S.E., Martin, K.L., Morris, B.C., Shuttleworth, A.D., Rubidge, T., Anderson, D.W., Kelly, D. (1989): Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. Infect. Immun. **57**, 367-376.
- Tso, J.Y., Siebel, C. (1989): Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. Infect. Immun. **57**, 468-476.
- Hunter, S.E., Brown, J.E., Oyston, P.C., Sakurai, J., Titball, R.W. (1993): Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **61**, 3958-3965.
- Hunter, S.E., Clarke, I.N., Kelly, D.C., Titball, R.W. (1992): Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. Infect. Immun. **60**, 102-110.
- Perelle, S., Gibert, M., Boquet, P., Popoff, M.R. (1993): Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. Infect. Immun. **61**, 5147-5156.
- Shimizu, T., Okabe, A., Minami, J., Hayashi, H. (1991): An upstream regulatory sequence stimulates expression of the perfringolysin O gene of *Clostridium perfringens*. Infect. Immun. **59**, 137-142.
- Twetén, R.K. (1988): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the perfringolysin O (theta-toxin) gene from *Clostridium perfringens* and characterization of the gene product. Infect. Im-

- mun. **56**, 3228–3234.
- 16) Tweten, R.K. (1988): Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta-toxin) from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. Infect. Immun. **56**, 3235–3240.
 - 17) Matsushita, O., Yoshihara, K., Katayama, S.-I., Minami, J., Okabe, A. (1994): Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. J. Bacteriol. **176**, 149–156.
 - 18) Roggentin, P., Rothe, B., Lottspeich, F., Schauer, R. (1988): Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. FEBS Lett. **238**, 31–34.
 - 19) Czeizulin, J.R., Hanna, P.C., McClane, B.A. (1993): Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. Infect. Immun. **61**, 3429–3439.
 - 20) Van Damme-Jongstein, M., Wernars, K., Notermans, S. (1989): Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. Antonie van Leeuwenhoek **56**, 181–190.
 - 21) Rood, J.I., Cole, S.T. (1991): Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Rev. **55**, 621–648.
 - 22) Shimizu, T., BaThein, W., Tamaki, M., Hayashi, H. (1994): The *virR* gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of the perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. **176**, 1616–1623.
 - 23) Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive response in bacteria. Microbiol. Rev. **53**, 450–490.
 - 24) Lyrstis, M., Bryant, A.E., Sloan, J., Awad, M.M., Nisbet, I.T., Stevens, D.L., Rood, J.I. (1994): Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol. Microbiol. **12**, 761–777.
 - 25) 櫻井 純, 永浜政博, 越智定幸 (1994) : ウェルシュ菌 α 毒素の作用. 日本細菌学雑誌. **49**, 719–736.
 - 26) Toyonaga, T., Matsushita, O., Katayama, S.-I., Minami, J., Okabe, A. (1992): Role of the upstream region containing an intrinsic DNA curvature in the negative regulation of the phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Immunol. **36**, 603–613.
 - 27) Katayama, S.-I., Matsushita, O., Minami, J., Mizobuchi, S., Okabe, A. (1993): Comparison of the alpha-toxin genes of *Clostridium perfringens* type A and C strains: evidence for extragenic regulation of transcription. Infect. Immun. **61**, 457–463.