

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05654

研究課題名(和文) 劇症型感染症発症時における遺伝子発現ネットワークの階層構造の解明

研究課題名(英文) Comprehensive transcriptome analysis of group A streptococci using the murine invasive model reveals a key gene network causing severe invasive diseases

研究代表者

渡邊 真弥 (Watanabe, Shinya)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60614956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌は、比較的症状の穏やかな局所感染から重篤な劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)に症状が進行する際に、転写調節因子に変異を持った株が選択され高病原性の細胞が選択される。我々は、A群レンサ球菌をマウスに局所感染させることにより、4つの転写調節因子に変異を有する株を選択した。マウス感染モデルとRNA-seq解析を用いて、これらの変異により恒常的に高発現した遺伝子群を特定した。さらに、*in vivo*においてその中の一部の主要病原因子の遺伝子発現がより亢進されることを明らかにした。本研究により、STSSに関わる遺伝子発現機構の一端が明らかになったと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A群レンサ球菌はヒトに咽頭に常在する細菌である。A群レンサ球菌は、冬季の咽頭炎の原因菌であるにも関わらず、劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)のような致死率の高い感染症も同時に起こす。STSSの患者から分離された株は、転写調節因子に変異があり病原因子が高発現していることがわかっている。本研究では、マウス感染モデルを用いて、転写調節因子に変異がある高病原株が感染時に発現上昇する遺伝子の一群を同定した。

研究成果の概要(英文)：Group A streptococci (GAS) can acquire a hypervirulent phenotype in transitioning from localized to systemic infections. This involves mutations in global regulator genes, such as *csrS*, followed by broad transcriptional alterations. However, the key genes controlled by the regulators have not yet been fully determined. In this study, the entire genomes of randomly-selected animal-passed GAS colonies were sequenced, as was a *sdaD2* strain. The significantly reduced *csrS* mutation frequency in *sdaD2* was accompanied by increases in mutations of other regulatory genes, such as *rocA*. The *in vivo* transcriptome profiles of six mutated hypervirulent-associated regulators was evaluated by RNA sequencing to identify a set of genes responsible for the hypervirulent phenotype. Transcriptome analysis identified a network co-regulated by the regulators involved in transitioning to systemic disease. This gene cluster may be important in inducing severe systemic GAS infections.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 劇症型レンサ球菌感染症 マウス感染モデル ゲノム解析 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌感染症は、世界中で年間 7 億人が罹患する疾患である。本邦では、2014 年 10 月の小児咽頭炎の発生報告数が過去 5 年と比べかなり多く、2014 年から 2015 年にかけて流行する兆しがみられている。A 群レンサ球菌感染症の大部分は、症状が比較的穏やかな非侵襲性感染症だが、約 1%の症例で深刻な侵襲性感染症を引き起こし劇症化する。劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome: STSS) は 1980 年代に米国等ではじめて報告され、その致死率は 30~70%にもおよび、STSS は世界規模で蔓延している新興・再興感染症のひとつである。

2000 年代に入り、咽頭炎患者由来株と STSS 患者由来株の網羅的なゲノム・転写解析によって、STSS 患者由来株では、二成分制御系の転写調節因子 *covS* にフレームシフト変異が起こり、多種の病原因子が高発現していることが明らかとなった。さらに、STSS 患者由来株の中には、他の転写調節因子 *rgg* や *rocA* に変異が起こり、高病原化している株も報告されている。つまり、局所から重篤な全身性の感染症に移行する時に、A 群レンサ球菌の転写調節因子がフレームシフト変異等により破壊され、多種多様な病原因子の誘導が起こることが劇症化に重要であると示唆された。しかし、*covS* は、A 群レンサ球菌の全遺伝子の 15%の発現を制御するが、その全ての遺伝子変動が劇症化に必須であるか、またはその一部の重要遺伝子の発現変動が重要なのかは、本研究開始当初議論されているところである。

2. 研究の目的

A 群レンサ球菌は、比較的症状の穏やかな局所感染から重篤な劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) に症状が進行する際に、主要な病原因子を制御する転写調節因子に変異を持った株が選択され高病原性の細胞が選択される。しかし、STSS の発症に必須の病原因子群の全体像は明らかになっていない。本研究の目的は、マウス感染モデルを用いて A 群レンサ球菌の遺伝子発現ネットワーク解析を行い、STSS 発症に関わる遺伝子群を推定することである。

3. 研究の方法

(1) STSS 患者から分離された A 群レンサ球菌株のゲノム解析

STSS 患者から分離された臨床分離 A 群レンサ球菌株のゲノムを次世代シーケンサー等によりそのゲノムを決定した。

(2) マウス局所感染モデルによる高病原化株の in vivo 選択解析

A 群レンサ球菌 MIT1 株をマウスの皮下に接種し、継続的に菌を回収した。回収した菌のゲノムを解析し、変異を有する遺伝子を決定した。

(3) 変異株および転写調節因子の遺伝子欠損株のマウスに対する病原性解析

マウス局所感染モデルから回収した変異を有する菌の病原性を確認するために、マウス全身感染モデルを用いた。

(4) マウス全身感染モデルを用いた A 群レンサ球菌の網羅的遺伝子発現解析

A 群レンサ球菌の親株および病原性に関わると推測される転写調節因子のノックアウト株を、マウスに感染させ継続的に菌を回収した。回収した菌から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

STSS 患者から分離された臨床分離 A 群レンサ球菌株の約 71%には、病原因子を負に制御する *csrSR* (*covSR*) や *rgg* に変異を持っていることが報告されている (Ikebe T. et al. 2010 PLoS Pathogens. Ikebe T. et al. 2016 Scientific Report)。しかし、STSS 患者から分離されたにも関わらず、転写調節因子に変異を持っていない株も存在する。そこで、STSS 患者から分離された臨床分離株 107 株のゲノム解析を次世代シーケンサーにより行った。通常のゲノム解析により *csrSR* などの変異を検出できなかった STSS 由来株をさらに詳細に解析したところ、2 株において少量の read に *csrS* に変異を持っていることがわかった。つまり、これらの株は *csrS* 等に変異を有する細胞を少量含んでいることが推測された。

A 群レンサ球菌のゲノム解析を行っている中で、非常に稀な疾患である急性胃腸炎患者の血液から分離した A 群レンサ球菌のゲノム解析を行った。この菌株は、侵襲性感染症を引き起こしやすい流行型 emm89 型の株であった。ゲノムが報告されている他の emm89 型の株と比較したところ、表層タンパク *SciA* と M タンパク質のアミノ酸配列が異なっており、本疾患との関連性が推測された (Watanabe S et al. 2016 Genome Announcements 4 (5), e011133-16)。さらに、1994 年に本邦で劇症型レンサ球菌感染症患者より臨床分離された emm3 型の M3-b 株の全ゲノム配列を決定し、さらに 2 株の劇症型レンサ球菌感染症由来株と 3 株の非由来株の計 5 株の

emm3 型株のドラフトゲノムを決定し比較した。比較した株間で主要病原因子の保有に違いがほとんどみられなかったことを明らかにした (Ogura K, Watanabe S et al. 2017 Journal of Genomics. 5, 71-74)。

STSS 患者から臨床分離した株の中で *csrS* 遺伝子に変異を持った細胞を少量含むことが明らかになった GAS_476 株 (Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S et al. 2012 Journal of bacteriology 194 (19), 5466-5466) を用いて、局所感染モデルにより当該変異株の選択がおこるかを解析した。GAS_476 株をマウスから継時的に回収し、血液寒天培地で培養した。その結果、1 日目では $5.7\% \pm 4.6\%$ 、3 日目では $74.5\% \pm 12.7\%$ 、6 日目では $97.8\% \pm 2.6\%$ がムコイド状のコロニーを形成していた。回収した菌のゲノム解析を行ったところ、ムコイド状のコロニーは *csrS* 遺伝子が frame shift していることがわかった。

DNA 分解酵素 *sdaD2* は M1T1 株が持つ病原因子である。この遺伝子を欠損させると *csrS* などの遺伝子に変異を持つ株の in vivo における選択性が低下するという報告がある (Walker MJ 2007 Nature Medicine)。そこで、GAS_476 株の *sdaD2* 遺伝子のノックアウト株を作成し、局所感染モデルにて経時的に菌を回収し、ゲノム解析でその変異箇所を決定した。*sdaD2* 欠損株は、1 日目では $0\% \pm 0\%$ 、3 日目では $14.1\% \pm 10.3\%$ 、6 日目では $57.4\% \pm 34.6\%$ がムコイド状のコロニーを形成しており、野生株と比べ優位にムコイド状のコロニーの割合が低下していた。回収した菌のゲノム解析を行ったところ、*csrS* 以外に、*csrR* や *rocA*、*liaR* 遺伝子に変異していることがわかった。つまり、*sdaD2* は局所感染モデルにおける変異した細胞の選択率の低下に関わるだけでなく、変異した遺伝子の構成も変わることが示唆された。

局所感染モデルで分離された株が高病原化しているかを確認するために、マウス敗血症モデルを用いてその病原性を確認した。*csrS* などに変異を持つ株は、その病原性が上昇していることがわかった。

局所感染モデルで選択された変異がある遺伝子 *csrS*、*csrR*、*rocA*、*liaR* は、転写調節因子をコードしており、frame shift などの変異によりその機能が阻害されていることが推測された。これらの転写調節因子の全身感染時における遺伝子制御を明らかにするために、マウス敗血症モデルと RNA-seq 解析を組み合わせて in vivo におけるトランスクリプトーム解析を行った。局所感染モデルで選択された *csrR*、*rocA*、*liaR* に変異を持つ株は *sdaD2* ノックアウト株であるため、本変異株を用いると *sdaD2* の影響が考えられる。そのため、野生株から *csrS*、*csrR*、*rocA*、*liaR* のノックアウト株を作製した。マウスの腹腔内に菌を投与し経時的に菌を回収し RNA を抽出した。次世代シーケンサーにより RNA-seq 解析を行った。その結果、*csrS*、*csrR*、*rocA* 欠損株では *hasA* や *slo* などの病原因子が野生株に比べ in vitro で高発現しているが、マウス感染後さらに発現が上昇していることがわかった。一方で、*liaR* ノックアウト株では既知の病原因子の高発現化がみられなかった。つまり、*csrS*、*csrR*、*rocA* ノックアウト株で高発現している病原因子が、さらに in vivo において発現上昇していた。このような病原因子の高発現化が STSS の発症に寄与していることが推測された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Cui, B., Watanabe, S., Sato'o, Y., Nishashi, F., Aiba, Y., Kiga, K., Sasahara, T., Tan, XE., Kawauchi, M., Boonsiri, T., Thitiananpakorn, K., Taki, Y., Li, FY., Imokawa, S., and Cui, L. Complete Genome Sequence of the Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Strain JMUB3031 Isolated from a Patient with Fatal Community-acquired Pneumonia. Microbiology Resource Announcements. 8 (4), e01652-18 (2019). 査読有
2. Kanesaka, I., Fujisaki, S., Aiba, Y., Watanabe, S., Mikawa, T., Kanayama, AK., Takahashi, H., Cui, L., and Kobayashi, I. Characterization of compensatory mutations associated with restoration of daptomycin-susceptibility in daptomycin non-susceptible methicillin-resistant Staphylococcus aureus and the role *mprF* mutations. Journal of Infection and Chemotherapy. 25 (1), 1-5 (2019). 査読有
3. Watanabe, S., Aiba, Y., Tan, XE., Li, FY., Boonsiri, T., Thitiananpakorn, K., Cui, B., Sato'o, Y., Kiga, K., Sasahara, T., and Cui, L. Complete genome sequencing of three human clinical isolates of Staphylococcus caprae reveals virulence factors similar to those of S. epidermidis and S. capitis. BMC Genomics. 19(1): 810. (2018). 査読有
4. Sato 'o, Y., Aiba, Y., Kiga, K., Watanabe, S., Sasahara, T., Hayakawa, Y., Sasaki, K., and Cui, L. Optimized universal protocol for electroporation of both coagulase-positive and -negative staphylococci. Journal of Microbiological Methods. 146: 25-32 (2018). 査読有
5. 渡邊真弥, 崔龍洙. 溶連菌感染症の歴史. 小児科 2018年10月 Vol. 59 No. 11 p1511-8.
6. Ogura, K., Watanabe, S., Kirikae, T., and Miyoshi-Akiyama, T. Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of a Streptococcus pyogenes emm3 Strain M3-b

- isolated from a Japanese Patient with Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *Journal of Genomics*. 5, 71-74 (2017). 査読有
7. 竹本訓彦, 小倉康平, 渡邊真弥, 秋山徹. 次世代シーケンス (NGS) による劇症型レンサ球菌の病原性解析. *日本化学療法学会雑誌* 2017年9月 Vol. 65 No. 5 p745-50. 査読無
 8. Watanabe, S., Sasahara, T., Arai, N., Sasaki, K., Aiba, Y., Sato 'o, Y., and Cui, L. Complete genome sequence of *Streptococcus pyogenes* strain JMUB1235 isolated from an acute phlegmonous gastritis patient. *Genome Announcements*. 4 (5), e01133-16 (2016). 査読有
 9. Watanabe, S., Matsumura, K., Iwai, H., Funatogawa, K., Haishima, Y., Fukui, C., Okumura, K., Kato, M., Hashimoto, M., Teramoto, K., Kirikae, F., Miyoshi-Akiyama, T., and Kirikae, T. A mutation in the decoding region of 16S rRNA attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 84 (8), 2264-2273. (2016). 査読有
 10. Watanabe, S., Takemoto, N., Ogura, K., and Miyoshi-Akiyama, T. Severe invasive streptococcal infection by *S. pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology and Immunology*. 60 (1), 1-9 (2016). 査読有

[学会発表](主要計 20 件、総 56 件)

1. 渡邊真弥. 試験管内で選択したカナマイシン耐性結核菌のマウスに対する病原性解析. 第 92 回 細菌学会総会. 2019 年 (招待発表)
2. ○竹本訓彦, 沼田格, 末次正幸, 堀野芽生, 渡邊真弥, 秋山徹. Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent replication errors. 第 92 回細菌学会総会. 2019 年 (招待発表)
3. ○渡邊真弥, 李峰宇, 氣駕恒太朗, 相羽由詞, 佐藤祐介, Xin Ee Tan, 河内護之, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 崔龍洙. 緑膿菌に広く感染するファージの分離・同定. 第 92 回細菌学会総会. 2019 年 (ポスター発表)
4. ○堀野芽生, 竹本訓彦, 渡邊真弥, 秋山徹. 高病原化 A 群レンサ球菌特異的検出法の開発. 第 92 回 細菌学会総会. 2019 年 (ポスター発表)
5. 渡邊真弥, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞, 佐藤祐介, 李峰宇, 氣駕恒太朗, 笹原鉄平, 崔龍洙. Oxacillin 感性 mecA 陽性黄色ブドウ球菌のラクタム薬感性機構の解析. 第 30 回日本臨床微生物学会総会 (ポスター発表)
6. Watanabe, S., Aiba, Y., Tan, XE., Li, FY., Boonsiri, T., Thitianapakorn, K., Cui, B., Sato 'o, Y., Kiga, K., Sasahara, T. and Cui, L. COMPLETE GENOME SEQUENCES OF STAPHYLOCOCCUS CAPRAE STRAINS ISOLATED FROM HUMAN AND COMPARATIVE GENOMICS OF *S. EPIDERMIDIS*, *S. CAPITIS* AND *S. CAPRAE*. In the 18th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSI2018) (Copenhagen, Denmark). 2018. (ポスター発表)
7. 渡邊真弥. 8. 次世代技術を用いた細菌学研究と細菌検査への応用～質量分析から次世代シーケンサーまで～ 第 45 回臨床検査技師研修会 2018 年 (口頭発表)
8. 渡邊真弥, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞, 佐藤祐介, 李峰宇, 氣駕恒太朗, 笹原鉄平, 崔龍洙. Oxacillin 感性 mecA 陽性黄色ブドウ球菌の Oxacillin 感性機構の解析. 第 17 回自治医科大学シンポジウム. 2018 年 (ポスター発表)
9. 渡邊真弥, 相羽由詞, 氣駕恒太朗, 笹原鉄平, 崔龍洙. Oxacillin 感性を示す mecA 陽性黄色ブドウ球菌の mecA 制御機構の解析. 第 66 回日本化学療法学会学術講演会 第 66 回日本化学療法学会総会 合同学会. 2018 年 (ポスター発表)
10. 渡邊真弥, Boonsiri Tanit, Thitianapakorn Kanate, 相羽由詞, 佐藤祐介, 氣駕恒太朗, 笹原鉄平, 崔龍洙. Oxacillin 感性を示す mecA 陽性黄色ブドウ球菌の -ラクタム薬感性化機構の解明. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 (ポスター発表)
11. Watanabe, S.#, Matsumura, K.#, Iwai, H.#, Funatogawa, K., Haishima, Y., Fukui, C., Okumura, K., Kato, M., Hashimoto, M., Teramoto, K., Kirikae, F., Miyoshi-Akiyama, T., and Kirikae, T. A mutation in the decoding region of 16S rRNA attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Keystone Symposia, New Developments in Our Basic Understanding of Tuberculosis* (British Columbia, Canada) 2017. (ポスター発表)
12. 渡邊真弥, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞, 佐藤祐介, 氣駕恒太朗, 李峰宇, 笹原鉄平, 崔龍洙. Oxacillin 感性を示す mecA 陽性黄色ブドウ球菌の in vitro 耐性化株の変異解析. 第 64 回日本化学療法学会東日本支部総会 第 66 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2017 年 (口頭発表)
13. 渡邊真弥, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞, 佐藤祐介, 氣駕恒太朗, 李峰宇, 笹原鉄平, 崔龍洙. Oxacillin 感性を示す mecA 陽性黄色ブドウ球菌の Oxacillin 耐性化機構の解明. 第 62 回日本ブドウ球菌研究会. 2017 年 (口頭発表)
14. 渡邊真弥, 松村和典, 祝弘樹, 船渡川圭次, 加藤雅子, 切替富美子, 秋山徹, 崔龍洙, 切替照雄. カナマイシン耐性に寄与する 16S リボソーム RNA の解読領域の変異はと結核菌の

- 弱毒化．第90回日本細菌学会総会．2017年（口頭発表+ポスター発表）
15. 竹本訓彦，渡邊真弥，秋山徹 A群レンサ球菌（*Streptococcus pyogenes*）における新規病原性（制御）因子の探索．第90回日本細菌学会総会．2017年（口頭発表+ポスター発表）
 16. 渡邊真弥，松村和典，祝弘樹，船渡川圭次，加藤雅子，切替富美子，秋山徹，崔龍洙，切替照雄．結核菌のカナマイシン耐性に寄与する16SリボソームRNAの解読領域の変異と病原性の変化．第11回細菌学若手コロッセウム in つくば．2017年（ポスター発表）
 17. K. Ogura, Watanabe, S., Kirikae, T., and Miyoshi-Akiyama, T. Complete Genome Sequence of a *Streptococcus pyogenes* emm3 Strain, M3-b, Isolated from a Japanese Patient with Streptococcal Toxic Shock Syndrome Case, and Comparative Genomics of *S. pyogenes* emm3 Strains. In *asm microbe 2016*. (Boston, Massachusetts, USA). 2016.
 18. 渡邊真弥，小倉康平，切替照雄，崔龍洙，秋山徹．A群レンサ球菌の侵襲性感染症発症時におけるゲノムの変化と遺伝子発現解析．第99回細菌学会関東支部総会．2016年（招待講演）
 19. 竹本訓彦，渡邊真弥，秋山徹 *Streptococcus pyogenes* におけるCovRS regulonの探索．第48回レンサ球菌研究会．2016年（口頭発表）
 20. 渡邊真弥，小倉康平，切替照雄，秋山徹．A群レンサ球菌の侵襲性感染症発症時における遺伝子発現解析．第10回細菌学若手コロッセウム．2016年（ポスター発表）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/bacteriology/>

6．研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。