

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19589

研究課題名(和文) 劇症型A群レンサ球菌感染症における新たな病原因子制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of virulence control mechanism in group A streptococcal infection

研究代表者

吉田 春乃(Yoshida, Haruno)

北里大学・感染制御科学府・助手

研究者番号：70563386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：当課題ではA群レンサ球菌(GAS)の病原性におけるRocAの役割を明らかにし、遺伝子変異がもたらすGAS強毒化の新たな機構を明らかにすることを目的とした。同時に臨床分離された二種のGAS(MTB313, 314)はほぼ同じゲノム構造を有しているが調節因子rocA遺伝子の配列が異なる。これをもとに組換えGASを作成、その遺伝子発現プロファイルを比較しヒトの病態に近づけたマウス感染モデルを用い病態の比較を行った。結果、rocA変異のあるMTB313はマウスに対し高い致死性を示し、既知の多くの病原因子発現が上昇していた。対してMTB314はマウスに対してほぼ致死性を示さず、rocAの影響が見られた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to clarify the new mechanism of sever GAS pathogenicity caused by rocA gene mutation. Two clinically isolates named MTB 313 and MTB314, have almost the same genomic structure, but the sequences of the regulator rocA genes are different. Based on this, recombinant GAS was prepared, and the gene expression profiles and pathological conditions were compared. As a result, MTB 313 with rocA mutation showed high lethality to hCD46Tg mice, and expression of many known pathogenic factors was elevated. In contrast, MTB 314 showed little lethality to mice. Summarizing the results, it was suggested that the spontaneous mutation of the rocA gene may have an effect on MTB 313's high pathogenicity.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球 GAS マウス感染モデル

1. 研究開始当初の背景

A 群溶血性レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*, 以降 GAS と略す) は咽頭炎、膿痂疹等の原因菌であり、皮膚常在菌であると見なされている。しかしその一方で、壊死性筋膜炎、播種性血管内凝固症候群 (DIC) 等を伴うレンサ球菌毒素性ショック症候群 (STSS) といった生命に関わる劇症型感染症を引き起こすことが知られる。劇症型 GAS 感染症は一般に「人食いバクテリア症」と呼ばれるほどに急激な進行と高い致死率 (約 30%) が特徴である。注目すべきことに近年日本では増加傾向を示し、2012 年には年間 243 名の患者が報告されているが、ありふれたレンサ球菌感染症がごく一部のケースに限り深刻な病態を示す理由は未だはっきりとは明らかになっていない。

研究開始当時、GAS の病原性については CovR/S 制御系を中心に複数の関連因子が同定されていたが、感染から毒性発揮までのメカニズム解明には、遺伝子レベルの解析を基盤とした細菌学的解析と、免疫学・組織化学・病理学的手法による宿主のさらなる解析の両方が必要であった。

2. 研究の目的

近年増加している A 群レンサ球菌による劇症型感染症の発症メカニズム解明をめざし、当研究課題では、1 人の髄膜炎患者より同時に分離された 2 株の GAS (MTB313, MTB314) の比較ゲノム解析により見いだした *rocA* (*regulator of CovR*) 遺伝子の変異に着目した。

研究開始当時、RocA は外刺激を受け取り、他の制御因子と相互作用しながら病原因子を含む下流遺伝子の発現調節を行うと予想されていたが、病原性との関連性、分子機構についてはほとんど明らかになっていなかった。

本研究では遺伝学的手法とマウス感染実験を用い、病原性における RocA の役割を明らかにすることで、遺伝子変異がもたらす GAS 強毒化の新たな機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え GAS 作製、および組換え GAS の病原性評価

大腸菌とレンサ球菌のシャトルベクターである pJRS233 (Ts: Emory Univ. Scott, JR 教授より分与) を用いた相同組換えによって、*rocA* 遺伝子を欠失させた組換え GAS の作製を試みる。また同様のシャトルベクター pLZ12-Km2 (北里大学・岡田信彦教授より分与) で完全長 *rocA* 遺伝子を導入し、RocA タンパク質合成能を回復させた相補株を作製

する。

患者からの分離株と作製した組換え GAS を用い、主要な分泌型毒素の活性を測定する。プロテアーゼ活性はアゾカゼイン法、DNase 活性はファージ DNA の分解能を電気泳動にて測定、溶血毒素はヒト血液の溶血試験により測定する。

(2) レンサ球菌 mRNA の抽出法の確立と *rocA* 発現様式解析

本研究では、グラム陽性で核酸抽出が難しいレンサ球菌に適した RNA 抽出法として「凍結破砕法」を用いる。臨床分離 GAS および組換え GAS を THY 液体培地で培養し、total RNA を抽出し、リアルタイム PCR (SYBR Green) で *rocA* の mRNA を定量することで、発現様式を経時的に解析する。

(3) 組換え GAS 遺伝子発現の網羅的解析

MTB313,314 と組換え GAS から「凍結破砕法」にて mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析し、株間で比較する。アレイは GAS の中で最も詳細なゲノム解析が進んでおり遺伝子型が MTB313,314 と近い MGAS5005 (劇症型分離株、M1 型) を参考としてカスタムデザインする。結果を解析し、株間の比較を行うことで、組換え GAS 間での発現量に差が見られる遺伝子を「RocA が発現調節に関与している遺伝子」として同定、分類し、特に病原性に関わると考えられるものについて重点的にリアルタイム PCR で詳細な発現解析を行う。

(4) 組換え GAS 感染マウスの病態解析

GAS による侵襲性感染はヒトに見られる病態であり、マウスではほとんど観察されない。当研究者らはこれまでに GAS のレセプターの 1 つであるヒト CD46 分子を全身に発現するトランスジェニックマウスをもちいて劇症型感染の動物モデルを確立している。これを用い、臨床分離された MTB313, MTB314 およびその組換え株を hCD46 トランスジェニックマウス足蹠部へ皮下注射により感染させ、致死性を検討する。

得られた致死曲線に基づき、経時的に感染巣 → 膝窩リンパ節 → 血液 → 脾臓/肝臓を採取 (組織はホモジネート処理) し、各組織の生菌量を測定することで菌の播種性を評価する。

(5) 組換え GAS 株の細胞内侵入性、定着性に関する評価

MTB313 は、分離状況及びトランスジェニックマウス感染実験により高い侵襲性を持つことが示唆されている。そこで MTB313, MTB314, MAT101, MAT100 の、培養細胞に

対する侵入性を、ヒト大腸上皮由来株化細胞である Caco-2, ヒト表皮角質細胞由来の HaCaT を用いた cell-invasion assay によって評価する。

また、生体内における定着性を評価するため、4 株のバイオフィーム産生能を比較する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換え GAS 作製、および組換え GAS の病原性評価について

rocA 遺伝子に変異のある MTB313 に pLZ12-Km2 - *rocA* を導入し、組換え GAS を得た。(組み込んだ完全長 *rocA* は MTB314 の *rocA* 遺伝子座より増幅した)。これを MAT101 とし、プラスミドのみを導入したコントロール株を MAT100 とした。

一方で、MTB314 の *rocA* 遺伝子座を相同組換えによって欠失させる試みは予定通りに進まず、組換え用のベクターは作成できたものの、MTB314 内で相同組み換えを起こした菌体を得ることができなかった。計画にあるシャトルベクターの他に pKD4 を入手し同様の組換えを試みたが、欠失株を得ることができなかった。以降の研究への時間的影響を考え、MAT101, MAT100 を *rocA* 組換え GAS とし て用いることとした。

各々の株について、既知の分泌型毒素タンパク質の発現および活性を定量した。その結果、MTB313 は溶血毒素 Streptolysin O を発現しており強い溶血活性を示した。また、MTB314 は分泌型のタンパク質分解酵素である SpeB を多く産生しており、MTB314 培養上清はアゾカゼイン法により高いタンパク質分解活性を持つことが示された。一方で MTB313 には SpeB タンパク質の発現は認められなかった。

(2) レンサ球菌 mRNA の抽出法の確立と *rocA* 発現様式解析

THY 培地で 37 静置培養した GAS を OD₆₀₀=0.5 付近で集菌、上清を除いて液体窒素で冷却し、超音波破碎装置で冷凍破碎を行ったのち回収。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を精製した (図 1)。

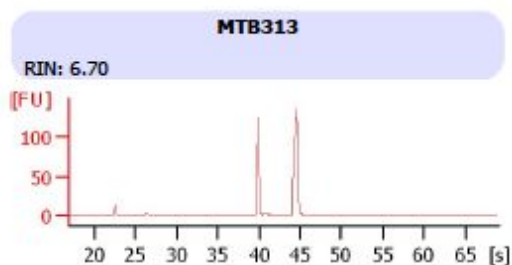


図 1 ; 超音波破碎装置によって抽出した RNA の分解度 (バイオアナライザー / Agilent)

MTB314, MAT101, MAT100 についても同程度の RNA を精製することができた。

rocA mRNA をリアルタイム PCR で定量した結果、MTB313 では MTB314 の約 50% の発現量を示した。MAT101 は他の 3 株に比べ、発現量に顕著な差は見られなかった。

(3) 組換え GAS 遺伝子発現の網羅的解析

上記(2)で抽出した RNA をもちいてマイクロアレイによる発現の網羅的解析を行ったところ、MTB313 と MTB314 では病原遺伝子をはじめ多くの遺伝子の発現プロファイルに大きな違いが見られた。

MTB313 / MTB314 比が 2 以上の値を示したものの中には *slo*, *sic*, *streptokinase A* などの病原遺伝子が含まれていた。また CRISPR の機能に関わる遺伝子群もこの中に含まれていた。一方で、MTB313 / MTB314 比が 1/2 以下を示したものは *tagatose-6-phosphate kinase* 等の代謝酵素、XRE family protein 等の調節因子と思われる機能未知の遺伝子が含まれていた。また、生化学的試験で MTB314 にのみ発現が見られた SpeB に関しては mRNA レベルでも同様の結果となった。

MAT101, MAT100 の mRNA 発現プロファイルはそれぞれ MTB314, MTB313 とほぼ同様の傾向を示したが、一部の遺伝子において *rocA* 相補の影響を受けていないと思われるパターンが見られた。

マイクロアレイで二倍以上の発現差が見られた遺伝子については、リアルタイム PCR で再現性を確認した。その結果、複数の調節因子の発現量が MTB313, MTB314 で差を示した。また、その調節因子に発現が制御されていると報告のある遺伝子の発現量も影響を受けていることが確認できた。

(4) 組換え GAS 感染マウスの病態解析

hCD46 トランスジェニックマウスの足裏片方あたり 1×10^7 CFU/10 μ l を皮下注射し、感染後 2 週間観察を行ったところ、株間で差異が見られた。MTB313 感染トランスジェニックマウスは、感染後数日で接種部位の組織が損傷を受け、壊死が始まっていた。対して MTB314 感染マウスでは、足の腫れが見られたが、それ以上の進行は観察されなかった。2 週間での致死率は、MTB313 が約 70% であったのに対し、MTB314 は 0% だった。また同様に、MAT101 は約 90%、MAT100 は約 10% だった。

さらに、感染後のトランスジェニックマウスの体内で GAS がどのように分布しているかを調べるため、感染後五日の各臓器内生菌数を測定した。

その結果、膝下リンパ節、血中、脾臓、肝臓の各組織内において、MTB313 の方が生菌

の量が有意に多いことが示され、感染後の体内で挙動に差が見られる結果となった。

(5) 組換え GAS 株の細胞内侵入性、定着性に関する評価

Caco-2, HaCaT を 24 ウェルプレートで培養し、THY 培地で培養した GAS(OD₆₀₀=0.5~0.8)を MOI=50 で上清に加えた。1 時間インキュベートした後、PBS で細胞を二度洗浄し、Penicillin/Gentamicin を含む培地に置換してさらに 1 時間インキュベートした細胞をトリプシンで回収して、THY 寒天培地に塗布し、翌日のコロニー数を計測した。

その結果、MTB314 は MTB313 に比して有意に高い侵入性を示した。また同様に、MAT101 は MAT100 よりも培養細胞に対し、高い侵入性を示した。

次に、バイオフィルムの産生について検討した。各 GAS を BHI 培地で培養し、96 ウェル 1 穴あたり 1×10⁵CFU 分注したものを 37 で 48 時間培養し、ウェルを洗浄した後クリスタルバイオレットで染色、洗浄後脱染色した液の吸光度 (545nm) を測定した。

その結果、MTB313 に比べ MTB314 はバイオフィルム構成物質を多量に産生していることが明らかとなった。MTB101 も、MTB313, MAT100 よりバイオフィルム産生が高かった。また、いずれの株も基準株である ATCC12344 よりバイオフィルムを多く産生する傾向が見られた。

以上の結果を総括し、ムコイドを示し *rocA* に変異のある MTB313 は MTB314 に比べてトランスジェニックマウスに感染させた場合の病原性が高く、その原因の一端が遺伝子発現プロファイルの違いから導かれる表現系の差異に影響を受けていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Haruno Yoshida, Yasuhito Ishigaki, Asako Takizawa, Kunihiko Moro, Yuki Kishi, Takashi Takahashi and Hidenori Matsui, Comparative Genomics of the Mucoid and Nonmucoid Strains of *Streptococcus pyogenes*, Isolated from the Same Patient with Streptococcal Meningitis. Genome Announcements, 査読有、vol 3, issue 2, DOI:10.1128/genomeA.00221-15

〔学会発表〕(計 1 件)

臨床分離された A 群レンサ球菌における遺伝子変異とその強毒化への影響
吉田春乃、松井英則、高橋孝
第 90 回日本細菌学会総会 (宮城県仙台市)

2017 年 3 月

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 春乃(YOSHIDA, Haruno)北里大学・感染制御科学府・助手
研究者番号: 70563386

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高橋 孝(TAKAHASHI, Takashi) 北里大学・感染制御科学府・教授
研究者番号: 00292855

岡田 信彦(OKADA, Nobuhiko) 北里大学・薬学部・教授

研究者番号: 80194364

石垣 靖人(ISHIGAKI, Yasuhito) 金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号: 20232275

松井 英則(MATSUI, Hidenori) 北里研究所・生命科学研究所・講師

研究者番号: 30219373