

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20598

研究課題名(和文) 感染性心内膜炎起因菌の組織定着と病態形成の解明

研究課題名(英文) Elucidation of tissue colonization and pathogenesis of infective endocarditis-causing bacteria

研究代表者

近藤 好夫 (KONDO, Yoshio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：30581954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：感染性心内膜炎は心内膜に疣贅を形成する感染性疾患で、原因菌は主に口腔由来のピリダンスレンサ球菌と指摘されている。本研究では心内膜炎病巣部より分離されたStreptococcus oralis NS308株を用いて、非病原株とのゲノム比較を行い、病原性への関与について検討した。まず次世代シーケンサーを用いて解析したところ、完全長のゲノム配列を得ることができた。これを元に非病原株のS. oralis Uo5株とNS308株を比較すると、NS308株に特異的な遺伝子は340個あり、そのうち69個は外来遺伝子であった。これらは本菌の病原性獲得と関わりがあると思われる、さらなる検討が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)： Infective endocarditis is an infectious disease that forms warts in the endocardium, and the causative bacteria are pointed out as oral cavity-derived virulence streptococci. In this study, we compared genomes with non-pathogenic strains and Streptococcus oralis strain NS308 isolated from endocarditis lesion, and investigated the involvement in pathogenicity. As a result of analysis using the next generation sequencer, it was possible to obtain a full-length genome sequence. Based on this, comparing of the non-pathogenic strain S. oralis Uo5 and NS308 revealed that there are 340 NS308-specific genes and 69 of which are foreign genes. It seems that these are related to the acquisition of the pathogenicity in this bacterium, and further investigation will be necessary.

研究分野：小児歯科学

キーワード：感染性心内膜炎 レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は、血液の逆流、弁狭窄などによって、血液中のフィブリンと血小板により生じた血栓が心内膜に付着し、さらにそこに病原体が付着増殖して疣贅と呼ばれる特徴的な疣ができる疾患である。この疣贅が原因となって弁膜自体が破壊されたり、感染源や塞栓源となって菌血症や様々な臓器不全を引き起こしたりすることから、感染性心内膜炎は多彩な臨床像を示し、適切な治療を行わなければ致死的ともなりうる。また感染性心内膜炎については、これまで主に臨床細菌学的な証拠を基に、その主要な原因菌はビリダンスレンサ球菌であること、感染源は主に口腔にあることが指摘されてきた。私たちの研究室では口腔細菌叢や感染性心内膜炎患者からの血液、疣贅から検出される菌種を分子生物学的手法により簡便かつ網羅的に同定しており、感染性心内膜炎の病巣部より分離された臨床分離株を複数保有している。なかでも本研究ではビリダンスレンサ球菌である *Streptococcus oralis* NS308 株に着目した。

2. 研究の目的

S. oralis NS308 株で発症したこの症例で特徴的な点は、患児は発症前に歯科処置はなかったが口腔衛生状態は不良であり、日常的に生じた菌血症により心内膜炎が発症したことである。さらに本菌株の特徴は、複数のハウスキーピング遺伝子群を用いた系統的解析では *S. oralis* と同定されるが、位相差顕微鏡で観察してみると連鎖が短く、標準株とは異なる形態を示している。また *S. oralis* は mitis グループに属する菌種で、感染性心内膜炎の病巣部より最も高い頻度で検出される。しかし *S. oralis* と感染性心内膜炎との関連についての報告は数少なく、不明な点が多い。そこで本研究では全ゲノム情報をもとに非病原株とのゲノ

ム比較を行い、*S. oralis* NS308 株による感染性心内膜炎の病原性を検討する。

3. 研究の方法

S. oralis NS308 株を嫌気下にて培養を行ったのちに、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を断片化したのちに、SMRTbell アダプターを付与しライブラリーの作製を行った。これを SMRT cell にアプライし、PacBio RS II を用いてシーケンスを行った。得られた配列は HGAP3 にてアセンブルした。シーケンスエラーを検出するために BWA と SAMtool を用いて、PacBio RS II で得られた結果とこれまでに得られていた配列のマッピングをおこなった。

得られたゲノム配列に対しては Prokka を用いてアノテーションをおこなった。

株特異的な遺伝子の検出には blastall を用いて、菌株間の比較をおこなった。

アライメント比較や dot plot 解析には Genome matcher を用いた。

4. 研究成果

S. oralis NS308 株からゲノム DNA を精製したのちに、次世代シーケンサー PacBio RS II にてゲノム解読を行った。その結果、162,753 リード (平均リード長: 6,974 bp) を得ることができた。これらを HGAP3 にてアセンブルしたところ、1本のスキヤホールドに収束した (genome coverage: 314x)。シーケンスエラーを修正するために、これまでに得られていた illumina GA II (50-bp single-end run、5,829,284 リード) でおこなった解析結果を、PacBio RS II の結果にマッピングした。マッピングでは8つのエラーを検出し、その内訳としては mismatch が1箇所、insertion/deletion が7箇所であった。エラー箇所の修正ののちに、これらの結果から 1,924,728 bp の全ゲノム配列を得て、ア

ノテーションを行ったところ、1,828 個の CDS、62 個の tRNA、4 個の rRNA オペロンと 1 箇所の CRISPR を含んでいた (図 1) 。

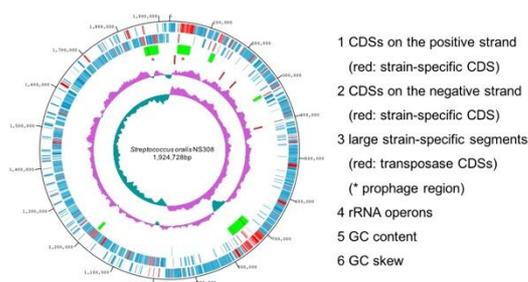


図 1 *S. oralis* NS308 株の染色体マップ

これまでに全ゲノム配列が公開されている *S. oralis* Uo5 株と NS308 株を比較すると、アライメント比較ではゲノムアレンジメントはみられなかった (図 2) 。

しかし、average nucleotide identity は 90.8% であり、通常は同菌株間において 95% 以上の相同性を認めることから、NS308 株は *S. oralis* の亜種の可能性が示唆された。

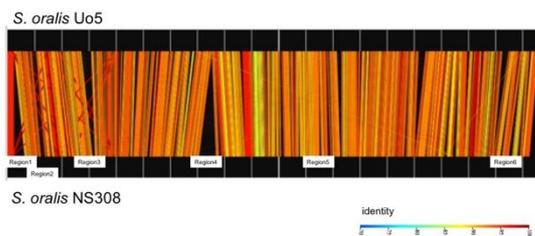


図 2 アライメント比較

より詳細に検討するために、両株間で保有する遺伝子の違いを検討したところ、NS308 株では 1,488 個 (81.4%) の CDS が共通であった。一方で NS308 株に特異的な CDS は 340 個あり、これらのうち 125 個についてはファージあるいはトランスポゾンなどから由来する外来遺伝子であることが明らかになった。外来遺伝子はおもに phage protein や hypothetical protein であったが、感染性心内膜炎との関連が報告されている表層タンパク質をコードする遺伝子や two

component system に関連する遺伝子も含まれていた。また多剤耐性 (Fluoroquinolones, Glycylcyclines, QACs, Dyes など) に関わる遺伝子領域 (mep operon) の獲得もみられた (図 3) 。

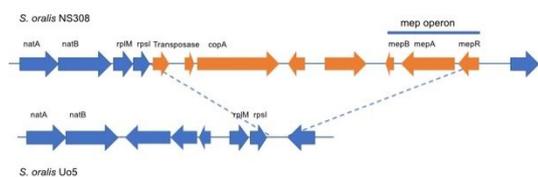


図 3 薬剤耐性遺伝子の獲得

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 3 件)

- (1) Kondo Y, Ogura Y, Sato K, Imamura K, Hoshino T, Nishiguchi M, Hasuwa T, Moriuchi H, Hayashi T, Fujiwara T.: Complete Genome Sequence of Streptococcus sp. Strain NPS 308. Genome Announc. 4(6). pii: e01349-16. doi:10.1128/genomeA.01349-16, 2016 査読有
- (2) Kadowaki T, Yukitake H, Naito M, Sato K, Kikuchi Y, Kondo Y, Shoji M, Nakayama K.: A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor. Sci Rep. 21;6:23288. doi: 10.1038/srep23288, 2016 (IF; 5.228) 査読有
- (3) Taguchi Y, Sato K, Yukitake H, Inoue T, Nakayama M, Naito M, Kondo Y, Kano K, Hoshino T, Nakayama K, Takashiba S, Ohara N.: Involvement of an Skp-Like Protein, PGN_0300, in the Type IX

Secretion System of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 84 (1) : 230-40, 2015 (IF; 3.731)査読有

〔学会発表〕(計18件)

- (1) 佐藤啓子、近藤好夫、今村圭吾、成田由香、内藤真理子、中山浩次：F. *johnsoniae* による樹枝状コロニー形成、生体運動合同班会議2017、2017年1月6～8日、神戸国際会議場（兵庫県、神戸市）
- (2) 今村圭吾、釜崎陽子、西俣はるか、近藤好夫、藤原卓：骨形成不全症に伴う象牙質形成不全症乳歯の形態観察、第34回日本小児歯科学会九州地方会および総会、2016年10月30日、宮崎市民プラザ（宮崎県、宮崎市）
- (3) 近藤好夫、佐藤啓子、今村圭吾、西口美由季、星野倫範、中山浩次、藤原卓：感染性心内膜炎由来 *Streptococcus oralis* の性状解析、第48回レンサ球菌研究会、2016年7月8～9日、長崎大学良順会館（長崎県、長崎市）
- (4) 今村圭吾、佐藤啓子、近藤好夫、成田由香、藤原卓、中山浩次：The Various formation of colony spreading、新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第4回領域全体会議、2016年6月8～10日、長崎大学良順会館（長崎県、長崎市）
- (5) 近藤好夫、佐藤啓子、今村圭吾、成田由香、中根大介、藤原卓、中山浩次：CSFs affect the colony spreading in *Flavobacterium johnsoniae*、新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第4回領域全体会議、2016年6月8～10日、長崎大学良順会館（長崎県、長崎市）
- (6) M Nishiguchi, K Imamura, H Nishimata, Y Kamasaki, K Satoh, Y Kondo, N Tanoue, T Fujiwara: A Case with Disturbances in Tooth Formation caused by Therapy for Rhabdomyosarcoma, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, May 27-28, 2016, Tokyo Dome Hotel (東京都、文京区)
- (7) Y Kondo, Y Motomura, K Murayama, H Nishimata, K Nishida, K Imamura, K Satoh, K Hidaka, Y Kamasaki, M Nishiguchi, T Hoshino, T Fujiwara: Construction of New Risk Predictive Model based on Machine Learning Method, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, May 27-28, 2016, Tokyo Dome Hotel (東京都、文京区)
- (8) 今村圭吾、佐藤啓子、近藤好夫、成田由香、藤原卓、中山浩次：軟寒天培地上での *Flavobacterium johnsoniae* の樹枝状コロニー Spredding、第89回日本細菌学会総会、2016年3月23～25日、大阪国際交流センター（大阪府、大阪市）
- (9) 今村圭吾、近藤好夫、佐藤啓子、成田由香、中根大介、藤原卓、中山浩次：“Dendritic” colony spreading in *Flavobacterium johnsoniae*、生体運動合同班会議2016、2016年1月8～10日、キャンパスプラザ京都（京都府、京都市）
- (10) Imamura K, Kondo Y, Sato K, Narita Y, Nakayama K: The colony spreading of *Flavobacterium johnsoniae*. One Health conference in Nagasaki, Nov 6, 2015, Nagasaki University (長崎県、長崎市)
- (11) 西田佳世、近藤好夫、西俣はるか、今

- 村圭吾、佐藤恭子、日高 聖、釜崎陽子、西口美由季、星野倫範、齋藤 幹、山崎要一、朝田芳信、八若保孝、苅部洋行、新谷誠康、早崎治明、藤原 卓：子どものこころと身体を見守り支援する大規模データ収集とリスク予測モデル構築の試み、第33回日本小児歯科学会九州地方会及び総会、2015年11月15日、福岡県歯科医師会館（福岡県、福岡市）
- (12) 釜崎陽子、星野倫範、田上直美、西口美由季、佐藤恭子、日高 聖、近藤好夫、西俣はるか、今村圭吾、西田佳世、藤原 卓：自閉症スペクトラム障害児の歯科治療に対する適応症に関する後方視的検討、第32回日本障害者歯科学会総会および学術大会、2015年11月6～8日、名古屋国際会議場（愛知県、名古屋市）
- (13) 佐藤啓子、近藤好夫、今村圭吾、内藤真理子、中山浩次：病原タンパク質分泌に関わる細胞内品質管理プロテアーゼ HtrA について、第57回歯科基礎医学会学術大会 2015年9月11～13日、朱鷺メッセ（新潟県、新潟市）
- (14) 近藤好夫、佐藤啓子、今村圭吾、星野倫範、中山浩次、藤原 卓：感染性心内膜炎由来 *Streptococcus oralis* 308株の細菌学的解析、第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月11～13日、朱鷺メッセ（新潟県、新潟市）
- (15) 今村圭吾、近藤好夫、佐藤啓子、成田由香、藤原卓、中山浩次：*Flavobacterium johnsoniae*における colony spreading に関する因子について、第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月11～13日、朱鷺メッセ（新潟県、新潟市）
- (16) 星野倫範、近藤好夫、日高 聖、藤原卓：細菌性心内膜炎の原因となった *Streptococcus mutans* の形態的・細菌学的特徴とその由来、第47回レンサ球菌研究会、2015年7月3～4日、ひまわり荘（宮城県、宮崎市）
- (17) 今村圭吾、佐藤啓子、近藤好夫、成田由香、藤原卓、中山浩次：*Flavobacterium johnsoniae*における colony spreading、新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第3回領域全体会議、2015年6月10日～12日、金沢市商工会議所会館（石川県、金沢市）
- (18) 近藤好夫、佐藤啓子、今村圭吾、成田由香、中根大介、藤原卓、中山浩次：*Flavobacterium johnsoniae*における colony spreading factor、新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第3回領域全体会議、2015年6月10日～12日、金沢市商工会議所会館（石川県、金沢市）
- 〔図書〕(計 0件)
なし
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
なし
取得状況(計 0件)
なし
- 〔その他〕
ホームページ等
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者
近藤 好夫 (KONDO, Yoshio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教

研究者番号：30581954

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし