

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08844

研究課題名(和文) 脳膿瘍分離レンサ球菌が産生する抗菌ペプチドの機能解析

研究課題名(英文) Characterization of antimicrobial peptide produced by *Streptococcus intermedius* isolate from human brain abscess.

研究代表者

黒田 誠 (Kuroda, Makoto)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

研究者番号：80317411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児脳膿瘍から分離された *Streptococcus intermedius* TYG1620株の全ゲノム解析の結果、Lanthionine型抗菌ペプチド(仮称インターロシン)の保有を明らかにした。ヒト口腔・咽頭拭い液とTYG1620株を共培養し、メタゲノム解析により増加・不応・減少する菌種が確認された。*Streptococcus parasanguinis* の解読リード数が顕著に減少し、TYG1620株培養液は *S. parasanguinis* の増殖を阻害した。TYG1620株は主要口腔フローラを抑制し、生存戦略を有利にしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔に常在する *Streptococcus intermedius* が病原性を発揮するためには、鼻腔常在菌種に競り勝つことが先決と考え、我々は *S. intermedius* TYG1620が有する抗菌ペプチドに着目してその分子探索および阻害ターゲット特定を実施した。本実験では TYG1620 が *Streptococcus parasanguinis*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 属に増殖阻害を示すことを明らかにした。病原細菌である *S. intermedius* は常在菌と競合して有用な菌種との生存戦略で優位にたとうとしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： *Streptococcus intermedius* is known to cause periodontitis and pyogenic infections in the brain and liver. We have reported the complete genome sequence of strain TYG1620 (genome size, 2,006,877 bp) isolated from a brain abscess in an infant, and the complete genome sequence exhibits novel antimicrobial lantibiotics synthesis, we designated it as "Interocin". To elucidate the antimicrobial potential of Interocin, cocultivation of freshly prepared human pharyngeal flora with either wild type TYG1620 in BHI broth under anaerobic condition at 37 °C for 24 h. Metagenomic DNA-seq suggested that TYG1620 appears to show potential of the growth inhibition in partial *Lactococcus* and *Streptococcus* species. We speculated that such antimicrobial peptide Interocin could contribute to expansion of the habitat by excluding original microbiota there, it might lead to full representation of the *S. intermedius* pathogenicity.

研究分野：薬剤耐性

キーワード： *Streptococcus* 抗菌ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus intermedius は *Streptococcus anginosus* group に属し、脳膿瘍を形成し分離頻度の高い菌種として知られる。我々の先行研究により、小児脳膿瘍から *S. intermedius* TYG1620 株を分離し、全ゲノム解析の結果、特徴的な病原因子 (7 型分泌装置依存の ESAT-6-like protein) に加え、Lanthionine 型抗菌ペプチドの生合成遺伝子群の保有を明らかにした。膿瘍を形成する際には、ヒト宿主免疫応答に抵抗するための病原性はもとより、多様な口腔常在フローラの存在下で *S. intermedius* 自身が増殖し、優勢になっているものと想定される。TYG1620 株はその抗菌ペプチド (仮称インテロシン: Interocin) を産生し、常在菌よりも優勢を維持する何かしらの役割を有していると作業仮説を立てた。

2. 研究の目的

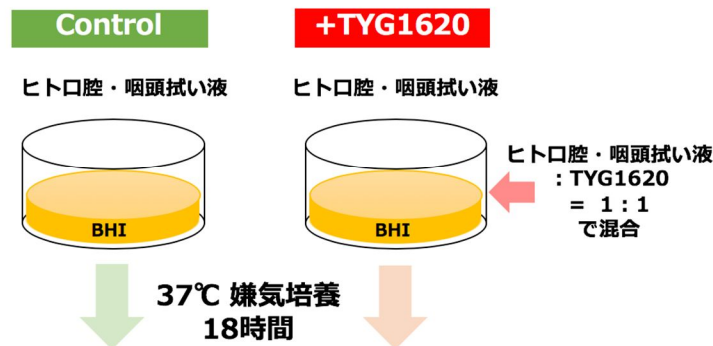
S. intermedius TYG1620 の抗菌活性により増殖阻害される菌種の探索と細菌フローラ内の生存戦略を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

S. intermedius TYG1620 により増殖阻害される菌種を探索するため、ヒト口腔・咽頭拭い液と TYG1620 株を共培養し、その混合培養液の精製 DNA からメタゲノム DNA-Seq ライブラリー (QIAseq FX kit) を調整し、Illumina NextSeq 500 シークエンサーで解読リードを取得しを定量的比較評価を実施した。

方法

インテロシンがターゲットにする菌種を特定するため、
TYG1620共培養で増殖抑制される菌種をメタゲノム法で探索した。



定量的メタゲノム解析 (metagenomic DNA-Seq)

さらに、ヒト口腔・咽頭拭い液から BHI 寒天培地で画線培養して単一コロニーを取得し、増殖阻害ターゲットの候補菌である多様な *Streptococcus* spp. 49 株を分離した。それら分離株の全ゲノム配列を Illumina NextSeq500 にて確定した。それら阻害候補菌と TYG1620 を寒天培地上で接触させ増殖阻止円の形成を判定した。

4. 研究成果

TYG1620 株と共培養することで増加・不応・減少する菌種が確認され、*Streptococcus parasanguinis* の解読リード数が顕著に減少していたため、同属の *S. intermedius* により増殖抑制を受ける菌種候補として着目した。

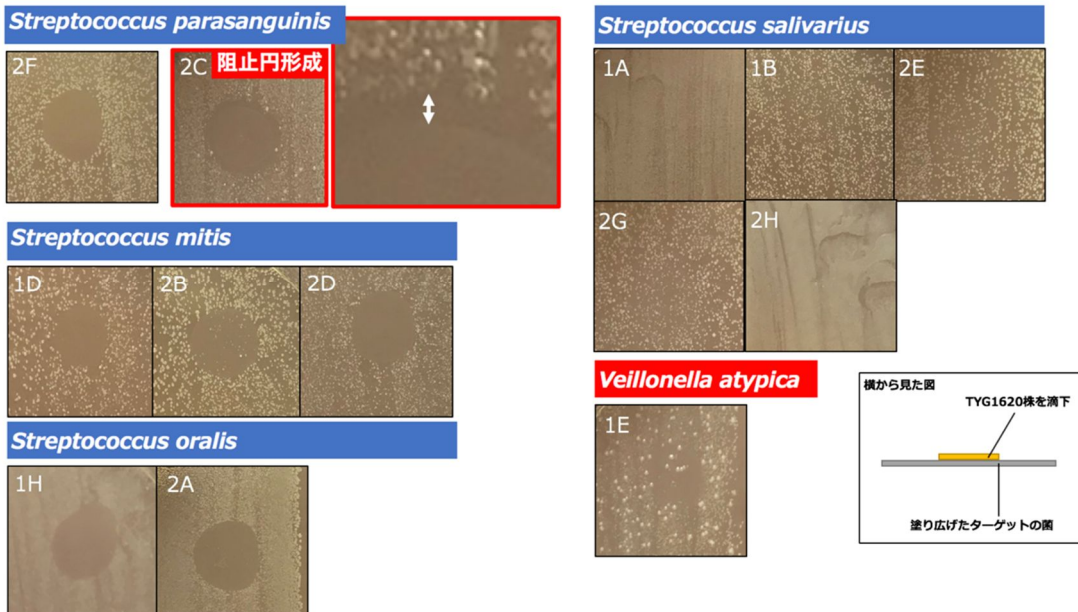
全ゲノム解読により、目的の *S. parasanguinis* 2 株、*S. oralis* 2 株、*S. mitis* 14 株、*S. salivarius* 30 株、*Veillonella atypica* 1 株の分離を確認した。増殖阻害の候補菌種株を BHI 寒天培地上に塗り広げ、そこに TYG1620 株培養液を滴下し嫌気培養にて判定したところ、*S. parasanguinis* 1 株で阻止円が観察された。*S. parasanguinis* は歯の表面に定着し、他の細菌が付着する基礎となり、バイオフィルム形成を促進する。*S. intermedius* TYG1620 株は口腔フローラの中で、重要な役割を果たす菌を抑制することで、細菌フローラ内の生存戦略を有利にしている可能性が示唆された。

結果

① ヒト口腔・咽頭フローラの中で、TYG1620と共培養することにより増殖が抑制、不応、促進される菌種が確認された。

Bacteria species	Control	TYG1620混合	log2 (TYG1620 /Control)	コメント
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	797,138	62,048	-3.68	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus australis</i>	42,372	8,464	-2.32	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus cristatus</i>	59,323	12,036	-2.30	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus mitis</i>	797,024	182,262	-2.13	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	109,449	25,458	-2.10	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	451,393	112,758	-2.00	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus oralis</i>	253,589	69,067	-1.88	有意に増殖抑制
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,829	7,594	-1.59	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus gordonii</i>	68,009	24,330	-1.48	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	11,306	4,069	-1.47	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus salivarius</i>	3,401,522	1,338,446	-1.35	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus equinus</i>	204,575	81,458	-1.33	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus thermophilus</i>	88,971	35,819	-1.31	有意に増殖抑制
<i>Streptococcus sanguinis</i>	110,480	64,287	-0.78	変化なし (不応)
<i>Streptococcus anginosus</i>	9,413	10,812	0.20	変化なし (不応)
<i>Veillonella rodentium</i>	9,864	22,886	1.21	有意に増殖促進
<i>Veillonella parvula</i>	137,394	333,652	1.28	有意に増殖促進
<i>Veillonella atypica</i>	535,224	1,324,484	1.31	有意に増殖促進
<i>Streptococcus mutans</i>	1,455	13,896	3.26	有意に増殖促進
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3,197	139,094	5.44	有意に増殖促進
<i>Streptococcus intermedius</i>	5590	6608044	10.21	TYG1620 混合

② TYG1620は*Streptococcus parasanguinis*に対して阻止円を形成した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中里奈、橋野正紀、関塚剛史、黒田誠
2. 発表標題 ヒト・口腔常在フローラ内でのStreptococcus intermediusの生存戦略解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuyoshi Sekizuka, Masanori Hashino, Yuba Inamine, Makoto Kuroda,
2. 発表標題 Growth Inhibition of Streptococcaceae in Healthy Gut Flora by Interocin of Streptococcus intermedius TYG1620 Isolated from a Human Brain Abscess
3. 学会等名 ESCMID/ASM Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----