

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15697

研究課題名(和文) 脳膿瘍患者由来S. intermediusの 7型分泌装置による病態誘導機序の解明

研究課題名(英文) characterization of type 7 secretion system in Streptococcus intermedius isolated from brain abscess

研究代表者

橋野 正紀 (Hashino, Masanori)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・研究員

研究者番号：30783633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小児脳膿瘍患者から原因菌として分離されたStreptococcus intermedius TYG1620株の病原性について、TYG1620株が保有するType 7 Secretion System (T7SS)関連遺伝子群との関連性を検討した。その結果、上皮細胞株であるHeLa細胞に対して、TYG1620株がT7SS依存的細胞傷害性を保有することを見出した。加えて、T7SS依存的細胞傷害性における責任因子候補因子となる複数のT7SS依存的分泌タンパク質を同定するとともに、T7SS依存的細胞傷害性が細胞膜損傷に起因することが示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳膿瘍、肝膿瘍の原因菌であるStreptococcus intermedius (Si)の病原性には、未解明な部分が多い。本研究ではSi TYG1620株が上皮細胞に対するT7SS依存的な傷害性を保有することを見出した。さらに、実施したSecretome解析からT7SS依存的細胞傷害性は、これまでに報告のある病原因子と異なる因子に起因することが強く示唆された。つまり、本研究成果はSiの既知の病原因子ではなく、T7SS依存的新規病原因子の存在を示唆するものであり、Siの病原性および病態誘導機序の解明に重要な知見となることが十分に期待される。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus intermedius TYG1620 strain was isolated as the causative agent from a brain abscess in an infant. In this study, to characterize the roles of Type 7 Secretion System (T7SS) in S. intermedius TYG1620 strain pathogenicity, we performed HeLa cell cytotoxicity assay, secretome analysis and transcriptome analysis using culture supernatant of clinical isolate TYG1620 and the transposon (Tn) mutant carrying Tn-insertion on *essa* (Tn-*essa* mutant) or *essC* (Tn-*essC* mutant) genes which is component of T7SS.

Ultrafiltrated TYG1620 culture supernatant exhibited T7SS-dependent cytotoxicity to HeLa cell. Secretome analysis revealed that several proteins exhibited marked decrease in both Tn-mutants compared with parent strain TYG1620. In addition, transcriptome analysis of HeLa cell treated with ultrafiltrated TYG1620 culture supernatant suggested that T7SS-dependent cytotoxicity was caused by cell membrane damage.

研究分野：病原細菌学

キーワード：Streptococcus 7型分泌装置 膿瘍形成

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原細菌においてタンパク質分泌装置は、宿主感染および病態誘導に重要な役割を担うことが知られている。このため、細菌感染症の制御に向けて分泌装置および分泌される細菌毒素について詳細な研究がなされてきた。これらの成果は、数多くの病原因子を同定するとともに、病原細菌の感染機序の解明、宿主免疫応答を含めた病態誘導機序の解明および分泌物を介した細菌感染症の制御法の確立等を通して、細菌感染症の包括的理解の進展に寄与した。一方で、タンパク質分泌装置に対する研究が進展していく中で、多種の病原細菌が分泌装置を有することが明らかになるとともに新規分泌装置の存在も明らかとなった。しかしながら、新規の分泌装置に対しては未解明な部分も多い。近年発見された 7 型分泌装置(Type 7 Secretion System; T7SS)は、グラム陽性病原細菌である *Mycobacterium* 属菌での保有が確認された後、複数種のグラム陽性病原細菌での保有が見出された。更に、*M. tuberculosis*、*Staphylococcus aureus* においてはマウス感染実験による T7SS の病原性への関与が報告されている(Tufariello JM. *et al.*, 2016, PNAS; Burts ML. *et al.*, 2005, PNAS)。これらの報告から T7SS はグラム陽性病原細菌の病原性において、既知の分泌装置と同様に重要な役割を担っていることが予想される。しかしながら、T7SS の保有が確認された多くの病原細菌種において、T7SS と病態誘導機序との関連性及び詳細な分泌タンパク質の機能は解明されていない。

グラム陽性細菌である *Streptococcus intermedius* (Si)は、口腔内・尿生殖器等の粘膜層に存在する常在菌として知られている。一方で、近年脳膿瘍および肝膿瘍患者の病変部位からの検出が多数報告され、膿瘍形成の原因菌としても認識されている。しかしながら、膿瘍形成に関する病原因子は未解明である。Si の病原因子同定のために、小児脳膿瘍患者から分離された Si TYG1620 株に対して次世代シーケンサーによるゲノム解析を含む事前研究を行った結果 (Hasegawa N. *et al.*, 2017, Infect Immun) 以下のことが示された。

- 全ゲノム解読による T7SS 関連遺伝子群の保有。
 - マウスへの皮下投与による膿瘍形成誘導。
 - Transposon(Tn)変異株ライブラリー感染マウスによる T7SS の病原性への関与。
- これらの結果から、Si TYG1620 株の膿瘍形成能には T7SS 介した分泌タンパク質が関与することが強く示唆された。

2. 研究の目的

Streptococcus intermedius (Si)は、生体内粘膜層(口腔内・尿生殖器等)に常在菌として存在するが、脳膿瘍および肝膿瘍の原因菌としても知られている。しかしながら、Si の病原性については未解明の部分が多い。小児脳膿瘍患者より原因菌として分離された Si TYG1620 株では、全ゲノム解読の結果 7 型分泌装置(Type 7 Secretion System; T7SS)関連遺伝子群の保有が確認された。T7SS は、他のグラム陽性病原細菌において病態誘導に重要な役割を担っていることが報告されている。このため、Si においても T7SS が病原性に関与することが十分に考えられた。実際、事前研究においてマウス感染実験により皮下膿瘍形成に T7SS が関与することが示唆された。そこで、本研究では、Si 病原性および病態誘導機序の解明を目的に、Si の病原性における T7SS の機能解析を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、小児脳膿瘍患者より原因菌として分離された Si TYG1620 株および TYG1620 株を親株として、Transposon 挿入により作製された T7SS 変異株(Tn-essA 株、Tn-essC 株)を供試した。各菌株の濃縮培養上清は、菌体を除去した培養上清を限外濾過膜により 20 倍に濃縮し作製した。

細胞傷害性の測定では、上皮細胞株である HeLa 細胞に対し各菌株の濃縮培養上清を添加した後、細胞培養液中に放出された乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase; LDH)量を測定することで評価した。

濃縮培養液中の網羅的タンパク質の同定および定量化を目的とし実施した Secretome 解析は、各菌株の濃縮培養上清を用いた Data-Independent Acquisition 法による Proteome 解析を外部機関に委託し、得られたデータをもとに評価した。

Transcriptome 解析では、各菌株の濃縮培養上清を添加した HeLa 細胞から経時的に mRNA を精製し、次世代シーケンサーにより RNAseq 解析を行った。また、細胞内カルシウムイオン流入試験では、カルシウム蛍光プローブで処理した HeLa 細胞に各菌株濃縮培養上清を添加し、蛍光顕微鏡のタイムラプス撮影を使用し評価した。

4. 研究成果

本研究では、小児脳膿瘍患者より原因菌として分離された *Streptococcus intermeidus* (Si) TYG1620 株が保有する 7 型分泌装置(Type 7 secretion system : T7SS)関連遺伝子群に着目し、Si の病原性における T7SS 役割について *in vitro* での検討を行った。

本研究では、Si TYG1620 株と TYG1620 株を親株にトランスポゾン遺伝子の挿入により作製された T7SS 変異株(Tn-essA 株および Tn-essC 株)を使用し、上皮細胞株である HeLa 細胞に対する傷害性を中心に解析を実施した。HeLa 細胞への各菌株の濃縮培養上清添加実験の結果、TYG1620 株培養上清添加により顕著な細胞傷害性が確認された。一方で、T7SS 変異株培養上清添加では TYG1620 株培養上清と比較して細胞傷害性の有意な減弱が確認された。この結果は、事前研究と同様に T7SS

の病原性への関与を示唆するものであった。

濃縮培養上清添加実験の結果から、TYG1620 株の保有する上皮細胞への傷害性には T7SS 依存的分泌因子が責任因子として機能していると考えられた。そこで、濃縮培養上清中のタンパク質の網羅的同定および定量化を目的に Secretome 解析を実施した結果、Tn-essA 株および Tn-essC 株の双方では、TYG1620 株と比較して T7SS 依存的な分泌が期待される複数タンパク質の顕著な分泌量の低下が確認された。一方で、既に Si の病原性との関連性が報告されている Intermedilysin 等の分泌量は、親株と T7SS 変異株で顕著な差は見られなかった。つまり、TYG1620 株の保有する上皮細胞への傷害性は、既知の病原因子ではなく T7SS 依存的に分泌される因子に起因することが考えられた。

加えて、濃縮培養上清添加による HeLa 細胞側の応答の詳細な検討に向けて、HeLa 細胞内での経時的転写変動を Transcriptome 解析により検討した。Transcriptome 解析の結果、T7SS 変異株と比較して TYG1620 株では、濃縮培養上清添加後の最初期遺伝子の転写増強が確認された。最初期遺伝子の転写増強から、細胞膜傷害によるカルシウムイオンの早期細胞内流入が考えられた。そこで、濃縮培養上清添加による細胞内カルシウムイオン濃度の変動についてカルシウム蛍光プローブを用いて測定した結果、TYG1620 株の濃縮培養上清添加による早期の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が確認された。これらの結果から、TYG1620 株の保有する上皮細胞傷害性因子は、細胞膜損傷に関与することが示唆された。

上記の結果から、本研究では Si TYG1620 株が上皮細胞株への細胞傷害性を保有することが示された。さらに、細胞傷害能には TYG1620 株の保有する T7SS が寄与しており、T7SS 依存的に分泌されるタンパク質が責任因子として機能することが示唆された。加えて、TYG1620 株と T7SS 変異株の濃縮培養上清内に含まれるタンパク質の網羅的同定および定量化により、責任因子候補因子となる複数のタンパク質が同定された。一方、既知の病原因子(Intermedilysin 等)の分泌量は、TYG1620 株と T7SS 変異株の間で顕著な差が確認されなかったことから T7SS 依存的分泌タンパク質が上皮細胞への細胞傷害能に重要な役割を担っていることが示唆された。また、細胞傷害能に対する細胞側応答の検討のため実施した Transcriptome 解析およびカルシウムイオン流入試験の結果から TYG1620 株の T7SS 依存的細胞傷害性因子が細胞膜損傷を誘導することが示唆された。本研究で得られた知見は、Si の病原性および病態誘導機序の解明の一助となることが十分に期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 橋野 正紀、関塚 剛史、稲嶺 由羽、黒田 誠
2 . 発表標題 小児脳膿瘍患者より分離されたStreptococcus intermedius TYG1620株におけるType Seven Secretion Systemの機能解析
3 . 学会等名 第101回 日本細菌学会関東支部総会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 橋野 正紀、関塚 剛史、稲嶺 由羽、黒田 誠
2 . 発表標題 Characterization of the cytotoxicity by Streptococcus intermedius T7SS
3 . 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masanori Hashino, Tsuyoshi Sekizuka, Yuba Inamine, Makoto Kuroda.
2 . 発表標題 Characterization of the cytotoxicity by Streptococcus intermedius type seven secretion system
3 . 学会等名 MICROBIAL PATHOGENESIS and HOST RESPONSE (Cold Spring Harbor Laboratory、米国) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 橋野正紀，関塚剛史，黒田誠
2 . 発表標題 Characterization of the T7SS-dependent cytotoxicity in Streptococcus intermedius pathogenicity.
3 . 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4 . 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----