

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20880039

研究課題名(和文) 豚レンサ球菌 srtG 領域の線毛形成および宿主定着能への関与の解析

研究課題名(英文) Analysis of the formation and the involvement in the ability to colonize hosts of the pilus encoded by the srtG cluster of *Streptococcus suis*

研究代表者

大倉 正稔 (OKURA MASATOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・研究員

研究者番号：60508315

研究成果の概要(和文)：豚レンサ球菌は豚や人に重篤な疾病を引き起こす重要な人獣共通感染症起因菌であり、近年本菌に関する研究は増加しているが、その病原因子に関してはほとんど分かっていない。本研究課題では、他の病原細菌で感染に重要な宿主への定着に寄与する事が知られている線毛が豚レンサ球菌の菌体表層に発現している事を明らかにした。さらに、本線毛は他の菌と組立て様式が異なり、宿主体内よりも宿主体表あるいは環境中で機能している可能性が指摘された。

研究成果の概要(英文)：*Streptococcus suis* is an important bacterium which can cause severe disease in pigs and humans. Despite increasing research in recent years, knowledge of the virulence determinants of *S. suis* remains limited. In many pathogenic bacteria, pilus structures have been reported to contribute to adherence to the host cells. The present study demonstrated that pilus-like structures extended from the cell surface of the *S. suis* strain. In addition, our data suggested that this pilus is different in its assembly from the well-known pili of other bacteria and may be important for interaction of *S. suis* with the surface of host animals or in its environment rather than that within the host animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,250,000	675,000	2,925,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：豚レンサ球菌、グラム陽性菌の線毛、宿主定着性

1. 研究開始当初の背景

豚レンサ球菌は豚に敗血症、髄膜炎、心内膜炎、関節炎等を引き起こすブタの重要な病原細菌の一つで、養豚産業に経済的な損失をもたらす。本菌は人にも感染し、近年養豚が盛んなアジア諸国で人への集団発生が続発し、人獣共通感染症起因菌として、その重要性が注目されてきている。実際、2005年には中国で215名の患者が発生し、39名が死亡する世界を震撼させる事例も起こっている。日本でも誌上に報告されていないものも含め、少なくとも10名の患者（うち2名は死亡）が確認されている。このような背景から、世界中で豚レンサ球菌に関する研究が盛んに行われているが、未だに本菌感染症に対する効果的な防除法は確立していない。本菌は健康なブタも保有しており、菌株により病原性の強さに違いがある事が知られているが、病原因子に関しては十分に明らかになっておらず、その感染メカニズムに未知の部分が多数残されている。

他の病原細菌には線毛と呼ばれるタンパク質複合体を持つものがあり、線毛は感染成立に重要な宿主への定着に寄与する事から重要な病原因子の一つに位置付けられている。分子レベルでは、線毛は単一の線毛タンパク質（メジャーサブユニット）が重合した骨格に別の線毛タンパク質（マイナーサブユニット）が組み込まれて形成されている。また、線毛形成に関連する遺伝子は、細菌ゲノム上で隣接して存在し、遺伝子群を形成している。研究代表者らはこれまでに豚レンサ球菌のゲノム情報を検索し、少なくとも4種類の線毛の形成に関わる遺伝子群が存在する事を明らかにしている。さらに、各遺伝子群の保有分布を調べ、病豚及びヒト由来強毒株のほとんどが特定の種類の線毛関連遺伝子群を保有する事も明らかにしている。

しかしながら、豚レンサ菌における線毛の存在については未だ証明できておらず、病原性（宿主への定着）との関連性についても全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、病豚及びヒト由来強毒株が保有する線毛関連遺伝子群の1つである *srtG* 領域について、各構成遺伝子を破壊する事で、線毛形成メカニズムの詳細及び宿主定着能への関与を調べた。

3. 研究の方法

(1) *srtG* 領域の線毛形成に関する解析

まず、*srtG* 遺伝子群を構成する2つの線毛サブユニット遺伝子 (*sgp1* 及び *sgp2*) とそれらを組立てる酵素 sortase の遺伝子 (*srtG*) について、各遺伝子の破壊株及び相補株を作成し、さらに各サブユニットタンパク質の抗血清（抗 *Sgp1* 及び抗 *Sgp2* 血清）を作製した。そして、作製した抗血清を用い、金コロイド免疫電子顕微鏡法により線毛形成の形態学的観察を行い、ウエスタンブロット法により各遺伝子の欠失による線毛形成への影響（各構成成分の発現状況、重合の程度等）を解析した。

(2) *srtG* 領域線毛の宿主定着能への関与についての解析

菌の動物体内での定着に着目して、本線毛と動物組織の構成成分である細胞外基質タンパク質（コラーゲン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン）との接着を解析した。各タンパク質をコーティングした96ウェルのプレート上に、線毛が最も良く発現する条件で培養した株とそれと同じ条件で培養した遺伝子破壊株、遺伝子相補株の菌液を接種し、一定時間静置後に洗うことによってウェルに粘着していない菌を除去した。次に粘着した菌をどの株も検出できる抗体を用い、発色反応により粘着菌量を比較した。

4. 研究成果

(1) *srtG* 領域発現による菌体表層の線毛形成
金コロイド免疫電子顕微鏡法を行い、*srtG* 領域の遺伝子により菌体表層に線毛が形成される事を実証し、*Sgp1* がメジャーサブユニットとして線毛の骨格を形成している事を明らかにした（図1）。

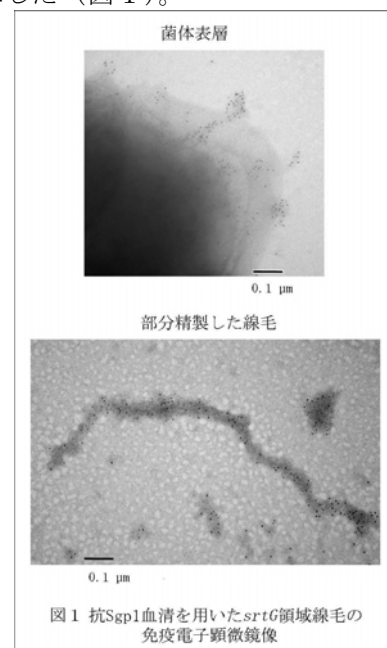
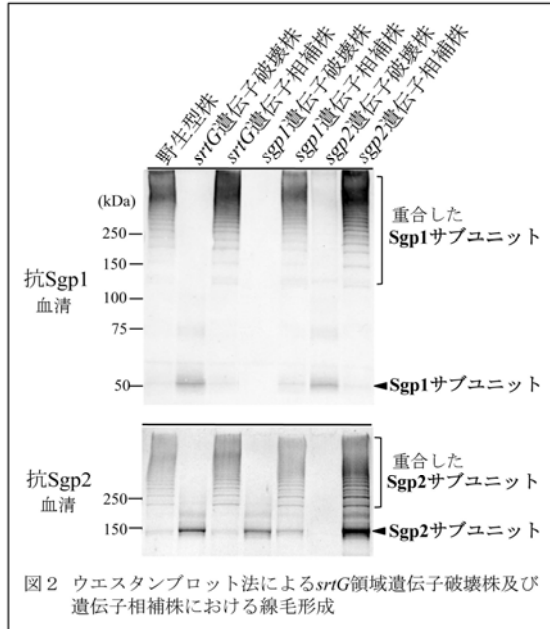


図1 抗*Sgp1*血清を用いた*srtG*領域線毛の免疫電子顕微鏡像

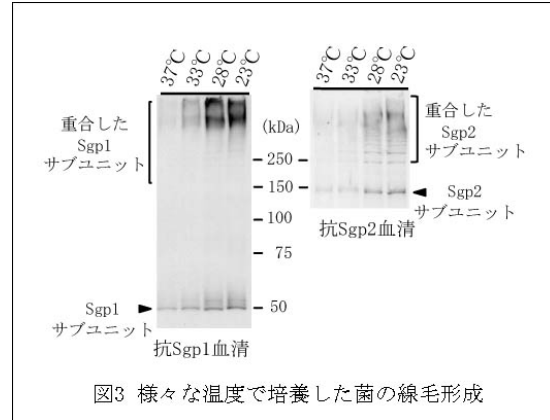
また、ウエスタンブロット法により、Sgp2 もマイナーサブユニットとして Sgp1 とともに線毛に組み込まれ、その組立てに SrtG が必須である事も明らかにした (図 2)。さらに、本線毛は、これまで報告されている線毛と組立て様式が異なり、組立てに重要でないと考えられていたマイナーサブユニットが線毛組立てに必要な事が明らかになった (図 2)。



このマイナーサブユニットの機能についてさらなる解析として、Sgp2 (997 アミノ酸) と他のいくつかの菌種の線毛タンパク質とで共通してみられたアミノ酸配列を置換あるいは欠失する事による線毛形成への影響を調べた。その結果、470 番目 (アスパラギン酸) 及び 780 番目のアミノ酸 (チロシン) は線毛形成に重要な役割を果たす事が明らかになった。以上の結果は、新たなタイプの組立て様式の線毛が存在する事を示唆しており、今後他菌種の未同定線毛を解析する上で有用な情報となる事が期待され、高い学術的評価を得ている。[Journal of Bacteriology に投稿中 (in revision)]

(2) *srtG* 領域線毛の生物学的機能は低温で発揮される

本線毛と細胞外基質タンパク質(コラーゲン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン)との接着を解析したところ、遺伝子破壊により線毛を欠失した株と野生型株との間で有意な差は認められなかった。しかし、解析の過程で、本線毛は低温 (20-30℃) で発現が上昇する事を見出した (図 3)。



そこで、豚の鼻腔や口腔内、様々な部位の体表温度を測定した結果、線毛発現に最適な 20-30℃である事が明らかになった (外気温 20-25℃)。以上の結果は、本線毛が宿主生体内よりも宿主体表あるいは環境中で機能している事を強く示唆しており、本菌が他の病原細菌とは異なる戦略で線毛発現により感染成立を有利にしている可能性を提示している。すなわち、*srtG* 領域線毛を保有する株は、体温より温度が低い宿主体表あるいは環境中では線毛の発現を上昇させる事により定着を有利にし、その後、生体内に侵入できるとその発現を抑制し、免疫原性を低下させる事 (線毛は表層の構造物である事から高い免疫原性を持つ) で、宿主の免疫システムから回避するという戦略で、感染を有利に進めている事が推測される。

今後は、この仮説を実証するため、野生型株と線毛欠失株をブタに噴霧等で感染させ、体表での定着率や豚体内への侵入率、体内に侵入した菌の生存率、豚への病原性などを比較する事を予定している。さらに、*srtG* 線毛が認識する標的物質 (認識物質) を特定するため、宿主体表あるいは環境中を想定した物質への接着能を野生型株と線毛欠失株との間で比較する事も行う予定である。宿主体表を想定した物質としては、ケラチンやムチンなどの表皮や粘膜の成分タンパク質、表皮を構成する細胞である角化細胞などを、環境中を想定した物質としては、金属や硝子などの無機物や、セルロースやキチンなどの有機物を候補に考えている。以上が明らかにできれば、菌の定着を阻害する等による防除技術の開発につながる事が期待される。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大倉正稔、大崎慎人、関崎勉、高井伸二、高松大輔、*Streptococcus suis* の線毛関連遺伝子群の分布及び *srtG* 遺伝子群の線毛形成に関する解析、第 91 回日本細菌学会関東支部総会、2008. 10. 23、生命の森リゾート
- ② 大倉正稔、大崎慎人、関崎勉、高井伸二、高松大輔、*Streptococcus suis* の線毛関連遺伝子群の分布及び *srtG* 遺伝子群の線毛形成に関する解析、第 82 回日本細菌学会総会、2009. 3. 12、名古屋国際会議場
- ③ 大倉正稔、大崎慎人、関崎勉、高松大輔、*Streptococcus suis* の *srtG* 遺伝子群による線毛様構造の発現及びマイナーサブユニット Sgp2 の線毛形成に重要な領域の特定、第 92 回日本細菌学会関東支部総会、2009. 11. 5、東京医科歯科大学
- ④ Masatoshi Okura、Makoto Osaki、Nahuel Pittipaldi、Marcelo Gottschalk、Tsutomu Sekizaki、Daisuke Takamatsu、Significant Contribution of Minor Pilin Subunit Sgp2 to Efficient Assembly of the Pilus Encoded by *srtG* Cluster of *Streptococcus suis*、44th United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources Panel of Animal and Avian Health Meeting、2009. 12. 2、National Institute of Animal Health
- ⑤ 大倉正稔、大崎慎人、関崎勉、高松大輔、*Streptococcus suis* の *srtG* 遺伝子群の線毛形成に関する解析、第 83 回日本細菌学会総会、2010. 3. 29、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 正稔 (OKURA MASATOSHI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・研究員
研究者番号：60508315

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：