

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 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16257

研究課題名（和文）脳膿瘍由来 *S. intermedius* の T7SS による血液脳関門突破機序の解明研究課題名（英文）Characterization of T7SS in *S. intermedius* isolated from brain abscess to blood-brain barrier disruption

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・主任研究官

研究者番号：30783633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：*Streptococcus intermedius* (SI) は、細菌感染性脳膿瘍の原因菌の1菌種と考えられているが、膿瘍誘導機序については未解明である。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 株において Type 7 Secretion System (T7SS) 依存的に分泌され、細胞傷害性への寄与が示唆された因子を同定した。加えて、同定した因子が他の T7SS 依存的分泌タンパク質の菌体外分泌にも関与することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重篤な症状を引起す細菌感染性脳膿瘍は、予防・制御方法の確立が医学上重要な課題となっている。しかしながら、脳膿瘍原因菌である *Streptococcus intermedius* (SI) の病態誘導機序は未解明である。本研究では、脳膿瘍由来の SI TYG1620 株において、既知の病原因子とは異なり、Type 7 Secretion System 依存的に分泌され細胞傷害性に寄与することが示唆された因子を見出した。本研究の成果は、SI における新たな病原因子を提示するものであるとともに、TYG1620 株の臨床的背景から血液脳関門突破能を含めた脳膿瘍形成機序の解明に重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus intermedius* (SI) is known as one of the bacteria causing brain and liver abscess. However, specific virulence factors involved in abscess formation have not been identified. SI TYG1620 strain was isolated as the causative agent from a brain abscess in an infant. In this study, we identified the cytotoxic factor secreted via Type 7 Secretion System (T7SS) in TYG1620 strain. In addition, this cytotoxic factor is also involved in the secretion of other T7SS-dependent secretory proteins. These results suggested TYG1620 strain produces a T7SS-dependent cytotoxic factor, not any known virulence factors.

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 細菌感染性脳膿瘍

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

*Streptococcus intermedius* (SI)はグラム陽性の球菌であり、口腔・尿生殖器細菌叢に存在する常在菌であるが、近年脳膿瘍・肝膿瘍を含む深部臓器膿瘍より高率に分離されており、深部臓器膿瘍原因菌の1菌種として考えられている。細菌感染性脳膿瘍では、菌が生体内バリアの1つである血液脳関門(Blood Brain Barrier : BBB)を突破し中枢神経器官への侵入が必要となる。細菌感染性脳膿瘍は、宿主に重篤な症状を引起するとともに、治療の侵襲性が高く、医学上解決すべき急務な課題となっている。しかしながら、多くの脳膿瘍原因菌では、中枢神経器官への移行様式が不明である。SIにおいても、どのように生体内バリアに保護された脳に移行し、膿瘍形成を誘導するのかについては未解明であり、関連する病原因子についても不明である。

所属センターにおいて、小児脳膿瘍患者の膿瘍サンプルより原因菌としてSI TYG1620株を分離した。病原性関連遺伝子の探索を目的に全ゲノム解読を実施した結果、Type 7 Secretion System (T7SS)関連遺伝子群の保有が確認された。T7SSは、広範なグラム陽性病原細菌で保有が確認されているタンパク質分泌装置であり、BBB突破能をもつ結核菌および黄色ブドウ球菌ではT7SS依存性の細菌毒素が同定され、病態誘導に重要な役割を担うことが報告されている。TYG1620株においてもマウス感染実験の結果から皮下膿瘍形成にT7SS遺伝子が関与することを報告済みである。加えて、申請者の事前研究によりTYG1620株が上皮系細胞株に対してT7SS依存性の細胞傷害性を有することを見出している。また、ゲノム情報よりT7SS関連遺伝子群はゲノム上に1組のみ存在しており、他のT7SS保有病原細菌のゲノムと比較しシンプルなゲノム構造であった。さらに、その他病原因子については、これまでに他のSIで報告されている病原因子遺伝子のみが確認された。つまり、臨床的背景、ゲノム情報、および事前研究結果から、TYG1620株はSI感染性脳膿瘍の解析に適した菌株であり、保有するT7SSが脳膿瘍誘導機序に寄与していることが考えられる。このことから、TYG1620株のT7SSに着目した病原性解析は、BBB突破能を含めたSI感染性脳膿瘍の誘導機序の解明に重要な知見となりうる。

## 2. 研究の目的

細菌感染性脳膿瘍では、生体内バリアの1つあるBBBにより保護されている中枢神経器官に病変が形成されるため、重篤症状を示す傾向にあるとともに治療自体にリスクを伴うことから、予防法・制御法の確立が急務な課題となっている。口腔内・尿生殖器細菌叢に常在菌として存在するSIが脳膿瘍を誘導するには、中枢神経器官への侵入の機会と膿瘍誘導関連因子の保有が必要となることが予想される。実際、SI感染性脳膿瘍の臨床報告では口腔内損傷や口腔内治療後に続発する例が多く存在している。つまり、SIは口腔内の損傷や治療を契機に血中に移行し、BBB突破能を保有した菌のみが中枢神経器官に侵入し脳膿瘍を形成することが考えられる。所属センターで分離されたSI TYG1620株は、脳膿瘍患者の病変部由来の菌株であり中枢神経器官への侵入能が保証されている、加えて全ゲノム解読および事前研究結果からTYG1620株の保有するBBB突破能を含めた脳膿瘍形成能には、T7SS関連遺伝子群が関与することが十分に期待される。そこで、本研究ではT7SS及びT7SS依存性の分泌因子に着目した病原性解析の実施により、未解明なSIのBBB突破能を含めた脳膿瘍誘導能に対する新たな知見の発見を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、小児脳膿瘍患者の病変部より原因菌として分離されたSI TYG1620株を使用してT7SSに着目した解析を実施した。事前研究において、TYG1620株を親株としたT7SSのmachinery proteinにトランスポゾンが挿入されたT7SS変異株とTYG1620株の培養上清中のタンパク質の網羅的同定および比較定量化(Secretome解析)を行った結果、T7SS依存性の分泌タンパク質を複数同定している。本研究では、同定した複数のT7SS依存性の分泌タンパク質のうち1つのタンパク質(以下、候補因子とする)に着目し、SI TYG1620株の病原性との関連性を検討した。検討において、下記の方法を用いた。

候補因子欠損変異株の作製および細胞傷害性との関連性の検討。

同定したT7SS依存性の分泌タンパク質である候補因子がTYG1620株の細胞傷害性に関与しているかを検討するために、TYG1620株を親株として候補因子欠損変異株を作製し、上皮系細胞株であるHeLa細胞に対する細胞傷害性を評価した。欠損変異株の作製は相同組換え法を用いた。得られた欠損変異株は、次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解読により候補因子をコードする遺伝子の欠損を確認した。また細胞傷害性の評価は、親株であるTYG1620株と候補因子欠損変異株の培養上清から菌体を除去し、3 kDa ポアサイズの限界ろ過膜を使用し20倍に濃縮したものをHeLa細胞に添加したのち、細胞培養液中に漏出したLactate dehydrogenase (LDH)量を測定することで評価した。

候補因子のリコンビナントタンパク質の作製および細胞傷害性の検討。

候補因子が直接的にTYG1620株の細胞傷害性に寄与しているのかを検討するために、候補因

子のリコンビナントタンパク質を作製し、HeLa 細胞に添加後、細胞傷害性の誘導を解析した。リコンビナントタンパク質の作製には、無細胞系タンパク合成法を用いた。また、リコンビナントタンパク質添加による細胞傷害性の評価は LDH の細胞外漏出量で評価した。

#### 候補因子欠損変異株培養上清中のタンパク質プロファイル確認

候補因子は T7SS 依存的に菌体外へと分泌されているが、候補因子欠損により他の T7SS 依存的分泌タンパク質の菌体外分泌への影響を確認するために、TYG1620 株および候補因子欠損変異株の培養上清を用いて data-independent acquisition 法による Secretome 解析を外部委託により実施した。得られたデータを解析し候補因子欠損による菌体外分泌タンパク質の変動を確認した。

#### 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 SI TYG1620 株を使用して、TYG1620 株の保有する T7SS 依存的分泌タンパク質（候補因子）に着目し、TYG1620 株の病原性との関連性を検討した。

TYG1620 株のゲノムデータをもとに相同組換え法により候補因子欠損変異株を作製した。なお、候補因子をコードする遺伝子の欠損は、次世代シーケンサーを用いたゲノム解読により確認した。得られた欠損変異株と親株である TYG1620 株の菌体を除去した濃縮培養上清を作製し、HeLa 細胞への添加による細胞傷害性の評価を行った結果、候補因子の欠損による細胞傷害性の有意な減弱が確認された。この結果から、事前研究により見出された TYG1620 株の T7SS 依存的細胞傷害性には、候補因子が寄与していることが示唆された。

一方で、無細胞系タンパク合成法により作製した候補因子のリコンビナントタンパク質を HeLa 細胞に添加し細胞傷害の誘導を検討した結果、細胞傷害性は確認されなかった。検討結果から、TYG1620 株の示す T7SS 依存的な細胞傷害性には、候補因子のみならず他の因子も必要である、もしくは候補因子同士が複合体を形成することが必要であることが考えられた。実際、ポアサイズの異なる限外ろ過膜を連続的使用し、TYG1620 株の濃縮培養上清を含有タンパク質の大きさごとに分取した後、各分画の細胞傷害性を評価した結果、候補因子単量体の大きさよりも大きなタンパク質が含まれる分画の添加により細胞傷害性が確認された。なお、欠損変異株の培養上清を用いて同様の解析を行うと、全ての分画で顕著な細胞傷害性は検出されなかった。この実験結果からも TYG1620 株の保有する T7SS 依存的な細胞傷害性には、候補因子のみではなく他の因子もしくは候補因子同士の複合体形成が必要であることが考えられた。

加えて、候補因子の欠損により菌体外分泌タンパク質のプロファイルがどのように変化するかを確認するために候補因子欠損変異株および TYG1620 株の濃縮培養上清を用いた Secretome 解析を実施し、両菌株間での分泌タンパク質の網羅的比較解析を実施した。Secretome 解析の結果、欠損変異株では候補因子は検出されなかった。一方で、予想に反して TYG1620 株と比較して候補因子欠損変異株の培養上清では、候補因子と異なる複数の T7SS 依存的分泌タンパク質の分泌量の減少が確認された。つまり候補因子は、候補因子自体が T7SS 依存的に菌体外に分泌されるのみならず、他の T7SS 依存的分泌タンパク質の菌体外分泌にも寄与していることが示された。

上記の結果から、本研究では SI TYG1620 株の保有する T7SS 依存的細胞傷害性において、T7SS 依存的に分泌される関連因子を同定した。さらに、同定した因子の培養上清を用いた Secretome 解析により、本因子が T7SS 依存的に分泌されるのみならず、他の T7SS 依存的分泌タンパク質の菌体外分泌にも寄与していることが示唆された。一方で、同定した因子は、単量体の状態では細胞傷害活性を示さず、T7SS 依存的細胞傷害性には他の因子の存在も必要となる、もしくは同定した因子同士の複合体形成が必要であることが考えられた。本研究では、未解明な SI における T7SS と病原性との関連性について、細胞傷害性に寄与する因子を同定するとともに同定した因子の複数の特性を見出した。本研究に使用された TYG1620 株は、臨床的背景から脳膿瘍形成能の保有が保証されているとともに、本研究結果およびゲノム情報から脳膿瘍誘導において T7SS が重要な役割を担っていることが考えられた。本研究成果は、BBB 突破能を含む SI 感染性脳膿瘍誘導機序解明の一助になることが期待される成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋野 正紀, 関塚 剛史, 黒田 誠
2. 発表標題 ESAT-6 like protein secreted via T7SS contributes to cytotoxicity of <i>Streptococcus intermedius</i>
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋野正紀、関塚剛史、糸川健太郎、黒田誠
2. 発表標題 ESAT-6 like protein contributes to T7SS-dependent cytotoxicity in <i>Streptococcus intermedius</i>
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋野正紀、糸川健太郎、関塚剛史、黒田誠
2. 発表標題 <i>Streptococcus intermedius</i> の病原性における7型分泌装置の特性解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------