

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21364

研究課題名（和文）ゲノム上の非共通遺伝子比較で抽出したclade特異的病原遺伝子候補の機能解析

研究課題名（英文）Functional analyses of clade-specific virulence genes specified from comparative genome analysis of uncommon genes

研究代表者

関崎 勉（Sekizaki, Tsutomu）

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70355163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Streptococcus suisは強毒から無毒まで多様性を示し、真の病原遺伝子は不明である。そこで、ゲノム上の非共通遺伝子の比較から真の病原遺伝子の特定を試みた。健康豚由来のS. suis 2株、近縁種であるS. parasuis 4株とS. ruminantium 3株のゲノム完全配列を決定し、データベースのS. suis 62株とS. ruminantium 2株と比較した。S. suisとS. ruminantiumにはEntner-Doudoroff経路とヒアルロン酸分解酵素遺伝子群がtandemに存在し、一方でS. parasuisにだけ存在するアミノ酸合成系遺伝子が見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Streptococcus suisおよびS. ruminantiumは、それぞれブタおよび反芻動物の口腔など上部消化器腔内や生殖器粘膜上に正常細菌叢として生息する。一方、S. parasuisはブタでは、宿主体内よりも生育環境から多く分離される。これらの3菌種間でのゲノム配列比較によって、エネルギー代謝や宿主組織侵襲性に関連するヒアルロンターゼ合成の遺伝子の有無や、アミノ酸合成系遺伝子の有無に違いが見られ、それが異なる菌種間での宿主との親和性の違いや自然界における生態を反映しているものと思われる、今後の病原性遺伝子解明や毒力推定に向けた新たな解析方向を示すものとなった。

研究成果の概要（英文）：Streptococcus suis shows extensive diversity from highly virulent to avirulent, however, the real virulence factor has yet been identified. This study aimed to identify the real virulence factor by comparing uncommon genes found on their genome sequences. Complete genome sequences of 2 strains of S. suis of healthy pig origin, 4 strains of S. parasuis, and 3 strains of S. ruminantium, the latter two are the close relatives of S. suis, were determined and compared with those of 62 strains of S. suis and 2 strains of S. ruminantium. Genes for Entner-Doudoroff pathway and hyaluronidase synthesis, which were tandemly clustered, were only found in S. suis and S. ruminantium, whereas some amino acid synthesis genes were only found in S. parasuis.

研究分野：獣医細菌学

キーワード：豚レンサ球菌 ゲノム解析 非共通領域 clade特異的病原遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は基本となる染色体構造 (core genome) に水平伝播で多くの外来遺伝子を獲得し pathogenicity island としてゲノムに装着して、強毒の病原細菌に進化してきた。近年では一般の消費者での髄膜炎患者も出ている豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) は、29 以上の血清型に型別されているが、病豚及びヒト患者から分離されるのは、血清型 2 型が最も多く、7, 9, 14 型などがそれに続く。また、Multi-locus sequence typing (MLST) による遺伝子型別では、強毒と思われる 2 型に、Clonal Complex (CC) 1 と呼ばれる最も強毒なグループと、それに続く CC20, CC25, CC28, CC104 などの clade がある。さらに全ての健康豚のだ液に常在し、無毒と思われる株も存在するなど多様性を示している。しかし、その毒力を規定する本質的な因子や真の病原遺伝子は不明である。これまでは、病豚やヒト患者から分離された強毒株と思われるものを多く収集し、それらの共通する遺伝子として、病原性関連遺伝子がいくつも提案されてきた。一方、それら個々の遺伝子を遺伝子組換えの操作でノックアウトさせても必ずしも病原性が消失するわけではなく、また、多くの強毒と思われる株を収集して、解析するとそれら病原性関連遺伝子と思われるものを保有しないにもかかわらず動物実験において強毒と判定される株も存在し、真の病原遺伝子は不明なままであった。一方、ゲノム配列決定技術の進歩により、完全長のゲノム配列決定が容易に行われるようになり、*S. suis* だけでなく、病原性や自然界での生態が異なる近縁種、例えば、*Streptococcus parasuis* や *Streptococcus ruminantium* の完全長ゲノム配列がデータベースに多く登録されるようになった。これら 2 菌種は、かつて *S. suis* と同種であると思われていたが、近年になって分類が再検討され別種であることが判明したもので、*S. parasuis* はブタの体液や体表などよりも環境中から多く分離され、一方、*S. ruminantium* はブタでなく反芻動物からしか分離された記録がないなど、その病原性や自然界での生態に大きな違いがあることから、これらを比較することで何らかの新知見が得られるのではないかとされている。

2. 研究の目的

本研究では、多様性を示す *S. suis* をモデルとして、これまで不可能だったゲノム上の非共通遺伝子の比較から真の病原遺伝子を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下の実験を行った。

- 1) データベースに登録されている情報に十分でないところがあるため、そのゲノム配列情報を増強するため、新たに、健康豚から分離した毒力が弱いと思われる *S. suis* 2 株のゲノム配列を MiSeq および MinION を使って complete genome sequence として決定した。
- 2) *S. suis* と比較解析するため以前は *S. suis* に分類されていた近年異種であると判明した近縁菌種である *Streptococcus parasuis* および *Streptococcus ruminantium* についても、重要と思われるそれぞれ 4 株および 3 株をこれまで収集した分離株から選択し、それらについても同様に complete genome sequence を決定した。
- 3) 上記の配列に加えて、既にデータベースに登録されていた *S. suis* 62 株と *S. ruminantium* 2 株の complete genome sequence を加えて比較ゲノム比較を行った。
- 4) 比較ゲノム解析では、各株の配列中にある遺伝子の同定から全体配列を連結させて類似度を比較したデンドログラム作成、共通遺伝子および非共通遺伝子の数をベン図により図示、ゲノム全体の genetic organization の比較、遺伝子を機能ごとに分類して、それらの有無やゲノム全体に占める存在割合を図示した。

4. 研究成果

1) 新たに決定したゲノム配列情報

S. suis 2 株 (DAT299, DAT300) および *S. parasuis* 4 株 (SUT-7, SUT-286, SUT-380, SUT-503) および *S. ruminantium* 3 株 (GUT-183, GUT-184, GUIT-189) の配列情報を表にまとめた。

Genome information	<i>S. suis</i>		<i>S. parasuis</i>				<i>S. ruminantium</i>		
	DAT299	DAT300	SUT-7	SUT-286	SUT-380	SUT-503	GUT-183	GUT-184	GUIT-189
Genome size (Mb)	2.13	2.32	2.20	2.20	2.11	2/06	2.18	2.12	2.08
No. of CDS	2,025	2,207	2,132	2,138	2,113	2,062	1,974	1,931	1,922
G+C%	41.3	41.1	39.9	40.0	39.8	39.9	39.9	40.0	40.1

2) *S. suis*, *S. parasuis*, *S. ruminantium* の 3 菌種間での比較

3 菌種間でゲノム配列から読み取れた遺伝子を比較すると、3 菌種全てに共通して保存されていた遺伝子 (orthologue) は 1,495 個であった。一方、それぞれの菌種特有の遺伝子は、*S. suis* で 5,120 個、*S. parasuis* で 720 個、*S. ruminantium* で 587 個であった (図 1)。3 菌種のゲノム配列から読み取れる遺伝子を機能別に分類し、それらを比較したものを図 2 に示す。特に大きな違いが見られたのは、*S. parasuis* においてアミノ酸合成代謝系遺伝子の数が他の 2 者に比べて多くなっている点であった。

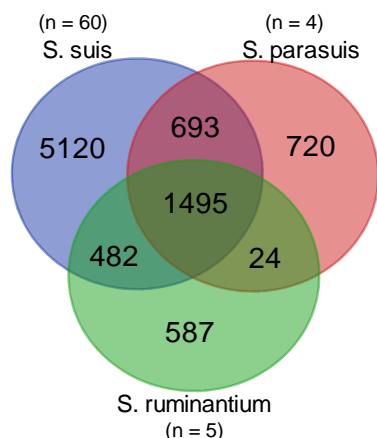


図1 3菌種間での共通遺伝子と非共通遺伝子の数

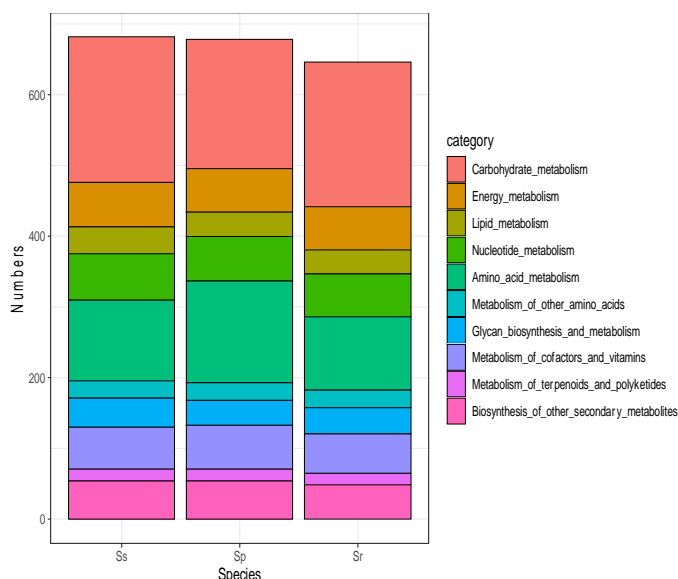


図2 3菌種間での遺伝子の機能別比較

さらに、詳細に比較検討すると、3菌種の間で環境中での生存、あるいは、生体内での生存に適応するためと思われる代謝系遺伝子の有無における違いが明らかになり、これらと病原性との関連が示唆された。特に、*S. suis* および *S. ruminantium* の2菌種だけには Entner-Doudoroff 経路に関連する遺伝子群とヒアルロン酸分解酵素遺伝子群が tandem に存在し、一方で *S. parasuis* にだけ存在するアミノ酸合成系遺伝子が見つかるなどその違いが明らかになった。

3) 代謝関連遺伝子の有無と菌の自然界での生態との関連

S. suis および *S. ruminantium* は、それぞれブタおよび反芻動物の口腔など上部消化器腔内や生殖器粘膜上に正常細菌叢として生息していることが分かっている。一方、*S. parasuis* はブタでは、宿主体内よりも生育環境から多く分離されることが分かっている。これらを総合すると、ヒアルロン酸分解酵素遺伝子群の存在は、*S. suis* および *S. ruminantium* が宿主体内に定着するために優位に働き、*S. parasuis* ではアミノ酸合成系遺伝子が宿主体内に比べてアミノ酸供給の少ない外部環境中での生存に有利に働いていると推察され、それが異なる菌種間での自然界における生態及び宿主との親和性の違いを反映しているものと思われた。また、前2者が保有していた Entner-Doudoroff 経路については、その存在意義は不明であるが、*Streptococcus pyogenes* など、病原性が明らかになっている他の *Streptococcus* 属菌にも同様にその遺伝子群が存在することから、宿主体内への侵襲性と何らかの関係が予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nomoto Ryohei, Ishida-Kuroki Kasumi, Tohya Mari, Nakagawa Ichiro, Sekizaki Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Three Streptococcus ruminantium Strains Obtained from Endocarditis Lesions of Cattle in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0124821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01248-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nomoto R, Ishida-Kuroki K, Nakagawa I, Sekizaki T	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete genome sequences of four Streptococcus parasuis strains obtained from saliva of domestic pigs in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc	6. 最初と最後の頁 e01245-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01245-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tohya Mari, Dozaki Shinichi, Ishida-Kuroki Kasumi, Watanabe Takayasu, Sekizaki Tsutomu	4. 巻 368
2. 論文標題 Basis of the persistence of capsule-negative <i>Streptococcus suis</i> in porcine endocarditis inferred from comparative genomics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnab083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnab083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita Nachiko, Watanabe Takayasu, Ishida-Kuroki Kasumi, Sekizaki Tsutomu	4. 巻 17
2. 論文標題 Transition of microbiota in chicken cecal droppings from commercial broiler farms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 e01142-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12917-020-02688-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Minowa-Nozawa Atsuko, Nozawa Takashi, Takamatsu Daisuke, Yoshida Akemi, Murase Kazunori, Kikuchi Taisei, Ishida-Kuroki Kasumi, Nitta Yoshihiro, Sekizaki Tsutomu, Nakagawa Ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Two Streptococcus suis Strains Isolated from Asymptomatic Pigs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01142-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01142-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida-Kuroki Kasumi, Takeshita Nachiko, Nitta Yoshihiro, Chuma Takehisa, Maeda Ken, Shimoda Hiroshi, Takano Ai, Sekizaki Tsutomu	4. 巻 9
2. 論文標題 16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Five Species of Wild Animals in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00368-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00368-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida-Kuroki Kasumi, Takeshita Nachiko, Nitta Yoshihiro, Chuma Takehisa, Maeda Ken, Shimoda Hiroshi, Takano Ai, Sekizaki Tsutomu	4. 巻 9
2. 論文標題 16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Wild Deer (Cervus nippon) in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00346-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00346-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Pan Yaqi, 黒木香澄, 野本竜平, 遠矢真理, 仁田義弘, 関崎 勉
2. 発表標題 Streptococcus suisの細胞壁結合タンパク質に関する調査
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
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
研究 分担者	遠矢 真理 (TOHYA MARI) (20804694)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	

	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
研究 協力者	香澄 黒木 (IHIDA-KUROKI KASUMI) (80760272)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官 (82603)	

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
---------	---------