

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19376

研究課題名（和文）細菌の多彩な病原性を操るポピュレーションダイナミクスと新規エピゲノム制御の探索

研究課題名（英文）Search for Population Dynamics and Novel Epigenomic Regulations that Manipulate Bacterial Pathogenicity

研究代表者

中川 一路（Nakagawa, Ichiro）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70294113

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）：A群レンサ球菌が宿主細胞内に侵入してゼノファジーに認識されるが、全ての菌が排除されるわけではなく、一部の菌はゼノファジーの分解から逃れる。そのため、感染した細胞から残存した菌を回収し、さらに再感染を行ったところ、一部の菌で、莢膜産生量が劇的に増加することが明らかとなった。現在これらの菌の遺伝子変異部位をショートリードシーケンサーによって解析したところ、ゼノファジーに晒された菌では、ゼノファジー不全細胞では見られない劇症型特有の変異株が出現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の病原性を大きく変化させる機構は、外来性遺伝子の獲得による構成遺伝子の変化だけでなく、点変異による遺伝子の変化やゲノム構造の変化を伴うリンジメントなど様々な要因が考えられる。そのため、「病原性の変化」を遺伝子の違いから類推することが細菌学の主流な研究スタイルとなっていた。本研究によって、一部の細菌では集団内でメチル化パターンの異なる亜集団を持つことで様々なストレス環境下での生存確率を制御あるいは異なる役割を分担させるといった高度な生存戦略を取ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Group A Streptococcus invades host cells and are recognized by xenophagy, but not all of the bacteria are eliminated, and some escape xenophagy degradation. Therefore, when the remaining bacteria were recovered from the infected cells and reinfected, we found that capsular production increased dramatically in some bacteria. We analyzed the gene mutation sites of these bacteria by short-read sequencing, and we found that the bacteria exposed to xenophagy showed a deleterious mutation that is not seen in xenophagy-deficient cells.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 遺伝子変異 ゼノファジー 病原性の変化

1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌は、劇症型感染症の増加が日本でも近年急増しており、その原因説明が急務である。劇症型感染症株に見られる共通の特徴としては、2成分制御系の1つである *covRS* 遺伝子あるいはその近傍で、生体内で変異が起き、莢膜の過剰産生や毒素の分泌の異常亢進によって病態が形成されると考えられている。この変異は特定の配列ではなく、*covRS* の遺伝子内やプロモーター領域などにのみ認められるという興味深い現象である。グラム陽性菌である A 群レンサ球菌のメチル化がどのような影響を与えているのかという点については、2019年に Watson のグループが制限修飾系の m6A 欠損株で、病原性遺伝子の発現が著しく減弱することを報告している。ただし、この結果は通常の増菌培地を用いた結果であり *in vivo* での遺伝子発現とは異なっている。すなわち、*in vivo* という細菌にとってストレスの大きな環境では異なるということが示唆された。共同研究者の竹本は、同時期にマウス感染モデルを用いて、A 群レンサ球菌のゲノム変異が、臨床分離株と同様に特定の領域に変異が入ることを実験的に証明していた。そこで、これまでの知見を照らし合わせることで、少なくとも A 群レンサ球菌ではゲノム修飾が、ゲノムの変異そのものを誘導しているのではないかという仮説を立てるに至った。

細菌の病原性を大きく変化させる機構は、外来性遺伝子の獲得による構成遺伝子の変化だけでなく、点変異による遺伝子の変化やゲノム構造の変化を伴うリレンジメントなど様々な要因が考えられる。そのため、「病原性の変化」を遺伝子の違いから類推することが細菌学の主流な研究スタイルとなってきた。しかし、同じゲノム配列であっても、Epigenetic な変化によって病原性が変化することが報告されてきており、従来の解析だけでは病原性の発揮メカニズムを説明できなくなっている。細菌において、DNA のメチル化は外来性遺伝子に対する免疫システムである制限・修飾系以外にも、複製開始制御や DNA ミスマッチ修復システムへの寄与が知られている。また、メチル化は遺伝子発現制御に関わり、近年、一部の細菌では集団内でメチル化パターンの異なる亜集団を持つことで様々なストレス環境下での生存確率を制御あるいは異なる役割を分担させるといった高度な生存戦略を取ることが明らかとなってきた。しかし、この亜集団の出現、すなわちポピュレーションダイナミクスが「偶然に」発生するのか、それとも外的要因によって、「特異的に」起きえるのか、という点についても、十分な見解は蓄積されていない。本研究ではこれらに加え、メチル化などのゲノムの修飾が、単に遺伝子発現だけでなくメチル化の制御を介してゲノムそのものの変異率さえ制御しているのではないかという可能性を解析する。このメカニズムについては、これまで単に「ゲノムに入る自然変異」として見逃されていた可能性が高く、このメカニズムを明らかにすることができれば、細菌が宿主内でダイナミックにゲノム変異を導入して病原性を変化させることを意味しており、細菌の新規治療法に結びつく可能性も秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、細菌が宿主内での環境変化に適応して高病原化するポピュレーションダイナミクスについて、その制御を担う制御メカニズムとしてエピゲノム制御機構に着目し、高病原化する新たなメカニズムを探索・解明することを目的としている(下図)。A 群レ

ンサ球菌感染では、通常咽頭炎や皮膚の化膿性疾患が主な疾患であるが、散発的に非常に侵襲性の高い劇症型感染症を引き起こすなど多彩な病態を示すことが特徴である。また、劇症型感染症は、特定の劇症型株が流行するのではなく散発的に発生することや、これまでのゲノム比較解析の情報などから通常の咽頭炎由来株が、生体内で何らかの原因によってゲノムのある領域に変異を起こすことで機能欠損体となり、様々な病原因子の過剰産生を起こすことで高病原化し、より侵襲性の高い疾患を引き起こすことが示唆されている。しかし、生体内でそのような変異が、いつ、どのように起きるのかについては明らかとされていない。そこで、本研究では、細菌のゲノムの特定の領域特異的に変異を起こすメカニズムについて、1) DNA 修飾が単に部位特異的な修飾によって遺伝子発現の変化を誘導するだけでなく、変異導入を誘発することで高病原化を促すのか 2) 宿主生体内ではゲノム変異が高頻度で誘発されるのか、またそれがどこで起きるのか 3) 変異を誘発するような外的刺激は存在するのか、の3点について明らかにする。そのため、A群レンサ球菌の種々の遺伝子欠失体・変異体・再導入体を駆使して *in vivo* (マウス感染系) と iPS オルガネラを用いた感染実験系により DNA メチル化と変異の頻度を解析し、また1分子リアルタイム測定によるミスマッチ直接検出法を導入することで、実際の生体内により近い状況で変異導入メカニズムに迫るとともにエピゲノミックな変化が変異導入に関わるかどうかを明らかにする。これらの結果は、単に劇症型感染症の発症要因を明らかとするだけでなく、細菌種が高病原化する全く新しい概念を提唱することとなる。

3. 研究の方法

1) *in vivo* における DNA 修飾による遺伝子発現変化とゲノム変異導入の解析

細菌では N6-methyladenine (m6A), N4-methylcytosine (m4C), 5-methylcytosine modifications (m5C) の DNA メチル化酵素(MTase)が存在している。A群レンサ球菌では制限修飾系として m6A が1つ存在しており、病原遺伝子の発現量を制御していることが報告されている(Nye et al, PLoS Pathogen, 2019)。しかし、これ以外にもゲノム比較解析から少なくとも2つ以上のオルファン MTase が存在している。そのため、比較ゲノム解析結果から、この候補遺伝子を選択し、それぞれの遺伝子欠失株・置換株・導入株を作製する(中川)。これらの株をマウス感染系において、経時的に回収し、PacBio SMRT sequencing によってメチル化部位の同定とその頻度、変異率測定を行う。変異率測定には、竹本が独自に開発中の1世代以内の変異率変化が測定可能な高い時空間分解能を持つ DNA ミスマッチ測定を用いる。同時に、回収した菌は short read sequencer によって、変異点を同定し変異体頻度を明らかにする。これらを総合しポピュレーションダイナミクスの観点から解析する。

2) iPS オルガネラを用いた変異導入の部位・感染時期の解析

マウス感染では、感染時のどの状態に変異の導入が起きるのかを解析するのは困難である。そこで、iPS 細胞を用いたオルガネラ系を用いて、上記1)と同様に行う。iPS オルガネラ系では、粘膜上皮、気管上皮、皮膚上皮系の3種類、すなわち A群レンサ球菌の初期感染部位と考えられるモデルを用いて解析を行う。このモデルは中川が確立している方法であり、上皮細胞系では感染30分程度で宿主細胞内に菌が侵入し、さらに3時間後には、宿主のオートファジー系から逃れた一部の菌が exocytosis を介して体内側に漏出することも確認できている。上記のマウス感染モデルの結果を比較することで、

部位別の変異体出現頻度を確認する。

3) 外的刺激による変異導入率の変化の解析

細菌が外的刺激を捉えるシステムとして2成分制御系があり、A群レンサ球菌には13種類が存在している。これらのセンサー系は炭素源、温度、pHなどの変化への順応に寄与すると考えられているが、DNA修飾や変異導入についての報告はない。そこで、これらの遺伝子欠損株と、上記のMTase欠損株、あるいは多重欠損株を用いて変異率・位置を同定する。

4. 研究成果

A群レンサ球菌感染では、通常咽頭炎や皮膚の化膿性疾患が主な疾患であるが、散発的に非常に侵襲性の高い劇症型感染症を引き起こすなど多彩な病態を示すことが特徴である。また、劇症型感染症は、特定の劇症型株が流行するのではなく散発的に発生することや、これまでのゲノム比較解析の情報などから通常の咽頭炎由来株が、生体内で何らかの原因によってゲノムのある領域に変異を起こすことで機能欠損体となり、様々な病原因子の過剰産生を起こすことで高病原化し、より侵襲性の高い疾患を引き起こすことが示唆されている。しかし、生体内でそのような変異が、いつ、どのように起きるのかについては明らかとされていない。そこで、本研究では、細菌のゲノムの特定の領域特異的に変異を起こすメカニズムについて、1) DNA修飾が単に部位特異的な修飾によって遺伝子発現の変化を誘導するだけでなく、変異導入を誘発することで高病原化を促すのか 2) 宿主生体内ではゲノム変異が高頻度で誘発されるのか、またそれがどこで起きるのか 3) 変異を誘発するような外的刺激は存在するのか、についての解析を行った。本年度は、DNA修飾に関わる修飾酵素の遺伝子破壊株を作製した。

さらに、細菌のゲノムの特定の領域特異的に変異を起こすメカニズムについて、1) DNA修飾が単に部位特異的な修飾によって遺伝子発現の変化を誘導するだけでなく、変異導入を誘発することで高病原化を促すのか 2) 宿主生体内ではゲノム変異が高頻度で誘発されるのか、またそれがどこで起きるのか 3) 変異を誘発するような外的刺激は存在するのか、についての解析を行った。本年度は、DNA修飾に関わる修飾酵素の遺伝子破壊株を作製した。また、A群レンサ球菌が宿主細胞内に侵入してゼノファジーに認識されるが、全ての菌が排除されるわけではなくて、一部の菌はゼノファジーの分解から逃れる。そのため、感染した細胞から残存した菌を回収し、さらに再感染を行ったところ、一部の菌で、莢膜産生量が劇的に増加することが明らかとなった。現在これらの菌の遺伝子変異部位をショートリードシーケンサーによって解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Akihiro, Hikichi Miyako, Nozawa Takashi, Nakagawa Ichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 FBX02/SCF ubiquitin ligase complex directs xenophagy through recognizing bacterial surface glycan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e52584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202152584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamawaki Tsukushi, Nakakido Makoto, Ujiie Kan, Aikawa Chihiro, Nakagawa Ichiro, Tsumoto Kouhei	4. 巻 565
2. 論文標題 Characterization of a putative maltodextrin-binding protein of Streptococcus pyogenes, SPs0871 and the development of a VHH inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.056	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 Aikawa Chihiro, Kawashima Kiyosumi, Fukuzaki Chihiro, Nakakido Makoto, Murase Kazunori, Nozawa Takashi, Tsumoto Kouhei, Nakagawa Ichiro	4. 巻 566
2. 論文標題 Single-chain variable fragment (scFv) targeting streptolysin O controls group A Streptococcus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 177~183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.021	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 Nozawa Takashi, Iibushi Junpei, Toh Hirotaka, Minowa-Nozawa Atsuko, Murase Kazunori, Aikawa Chihiro, Nakagawa Ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Intracellular Group A <i>Streptococcus</i> Induces Golgi Fragmentation To Impair Host Defenses through Streptolysin O and NAD-Glycohydrolase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e1974-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01974-20	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川一路
2. 発表標題 生命金属の新潮流
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川 知宏, 長門石 暁, 中木戸 誠, 妹尾 暁暢, 星野 将人, 野澤 孝志, 村瀬 一典, 津本 浩平, 中川 一路
2. 発表標題 A 群レンサ球菌の増殖に必要な鉄獲得機構に対する阻害剤の探索
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤 孝志, 中川 一路
2. 発表標題 ESCRT 機構による A 群レンサ球菌感染制御
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〕

京都大学医学部微生物感染症学分野 http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp

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	竹本 訓彦 (Takemoto Norihiko) (40546793)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局 等・上級研究員 (82610)	

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