

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580420

研究課題名(和文)豚レンサ球菌の莢膜欠失による異なる病原性発現機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism that elaborate an alternative pathogenicity by loss of capsule in *Streptococcus suis*

研究代表者

関崎 勉 (SEKIZAKI, TSUTOMU)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：70355163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：豚レンサ球菌は豚やヒトに髄膜炎や心内膜炎を起こす病原細菌だが、この菌が表層に産生する莢膜は白血球の食菌作用に抵抗する重要な病原因子である。本研究では、豚の心内膜炎由来株に多く見られる無莢膜株を解析し、莢膜形成の遺伝子群に突然変異があること、さらに変異部位によっては菌が死んでしまい、他の変異によりこれを逃れることを見出した。また、無莢膜株は血小板接着やバイオフィーム形成能亢進という心内膜炎発症に都合の良い性質を示し、莢膜産生株がバイオフィームに取り込まれるのを促進することを示した。

研究成果の概要(英文)： *Streptococcus suis* is a bacterial pathogen that causes meningitis or endocarditis in pigs and humans. Capsule, a surface component produced by this bacterium, is an important virulence factor that inhibits phagocytosis of white blood cells. This study showed that acapsular cells of *S. suis*, which have sometimes been found in swine endocarditis isolates, have spontaneous mutations in capsular polysaccharide synthesis (cps) genes, and that mutations in some cps genes appeared lethal for the bacteria, whereas these lethal effects were relieved by mutations in the other cps genes. Moreover, acapsular cells showed elevated adherence to porcine and human platelets, a major virulence determinant for infective endocarditis, compared with capsular cells and the acapsular cells facilitated the incorporation of capsular cells to the biofilm formed by acapsular cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症 獣医細菌学 分子遺伝学 レンサ球菌 病原因子 プタ 莢膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) 感染症は若齢豚を中心に敗血症、髄膜炎、心内膜炎等を起こす疾病である。本病は世界中の養豚国で発生しており、また、人にも髄膜炎、心内膜炎などを起こすことが報告されているが、従来は散発的な発生に留まっていた。しかし、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、人獣共通感染症としての本病の重要性が世界的に注目されてきている。すなわち、1998 年には中国江蘇省で豚 8 万頭に及び本病の発生があり、その際 25 名の患者が発生し、うち 14 名が死亡した。また、2005 年には中国四川省で 215 名の患者発生に対して 39 名が死亡し世界を震撼させた。タイやベトナムなどのアジア諸国においても豚あるいは豚肉等を原因とする人の集団発生と死亡例が報告されている。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 14 名の患者 (うち 2 名は死亡) が確認されている。健康な豚が扁桃などに本菌を保菌していても発症しない例は多く、保菌の程度については、日本および諸外国での成績から、子豚で 30~40%、成豚で 60%ほどと推定されている。同時に、臨床上健康な豚がと畜場で解体される際、心臓病変の発見により心内膜炎を指摘される例も多く、これらの保菌部位から食肉が汚染されて人への感染源になると考えられる。しかし、本菌が扁桃や心内膜に潜在的に定着するメカニズムや病原因子に関する学術知見は全くなく、本菌を健康豚から排除する技術の開発を妨げている。

(2) *S. suis* の病原因子としては muramidase released protein (MRP)、extracellular factor (EF)、溶血毒素スリジン (SLY) などが報告されてきたが、これらマーカー分子の遺伝子をノックアウトしてもその病原性に大きな変化がなく、病原因子としての役割は否定されている。また、これらの因子はヨーロッパで分離される強毒株では保有率が高い傾向にあるが、北米で分離される強毒株の多くはこれらの因子を保有せず、強毒株識別のためのマーカーとしても利用することができない。血清白濁化因子と病原性との関連も報告されたが、一部の株だけに存在する因子である。また、いくつかの house-keeping 遺伝子をノックアウトして病原性が下がった報告もあるが、それらは細菌の生育に本質的または有効な因子であり、これらを欠失した株の脆弱化により病原性が低下したものと考えられる。しかし、莢膜を失った株は弱毒化し、血清の殺菌作用への抵抗性の低下、宿主の免疫応答の亢進が見られるなどの結果、生体内での殺菌が速やかに行われる。ところが近年、莢膜を失った株の方が宿主細胞への接着、細胞への侵入性、バイオフィーム形成能が亢進することが見出され、本来病原因子であるはずの莢膜を失った結果、病原性に

関連する異なる性状が現れることが明らかとなった。一方で、申請者らは、豚の心内膜炎から分離した *S. suis* には、莢膜を欠失した株が無視できぬ割合で分離され、心内膜炎由来株には正常に莢膜を発現する株と莢膜を欠失した株の 2 つの集団が混在していることを見出した。心内膜炎では、菌が心臓の弁膜・心内膜等に接着し、バイオフィームを形成することにより患部に定着して疣贅を形成する。感染の初期においては、血流中で宿主の防御反応に抵抗し生き延びるために莢膜が必要である。しかし、心臓弁膜等に接着し、バイオフィームを形成するためには、莢膜を失うことが必要なのであるか。もし、そうならば、心内膜炎から莢膜を欠失した株が多く分離されることは偶然の産物ではなく、菌にとって計算された計画的変化であり、生体内の特定の niche に留まるための仕組みであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで収集した心内膜炎由来 *S. suis* 株を用いてその莢膜欠失を生じる遺伝子の変異を解明し、さらにその遺伝子変異の法則性や変異を生じる調節系の有無について解析し、本菌が豚に定着するメカニズムを明らかにする糸口を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 莢膜発現の検査

収集した心内膜炎由来菌株について少なくとも 300 株程度を用いて、それらの莢膜発現について血清による凝集反応および電子顕微鏡観察により明らかにした。凝集反応は、通常のスライド凝集反応だけでなく、莢膜発現が弱くなった株の存在も想定してキャピラリー凝集反応及び共凝集反応も併用した。電子顕微鏡観察では、ネガティブ染色および超薄切片法で Ruthenium Red 染色や免疫染色などを併用して莢膜の存在を視覚的にも明らかにした。

(2) 莢膜遺伝子群の構造解析

凝集反応および電子顕微鏡観察において莢膜を欠失したと確認された株について、莢膜産生遺伝子 (*cps*) 群領域をカバーする全 21 組の primer セットを用いて PCR によりそれぞれの領域断片の増幅が見られるか調べた。増幅が見られたが、予想される断片長とは異なるものについては、その塩基配列を決定して、変異の実体を明らかにした。増幅が見られなかった領域に関しては、inverse PCR などにより周辺領域を増幅させ、欠失が起こった領域の塩基配列を明らかにした。さらに、莢膜欠失にも関わらず、全ての領域で増幅が見られた場合には、全領域の塩基配列を決定した。

(3) 有莢膜株及び無莢膜株の血小板への接着
豚及びヒト血小板を培養用マイクロチャン

バーに固定し、髄膜炎由来有莢膜株及び心内膜炎由来無莢膜株の血小板への接着性を観察した。同様に、髄膜炎由来野生株を元に実験的に *cps* 遺伝子領域に変異を導入した無莢膜株も供試し、血小板への接着性を親株と比較した。

(4) *cps2NO* 及び *cps2IJ* 領域の変異実験

解析した心内膜炎由来無莢膜株で変異が見られなかった *cps2NO* 及び *cps2IJ* 領域に実験的に変異を導入するため、この領域を欠失した遺伝子断片を温度感受性プラスミドベクターに連結し、有莢膜株および *cps2EF* 領域に変異した無莢膜株に形質転換した。これを、温度を上げて培養し single-cross over 変異株を作成した後、温度を下げて培養し、double-cross over 変異株が形成されるかを観察した。

(5) 無莢膜株存在・非存在下での有莢膜株のバイオフィーム形成能の比較

cps2EF 領域欠失無莢膜株を用いて、これにスペクチノマイシン耐性発現プラスミドベクターに *cps2EF* 領域を連結したものを形質転換し有莢膜になった株を用意した。培養用マイクロチャンバーに無莢膜株のバイオフィームを形成させたものと、菌を接種しない対照を用意し、これらに上記の発現ベクターにより有莢膜になった株を添加して一定時間培養後、菌を回収し、スペクチノマイシン添加培地に接種して、有莢膜株のバイオフィームへの取り込みを測定した。

4. 研究成果

(1) 心内膜炎及び髄膜炎由来株の莢膜産生性血清型 2 型及び 1/2 型に必須な *cps2J* 遺伝子を保有する心内膜炎由来 256 株と対照として髄膜炎由来 32 株を用い、それらの莢膜発現を血清凝集反応と電子顕微鏡観察により調べると、髄膜炎由来株は全て莢膜を発現していたのに対し、心内膜炎由来株中 86 株(34%)は、莢膜を発現していなかった。

(2) 莢膜遺伝子の解析

莢膜を発現していない株から 43 株を無作為に選び、*cps* 遺伝子群領域の各遺伝子に対する PCR を実施したところ、18 株で増幅が見られないか、親株と異なる増幅が見られた。塩基配列を決定すると、欠失や挿入が起こっていた。特に、*cps2EF* 領域に変異が集中していたことから、残りの 25 株について *cps2EF* 領域の塩基配列を決定したところ、20 株で 1~数塩基の変異を見つけた。残りの 5 株については、*cps* 領域全長の塩基配列を決定し、*cps2EF* 領域以外に 1~数塩基の変異を見つけた。しかしながら、*cps2IJ* 及び *cps2NO* 領域への変異は、1 株の例外(同時に *cps2H* にも変異あり)認められなかった。

(3) 血小板への接着

血小板への接着性は、心内膜炎起因菌にとって病変形成過程に重要な病原因子であるとされている。豚の髄膜炎由来有莢膜株と豚の心内膜炎由来無莢膜株での豚及びヒト血小板への接着性は、無莢膜株の方が有意に高かった。これは、別な有莢膜株とその莢膜遺伝子変異株との比較でも同様であった。

(4) *cps2NO* 及び *cps2IJ* 領域の変異実験

有莢膜株を使用した場合、*cps2NO* または *cps2IJ* 領域の double-cross over による変異株は生じなかった。しかし、予め *cps2EF* 領域に変異を導入した無莢膜株を使用した場合、通常の高確率で *cps2NO* 及び *cps2IJ* 変異株を生じた。従って、この領域の変異は、菌にとって致死的事であること、さらに *cps2EF* 領域の変異がその致死性を回避すると解釈された。

(5) バイオフィーム形成能

無莢膜株は、有莢膜株に比べて有意にバイオフィーム形成能が勝っていた。さらに、無莢膜株でバイオフィームを形成させた場合には、有莢膜株の無莢膜株バイオフィームへの取り込みが有意に亢進した。

(6) まとめ

豚レンサ球菌の病原因子である莢膜を失うと、白血球によって食菌されるだけでなく、莢膜形成遺伝子の変異部位によっては、それだけで致死になることが判明した。このように菌にとっては危険性の高い莢膜の変異であるが、その結果、心内膜炎の惹起に関連する血小板への接着の亢進、バイオフィーム形成能亢進など、心内膜炎発症に寄与する性状が現れた。さらに、有莢膜株のバイオフィームへの取り込み亢進を示したことは、無莢膜株と有莢膜株という異なる形質の細菌が協調して病変を形成するという、これまでにない新しい概念を提唱する結果となった。

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)

[雑誌論文](計10件)

Kerdsin A, Akeda Y, Hatrongjit R, Detchawna U, Sekizaki T, Hamada S, Gottschalk M, Oishi K. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. *J Med Microbiol.* 63:824-830, 2014.

Lakkitjaroen, N., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M., and Sekizaki, T. Capsule loss or death: The position of mutations among capsule genes sways the destiny of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 354:46-54, 2014.

Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C.,

Gottschalk, M. and Takamatsu, D. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 52:1714-1719, 2014.

Nomoto R., Tien le H.T., Sekizaki T., and Osawa R. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus gallolyticus* isolated from humans and animals. *Jpn J Infect Dis.* 66(4):334-336, 2013.

Okura, M., Takamatsu, D., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Osaki, M., Sekizaki, T., Gottschalk, M., Kumagai, Y., and Hamada, S. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis 1 gene clusters from all serotypes of *Streptococcus suis*: potential mechanisms for the generation of capsular variation. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:2796-2806, 2013.

Anusak, K., Dejsirilert, S., Akeda, Y., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M., Oishi, K. Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR. *J. Med. Microbiol.* 61:1669-1672, 2012.

Sekizaki, T. *Streptococcus suis*: an emerging biothreat. *Journal of Disaster Research* 7 (3):303-312, 2012.

Fittipaldi, N., Xu, J., Lacouture, S., Tharavichitkul, P., Osaki, M., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Gottschalk, M. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. *Emerg. Infect. Dis.* 17:2239-44, 2011.

Lakkitjaroen, N., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M., Sekizaki, T. Loss of capsule among *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its biological significance. *J. Med. Microbiol.* 60:1669-1676, 2011.

Okura, M., Osaki, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Sekizaki, T., and Takamatsu, D. The minor pilin subunit Sgp2 is necessary for assembly of the pilus encoded by the srtG cluster of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.*, 193:822-831, 2011.

[学会発表](計18件)

野本竜平、石田沙倉、遠矢真理、関崎 勉、丸山史人、大澤 朗 Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, and 26 based on DNA homology. 第87回日本細菌学会総会, タワーホール船堀(国立感染研), 2014.3.26-28.

石田沙倉、遠矢真理、野本竜平、大澤 朗、関崎 勉 *Streptococcus suis* の再分類に対応するPCR法 第87回日本細菌学会総会, タワーホール船堀(国立感染研),

2014.3.26-28.

大倉正稔、大崎慎人、関崎 勉、丸山史人、野澤孝志、中川一路、浜田茂幸、高松大輔 豚レンサ球菌莢膜糖鎖合成遺伝子領域を標的とした型別法の開発と利用 第87回日本細菌学会総会, タワーホール船堀(国立感染研), 2014.3.26-28.

Ishida, S., Tohya, M., Nomoto, R., Osawa, R., and Sekizaki, T. Development of a novel LAMP assay for detection of *Streptococcus suis*. 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2014. Tower Hall Funabori, Tokyo, Japan. 2014.3.24-25.

関崎 勉 「豚レンサ球菌の莢膜と病原性について」シンポジウム「グローバル化時代の新興感染症」, 日本大学生物資源科学部、藤沢、神奈川 2013.12.6-7.

Sekizaki, T. Loss of capsule and an alternative virulence in *Streptococcus suis*. First International Workshop on *Streptococcus suis*, Beijing, China, 2013.8.12-13.

大倉正稔、高松大輔、丸山史人、野澤孝志、中川一路、大崎慎人、関崎 勉、熊谷由美、浜田茂幸 *Streptococcus suis* 全血清型の莢膜多糖合成遺伝子クラスターの解析 第22回Lancefieldレンサ球菌研究会、順天堂大学、東京、2013.6.28-29.

Lakkitjaroen, N., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M., and Sekizaki, T. Gene conversions in the *Streptococcus suis* cps genes lead to either death or benefit for adhesiveness of the whole population. 第22回Lancefieldレンサ球菌研究会、順天堂大学、東京、2013.6.28-29.

大倉正稔、高松大輔、丸山史人、野澤孝志、中川一路、大崎慎人、関崎 勉、浜田茂幸 *Streptococcus suis* 全血清型の莢膜関連遺伝子群の解析 第86回日本細菌学会総会、幕張メッセ、千葉、2013.3.18-20.

Nattakan Lakkitjaroen, 高松大輔、大倉正稔、大崎慎人、関崎 勉 Mutations in cps2J and SSU0533-0534 regions of cps2 locus are lethal for *Streptococcus suis*. 第86回日本細菌学会総会、幕張メッセ、千葉、2013.3.18-20.

Sekizaki, T. Surface components of *Streptococcus suis*. 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012. Buyeo, Korea. 2012.9.13-14.

関崎 勉 豚レンサ球菌感染症の分子遺伝学的研究 第5回感染病態研究フロンティア、東京、2012.8.4

Lakkitjaroen, N. Takamatsu, D., Okura, M., Osaki, M., Sekizaki, T. Mutations that affect the production of capsule in *Streptococcus suis*. 第21回Lancefieldレンサ球菌研究会、大阪大学、大阪 2012.6.8-9.

関崎 勉 ヒトと動物に共通するレンサ球菌感染症（特別講演）第 22 回 Lancefield レンサ球菌研究会、大阪大学、大阪 2012.6.8-9

Sekizaki, T. Recent research progress in *Streptococcus suis* infection. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎ブリックホール（長崎大学医学部）長崎 2012.3.27-29.

大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉, 高松大輔. *Streptococcus suis* 血清型 1 型、2 型、1/2 型及び 14 型の莢膜合成遺伝子領域の比較解析 第 85 回日本細菌学会総会、長崎ブリックホール（長崎大学医学部）、長崎 2012.3.27-29.

Lakkitjaroen, N., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M., Sekizaki, T. Frequent loss of capsular expression in *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its significance in the pathogenesis of endocarditis. International Union of Microbial Society 2011, Sapporo, Japan. 2011.9.6-10.

Lakkitjaroen, L., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M., Sekizaki, T. Frequent loss of capsular expression in *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its significance in the pathogenesis of endocarditis. 第 20 回 Lancefield レンサ球菌研究会、愛知学院大学、名古屋、2011.6.13-14.

〔図書〕(計 1 件)

関崎 勉 「昨今の食中毒問題とその規制強化から学ぶもの」"生食のおいしさとリスク" 一色賢司編、p. 523-529、エヌ・ティー・エス出版、2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関崎 勉 (SEKIZAKI TSUTOMU)
東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：70355163

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大澤 朗 (OSAWA RO)
神戸大学大学院農学研究科・教授
研究者番号：10253189

大崎慎人 (OSAKI MAKOTO)
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・主任研究員
研究者番号：80355164

高松大輔 (TAKAMATSU DAISUKE)
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・主任研究員
研究者番号：60414728

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