

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592769

研究課題名(和文) 高病原性ストレプトコッカス・ミチスは存在する：その病原性と疫学の研究

研究課題名(英文) Highly pathogenic *Streptococcus mitis* exists: A study on its pathogenicity and epidemiology

研究代表者

長宗 秀明 (Nagamune, Hideaki)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：40189163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低病原性の口腔連鎖球菌 *Streptococcus mitis* (SM) にコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) を複数持つ株が確認されたため、SM株パネルを用いてゲノム比較や病原性と疫学解析を行った。その結果、ペニシリン耐性 (PR) でヒト指向性CDCによる強いヒト細胞障害性を示す高病原性SM (HPSM) が肺炎患者等から高率に分離されることが判明した。これらSM株と同属菌種のゲノム比較の結果、各CDC遺伝子の配座はパターン分けでき、その近傍で近縁種と遺伝子交雑の可能性が示された。従ってCDC遺伝子がSMに伝搬後、さらに菌種内/菌種間で組換えを起し、PR獲得も伴いHPSMが生じたと推定された。

研究成果の概要(英文)：In *Streptococcus mitis* (SM), an oral streptococcus generally recognized as low pathogenic species, the strains with plural cholesterol-dependent cytolysins (CDC) were identified. Therefore, we carried out the study on pathogenicity and epidemiology of SM strains including their comparative genome analysis. It was revealed that highly pathogenic SM (HPSM) strains with penicillin G-resistance (PR) and potent cytotoxicity against human cells by human-directed CDC were frequently isolated from the patients of pneumonia and Kawasaki disease. As the results of comparative genome analysis among Mitis group streptococci, it was shown that all loci of CDC genes were individually classified into several patterns and the genomic hybridization with related species probably occurred at the loci nearby CDC genes. Thus, it was suggested that HPSM occurred through further recombination within or among species after the first transmission of CDC genes, and PR mutations.

研究分野：細菌学

キーワード：連鎖球菌 *Streptococcus mitis* 毒素 病原性 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

口腔連鎖球菌 *Streptococcus mitis* (SM) は肺炎球菌 *S. pneumoniae* (SPn) と同じミチス群連鎖球菌に分類され、両者は非常に近い遺伝的性質を持っている。しかし SPn と異なり、これまで SM の病原性は極めて低いと考えられてきたため、その病原性に関する研究は国内外において限られたものであった。しかし近年、本菌が起因菌となりうる口腔内や呼吸器感染、心内膜炎等の疾患に加え、中国での SM 劇症性感染症の集団発生例や我が国での同様な感染例が報告されるなど、SM の高病原性株の存在や出現が推測され始めており、その疫学的な情報や病原性の分子論的な基盤情報が必要となっている。

研究代表者らは以前、アングノーサス群連鎖球菌という別菌群の口腔連鎖球菌 *Streptococcus intermedius* (SI) の病原性に着目して、SI がヒト細胞に特異的に作用するコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) の一種であるインターメディリシン (ILY) を分泌することを発見し、ILY 大量分泌株がヒトの深部臓器で重篤な膿瘍を引き起こすことを疫学的に明らかにした。CDC とは、A 群連鎖球菌のストレプトリシン O (SLO)、ブタ連鎖球菌のスィリシン (SLY)、SPn のニューモリシン (PLY) のように細胞膜コレステロール (CHL) あるいは ILY のように細胞膜タンパク質のヒト型 CD59 を受容体として結合し、細胞膜上で 40-50 分子が環状に会合して膜に貫入し、巨大な膜孔を形成して細胞死を誘導する毒素である。SM の持つ CDC としては、PLY と高い相同性を持ち CHL を受容体とするミチリシン (MLY) の存在が報告されているのみであった。その後、研究代表者らは ILY アナログの探索過程で、川崎病児からの SM 分離株が ILY と類似のヒトに高い指向性を示す CDC、*S. mitis* 由来ヒト血小板凝集因子 (Sm-hPAF) を分泌することを見出し、その一部の性状を報告した。そこでさらに、少数の SM 株を用いて CDC アナログの検索を行った結果、一部の SM 株がヒト細胞に高い指向性を示す新規 CDC を含めた複数の CDC を発現・分泌し、ヒト細胞に障害性を示す SM であることを確認した。しかもその多くが、ペニシリン G (PG) に対し抵抗性を示す高病原性 SM (HPSM) であることを見出した。

このような背景から、本研究ではこれまで蓄積してきた口腔連鎖球菌に由来する CDC の分子情報や遺伝子資産も活用し、HPSM の病原因子の一つと考えられる新規 CDC の作用特性や HPSM の示す病原性と疫学の解析を行い、HPSM の実態を明らかにしていくことを目指している。その成果は、近年問題となっている SM 株による劇症性感染症のメカニズムを解明するためにも貴重な情報を提供するものと期待される。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、非病原性の口腔連鎖球菌 SM の中に、SLO や PLY と類似の CDC を複数種持ち、ヒト細胞に強い障害性を示すだけでなく、PG 耐性も示す HPSM 株が存在することを発見した。本研究ではこの HPSM に関して、以下の3点を研究目的とした。まず、(1) CDC を保有する SM 株や HPSM がヒトにおける疾病の起因菌となり、その治療時に PG 耐性を獲得あるいは強化して HPSM 化したり病原性を向上させた可能性があることから、分離源の由来、CDC の保有/発現状況、及び PG 耐性の相関性を解析し、HPSM の疫学的情報を得ることを目指した。また HPSM 迅速検査系開発の検討も進めた。次に、(2) SM 株で新たに見つかったヒト細胞に高い指向性を示す新規 CDC の分子特性を明らかにし、これも含めて HPSM の持つ CDC 特性に注目して、HPSM の病原性の解明を目指した。さらに、(3) 比較ゲノム解析を行って、HPSM の系統分類や CDC 遺伝子獲得による病原性化の遺伝的メカニズムに関する情報を得ることも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) SM 株の分離と同定: SM 株の一部は、健康人口腔より採取した歯垢から Mitis-Salivarius 寒天培地を用いて分離した。SM の臨床分離株 (肺炎患者や川崎病患者由来株) は協力研究者から分与された。SM 及びその類縁菌種の基準株と標準株は、岐阜大学や ATCC 等の微生物保存機関から入手した。SM 分離株は、*sodA*、*cpsA* 及び *spn9802* 遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により類縁菌種の SPn や *S. pseudopneumoniae* (SPpn) と区別し同定した。また後に述べる MLST 解析でも同定結果を確認した。これら菌株は、5%ウマ脱繊維血含有 Brain-Heart-Infusion (BHI) 寒天及び BHI 液体培地で培養した。また溶菌酵素遺伝子 *lytA* を持つ SM 株は、±1%塩化コリンの BHI 培地で培養し、経時的にサンプリングして、溶血活性測定とイムノプロットによる CDC 含有量測定に供した。

(2) SM 株における CDC 遺伝子分布解析: ゲノム DNA を鋳型とし、SM が保有する全 CDC【MLY、Sm-hPAF、新規5ドメイン型 CDC (5D-CDC)】の各遺伝子特異的プライマーを上記の SM 同定用 PCR のプライマーと併用して今回開発したマルチプレックス PCR により、分布を解析した。

(3) SM 株の PG 感受性試験: Clinical & Laboratory Standards Institute の薬剤感受性測定法に準拠し実施した。96穴プレートに分注したウマ溶血液含有の塩類調整 Mueller-Hinton 液体培地による PG 希釈系列に被検菌を接種し、CO<sub>2</sub> 培養器内で 37

24 時間静置培養した。培養後、ウェル内及び底面での菌の増殖と、菌の増殖によるヘモグロビンの変色を確認し、増殖の有無を判断して各株の最小発育阻止濃度を判定した。

(4) 新規 5D-CDC 組換え体調製：僅かに部分構造が異なる 3 種類の 5D-CDC 亜系分子の成熟型毒素、追加ドメイン欠損変異体 ( $\Delta$ ExD-5D-CDC) 及び膜結合ドメイン 4 のみの変異体 (D4) の各遺伝子を、各亜系遺伝子を持つ SM 株ゲノムを鋳型として PCR 増幅した。これを pQE-9 ベクターに組み込み、大腸菌発現系を構築した。その菌体破砕液から His Trap カラムで組換え体を精製した。なお比較に用いた MLY、SLY、ILY 及び Sm-hPAF は既存の発現系を用いて同様に調製した。

(5) 溶血活性：健常人から採血したヒトのアルセバー保存血、及び購入した動物の保存血をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で洗浄し 25% 赤血球懸濁液を調製した。マイクロ遠心管中で各 SM 株培養上清あるいは精製 CDC を PBS で希釈した 490  $\mu$ l の希釈液を作製し、25% 赤血球懸濁液 10  $\mu$ l を加えて混和した。37 で 1 時間反応後、遠心して各上清の 200  $\mu$ l を 96 穴マイクロプレートに移し、OD<sub>540</sub> を測定して溶血率を算定した。

(6) CDC のコレステロール親和性解析：50 mol% CHL 含有卵黄レシチンリポソーム (+CHL-lipo) と CHL 不含有卵黄レシチンリポソーム ( $\Delta$ CHL-lipo) をバンガム法で作製して Nucleopore 膜を通し、単層リポソームを調製した。これらを固定化した L1 センサーチップを装着した Biacore1000 (Biacore) で各 D4 とチップ間の相互作用を測定し、CHL への親和性を解析した。

(7) CDC の細胞毒性：ヒト単球系細胞株 HL60 【RIKEN BRC No. RCB0041】(ILY 受容体のヒト型 CD59 を発現する) と U-937 DE-4 【RIKEN BRC No. RCB0435】(ヒト型 CD59 を発現しない) を RPMI1640 培地で懸濁し 96 穴プレートに 1.0 $\times$ 10<sup>5</sup>/50  $\mu$ l/穴で播種し、ここに同培地による各 CDC 希釈液を 50  $\mu$ l/穴で加えて CO<sub>2</sub> 培養器内で 37、1 時間反応させた。次にミトコンドリア活性測定用の WST-1 反応液を 100  $\mu$ l 加えて反応後、OD<sub>415</sub> を測定して細胞生存率を算定した。

(8) SM 株の細胞毒性：ラット肝臓細胞株 BRL3A 【JCRB 細胞バンク No. JCRB0025】のヒト型 CD59 発現株 (BRL3A-huCD59) 及びそのコントロール株 (BRL3A-VC) の 10% ウシ胎児血清含有 DMEM 懸濁液を作製し、各々 48 穴プレート中に 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup>/穴で播種して 37 の CO<sub>2</sub> 培養器内にて一晩培養した。上清を除き、ここに 10% BHI 含有 DMEM による各被検菌株の希釈液 250  $\mu$ l (m.o.i.=10) を分注して遠心 (110xg, 5 分) し、37 の CO<sub>2</sub> 培養器内で 3

時間共培養を行った。培養後、鏡検し、その上清 100  $\mu$ l を分取して乳酸脱水素酵素の漏出量を測定して細胞生存率を算出した。

(9) ゲノム解析：SM 株パネル 105 株中の 46 株と近縁菌種 *S. infantis*, *S. australis*, *S. gordonii*, *S. tigurinus* (*S. australis* のみ 2 株、後は 1 株) のドラフトゲノムにつき、「ゲノム支援 (科研費新学術領域)」の助成 (共同研究先：宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・林哲也教授) を受けて解析を行った。各菌株のゲノム配列は MiSeq (Illumina) によるペアエンドシーケンス解析でドラフト配列を得、必要に応じて 454 GS FLX (Roche) によるメイトペアシーケンス解析を追加し、Newbler によるアセンブルを行った。Nm-65 株は、北海道システムサイエンス株式会社にて 454 GS FLX (Roche) でのシングルエンドシーケンス解析とメイトペアシーケンス解析後、GAP クローリングも試みた。CDC 遺伝子の周辺配列の解析は、ドラフトゲノム情報から各 CDC 遺伝子の上流及び下流の各々 10kbp の配列情報を抽出し、ORF finder で ORF を推定後、推定 ORF の BLAST 検索結果を参考にアノテーションを行った。

#### 4. 研究成果

(1) 高病原性 SM 株の検出：基準株に加えて健常人や感染症等の患者からの分離株からなる 105 株の SM 株パネルを作製した。このパネルについて、これまで報告のあった *mly* と *sm-hpaf* に加えて新たに見出された *sm-hpaf* と高い相同性を示す新規 *5d-cdc* も対象とし、本研究で開発した CDC の保有状況まで鑑別できる SM 株検出用マルチプレックス PCR で CDC の分布を解析した。その結果、*mly* を単独で持つ株が 3 株、*mly* と *sm-hpaf* を同時保有する株が 14 株、*5d-cdc* を単独で持つ株が 29 株、*mly* と *5d-cdc* の同時保有株が 10 株、また 3 種全てを持つ株が 2 株同定された。従って CDC の保有率は 55.2% を占めた。次にこれら SM 株のペニシリン耐性化を検討した結果、感受性株 38.1%、中等度耐性株 15.2%、耐性株 46.7% と過半数の SM 株で中等度以上の耐性化が見られた。これらの耐性株について、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性を測定したが、ほとんどその活性は検出されなかった。そこで肺炎球菌で報告されているようなペニシリン結合タンパク質 (PBP) の耐性化変異の有無について検討した結果、中等度耐性株や耐性株の PBP1A、PBP2B、及び PBP2X の 1~3 箇所において肺炎球菌と類似の耐性化変異が観察された。また全ての SM 株の培養上清中のヒト赤血球溶血活性を測定し、上清中に溶血率 50% を示す CDC 力価を分泌する高溶血力価株の出現率を、健常者由来株と肺炎や川崎病患者由来株とで比較

してみると、それぞれ 30.6%と 48.2%であり、患者由来株での出現率が高いことが分かった。また、高溶血力価株の中でもペニシリン耐性を同時に示す HPSM 株の出現率は、健康人由来株では 20.0% (3 株/15 株中)だが患者由来株では 88.9% (24 株/27 株中)と、後者で 4 倍以上高い出現率であった。さらにこれは、全健康者由来株 49 株中では 6.1%、全患者由来株 56 株中では 42.9%となり、前者に比べて後者では 7 倍もの高頻度で出現していることが確認された。

(2) SM 株由来 CDC の特性：僅かに一次構造が異なった 3 種類の新規 5D-CDC 亜系分子の成熟体及び変異体の組換え体を調製し、それらの溶血特性について、典型的 CDC で CHL を受容体として動物種依存性を示さない SLY、非典型的 CDC でヒト型 CD59 を受容体としてヒト特異的に作用する ILY、及び CHL とヒト型 CD59 の両者を受容体とする Sm-hPAF の特性と比較した。その結果、いずれの新規 5D-CDC もヒト赤血球に強い溶血活性を示した。しかしそれより弱いものの、他の動物赤血球にも溶血活性を示した。また新規 5D-CDC は亜系の違いによって、溶血活性に 3 倍程の強弱差が見られた。ところで、どの 5D-CDC 亜系分子においても、追加ドメインを持たない  $\Delta$ ExD-5D-CDC の溶血特性は成熟型とほとんど同じであったことから、追加ドメインは溶血活性には大きな影響を与えないことも分かった。これらの特性は Sm-hPAF と酷似していた。次に、ヒト細胞特異的な ILY の受容体であるヒト型 CD59 の有無が新規 5D-CDC の細胞障害性に及ぼす影響を、既知の 3 種の CDC と比較した。SLY は両細胞株にほぼ同じく強い細胞障害性を示し、ILY は HL60 には強い細胞障害性を示したが U-937 DE-4 には全く障害性を示さなかった。一方、全ての新規 5D-CDC は HL60 に対して ILY より弱いものの顕著な障害性を示した。また U-937 DE-4 にも障害性を示したが、その障害性は HL60 に比べて 1/16~1/43 と著しく低かった。この結果はヒト型 CD59 が新規 5D-CDC に対する高親和性の受容体となることを示唆している。さらに  $\Delta$ ExD-5D-CDC で検討した結果においても、この細胞障害性はほとんど同じであり、追加ドメインは細胞障害性にも影響しないことが確認された。これらの特性も Sm-hPAF と類似していた。

次に表面プラズモン共鳴解析で CHL への親和性を検討した結果、全ての新規 5D-CDC は CHL への親和性を示したものの、表 1 に示すように SLY を基準に比較するとその親和性は 0.012-0.387 で、Sm-hPAF の場合と同様に、CHL への親和性は低かった。なお  $\Delta$ CHL-Lipo への親和性は全ての CDC でほとんどバックグラウンドレベルであった。この結果から、新規 5D-CDC にとって、CHL は低親和性の受容体となるものと考えられた。

表 1 : +CHL-Lipo への CDC の親和性比較

CDC*	平衡定数比 (対 SLY 比)
Sm-hPAF	0.176
5D-CDC <sub>subtype1</sub>	0.387
5D-CDC <sub>subtype2</sub>	0.040
5D-CDC <sub>subtype3</sub>	0.012
ILY	0.003

\*新規 5D-CDC と既知 CDC の D4 を使用

さらに、*mly* 遺伝子を持つ株が *lytA* 遺伝子も保有する特徴に注目し、その翻訳産物 LytA による自己溶菌を阻害するコリンの有無で増殖特性と CDC 分泌特性を検討した。その結果、これらの株ではコリン存在下で溶菌が抑制され、培養上清中の溶血活性は低下し、コリン非存在下で観察された定常期に維持される高い溶血活性も確認されなかった。さらに、培養上清中に分泌される MLY と Sm-hPAF をイムノプロットで経時的に調べた結果、コリン存在下では MLY は菌体内に蓄積される傾向が見られた。一方、Sm-hPAF はコリンの有無に関わらず同様の分泌傾向を示した。従って、PLY 同様に分泌シグナルの無い MLY は LytA による自己溶菌作用で菌体外へ放出される可能性が高く、SM の CDC は種類により放出機構が異なることが明らかとなった。この結果は、SM から分泌される CDC の種類や量は、その生理状態や生育状況に依存して調節される可能性を示している。

(3) SM 株の細胞毒性：CDC 遺伝子の保有パターン別に SM の被検菌株を選択し、BRL3A-huCD59 及び BRL3A-VC と 3 時間の共培養を行った。その結果、*5d-cdc* の保有株は BRL3A-huCD59 に高い細胞障害性を示し、ヒト型 CD59 を発現しない BRL3A-VC に対してはほとんど障害性を示さなかった (図 1 に典型例を示す)。一方、各被検菌株の BHI 培養上清のヒト赤血球溶血活性を測定した結果では、*5d-cdc* 単独保有株や全ての CDC 遺伝子保有株よりも *mly* と *sm-hpaf* あるいは *mly* と *5d-cdc* を同時に保有する株において強い溶血性が確認された (図 1 の DF for HD<sub>50</sub>: 溶血 50%を与える培養上清希釈倍率)。各 CDC の細胞膜への膜孔形成作用は赤血球でも有核細胞でもメカニズムは変わらないと考えられることから、この結果は、菌体と宿主細胞の相互作用の有無など、菌体を取り巻く環境の違いで CDC の生産パターンが変化する可能性を示していると考えられた。また血清を含む環境では、SM 株の増殖早期における細胞障害性の大部分は、MLY に比べて CHL による阻害作用を受けにくくヒト型 CD59 を受容体とする新規 5D-CDC が担っている可能性が示唆された。MLY は、菌の増殖後期に先に述べた自己溶解作用に伴って分泌され、感染の

憎悪や組織浸潤に寄与するのかもしれない。

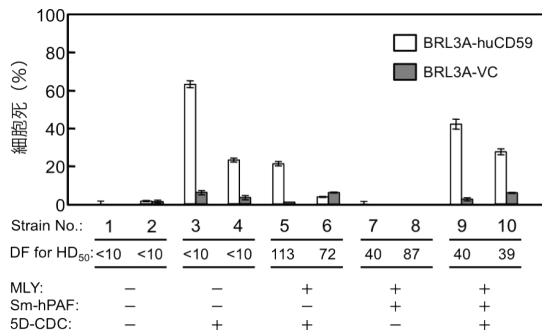


図 1 : CDC 遺伝子保有パターン異なる SM 株の細胞障害性

(4) SM 株のゲノム解析と系統分類: SM 株パネル中から 46 株と近縁菌種 5 株の 51 株についてドラフトゲノムの解析を行った。この中には現時点で確認されている全ての CDC 保有パターンの SM 株を含んでいる。SM のゲノムサイズは約 1.8~2.3Mbp の範囲であり、SM の 1 株については完全ゲノムの情報を得た。22 株の CDC 保有株と 23 株の CDC 非保有株について MLST 解析を行って、SM における各 CDC 遺伝子を持つ株の系統分類学的な検討を行った。7 種のハウスキーピング遺伝子のコンカテマーを用いて検討した結果、CDC 非保有株は CDC 保有株から分離したクレードを形成する傾向が強く、両者が異なる亜系統である可能性が示唆された。しかし CDC 遺伝子の保有パターンと SM の系統分類には相関性は見られなかった。そこで次に、SM の保有する各 CDC 遺伝子の周辺領域を比較解析した。先ず *mly* 遺伝子保有株においては、*mly* の配座がゲノム上で異なる 2 パターンに大別されることが分かった。完全ゲノム情報が報告されている B6 株と比較すると、その一つは CDC を持たない SM 株のあるストレス応答遺伝子の下流に *mly* 遺伝子を含む数遺伝子が挿入されたパターン群であり、それは更に SPpn などの他菌種との間で遺伝子組換えを経たと考えられる亜系統も含んでいた。もう一つのパターンは *mly* を含む大きな周辺領域が SPpn のゲノム配列と高い相同性を示したことから、SPpn からシュドニューモリシン遺伝子が伝搬してきたグループである可能性が考えられた。次に *sm-hpaf* 遺伝子については、パターン 1 の群では CDC を持たない SM 株ゲノムのあるグリコシダーゼ遺伝子の上流に挿入された形で配座していた。また *sm-hpaf* 遺伝子保有株の場合でも、パターン 1 群の *sm-hpaf* 遺伝子の極めて近傍において恐らく SPpn に由来すると思われる遺伝子断片とさらに遺伝子組換えが起こって生じたと推測される 2 つ目の配座パターン群が確認された(図 2 参照)。さらに新規 *5d-cdc* 遺伝子保有株でも、類似の CDC をコードする *sm-hpaf* 遺伝子とは異なる B6 株のゲノム位置に新規 *5d-cdc* 遺伝子が挿入されたパターン群と、さ

らにその後新規 *5d-cdc* 遺伝子の直後において遺伝子組換えが起こっているパターン群に大別されることが判明した。また今回解析した SM 株につき、ゲノム全体を SM、SPn、SPpn の完全ゲノム情報と比較した結果、SM 株では非常に頻りに遺伝子の逆位転座や遺伝子交雑を起していること、またそれが各 CDC 遺伝子の近傍でも起していることが明らかとなった。

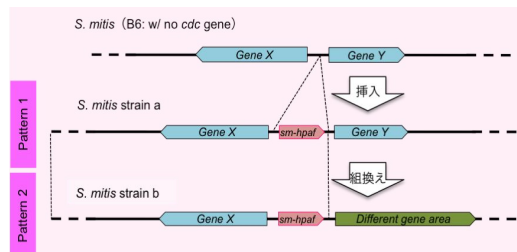


図 2 : SM ゲノム上の *sm-hpaf* 領域の構造

(5) 新規 SM マーカー遺伝子の探索: 従来 SM の良好な単一マーカー遺伝子がなかったため、データバンク上及び今回得たゲノム情報に基づき候補遺伝子を検索した結果、あるトランスポーター関連遺伝子の中に SM 特有の配列を見出した。この領域の PCR を行ったところ、SM 株の 105 株中 104 株が陽性反応を示し、他の近縁菌種での非特異増幅は無かった。従って本遺伝子は、HPSM 迅速検査系の菌種特異的マーカー遺伝子としての利用が期待され、現行のマルチプレックス PCR の改良や PCR イムノクロマトへの応用を進めている。

(6) 総括: 今回、疫学的に HPSM 株の出現率を解析した結果、健康人株で 6.1% に対して感染症等の患者株では 42.9% と、後者で 7 倍も高頻度で確認された。恐らくヒト体内での生存に有利な CDC 保有株が、感染症等の治療時に PBP 変異を伴う PG 耐性を獲得して HPSM 化し、さらにそれが日和見的に、あるいは易感染性宿主に伝搬して感染症を引き起こす可能性が示唆された。これを検証するにはさらに詳細かつ大規模な疫学調査が必要であると考えられる。また、HPSM の CDC の中で詳細な特性が不明であった新規 5D-CDC について解析した結果、ヒト型 CD59 を高親和性受容体とする Sm-hPAF と類似のヒト細胞指向性 CDC であることが明らかになった。HPSM の各 CDC は異なる発現・分泌制御を受けると考えられるが、今回の結果では、この新規 5D-CDC が HPSM の増殖早期にヒト細胞を障害する毒素である可能性が示唆された。次に、ゲノム比較解析で SM 株を系統分類した結果、CDC 保有株と非保有株は異なるクレードを作る傾向があったが、CDC 遺伝子の保有パターンと菌株の系統進化には相関性が見られなかった。しかし興味深いことに、各

CDC 遺伝子の配座は数パターンに分類され、CDC 遺伝子は菌種内及び近縁菌種間で組換えを生じていることが示唆された。この結果から、CDC 保有株は、SM と近縁菌種が共存するバイオフィルム等の環境でゲノムの交雑を起こして CDC 遺伝子を授受することで形成されたことが推察された。さらに疫学的知見を踏まえると、それが抗生剤に曝されて HPSM の亜群を生じたことも想像に難くない。

今後、現在も検討中の各 CDC 遺伝子ノックアウト株を用いた HPSM の感染性や病原性に対する各 CDC の寄与の検討に加え、本研究結果を基盤とした、より大規模な疫学調査や CDC 遺伝子伝搬機構の解析を行うことによって、HPSM のみでなく SPn 等の近縁の病原性菌種を交えた病原性ネットワークの実態に関する情報やそれら菌種による感染症の制御のための重要な情報が得られるものと考えられ、その進展が期待される。

## 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)

[雑誌論文](計1件)

A. Tababa, K. Ohkura, Y. Ohkubo, T. Tomoyasu, H. Ohkuni, R. A. Whaley, H. Nagamune, The diversity of receptor recognition in cholesterol-dependent cytolysins, *Microbiol. Immunol.*, 査読有, Vol.58, No.3, 2014, pp.155-171, doi: 10.1111/1348-0421.12131.

[学会発表](計10件)

森下惇、田端厚之、村上漱、高尾亜由子、大國寿士、小椋義俊、林哲也、友安俊文、前田伸子、長宗秀明、「*S. mitis* におけるコレステロール依存性細胞溶解毒素遺伝子の分布とβ-ラクタム系薬耐性の関連性」、第88回日本細菌学会総会、2015年3月28日、長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

Hideaki Nagamune、Atsushi Tabata、Yoshitoshi Ogura、Tetsuya Hayashi、「Diversity in genome structure showing the genomic dynamism of human-derived *Streptococcus mitis*」、International Symposium on Genome Science 2015、2015年1月20日、Hitotsubashi Hall (Tokyo, Chiyoda-ku)

玉岡雅章、竹田望、田端厚之、大倉一人、友安俊文、大國寿士、長宗秀明、「コレステロール依存性細胞溶解毒素の膜孔形成活性に対する糖の抑制効果」、第87回日本生化学会大会、2014年10月18日、国立京都国際会館(京都府、京都市)

田端厚之、長宗秀明、「ヒト由来 *Streptococcus mitis* のゲノムダイナミクスを物語るゲノム構造の多様性」、新学術領域「ゲノム支援」2014年度拡大班会議、2014年8月21日、ポートピアホテル(兵庫県、

神戸市)

村上漱、田端厚之、高尾亜由子、友安俊文、大國寿士、長宗秀明、「高病原性 *Streptococcus mitis* 検出・同定システム」、第87回日本細菌学会総会、2014年3月28日、タワーホール船堀(東京都、江戸川区)

竹田望、田端厚之、野上明日香、高尾亜由子、大國寿士、前田伸子、友安俊文、長宗秀明、「N末に追加ドメインを有するコレステロール依存性細胞溶解毒素の作用特性」、第86回日本生化学会大会、2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

長宗秀明、「高病原性株を含むヒト由来 *Streptococcus mitis* におけるゲノムバリエーション」、新学術領域「ゲノム支援」2013年度拡大班会議、2013年8月28日、ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)

田端厚之、大倉一人、友安俊文、大國寿士、長宗秀明、「コレステロール依存性細胞溶解毒素の受容体認識および作用特性における多様性」、第60回毒素シンポジウム、2013年7月18日、楓香荘(兵庫県、宍粟市)

竹田望、田端厚之、野上明日香、高尾亜由子、大國寿士、前田伸子、友安俊文、長宗秀明、「新規5ドメイン型コレステロール依存性細胞溶解毒素の分子特性」、第86回日本細菌学会総会、2013年3月20日、幕張メッセ国際会議場(千葉県、千葉市)

野上明日香、田端厚之、竹田望、高尾亜由子、大國寿士、前田伸子、友安俊文、長宗秀明、「β溶血性の高病原性 *Streptococcus mitis* サブグループの特性」、第86回日本細菌学会総会、2013年3月20日、幕張メッセ国際会議場(千葉県、千葉市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長宗 秀明 (NAGAMUNE, Hideaki)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授  
研究者番号：40189163

### (2)研究分担者

友安 俊文 (TOMOYASU, Toshifumi)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：20323404

田端 厚之 (TABATA, Atsushi)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教  
研究者番号：10432767