

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659197

研究課題名(和文) A群レンサ球菌の常在を可能にする因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors enabling Group A Streptococcus reside without virulence

研究代表者

浜田 茂幸 (Hamada, Shigeyuki)

大阪大学・微生物病研究所・特任教授

研究者番号：60028777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、A群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*: GAS) が、健常者に病原性を引き起こさずに常在を可能とする未知の因子を明らかとすることを目的とした。その結果、健常人の8割以上がA群レンサ球菌を無症候性キャリアであること、また、実際にA群レンサ球菌を単離方法を検討することにより、健常人からの本菌単離培養することに成功した。また、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、本菌の細胞内常在を可能とする遺伝子を3個同定することができた。また、本遺伝子は情報解析の結果、幅広い常在細菌にも存在し、バクテリオファージを介して共有されているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this project is to identify factors enabling Group A Streptococcus (GAS) reside without virulence in healthy person. As results, about 80 percent of healthy adult carry this bacteria without any disease. And improvement of culture methods for GAS isolation enabled the 32 GAS isolates from 13 persons. In addition, from the transcriptome analysis using microarray, we could identify 3 genes related to GAS residence inside human cells. From phylogenetic analysis, these genes can be shared with wide range of commensal bacteria and be transferred via bacteriophage. This indicates the genes may shed light on the new mechanisms to how commensal bacteria reside with human.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：A群レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

レンサ球菌属の細菌には、産業上有用な *Streptococcus thermophilus* 等を含め、多数の種が存在している。中でも、レンサ球菌種の分類学上の分類基準種であり、かつ咽頭部粘膜が初発感染部位と考えられる A 群レンサ球菌 GAS は、咽頭炎をはじめとする多彩な病態を示すだけでなく、致死率の極めて高い劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) の起原菌として注目を集めている。そのため、本 GAS では、申請者が決定した劇症型の SSI-1 株 (Genome Res., 2003) を含め 13 株のゲノムが決定されている。さらに、申請者は、これまで本 GAS のみならず、*S. mutans*, *S. pneumoniae* といった口腔、咽頭などをニッチとする病原細菌および宿主の防御機構について研究してきた (J.Biol.Chem., 2011; BMC Genomics, 2011; Cell. Microbiol., 2009; J.Biol.Chem., 2008, Science, 2004)。このようにレンサ球菌属の病原細菌の研究を行ってきたが、疫学データからは、健常者の多くが病原細菌を発病すること無くキャリアとして維持しており、その理由は未解明のままである。とくに GAS においては、健常者の 15-30%程度が発病すること無く保持しており、この「常在化」の分子機構を明らかにすることは、現在主流の抗生剤を用いた治療法に取って代わる新たな治療法の開発につながると考えられる。最近になって、常在細菌の表皮ブドウ球菌が産生するセリンプロテアーゼにより、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成が阻害されることが示されたが (Nature, 2010, 465:346)、一方で、必ずしも黄色ブドウ球菌が除去されるという疫学的な統計結果は得られていない。生態学的には少しでもニッチが異なれば、種分化が起こり、近縁種を排除するのではなく、共存することで種の多様性は保持される。すなわち、病原細菌が過剰な病原性を発揮することは、種全体の多様性維持という観点からは、病原細菌を排除することは必ずしも種にとって望ましくない。そのため、申請者は特に GAS の近縁種が咽頭というニッチにおいて、GAS の病原因子の発現を抑制する因子を保有していると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、GAS が健常者で病原性を発揮することなく常在するための未知の因子を明らかにする目的で、2 年間で次の研究を企画した。1) 健常者からの GAS の単離と単離株の細胞、マウスへの毒性試験およびドラフトゲノムの決定、2) 高速シーケンサーを用いた咽頭試料に共通かつ GAS の近縁種由来の ncRNA や分泌性ペプチドをコードする RNA 分子の決定、3) 同定された RNA 分子の GAS の病原因子に与える影響の解明、4) 健常者の GAS 分離頻度と新規 RNA 分子との相関解析

また、メタデータとの多重相関解析により影響を与える因子の決定を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究では、目的を達成するために、下記の項目について遂行する予定であった。

- 1) 健常者からの GAS の単離と単離株の細胞、マウスへの毒性試験および単離株のドラフトゲノムを決定。
- 2) 高速シーケンサーを用いて、咽頭試料に共通かつ GAS の近縁種由来の ncRNA や分泌性ペプチドをコードする RNA 分子を決定。
- 3) 同定された RNA 分子の GAS の病原因子に与える影響を解析する。
- 4) 健常者の GAS 分離頻度と新規 RNA 分子との相関解析また、メタデータとの多重相関解析を行う。これらのうち、特に、健常者の GAS 保有状況調査や単離方法の改良、GAS が細胞内で常在する遺伝子を同定したので、これらを成果において詳細を記載する。

4. 研究成果

東京医科歯科大学において、倫理申請を行い、約 150 名のボランティアの咽頭スワブ資料を集めた。ここから、培養法、非培養法の両者を用いて、健常者からの GAS の単離、および GAS の存在を確かめた。GAS の単離においては、嫌気培養、好気培養、3 種類の培地を検討したところ、32 株を単離することができたものの、単離できる確率は 2-3%の健常者にとどまっており、従来報告にある 1-5%と変わらない結果となった。一方、環境微生物学的なアプローチである非培養法を用いた報告はこれまでなされていなかった。そこで、まず、GAS 特異的な PCR プライマーを文献的に検索した。その結果として、VTPase 遺伝子を標的としたプライマーおよびタイピングで常用されている *emm* を標的としたプライマーが存在していた。予備的検討の結果、これらのプライマーのうち、*emm* プライマーについては、GC 含量が低く、非特異的な増幅が多数認められた。また、一つのプライマーでは、偽陽性の可能性が排除できないと考え、新たなプライマーのデザインを行った。すべての生物が保有するリボソーム RNA 遺伝子を標的としたプライマーを 200 万以上の配列が登録されている RDP11 データベースを利用して GAS 特異的なプライマーをデザインした。さらに、*emm* についても、タイピングの重要性が高いため、新規にプライマーをデザインした。このプライマーをデザインするにあたり、既存のデータベースでは、タイピングに用いられる *emm* の部分配列のみが登録されているものがほとんどであったため、ゲノムデータベースから完全ゲノム配列を 18 株分入手するとともに、研究室で独自に配列を決定した 241 株のゲノム配列を用いた。これらの配列から *emm* 配列を抽出し、配列をアライメ

ントし、保存領域を同定した。このようにして、新規の 16S rRNA 遺伝子、*emm* を標的としたプライマーを作成するとともに、PCR の条件を検討し、実際の咽頭スワブ中に含まれる 3 個の遺伝子を標的とした PCR を実施した。その結果、8 割以上のサンプルから 3 個の遺伝子全てで陽性と判定され、GAS は従来の培養法では、培養できない状態にあるものの極めて広い健常者に分布していることが初めて明らかになった。さらに、*emm* については、配列決定を行ったところ、疫学的に流行している GAS とは、遺伝子型が異なることがわかった。さらに、これまで報告されていないが、複数の *emm* 型の GAS が健常者では共存していることが判明した。

そこで、次に、GAS がどのようにして、宿主内で生息しているのかを明らかとすることにした。種々の *emm* の菌株を細胞内侵入能確認実験を行ったところ、多くの菌株が細胞内侵入能を有していた。そこで、どのように GAS が細胞内で生息可能としているのか、その責任遺伝子の探索を行った。まず、本菌が宿主細胞内で長期生存することを確認した。ヒト由来の細胞として HeLa 細胞および KYSE-510 細胞を、マウス由来の細胞として野生型 MEF 細胞 (atg5 +/+ MEF) を用い、GAS SSI-1 株感染後の各細胞内における生存菌数を経時的に測定した。その結果、全ての細胞において感染 12 時間以上、場合によっては 36 時間においても本菌が宿主の細胞内より検出された。また、本菌を含む多くの細菌種において、排除システムとして認識されているオートファジーの活性化をオートファゴソームの膜構成成分の 1 つである LC3 の活性化を指標として測定したところ、感染 4 時間後において全ての細胞でオートファジーが最も活性化していることが明らかとなった。つまり、本菌はオートファジーが活性化しているのにも拘らず、宿主細胞内で生存する術を有していることが確認することができた。

そこで、オートファジーの回避に重要な本菌の責任遺伝子を同定するべく、全 Open Reading Frame (ORF) を網羅するマイクロアレイを用いて、本菌の細胞侵入後の経時的な遺伝子発現変化を解析した。解析にあたり、宿主細胞内から少数しか存在しない本菌の RNA を効率的に抽出する必要があった。本菌は極めて少数の個体のみが細胞内で生存し、かつ、その数も感染後徐々に減少することから、感染細胞内からの菌体 RNA の抽出は非常に困難であった。そこで、2007 年に Rohde らによって、本菌と同様に細胞内侵入能を持つ結核菌の感染細胞から菌体 RNA のみを効率的に回収する方法が報告されていたので、これを応用することとした。この中で彼らは、GTC buffer と呼ばれるグアニジンを基本とした溶液を用いることで、真核細胞 (宿主細胞) 由来 RNA と原核細胞 (菌体) RNA の両者を含む感染細胞由来 RNA 溶解液から真核細胞 RNA のみを除去することに成功していた。そこで、

この方法を参考にすることで、感染細胞から GAS の RNA のみを抽出することに成功した。この GTC buffer を用いた菌体 RNA 回収方法は、リステリア菌 や 黄色ブドウ球菌のような細胞侵入能を持つグラム陽性細菌においても適用可能であると考えられることから、他のグラム陽性細菌種の細胞内での遺伝子発現動態解析への応用できるものと考えられる。

本菌は、既に感染 2 時間後より、SLO によってエンドソーム膜を溶かして細胞質への脱出を開始することが知られている。そして、細胞質へと移行した菌に対してはオートファジーが誘導され、感染後 4 時間後にその活性はピークを迎える。そこで、前述の 3 種の細胞のうち、HeLa 細胞と KYSE-510 細胞、HeLa 細胞と atg5 +/+ MEF 細胞、atg5 +/+ MEF 細胞と KYSE-510 細胞の組合せにおいて、感染 2 時間後に対して、感染 4 時間後に有意に発現の上昇が認められた GAS 遺伝子を抽出し、さらにオートファジーを誘導できない atg5 -/- MEF 細胞においては発現が低下する、あるいは発現変化の認められない遺伝子を最終的にオートファジーに対抗する GAS 遺伝子の候補として 7 個、選定した。

この選定した候補遺伝子の欠損株および相補株を作製し、感染細胞内での生存率やオートファゴソーム形成率測定したところ、3 つの候補遺伝子の欠損株に対するオートファゴソームの形成率は親株である SSI-1 株のものより約 1.5 倍程度増加し、これに伴い上記の 3 個の遺伝子破壊株の細胞内生存率は顕著に減少していた。

また、オートファゴソーム形成率の増加と菌の細胞内生存率の減少は、本菌の変異株である JRS4 株においても、該当遺伝子欠損株を用いた解析により、その再現性が確認された。これらの菌体遺伝子によるオートファジーの回避 / 阻害機構については現在鋭意解析中であるが、本菌がオートファジーに対抗し、常在するうえで重要な役割を担っていることが推測される。これらの二株は、*emm* の型も、臨床症状も大きく異なっていることから、GAS において、普遍性があるものと考えられる。また、細胞内への侵入率も 20 倍程度は異なることから、普遍性があるものと考えている。

さらに、実験的にオートファジーに対抗することが証明された 3 つの遺伝子について、NCBI データベース上で異なる細菌種においてホモログを検索した。その結果、これらの遺伝子のホモログが GAS の他菌株や肺炎球菌といった同じレンサ球菌属の細菌種、あるいは乳酸菌や一部の腸内細菌を含む常在細菌種のゲノム上に存在していることが明らかになった。また、興味深いことに、本研究で見出された 3 つのオートファジー対抗遺伝子のうち 1 つは本菌のプロファージ上にコードされている遺伝子であったが、この遺伝子のホモログもまた、常在細菌種を含む幅広い細

菌種のゲノム上に存在していた。すなわち、このことから、本研究において見出された遺伝子は、ファージの水平伝播を介して他の細菌種に拡大し、本菌において観察されたオートファジーへの対抗因子としての機能を持つだけでなく、常在細菌種を含む多くの細菌種にとって、それらの生息域での定着、生存、増殖において何らかしらの影響を与えているものと考えられる。本結果は、種々の常在細菌の常在機構では、これまで考えられていない現象であり、新たな常在細菌の常在機構研究に新たな切り口を与えるものだと考えられる。

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)

〔その他〕

ホームページ等

http://rcc-eri.biken.osaka-u.ac.jp/bacterial_infections.html

6．研究組織

(1)研究代表者

浜田 茂幸 (HAMADA, Shigeyuki)

大阪大学・微生物病研究所・特任教授

研究者番号：60028777

(2)研究分担者

丸山史人 (MARUYAMA, Fumito)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・

准教授

研究者番号：30423122