

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792295

研究課題名(和文) ストレプトコッカス・オラーリスによる感染性心内膜炎発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis for mechanism of infective endocarditis caused by Streptococcus oralis

研究代表者

小西 郁理 (KONISHI, IKURI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00572380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：感染性心内膜炎は疣贅と呼ばれる血小板やフィブリンと細菌の塊を形成し、全身性の炎症を生じ多彩な臨床像を呈する疾患として知られている。本疾患の原因菌は主に口腔由来のピリダンスレンサ球菌であることが指摘されているが、その発症メカニズムについては不明な点も多い。本研究では、心内膜炎病巣部より分離された菌株 *S. oralis* 308株の全ゲノム配列の決定を行うとともに、すでに公表されている非病原性株とのゲノム比較を行い、病原遺伝子の網羅的解析を行うことを目的とした。現時点で全ゲノム解読は概ね終了し、引き続き解析作業を行っていく。

研究成果の概要(英文)：Infective endocarditis is characterized by formation of septic masses of platelets on the surfaces of heart valves and it most commonly caused by oral viridans streptococci. Although many factors may contribute to pathogenicity, onset of infective endocarditis still need to be further investigated. In this study, we attempt to determine whole genome sequence of *Streptococcus oralis* 308 isolated from infective endocarditis patient, and compare with avirulence strain of *S. oralis* to find the novel pathogenic genes. In present, we have generally finished determining the genome sequence, and intend genomic analysis.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯学 口腔内常在細菌 感染性心内膜炎 *Streptococcus oralis* ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は、血液の逆流、弁狭窄、その他の原因によって、血液中のフィブリンと血小板により生じた血栓が心内膜に付着し、さらにそこに病原体が付着増殖して疣贅と呼ばれる特徴的な疣ができる疾患である。この疣贅が原因となって弁膜自体が破壊されたり、感染源・塞栓源となって菌血症や様々な臓器不全を引き起こしたりすることから、感染性心内膜炎は多彩な臨床像を示し、適切な治療を行わなければ致命的ともなりうる全身性敗血症性疾患といえる。また感染性心内膜炎については、これまで主に臨床細菌学的な証拠を基に、その主要な原因菌はピリダレンスレンサ球菌であること、感染源は主に口腔にあることが指摘されてきた。事実、口腔の常在微生物のうちではレンサ球菌が数的に圧倒的に優勢であること、一般の歯科治療や食物の咀嚼時にも一過性の菌血症がしばしば起こること、また、菌血症の血液あるいは感染性心内膜炎の病巣部から口腔常在菌と同一のレンサ球菌種が頻りに分離されることなどが広く知られてきた。こうした臨床的所見を背景に、歯垢の主構成菌である *Streptococcus sanguinis* や齲蝕原性菌である *Streptococcus mutans* はウサギやラットの実験的心損傷部に高い感染性を示すこと、それには菌体外産物（デキストランや slime）あるいは菌体表層物質（リポタイコ酸やフィブロネクチン結合因子）が菌体の付着に関与することが実験的にも示されてきた。

私たちの研究室では口腔細菌叢や感染性心内膜炎患者からの血液、疣贅から検出される菌種を分子生物学的手法により勘弁かつ網羅的に同定する研究をこれまでに進めており (Konishi-Kondo I *et al.* Journal of Oral Microbiology. DOI: 10.3402, 2009. Hoshino T *et al.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48: 195-199, 2004)、感染性心内膜炎の病巣部より分離された臨床分離株を複数保

有している。なかでも本研究ではピリダレンスレンサ球菌である *Streptococcus oralis* 308 株に着目した。この症例で最も特徴的な点は、原因菌が口腔レンサ球菌であったこと、患児は発症前に歯科処置はなかったが口腔衛生状態は不良であり、日常的に生じた菌血症により心内膜炎が発症したことである。また、本菌株は複数のハウスキーピング遺伝子群を用いた系統的解析では *S.oralis* と同定されるが、位相差顕微鏡で観察してみると標準株とは異なる形態を示している。

また *S.oralis* は mitis グループに属する菌株で、感染性心内膜炎の病巣部より最も高い頻度で検出される株である。しかし *S.oralis* と感染性心内膜炎との関連についての報告は数少なく、詳細については不明な点が多い。そこで私たちの研究室では、*S.oralis* が感染性心内膜炎を発症するメカニズムを解明する実験を立ち上げた。

2. 研究の目的

本研究ではまず *S.oralis* 308 株の全ゲノム解読を行うとともに、病原性遺伝子の網羅的同定を目的とする。現在、*S.oralis* 308 株はドラフトシーケンスまで終了しており、今後はゲノム配列の決定を行う。2011年に非病原性である *S.oralis* Uo5 株の全ゲノム情報が公開されたため、これと保有する遺伝子の違いを比較し、病原性遺伝子の探索とその獲得機構について検討する。

3. 研究の方法

(1) シークエンスライブラリーの調整

S.oralis 308 株より精製した genomic DNA を genomic solution hydroshear (ジーンマシズ社) を用いて物理的に断片化し、約 8kb の長さをピークとする DNA を回収した。回収した DNA の両末端を平滑化、ピオチン修飾した loxP サイトを含む環状化アダプターを

連結後、アガロースゲル電気泳動により 6.5 – 9.5 kb にサイズに相当する DNA 画分を Elutrap 電気溶出システム(GE 社)を用いて抽出精製し、Cre Recombinase による環状 DNA を調整した。

環状 DNA をアコースティックソルビライザー Covaris S-series (コバリス社)を用いて物理的に数百 bp に断片化した。断片化した DNA の両末端を平滑化後、環状アダプターに修飾したビオチンをストレプトアビジン磁気ビーズで回収後、ライブラリーアダプター連結を行った。その後、ビオチン修飾した PCR 増幅プライマーを用いて PCR 法による増幅 (20 サイクル) を行い、PCR 増幅プライマーに修飾したビオチンとストレプトアビジン磁気ビーズで回収しアルカリ処理後、一本鎖 DNA を回収しシーケンスライブラリーとした。

(2) 高速シーケンス

8kb ペアエンドライブラリーはアダプターを介してキャプチャービーズ上に結合させた。その後、PCR 反応試薬が入った油水エマルジョンに取り込ませ、個々のキャプチャービーズごとに PCR 法による増幅 (エマルジョン PCR) を行い、キャプチャービーズを回収した。

得られたキャプチャービーズをカウント後、適正ビーズ量となるように PicoTiterPlate に添加し Genome sequencer FLX+ System を用いてシーケンスを行った。

4. 研究成果

これまでに illumina genome analyzer で得られた結果 (リード長が 100bp 以上のコンティグが 139 個) と今回行った Genome sequencer FLX+ System を用いた解析結果 (総解析リード数: 129,281、解析総塩基数: 63,199,119 base) のアセンブルを行ったところ、3 つのスキマホールドにまで収束することができた。さ

らに、このスキマホールドとすでに公表されている *S. oralis* Uo5 株のゲノム配列を参考に比較すると、スキマホールドは 1 つのスキマホールドにまとめることができた。しかし、このスキマホールド内には 21 個のギャップが存在していたため、primer walking 法でギャップクロージングを進めている。現時点ではギャップは 16 個閉鎖することができ、残りのギャップは 5 個となった。残ったギャップ内には繰り返し配列などが含まれることが予想され、primer walking 法では解読に難渋している配列もあるが、この配列を含む前後領域をクローニングし、そこからの解析を現在は行っている。また、ミスリーディングである可能性の部位もまだわずかに残っており、これらの確定作業も並行している。

したがって、全ゲノム解読は概ね終了している。また、すでに解読が終了している領域に関しては、遺伝子領域予測とアノテーション作業も完了している。今後は得られた結果をデータベース化し、登録するとともに非病原株とのゲノム比較を行い、本菌株が保有する病原遺伝子の探索を進めていく。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

なし

取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

小西郁理（KONISHI IKURI）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・客員研究
員

研究者番号：00572380

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし