

令和元年5月17日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26461512

研究課題名(和文) A群連鎖球菌の劇症型感染症の責任遺伝子の同定と発症機構の解析

研究課題名(英文) Search for genes involved in severe invasion of *Streptococcus pyogenes* and analysis of the mechanism of its onset

研究代表者

井坂 雅徳 (Isaka, Masanori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40336673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：A群連鎖球菌は劇症型という重篤な症状を引き起こすが、その機序は不明である。外界からの刺激を受け取り菌体内部へ情報を伝達する二成分制御系の仕組みを解析することで、劇症型発症機構が明らかになると考え、二成分制御因子のセンサータンパク質の酸感受性機構とバイオフィーム産生機序を解析した。その結果、SPY1622が酸感受後に繊毛を発現し、バイオフィーム産生をしていたことを見出した。また、新規にSPY1588も酸感受性に関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A群連鎖球菌の劇症型発症機構は未だ解明されていない。そのため、この発症機構を解析することは、この細菌感染症の致死率を低下ないし抑制することに他ならない。

A群連鎖球菌の酸による劇症型発症が明らかになれば、この細菌感染時に酸中和を積極的に実施することにより、抗生物質に依存しない処置が考えられる。この方法は簡便であるため致死率の抑制がすぐに期待出来、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Group A streptococci cause the severe invasive disease, but the mechanism is unknown. The two-component regulatory system receives external stimuli and transmits a signal to inside the cells. *Streptococcus pyogenes* produces biofilm production. Biofilm is one of the virulence factors, and its production is produced by external stimuli. *Streptococcus mutans* has been thought to be associated with dental caries, its the two-component sensor protein recognizes the acid produced by sugar fermentation.

研究分野：細菌学

キーワード：A群連鎖球菌 劇症型感染症 二成分制御因子 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

劇症型溶血性 A 群連鎖球菌による感染症は、発病後数十時間以内に急激な筋膜壊死をもたらせ、ショック症状から死に至らしめる重篤な症状を引き起こす。A 群連鎖球菌は、猩紅熱を発症することで知られているが、劇症型へ変異すると人食いバクテリアと称される上記諸症状を引き起こす。この A 群連鎖球菌が劇症型へ変異する機構は未だ解明されていない。

A 群連鎖球菌が劇症型へ変化するには外界からの情報を受容し、その情報を元に变化したと考えられる。A 群連鎖球菌は様々な毒素を分泌し免疫応答を回避する。この分泌毒素の質及び量的変化を従来株及び劇症型株で二次元電気泳動により解析した結果、劇症型に伴い毒素産生が増加、および新規毒素産生が認められた。この影響は、二成分制御因子の CovS センサータンパク質のアミノ酸変異と報告されている。

この二成分制御因子は、環境変化を感知するセンサータンパク質と、遺伝子発現制御を行うレギュレータータンパク質の二種類のタンパク質が関与している。センサータンパク質は、活性部位のヒスチジン残基が自己リン酸化し、レギュレータータンパク質のアスパラギン酸残基へリン酸を転移してレギュレータータンパク質の活性を調節している。

A 群連鎖球菌と同属のストレプトコッカス・ミュータンス菌は酪酸産生と、その酸により虫歯を増悪させ、バイオフィルムを産生する。ミュータンスの酸感受機構は、この菌の二成分制御因子が関与している報告がある。この制御因子は、A 群連鎖球菌にも保存され、*spy1622* 遺伝子欠損株により、バイオフィルム産生低下、酸感受性変化、増殖変化をもたらす結果を得た。

これらの結果より、この *spy1622* 遺伝子およびその産物が、A 群連鎖球菌の酸刺激による劇症化の関与と、発症予防および感染防御因子になりうるが、二成分制御因子は他に 11 種類存在するため、他の情報伝達経路などとの複雑な関連性があると推測し詳しく調査する必要がある。

2. 研究の目的

A 群連鎖球菌の二成分制御因子の研究は、二成分制御因子のレギュレータータンパク質欠損株による報告が多く、外界刺激のリガンドと、それを受容するセンサータンパク質の研究報告は少ない。そして外界刺激感受に伴い、劇症型発症に至る経過は解析されていない。そこで酸が A 群連鎖球菌の劇症化に関与すると考え、A 群連鎖球菌の劇症型感染症の責任遺伝子の同定と発症機構の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) A 群連鎖球菌の劇症化制御遺伝群の検討

遺伝子欠損株の作製

A 群連鎖球菌はゲノム株 SF370 株、劇症型発症株 (1529, MDYK) を使用した。これらの二成分制御因子センサータンパク質遺伝子欠損株は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を相同組換え法で作製した。

バイオフィルム産生

(1) で作製した菌体を、バイオフィルム産生培地に摂取し、96穴プレート上で 37℃ で 18 時間培養した。PBS でプレートを洗浄後、クリスタルバイオレットで染色し、エタノールで染色されたクリスタルバイオレットを抽出した。抽出された染色液を吸光度 590nm で測定した。

リアルタイム PCR

バイオフィルム産生培地により、3-1 で作製した菌体を 2 時間培養後、遠心分離法で菌体を回収した。ムタノリジン処理後、RNA 抽出キットにより RNA を抽出した。アガロースゲルで RNA 精製度を確認後 cDNA へ逆転写を施した。ropB, mga, lacD1, CcpA のプライマーによりリアルタイム PCR を実施し、三刺激の有無で増減する制御因子を測定した。*spy1622* 遺伝子欠損株は、絨毛遺伝子の発現を測定した。*spy1588* 遺伝子欠損株は、*mga* 遺伝子の発現を測定した。

ウエスタンブロット

spy1622 遺伝子が絨毛発現に関与していることを確認するために、SF370, 1529 株および *spy1622* 欠損株より外膜タンパク質を抽出、SDS-PAGE、抗 T1 抗原抗体によるウエスタンブロットを実施した。

(2) 新規酸感受性センサータンパク質の解析

質量分析

バイオフィルム産生培地で培養した菌体から膜タンパク質分画を抽出した。また、産生したバイオフィルムからタンパク質を 4M 尿素で抽出、脱塩し、バイオフィルムタンパク質を抽出した。これらのタンパク質を SDS-PAGE で分離、CBB 染色後、遺伝子欠損により産生抑制を受けたタンパク質バンドを LC-MS 質量分析器でタンパク質を同定した。同定したタンパク質の酸刺激による挙動は、リアルタイム PCR により調査した。

プロモーター活性

質量分析で新規に同定された、酸刺激を受容する二成分制御因子センサータンパク質の情報伝達系を調べるため、*mga* プロモーター活性を調査した。大腸菌と連鎖球菌のシャトルベクター pNU212kmへ *mga* プロモーター領域の遺伝子配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した pNU212(*mga-luc*) を、3-1 で作製した遺伝子欠損株へ導入した。バイオフィルム産生培地で菌体

を培養後、ルシフェラーゼ活性を測定し、pHの変化とプロモーター活性変化を測定した。

SPY1588 センサータンパク質の立体構造解析およびバイオフィーム産生

I-TASSER サーバにより SPY1588 センサータンパク質の立体構造を解析後、CueMol2 ソフトウェアによりタンパク質の静電ポテンシャルを計算し、酸を感受すると考えられる負電荷領域を検討した。

負電荷を担うアミノ酸を特定し、そのアミノ酸をポイントミューテーション法によりアミノ酸置換を施した。pNU212 ベクターへアミノ酸置換した spy1588 遺伝子を結合させ、spy1588 欠損株へ導入した。バイオフィーム産生培地で酸性状況下培養し、酸を感受するアミノ酸部位を検討した。

4. 研究成果

A 群連鎖球菌の劇症化制御遺伝群の検討

研究方法の(1)の実験より、SPY1622 センサータンパク質は酸を感受してバイオフィーム産生に関与していることが示唆された(図1右)。ミュータンス菌に SPY1622 と相同性が高い HK11 が存在し、ミュータンス菌でも酸感受性とバイオフィーム産生に関与していると報告されていることから、SPY1622 も同様の酸感受性機構が存在していることが示唆された。

(1)の実験より、ウエスタンブロット(図1左上)およびリアルタイム PCR(図1左下)による解析から、SPY1622 が酸を感受後に繊毛を発現してバイオフィーム産生に関与していることも新たに解明された。

さらに、リアルタイム PCR の解析から、毒素タンパク質の発現制御を行う mga 遺伝子が、酸感受後に変化することが明らかとなった。これらの結果から、二成分制御因子が酸感受後に Mga タンパク質へ情報を伝え、Mga タンパク質の誘導に関与することが示唆された。

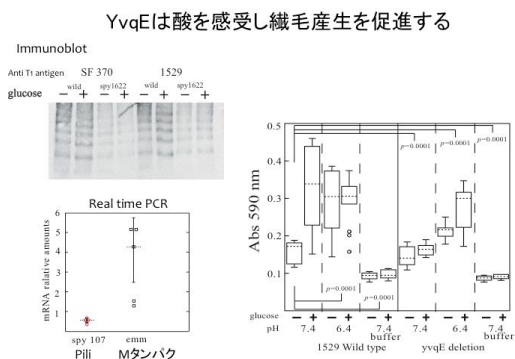


図1 spy1622(YvqE)の機能解析結果 左上：ウエスタンブロット、左下：リアルタイム PCR、右：バイオフィーム産生
新規酸感受性センサータンパク質の解析

(1)の実験結果より、SPY1622 センサータンパク質が酸感受性を示す結果以外に、新規に SPY1588 が酸感受性を示し、バイオフィーム産生に関与する結果が得られた。このセンサータンパク質の酸感受性機構を解析するために、(2)の質量分析を行いバイオフィーム産物から情報伝達系を調査した。その結果、バイオフィームの構成成分として M タンパクが突き止められた。リアルタイム PCR の結果と(2)のプロモーター活性の解析結果から、SPY1588 が酸感受後に mga プロモーターを活性化し、M タンパクを産生してバイオフィーム産生を行う一連の情報伝達系が明らかとなった。さらに、(2)の SPY1588 の立体構造解析と静電ポテンシャル解析、アミノ酸置換によるバイオフィーム産生の結果から、SPY1588 は負電荷領域で酸とインタラクションすることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

- ①Tatsuno I, Isaka M, Masuno K, Hata N, Matsumoto M, Hasegawa T. Functional Predominance of msr(D), Which Is More Effective as mef(A)-Associated Than mef(E)-Associated, Over mef(A)/mef(E) in Macrolide Resistance in Streptococcus pyogenes. Microb Drug Resist. 2018 Feb 6. doi: 10.1089/mdr.2017.0277. 査読有
- ②Nishio N, Hasegawa T, Tatsuno I, Isaka M, Isobe KI. Female GADD34 mice develop age-related inflammation and hepatocellular carcinoma. Geriatr Gerontol Int. 2017 ;17(12):2593-2601. doi: 10.1111/ggi.13080. 査読有
- ③Hasegawa T, Hata N, Matsui H, Isaka M, Tatsuno I. Characterisation of clinically isolated Streptococcus pyogenes from balanoposthitis patients, with special emphasis on emm89 isolates. J Med Microbiol. 2017 ;66(4):511-516. doi: 10.1099/jmm.0.000460. 査読有
- ④Isaka M, Tatsuno I, Maeyama J, Matsui H, Zhang Y, Hasegawa T. The YvqE two-component system controls biofilm formation and acid production in Streptococcus pyogenes. APMIS. 2016;124(7):574-85. doi: 10.1111/apm.12538. 査読有
- Tatsuno I, Okada R, Matsumoto M, Hata N, Matsui H, Zhang Y, Isaka M, Hasegawa T. Relevance of spontaneous fabT mutations to a streptococcal toxic shock syndrome to non-streptococcal toxic shock syndrome transition in the novel-type Streptococcus

pyogenes isolates that lost a salRK.APMIS. 2016;124(5):414-24. doi: 10.1111/apm.12521. 査読有

⑥Zhang Y, Tatsuno I, Okada R, Hata N, Matsumoto M, Isaka M, Isobe K, Hasegawa T. Predominant role of msr(D) over mef(A) in macrolide resistance in Streptococcus pyogenes.Microbiology. 2016 ;162(1):46-52. doi: 10.1099/mic.0.000206. 査読有

⑦Zhang Y, Okada R, Isaka M, Tatsuno I, Isobe K, Hasegawa T. Analysis of the roles of NrdR and DnaB from Streptococcus pyogenes in response to host defense.APMIS. 2015 ;123(3):252-9. doi: 10.1111/apm.12340. 査読有

⑧Okada R, Matsumoto M, Zhang Y, Isaka M, Tatsuno I, Hasegawa T. Emergence of type I restriction modification system-negative emm1 type Streptococcus pyogenes clinical isolates in Japan.APMIS. 2014 ;122(10):914-21. 査読有

Tatsuno I, Isaka M, Okada R, Zhang Y, Hasegawa T. Relevance of the two-component sensor protein CiaH to acid and oxidative stress responses in Streptococcus pyogenes.BMC Res Notes. 2014 28;7:189. doi: 10.1186/1756-0500-7-189. 査読有

Masuno K, Okada R, Zhang Y, Isaka M, Tatsuno I, Shibata S, Hasegawa T. Simultaneous isolation of emm89-type Streptococcus pyogenes strains with a wild-type or mutated covS gene from a single streptococcal toxic shock syndrome patient. J Med Microbiol. 2014 ;63(Pt 4):504-7. doi: 10.1099/jmm.0.070300-0. Epub 2014 Jan 25. 査読有

Tatsuno I, Okada R, Zhang Y, Isaka M, Hasegawa T. Partial loss of CovS function in Streptococcus pyogenes causes severe invasive disease.BMC Res Notes. 2013 28;6:126. doi: 10.1186/1756-0500-6-126. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1 井坂 雅徳, 立野 一郎, 前山 順一, 長谷川 忠男

二成分制御センサータンパク質 SPY1588 は、バイオ フィルム産生とmgaプロモーター発現を促進させる 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)平成 30年3月27,28,29日

2 前山 順一, 林 大介, 山本 十糸子, 向井 徹, 岡林 佐知, 田村 敏生, 山崎 利雄, 尾関 百合子, 松本 壮吉, 山本 三郎

カニクイザルを用いた MDP1 と G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の有効性評価第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)平成 30年3月27,28,29日

3 立野 一郎, 松本 昌門, 松井 秀之, 井坂 雅徳, 長谷川 忠男

Functional predominance of msr(D), over mef(E) in macrolide resistance in Streptococcus pyogenes 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)平成 30年3月27,28,29日

4 前山 順一, 山崎 利雄, 林 大介, 山本 十糸子, 尾関 百合子, 鈴木 史子, 山口 雄大, 松本 壮吉, 伊保 澄子, 山本 三郎

遅延型過敏反応から検討した MDP1 および G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の免疫条件第90回日本細菌学会総会 仙台国際センター展示棟(宮城県・仙台市)平成 29年3月19,20,21日

5 立野 一郎, 松本 昌門, 松井 秀之, 井坂 雅徳, 長谷川 忠男

Characterization of spontaneous fabT mutations in the novel-type Streptococcus pyogenes isolates第89回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)平成 28年3月23,24,25日

6 松尾(川田)美樹, 立野 一郎, 長谷川 忠男, 小松澤 均

化膿レンサ球菌の二成分制御系によるナイシン 耐性機構 第89回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)平成 28年3月23,24,25日

7 張 顔, 立野 一郎, 松本 昌門, 井坂 雅徳, 長谷川 忠男

Predominant role of msr(D) over mef(A) in macrolide-resistance in Streptococcus pyogenes 第89回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)平成 28年3月23,24,25日

8 前山 順一, 山崎 利雄, 山本 十糸子, 林 大介, 鈴木 史子, 尾関 百合子, 伊保 澄子, 松本 壮吉, 山本 三郎

組換え結核菌抗原 MDP1 および DNA アジュバント G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の最適化の 試み第89回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)平成 28年3月23,24,25日

9 張顔, 松本昌門, 井坂雅徳, 立野一郎, 長谷川忠男

新型の emm1 タイプ A 群レン サ球菌におけるマクロライド耐性への MefAの関与 第88回日本細菌学会総会 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)平成 27年3月27,28日

10 井坂雅徳, 立野一郎, 前山順一, 長谷川 忠男

A群連鎖球菌が産生するバイオ フィルムの構成成分の同定とその特性について 第88回日本細菌学会総会 長良川 国際会議場(岐阜県・岐阜市)平成 27 年 3月26,27日

11 立野一郎, 岡田涼, 張顔, 松本昌門, 畑七 奈子, 井坂雅徳, 長谷川忠男

近年出現した A 群レンサ球菌 saIR-saIK 欠損株に関する研究 第 46 回レンサ球菌研究会
東京大学(東京都・文京区)平成 26 年 6 月 27 日
12 井坂雅徳、立野一郎、前山順一、長谷川 忠男
二成分制御因子による A 群連鎖球菌のバイオフィルム形成機構の解析 第 87 回日本細菌学
会総会 タワーホール船 堀(東京都・江戸川区)平成 26 年 3 月 27,28 日
13 岡田涼、畑七奈子、脇本幸夫、長谷川忠男 近年出現した新規 A 群レンサ球菌の 特性に関
する研究 第 25 回日本臨床微生物学会総会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)平成26年2
月2日

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者: 長谷川忠男

ローマ字氏名: (HASEGAWA tadao)

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10314014

研究分担者: 立野一郎

ローマ字氏名: (TATSUNO ichiro)

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 講師

研究者番号(8桁): 50311642

研究分担者: 前山順一

ローマ字氏名: (MAEYAMA jyun-ichi)

所属研究機関名: 国立感染症研究所

部局名: 血液・安全性研究部

職名: 主任研究官

研究者番号(8桁): 40199641

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。