

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870840

研究課題名（和文）血清型変換株作出による豚レンサ球菌の抗原性変換発生機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism for capsular switching in *S. suis*

研究代表者

大倉 正稔（OKURA, Masatoshi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域・主任研究員

研究者番号：60508315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：豚レンサ球菌は人獣共通感染症として重要な細菌であり、菌体表層の抗原性（莢膜による）により30以上の血清型に型別されている。本研究では、豚レンサ球菌において、他の血清型株のゲノムDNAと混合し、自然形質転換を誘導することにより、血清型が変換しうることを実証した。また、莢膜の欠失により、自然形質転換能が大きく上昇することも明らかにした。さらに、莢膜を欠失した豚レンサ球菌をマウス体内で継代することにより、莢膜が復活した株が出現しうることが明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Streptococcus suis is an important bacterium which can cause severe disease in pigs and humans. *S. suis* strains are classified into more than 30 serotypes on the basis of the antigenicity of their capsular polysaccharides (CPSs). In this study, we demonstrated that switching of CPS can be occurred by mixing with the sigX RNA polymerase sigma factor (SigX)-inducing peptide (XIP) and a genomic DNA extracted from the strain of other serotype. In addition, we found that unencapsulation increase the XIP-induced competence efficiencies. We also revealed a recovery of a capsule after in vivo passages of a non-encapsulated strain in mice.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌学 レンサ球菌 抗原性変換 血清型

1. 研究開始当初の背景

豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) は豚に髄膜炎や敗血症、心内膜炎等を引き起こすため、養豚産業において多大な経済的損失を与えている⁽¹⁾。本菌は人にも感染する人獣共通感染症起因菌としても知られている。人への感染は豚や豚肉との接触に起因しており、重篤な場合、死に至る。人の感染事例は世界各地で起こっているものの散発的であったが、近年、アジア諸国で集団発生が続発し、死亡例も増加していることから、本菌の重要性が国内外で注目されている^{(2), (3)}。

本菌は菌体表層を覆う多糖体である莢膜の抗原性の違いにより、36の血清型が現在までに知られている⁽⁴⁾。病豚からは様々な血清型が分離されるが、2型が最も多く、人患者由来株もほとんどが2型である。そのため、2型株に対する豚用ワクチンが開発され、市販されているが、このワクチンには他の血清型株に対する防御効果は期待できないという欠点がある。すなわち、ワクチンの普及・使用状況によっては、ワクチン抗体を回避できる新たな血清型株の出現を含めた2型以外の株が今後台頭する事も十分考えられる。

S. suis の莢膜は2-5個の糖で構成される糖鎖ユニットが重合した多糖体であり、その合成には複数の糖合成、糖修飾及び糖転移酵素の連携が必要である。研究代表者らはこれまでの研究で、これら莢膜合成に関与する酵素をコードする遺伝子は染色体上で長さ数十 kb におよぶ遺伝子クラスター (*cps gene cluster*) を形成し、その構成遺伝子は血清型により多様であることを明らかにした⁽⁴⁾。さらに、研究代表者らの詳細な解析から、*S. suis* は「*cps gene cluster* の一部あるいは全領域の交換」により、全く異なる抗原性 (血清型) に変換しうることが示唆された⁽⁴⁾。実際、近年、患者から分離頻度が増加している血清型 14 型株は、これまで流行していた 2 型強毒株の *cps gene cluster* の一部が別の遺伝子に置き換わったことにより出現した可能性が指摘されている⁽⁵⁾。すなわち、*cps gene cluster* の交換は *in vivo* で恒常的に起こっていると考えられ、2 型ワクチンの普及は「高い病原性を保持したまま抗原性 (血清型) だけが変わり、既存のワクチンで防御できない株」の出現を促す可能性がある。しかし、*S. suis* の抗原性 (血清型) 変換は実証されておらず、機序や変換を引き起こす要因については分かっていない。

S. suis が血清型を変換するためには、まず、異なる血清型の株から数十 kb にもおよぶ *cps gene cluster* の全長または一部を獲得する必要がある。

本研究課題では、その獲得様式について「①供与側の株 (ドナー株) のファージやトランスポゾン等の可動遺伝因子 (Mobile genetic

element) が関与して受容側に伝達する」及び「②自然形質転換能を有する受容側の株 (レシピエント株) が菌体外に放出された供与側の DNA を直接菌体内に取り込む」の2種類の可能性に着目した (図 1)。

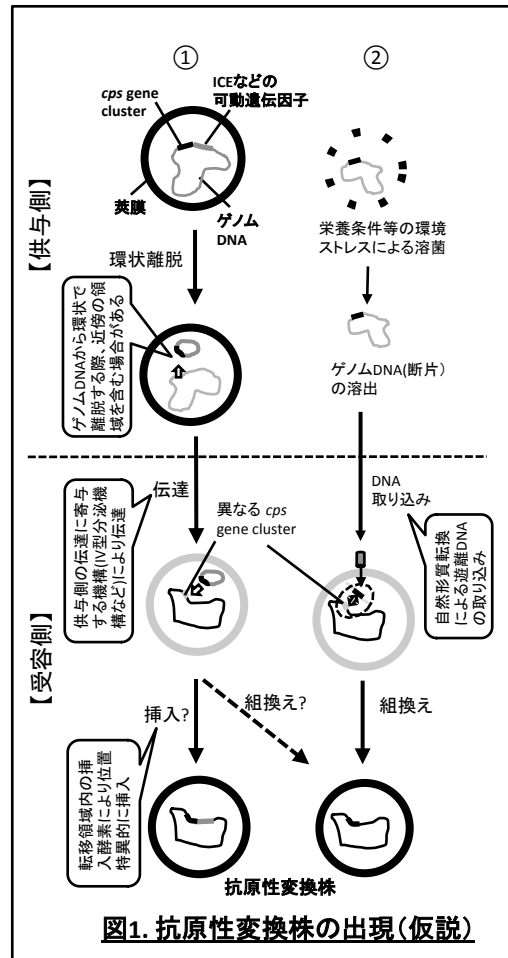


図1. 抗原性変換株の出現(仮説)

①については、研究代表者らが実施した多株ゲノム比較解析において、いくつかの株で *cps gene cluster* 近傍に Integrative and Conjugative Element (ICE) と呼ばれる可動遺伝因子 (50 kb 以上) が存在することを見出している。一部の ICE は、自身のゲノムから環状で切出され、時に近傍領域を巻き込んで他の株に伝達する⁽⁶⁾。従って、*cps gene cluster* 近傍の ICE も *cps gene cluster* の伝達に関与している可能性がある。②については、*S. suis* の特定の株が形質転換誘導ペプチドの添加により自然形質転換が誘導され、DNA を取り込むようになることが報告されており⁽⁷⁾、研究代表者らの予備実験においても、死菌の DNA を獲得して *cps gene cluster* の変異を修復したと考えられる株の出現を確認している。

2. 研究の目的

本研究課題では上記2つの可能性をもとに *S. suis* の抗原性 (血清型) 変換が実際に起こり得ることを *in vitro* の実験により証明するとともに、変換を引き起こす要因や変換が起こりやすくなる条件を含めた「*in vivo* に

おける抗原性（血清型）変換の発生機序」を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ICE による抗原性変換の検証

① ドナー候補株の選抜

57 株のゲノム解析より、*cps* gene cluster 近傍に ICE を有するドナー候補株を選抜した。

② *cps* gene cluster を含む領域の環状切り出し現象の検証

レシピエント株への伝達に際して起こる「ドナー株ゲノム内から *cps* gene cluster 含む領域が環状で切り出される現象」を実験的に検証するため、

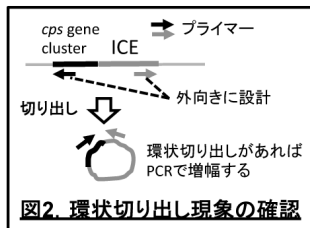


図2. 環状切り出し現象の確認

①で選抜した候補株を培養し、図2のように設計したプライマーを用いた PCR を実施した。

③ ドナー株 ICE による抗原性変換の検証

②が確認できた場合、図3のように薬剤耐性等のマーカーを *cps* gene cluster に付与した「②で切り出し現象が確認されたドナー株」と「レシピエント株」を共培養し、抗原性（血清型）変換株の作出を試みた。

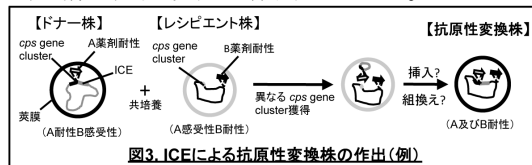


図3. ICEによる抗原性変換株の作出(例)

(2) 自然形質転換による抗原性変換の検証

① レシピエント候補株の選抜

自然形質転換誘導ペプチドの添加により、特定の *S. suis* 株が DNA を取り込み、組み換えが起こりうるということが報告されている⁽⁷⁾。そこで、解析中の 57 株のゲノム情報から、本ペプチドのコード領域や他の自然形質転換関連遺伝子を保有する株を検索し、自然形質転換能があると予想されるレシピエント株候補を選抜した。

② レシピエント候補株における自然形質転換の実証

薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドを供与 DNA として使用し、①で選抜したレシピエント株候補に形質転換誘導ペプチドを添加して培養することにより、形質転換株（薬剤耐性獲得株）が出現するかを確認した。形質転換株が出現した場合は、最も高頻度に起こる条件を出現頻度により検討した。

③ レシピエント株の自然形質転換誘導による抗原性変換の検証

②で形質転換率が高かった株をレシピエント株とし、②で検討した最も高頻度に形質転換が起こる条件で、図4のようにマーカーを付与したドナー株の死菌液または抽出ゲノム DNA と共培養し、抗原性（血清型）交換株作出を試みた。

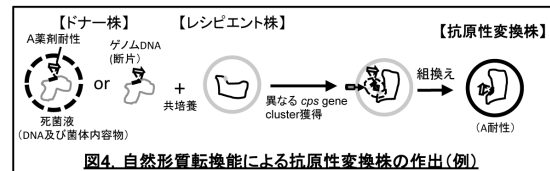


図4. 自然形質転換能による抗原性変換株の作出(例)

(3) in vivo における抗原性変換の検証

マウスに病原性の低い特定の株を接種し、薬剤耐性遺伝子などのマーカーを付した別の血清型株の死菌やゲノム DNA を混合し、血清型変換が起こりうるかを検証する。

まず、病原性の低い株として荚膜欠失株を使用し、マウス体内で継代することにより、荚膜の復活が起こりうるかを検証した。

4. 研究成果

(1) ICE による抗原性変換の検証

① ドナー候補株の選抜

57 株のゲノム解析より、*cps* gene cluster 近傍に ICE を有するドナー候補株を 18 株同定した。

② *cps* gene cluster を含む領域の環状切り出し現象の検証

①より血清型 2 型株 8 株を選択し、ICE の *cps* gene cluster を含む環状切り出しを検証した。その結果、ICE のみの切り出しは確認できたが、*cps* gene cluster を含む環状切り出しは確認できなかった。マイトマイシン C の添加や培養条件の変更も検討したが、同様に確認できなかった。In vivo を想定した新たな条件による検討が必要と考えられる。

③ ドナー株 ICE による抗原性変換の検証

抗原性（血清型）変換株は通常の培養条件では得られなかった。マイトマイシン C の添加や培養条件の変更も検討したが、同様に確認できなかった。②同様 In vivo を想定した新たな条件による検討が必要と考えられる。

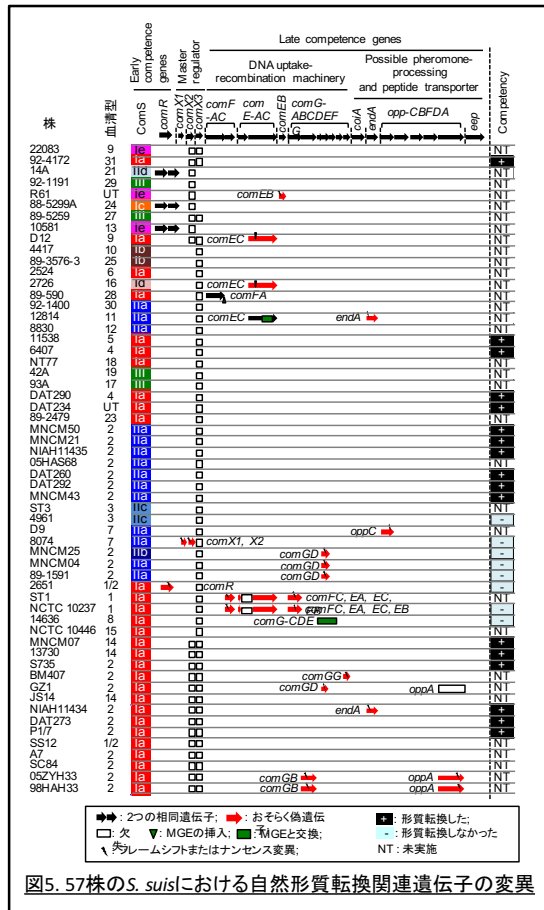
(2) 自然形質転換による抗原性変換の検証

① レシピエント候補株の選抜

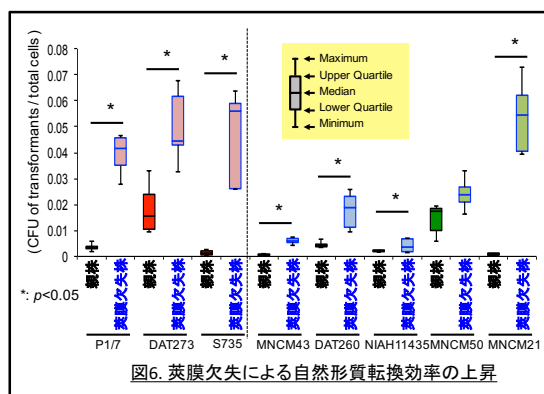
57 株のゲノム解析より、自然形質転換関連遺伝子を調べた結果、いくつかの株は関連遺伝子のいずれかまたは複数に明らかに遺伝子の大きさに影響する変異が導入されており、機能していないことが予想された（図5）。また、自然形質転換誘導ペプチドが少なくとも 3 種類存在することも明らかになった。

② レシピエント候補株における自然形質転換の実証

57 株より、25 株選択し、実際に自然形質転換が誘導されうるかを検証した。各株のゲノム配列から予想される自然形質転換誘導ペプチドの添加により、①の解析で自然形質転換関連遺伝子のいずれか機能していないと考えられた株については全て自然形質転換が誘導されなかった。一方、明らかな変異が認められなかった株については 1 株を除き、自然形質転換が誘導された。



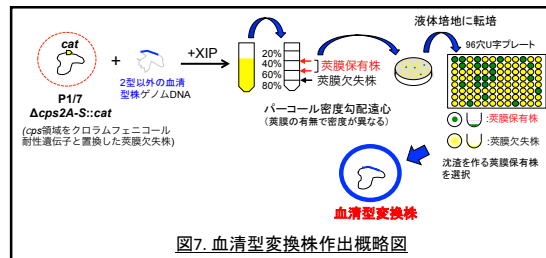
これらの株のうち莢膜を欠失している株が1株存在し、形質転換効率が非常に高かったことから、莢膜の欠失は自然形質転換の効率に影響する可能性を考え、血清型2型株を8株選択し、*cps* gene cluster 全領域を薬剤耐性遺伝子と交換した莢膜欠失株を作成し、親株と自然形質転換効率を比較したところ、全株で1.4~50倍上昇した(図6)。また、株によっては、効率は低いものの、自然形質転換誘導ペプチドの添加しなくても、形質転換体が出現した。以上から、莢膜欠失は自然形質転換に影響を及ぼすことが明らかとなった。



③自然形質転換誘導による抗原性変換検証
 マーカーを付与したドナー株の抽出ゲノムDNAと自然形質転換誘導ペプチドを添加して培養することにより、様々な抗原性(血清型)交換株の作出に成功した。すなわち、抗原

性変換に自然形質転換が大きく寄与していることが示唆された。

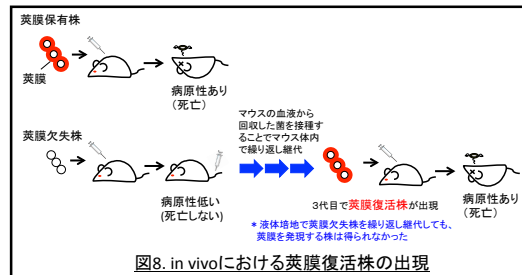
さらに、②の結果より、莢膜欠失株を使用し、様々な血清型株のゲノムDNAと自然形質転換誘導ペプチドを添加して培養し、パーコール密度勾配遠心(莢膜保有の有無で密度が異なる)と液体培地への接種による沈渣の有無(莢膜欠失により沈渣ができなくなる)により、マーカー遺伝子を導入することなく、血清型変換株の作出に成功した(図7)。しかし、自然形質転換誘導ペプチドを添加しない場合は、通常の培養では血清型変換は認められなかった。



(3) in vivoにおける抗原性変換の検証

①in vivoにおける莢膜発現の復活

図8のように莢膜合成遺伝子の変異により莢膜を欠失した*S. suis*株を液体培地で繰り返し培養しても、莢膜の発現は認められなかったが、マウス体内で継代すると、莢膜合成遺伝子の機能が回復し、莢膜を発現する株が出現した。



②in vivoにおける抗原性変換

①と同様にマウス体内で継代することにより、抗原性変換が起こりうるかを現在検証しているところである。

<引用文献>

- (1) Staats JJ, et al. ; Vet Res Commun, 21:381-407, 1997.
- (2) Ye C, et al. ; Emerg Infect Dis, 12:1203-1208, 2006.
- (3) Wertheim HF, et al. ; Clin Infect Dis, 48:615-625, 2009.
- (4) Okura M, et al. ; Applied Environment Microbiol, 79:27-6162, 2013.
- (5) Zhang A, et al. ; BMC Genomics, 12:523, 2011.
- (6) Wozniak RAF, et al. ; Nature Rev Microbiol, 8:552-563, 2010.
- (7) Zaccaria E, et al. ; PLoS One 9 :e99394, 2014.

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計7件)

- ① Okura M, Nozawa T, Watanabe T, Murase K, Nakagawa I, Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M, Hamada S, Maruyama F. A locus encoding variable defence systems against invading DNA identified in *Streptococcus suis*. *Genome Biol Evol.* (2017) 9:1000-1012. (査読有)
- ② Auger JP, Meekhanon N, Okura M, Osaki M, Gottschalk M, Sekizaki T, Takamatsu D. *Streptococcus suis* serotype 2 capsule in vivo. *Emerg Infect Dis.* (2016) 22:1793-1796. (査読有)
- ③ Vinogradov E, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 9 capsular polysaccharide and assignment of functions of the cps locus genes involved in its biosynthesis. *Carbohydr Res.* (2016) 433:25-30. (査読有)
- ④ Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens.* (2016) 5:E45. (査読有)
- ⑤ Van Calsteren MR, Goyette-Desjardins G, Gagnon F, Okura M, Takamatsu D, Roy R, Gottschalk M, Segura M. Explaining the serological characteristics of *Streptococcus suis* serotypes 1 and 1/2 from their capsular polysaccharide structure and biosynthesis. *J Biol Chem.* (2016) 291:8387-8398. (査読有)
- ⑥ Roy D, Auger JP, Segura M, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Gottschalk M. Role of the capsular polysaccharide as a virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 14. *Can J Vet Res.* (2015) 79:141-146. (査読有)
- ⑦ Lakkitjaroen N, Takamatsu D, Okura M, Sato M, Osaki M, Sekizaki T. (2014) Capsule loss or death: the position of mutations among capsule genes sways the destiny of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett.* (2014) 354:46-54. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

- ① M. Okura, M. Osaki, F. Maruyama, T. Nozawa, K. Murase, I. Nakagawa, S. Hamada,

M. Tohya, T. Watanabe, T. Sekizaki, D. Takamatsu. Differences in genetic competence among *Streptococcus suis* serotype 2 strains and a factor that affects the ability. 3rd International Workshop on *Streptococcus suis*. 2016.9.8 Brownschweig(Germany).

- ② 高松 大輔, 大倉 正稔, 大崎 慎人, 関崎 勉 Recovery of *Streptococcus suis* serotype 2 capsule and its virulence in vivo. 日本細菌学会総会 2016.3.24 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

- ③ 大倉 正稔, 大崎 慎人, 関崎 勉, 高松 大輔 豚レンサ球菌の特定集団で見られた荚膜欠失による自然形質転換能の上昇. 日本細菌学会総会 2016.3.24 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

- ④ M. Okura, T. Nozawa, T. Watanabe, K. Murase, I. Nakagawa, D. Takamatsu, M. Osaki, T. Sekizaki, M. Gottschalk, S. Hamada, F. Maruyama. A hot-region promoting intraspecific divergence by shift of genetic elements related to defense systems against invading DNA. SMBE Satellite Workshop on Genome Evolution in Pathogen Transmission and Disease. 2016.2.24 Shiga Kogen(Japan).

- ⑤ 大倉 正稔, 野澤 孝志, 渡辺 孝康, 中川 一路, 高松 大輔, 大崎 慎人, 関崎 勉, 浜田 茂幸, 丸山 史人 ゲノム解析から明らかとなった *Streptococcus suis* における曖昧な種の境界及び進化の鍵となるスポット 日本細菌学会総会 2015.3.28 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

- ⑥ M. Okura, T. Nozawa, T. Watanabe, I. Nakagawa, D. Takamatsu, M. Osaki, T. Sekizaki, Y. Kumagai, M. Gottschalk, S. Hamada, F. Maruyama. Genome sequencing of miscellaneous strains revealed the genes for characterizing the species "*Streptococcus suis*" and potentially hazardous populations for human. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases 2014.11.12 Buenos Aires(Argentina).

- ⑦ 大倉 正稔, 高松 大輔, 野澤 孝志, 渡辺 孝康, 中川 一路, 大崎 慎人, 関崎 勉, 浜田 茂幸, 丸山 史人 多株ゲノム比較解析により明らかになった *Streptococcus suis* に特徴的な遺伝子 レンサ球菌研究会 2014.6.27 東京大学弥生キャンパス内フードサイエンス棟中島董一郎記念ホール(東京都・文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 正稔 (OKURA, Masatoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・動物衛生研究部門 細菌・寄生
虫研究領域・主任研究員

研究者番号：60508315