

令和元年5月23日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08782

研究課題名(和文) ファージ由来DNAに注目したA群レンサ球菌のマクロライド耐性機構と病原性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of macrolide resistance mechanism and virulence of *Streptococcus pyogenes* focused on phage DNA

研究代表者

長谷川 忠男 (Hasegawa, Tadao)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10314014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年分離されるemm1タイプのA群レンサ球菌に含まれるファージ由来のDNAに注目して研究を行った。抗生物質マクロライドの耐性メカニズムとして考えられていたmef(A)/mef(E)遺伝子がコードする排出ポンプの役割は少なく、ゲノム上それらの直下に存在する各々のmsr(D)遺伝子がより重要な役割を果たすことが明らかとなり、耐性度の違いもそれぞれのmsr(D)の塩基配列の違いに起因していることが示唆された。マクロライド耐性に関しては、外界の刺激を感知し遺伝子発現を制御する二成分制御因子の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果は従来マクロライド耐性メカニズムの一つとして定説であったmef(A)/mef(E)による薬剤の排出メカニズムの関与は少なく、mef(A)/mef(E)遺伝子それぞれのゲノム直下にあるmsr(D)の重要性を確立したのみならず、それぞれのmsr(D)の塩基配列の違いが菌のマクロライド耐性の度合いと相関することを世界で初めて明らかにしたことが学術的な意義である。マクロライドは世界で広く使用されている抗生物質のひとつであり、薬剤耐性を克服するうえでその真の耐性メカニズムを明らかにしたことは今後の創薬にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the macrolide resistance mechanism and virulence of *Streptococcus pyogenes* focused on phage DNA.

The roles of mef(A)/mef(E) genes that encode drug efflux pump in macrolide resistance are not much; however, those of msr(D) genes that exit downstream of mef(A)/mef(E) genes play more important roles. In addition, the degree of macrolide resistance is correlated with the nucleotide difference of msr(D) genes. Finally, macrolide resistance is suggested to be under control of two-component regulatory systems that sense outer signals.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 マクロライド ファージ mef(A) msr(D) 薬剤耐性 病原性

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

1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は小児の急性咽頭炎の主要な起炎菌であるとともに致死率の高い劇症型レンサ球菌感染症(streptococcal toxic shock syndrome, STSS)など多彩な感染症を引き起こす。細菌表層に存在する M タンパクをコードする *emm* 遺伝子によって分類され、*emm1* タイプが STSS で最も多く分離されている。A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎は感染症法 5 類定点把握疾患に分類され、毎年 30 万人近くが報告されているが実数は遥かに多数にのぼることが推定される。STSS は典型的にはいわゆるヒト喰いバクテリア症と呼ばれる壊死性筋膜炎を始めとする全身性の重篤な病態を引き起こす再興感染症である。この疾患も感染症法によって 5 類感染症全例把握疾患に分類されており、その頻度は年々増加している。その原因を解明するとともに、STSS の新たな治療戦略の開発が急務である。

治療の中心は抗生物質療法である。咽頭炎等軽微な感染症にはペニシリン系の抗菌薬が第一選択であるが、マクロライド系の抗菌薬も汎用されている。我々は STSS を引き起こす *emm1* タイプの菌のうち新規の株が高頻度に出現してきていることを報告した (引用文献)。これらの株では、type I restriction and modification system をコードしている領域が欠損しており、外部から DNA の取り込み効率が増加している。またマクロライド耐性遺伝子 *mef(A)* 遺伝子を保有するファージ由来の遺伝子Φ1207.3 が含まれていることがゲノム解析によって明らかとなっていた。*mef(A)* とその近縁の *mef(E)* 遺伝子がコードする排出ポンプがマクロライド耐性メカニズムに重要な役割を果たすことは肺炎球菌において主に長年研究されてきた。しかし A 群レンサ球菌を用いた研究はあまり行われていなかった。我々は新規の株を用いて、マクロライド耐性機構の再検討を行い、*mef(A)* ノックアウトによっても耐性度は変化しないが、その下流に存在する *msr(D)* ノックアウトにより、耐性度が大きく変化する結果を得て、*msr(D)* 遺伝子が *mef(A)* 遺伝子と比してより大きく関与している可能性を示唆した (引用文献)。この論文では *emm4*、*emm75* タイプの菌においてもノックアウト株を樹立したが、我々の結果が A 群レンサ球菌において普遍化できていない状態であった。

2. 研究の目的

(1) A 群レンサ球菌臨床分離株のうち *mef(A)* を有し、*emm* タイプが異なる株においても *emm1* タイプと同じ結果が得られるのか否か、すなわち *msr(D)* の優位性は A 群レンサ球菌において普遍的な現象であるかを明らかにする。

(2) A 群レンサ球菌には *mef(A)* と近縁の *mef(E)* 遺伝子を保有する株が存在する。この *mef(E)* 保有株において *msr(D)* 遺伝子が存在するのか否か、また存在するのであればその役割はどのようなものであるかを明らかにする。

(3) *mef(A)*、*msr(D)* の発現を調節する因子は何であるかを明らかにする。

(4) *mef(A)*/*msr(D)* を有するファージ DNA には明らかにファージとしての機能を発現することが予想される遺伝子のほかに細菌の生存あるいは病原性に関与する可能性を有する種々の遺伝子が存在する。これらの遺伝子のうちストレス応答に関与することが想定される *clpP* 遺伝子に注目し、病原性への関与の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) A 群レンサ球菌臨床分離株における *mef(A)*、*msr(D)* 遺伝子保有株の検索とノックアウト株の樹立 臨床分離株よりゲノム DNA を抽出し、*mef(A)*、*msr(D)* 遺伝子の有無を PCR により検索した。保有する株においては、引用文献 で行った方法によりそれらのノックアウト株の樹

立を試みた。さらにノックアウト株に *mef(A)*, *msr(D)* 遺伝子を導入した相補株も樹立し実験に供した。

(2) 二成分制御系因子ノックアウト株の樹立 マクロライド耐性関連遺伝子の発現がどのようにコントロールされているかを検討する目的で *emm1* タイプの 10-85 株を用いて、この株に存在するすべての二成分制御系センサー蛋白質、レギュレーター蛋白質をコードする遺伝子のノックアウト株の樹立を試み、薬剤感受性試験に供した。

(3) 薬剤感受性試験 野生株、ノックアウト株、相補株に対して Etest によって薬剤感受性を検討した。

(4) *clpP* 遺伝子ノックアウト株の樹立とストレス応答実験 引用文献 に示す新規の *emm1* タイプの菌に含まれるファージ上に存在する *clpP* 遺伝子のノックアウト株を樹立した。またこの *clpP* 遺伝子と相同性のあるゲノム上に存在する別の *clpP* 遺伝子のノックアウト株も同時に樹立し、機能比較を行った。樹立したノックアウト株を用いて温度ストレス、過酸化酸素ストレス、栄養ストレス等のストレス実験を行い、関与を検討した。

4. 研究成果

(1) 新たなノックアウト株の樹立と *mef(A)*, *msr(D)* の関与 引用文献 に用いた 3 株の臨床分離株由来以外に 5 株の臨床分離株由来のノックアウト株の樹立に成功した。そのうちの 1 株は *mef(E)* を有する株である。いずれの株においても *mef* 遺伝子ノックアウト株において野生株とマクロライド感受性に有意な差は認められなかった。一方 *msr(D)* 遺伝子ノックアウト株では有意な変化が認められ、マクロライド耐性における *msr(D)* 遺伝子の優位性が改めて確認できた。

(2) *mef(A)* 関連 *msr(D)* と *mef(E)* 関連 *msr(D)* の機能研究 *mef(A)* と *mef(E)* の下流にはそれぞれ *msr(D)* 遺伝子が存在するが、その塩基配列には違いが存在する。従来 *mef(A)* 保有株と *mef(E)* 保有株ではマクロライド耐性度が異なることが示唆されていた。この違いが *msr(D)* の違いである可能性を検討するため *mef(A)msr(D)* ダブルノックアウト株、*mef(E)msr(D)* ダブルノックアウト株、*mef(A)/mef(E)-msr(D)* 非保有株に *mef(A)* 関連 *msr(D)* と *mef(E)* 関連 *msr(D)* を遺伝子導入しマクロライド耐性を検討した。その結果 *mef(A)* 関連 *msr(D)* のほうが *mef(E)* 関連 *msr(D)* より機能的に強力であることが判明し、従来の株間におけるマクロライド耐性の違いはそれぞれが保有する *msr(D)* に起因することが示唆された。

(3) 二成分制御系因子のマクロライド耐性における関与 *emm1* タイプの 10-85 株に存在する 12 対の二成分制御系センサー蛋白質とレギュレーター蛋白質をコードする遺伝子のノックアウト株を樹立した(一つのレギュレーターは樹立不可)。それらのうち 2 つのセンサーと 2 つのレギュレーターノックアウト株においてマクロライド耐性の変化が認められた。しかしながらこの変化がマクロライドに特異的かどうか、耐性遺伝子発現の解析は現在進行中である。

(4) *clpP* 遺伝子ノックアウト株のストレス応答実験 ファージ上に存在する *clpP* 遺伝子と相同性のあるゲノム上に存在する *clpP* 遺伝子(従来の *emm1* タイプにも存在)に関して 10-85 株由来ノックアウト株を樹立した。温度ストレス、過酸化酸素ストレス、栄養ストレス、種々の抗生物質感受性の違いを比較検討した。その結果ゲノム由来 *clpP* に関してはどのストレスに関して親株に比してストレス応答が減弱していることが示唆された。一方ファージ由来の *clpP* ノックアウト株では親株と有意な差は認められなかった。マウス感染モデル実験は未実施であるが、これらの *in vitro* の結果から病原性への関与は現在少ないと考えている。

Okada 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); 914-921.

Zhang 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.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Hasegawa T, Matsumoto M, Hata N, Yano H, Isaka M, Tatsuno I. Homologous role of CovRS two-component regulatory system in NAD⁺-glycohydrolase activity in *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* as in *Streptococcus pyogenes*. APMIS. 2019 127(2):87-92. doi: 10.1111/apm.12914 査読有

Tatsuno 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 24(8):1089-1097. doi: 10.1089/mdr.2017.0277 査読有

Hasegawa 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 66:511-516. DOI 10.1099/jmm.0.000460 査読有

Kawada-Matsuo M, Tatsuno I, Aarii K, Zendo T, Oogai Y, Noguchi K, Hasegawa T, Sonomoto K, Komatsuzawa H. Two-component systems involved in susceptibility to nisin A in *Streptococcus pyogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 2016 16;82(19):5930-9. doi: 10.1128/AEM.01897-16 査読有

Kamiya Y, Hasegawa T, Takegami Y, Horiba K, Ando S, Torii Y, Kidokoro H, Kato T, Natsume J, Kawada J, Ito Y. Primary psoas abscess caused by group A streptococcus in a child: Case report with microbiologic findings. J Infect Chemother. 2016 22(12):811-814. doi: 10.1016/j.jiac.2016.06.011 査読有

Matsumoto M, Yamada K, Suzuki M, Adachi H, Kobayashi S, Yamashita T, Minagawa H, Tatsuno I, Hasegawa T. Description of the pathogenic features of *Streptococcus pyogenes* isolates from invasive and non-invasive diseases in Aichi, Japan. Jpn J Infect Dis, 2016 69(4):338-41. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.334 査読有

Isaka M, Tatsuno I, Maeyama JI, 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 *saIRK*. APMIS. 2016 124(5):414-24. doi: 10.1111/apm.12521 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

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 平成 30 年

長谷川忠男、松本昌門、松井秀之、井坂雅徳、立野一郎

A 群レンサ球菌における *mef(A)*, *mef(E)* マクロライド耐性システムの解析

第 54 回日本細菌学会中部支部総会 平成 29 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：立野 一郎

ローマ字氏名：Ichiro Tatsuno

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

研究分担者氏名：井坂 雅徳

ローマ字氏名：Masanori Isaka

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：助教

研究者番号 (8 桁): 40336673