

令和元年6月9日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15037

研究課題名(和文)豚レンサ球菌のオートファジー誘導と回避での有莢膜菌及び無莢膜菌の協働に関する解析

研究課題名(英文) Analysis of collaborative activities between the capsule-positive and capsule-negative *Streptococcus suis* in the induction of and escape from autophagy

研究代表者

関崎 勉 (Sekizaki, Tsutomu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：70355163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：*Streptococcus suis*の髄膜炎由来株、心内膜炎由来株およびその無莢膜株では、無莢膜株の方が有莢膜株より高い細胞障害性と細胞侵入性を示した。オートファゴソームマーカーGFP-LC3を強発現した細胞株でファゴソームの形成が観察されたが、侵入した菌の数が少なく、細菌のトランスクリプトーム解析は困難だった。そこで、侵入に重要と思われる細胞壁タンパク質遺伝子(22個)の欠失変異株を作製したところ、4つの変異株において、バイオフィーム形成能と接着能が低下していた。そのうち2つの遺伝子での2重遺伝子欠失変異株を作製したが、バイオフィーム形成能および細胞への接着能がさらに低下することはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Streptococcus suis*無莢膜株が無莢膜株より高い細胞障害性と侵入性を示した成績は、これまで無毒とされていた菌の新たな病原性を示した成績と言える。また、これまで全く知見がなかった*Streptococcus suis*においてもオートファジーが誘導されることが明らかになり、本菌感染症における感染初期段階での宿主応答が発症または治癒における重要な通過点であることが明らかとなった。これらの成績は、本菌感染症の予防や症状重篤化阻止に向けた新たな対策法開発にとって重要な知見となった。

研究成果の概要(英文)：Capsule-negative *Streptococcus suis* of porcine endocarditis and meningitis origins showed a higher degree of cytotoxicity and invasion to cultured cells compared with those of capsule-positive bacteria. Autophagy was observed in cultured cells expressing GFP-LC3, a biomarker of autophagosomes; however, number of invaded cells were very few and the transcriptome assay could not be performed. Twenty-two genes encoding cell-wall proteins, which were thought to play an important role in invasion, were individually deleted in the capsule-negative *S. suis* strain. Four deletion mutants showed lower level of biofilm formation and two of them and two other deletion mutants showed lower level of adherence to cultured cells compared with the parent strain; however, each of double-gene deletion mutants did not alter the levels of biofilm formation and adherence to cultured cells.

研究分野：獣医細菌学

キーワード：豚レンサ球菌 オートファジー 莢膜 心内膜炎 感染症 細胞障害性 細胞侵入性 細胞壁タンパク質

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

1. 研究開始当初の背景

豚レンサ球菌(*Streptococcus suis*)は、ブタやヒトに髄膜炎や心内膜炎を起こす人獣共通感染症の病原細菌で、近年世界中でブタとヒトの感染例が報告されている。本菌の莢膜は、食菌作用回避に関与する重要な病原因子と考えられているが、研究代表者らは、心内膜炎病変部には本菌の有莢膜菌だけでなく、毒力が低いと思われた無莢膜菌が共存し、双方が互いの弱点を補って病変を形成した可能性を見出した。一方、A群レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)が宿主細胞に侵入すると、細胞は自然免疫であるオートファジーによってそれを排除しようとするのが知られている。しかし、*S. suis* が宿主細胞に侵入することは知られているが、その後のオートファジー誘導性については全く知見がない。また、オートファジーと莢膜の有無の関係についても全く知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、*S. suis* が宿主細胞へ侵入した後の、細胞のオートファジーによる排除機構の誘導と菌によるその回避メカニズムおよび一連の過程における有莢膜菌と無莢膜菌との協働を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下の実験を行った。

- 1) 臨床的に強毒株が多い血清型 2 型の P1/7 株[MLST 型別による Sequence Type (ST)1, sly (+)] と SUT2083 株(ST28, sly (-))、およびこれらから実験室で作製した無莢膜変異株の DAT696 株、SUT2080 株を加えた 4 株を用いた。これらの株をヒト子宮頸癌由来細胞 (HeLa 細胞)、カナダ・モントリオール大学・獣医学部より分与を受けた新生子豚の気管上皮細胞 (NPTc 細胞) 及び豚の脳微小血管内皮細胞 (PBMEC 細胞) に感染した際の細胞障害性を取りパンブルー染色による生死細胞数算定で評価した。
- 2) 上記培養株化細胞を通常のプレートに培養したところに、4 菌株をそれぞれ感染させ一定時間培養後、ゲンタマイシンおよびペニシリンを添加し、細胞外の細菌を死滅させた状態にしてから、細胞を低濃度の Triton X-100 で溶解し、細菌を寒天培地で培養して、コロニー数を測定することにより、*S. suis* の細胞侵入性を評価した。
- 3) オートファゴソームのマーカーである GFP-LC3 を強発現した細胞株を作製し、4 菌株を感染させた場合にオートファゴソームが形成されるか観察した。
- 4) 細胞侵入の最初の過程で重要な働きをされると考えられる細胞壁タンパク質に着目し、ST28 の無莢膜株を用いてゲノム上にあるそれらの遺伝子 (22 個) のそれぞれを欠失した変異株を作製し、それらのバイオフィーム形成性および細胞への接着性を観察した。

4. 研究成果

- 1) 細胞障害性
P1/7、DAT696、及び SUT2080 株はいずれの細胞に対しても毒性を示さず、SUT2083 株が両細胞に毒性を示した。
- 2) 細胞侵入性
4 菌株の培養株化細胞への侵入率は、これまで報告のあった *Streptococcus pyogenes* での細胞侵入率に比べて 1/10 以下の低いものであったが、莢膜の有無で比較すると、無莢膜株の方が有莢膜株より有意に高かった。これらの成績から ST によって細胞毒性に差異はあるものの、莢膜の有無が細胞内侵入率に影響することが示された。
- 3) オートファジーの観察
用いた 4 菌株は、いずれもオートファジーに認識されていた。これらの成績から、*S. suis* は、無莢膜菌が莢膜を保有する菌と比較して高い細胞内侵入能を示し、さらに宿主細胞内侵入後は、莢膜の有無に関わらずオートファジーによって認識されることが明らかとなった。
しかし、オートファジーからの回避など細胞内動態や、Transwell プレートで培養した細胞を用いた細胞からの脱出における有莢膜菌と無莢膜菌の協働の観察については、実験条件の調整に難航し実現できなかった。細胞における動態を十分に観察できていないことから、当初予定していた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析は実施できなかった。
- 4) 細胞壁タンパク質遺伝子欠失変異株の性状
22 個の遺伝子のうち 1 個を除く 21 個の遺伝子欠失変異株を作製できた。1 個については成育に必須な遺伝子のため欠失変異株は作製できなかった。個々の遺伝子欠失変異株のうち、4 つの遺伝子欠失変異株において、バイオフィーム形成能、またそのうち 2 つおよび別な 2 つの遺伝子欠失変異株で細胞への接着能が低下していた。そこで、前者の 4 つの遺伝子から 2 つをとった 4 通りの組み合わせで遺伝子欠失変異株を作製して同様に調べたが、バイオフィーム形成能および細胞への接着能がさらに低下することはなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Arai S, Kim H, Watanabe T, Tohya M, Suzuki E, Ishida-Kuroki K, Maruyama F, Murase K, Nakagawa I, Sekizaki T. Assessment of pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential

- source of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res*, 79(9):941-948, 2018. doi: 10.2460/ajvr.79.9.941. [査読あり]
2. Yamada R, Tien LHT, Arai S, Tohya M, Ishida-Kuroki K, Nomoto R, Kim H, Suzuki E, Osawa R, Watanabe T, Sekizaki T. Development of PCR for identifying *Streptococcus parasuis*, a close relative of *Streptococcus suis*. *J Vet Med Sci*. 80(7):1101-1107, 2018 Jun 6. doi: 10.1292/jvms.18-0083. [査読あり]
 3. Tohya M, Sekizaki T, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequence of *Streptococcus ruminantium* sp. nov. GUT-187T (=DSM 104980 T =JCM 31869 T), the type strain of *S. ruminantium*, and comparison with genome sequences of *S. suis* strains. *Genome Biol Evol*. 10(4):1180-1184, 2018 Apr 6. doi: 10.1093/gbe/evy078. [査読あり]
 4. Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y, Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T. Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 67:3660-3665, 2017. doi:10.1099/ijsem.0.002204. [査読あり]
 5. Watanabe T, Shibasaki M, Maruyama F, Sekizaki T, Nakagawa I. Investigation of potential targets of *Porphyromonas* CRISPRs among the genomes of *Porphyromonas* species. *PLOS ONE*. 12:e0183752, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0183752. [査読あり]
 6. Meekhanon N, Kaewmongkol S, Phimpraphai W, Okura M, Osaki M, Sekizaki T, Takamatsu D. Potentially hazardous *Streptococcus suis* strains latent in asymptomatic pigs in a major swine production area of Thailand. *J. Med. Microbiol*. 66(5):662-669, 2017. doi:10.1099/jmm.0.000483. [査読あり]
 7. 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*. 9:1000-1012, 2017. doi: 10.1093/gbe/evx062. [査読あり]
 8. Auger J-P, Meekhanon N, Okura M, Osaki M, Gottschalk M, Sekizaki T, and Takamatsu D. *Streptococcus suis* Serotype 2 Capsule In Vivo. *Emerg. Infect. Dis*. 22:1793-1796, 2016. doi: 10.3201/eid2210.151640. [査読あり]
 9. Tohya M, Watanabe T, Maruyama F, Arai S, Ota A, Athey TB, Fittipaldi N, Nakagawa I, Sekizaki T. Comparative Genome Analyses of *Streptococcus suis* Isolates from Endocarditis demonstrate Persistence of Dual Phenotypic Clones. *PLOS ONE* 11:e0159558, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0159558. [査読あり]
 10. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 5:pii:E45, 2016. doi: 10.3390/pathogens5030045. [査読あり]
 11. 遠矢真理、関崎 勉「心内膜炎を惹起させる豚レンサ球菌の新たな戦略」*日本獣医師会雑誌* 69:339-344, 2016. [査読あり]

[学会発表](計23件)

1. Sekizaki T and Watanabe T. Metagenomic analysis of antimicrobial resistance genes in pig and chicken farms in Japan. The 1st Joint Meeting of Veterinary Science in East Asia, Seoul National University, Seoul, Korea, 10-12 May, 2018.
2. Sekizaki T. *Streptococcus suis*: Presence of capsule-negative cells in lesions of endocarditis. 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(九州大学) 2018.03.27-29.
3. Hyunjung Kim, Sakura Arai, Kazunori Murase, Takayasu Watanabe, Kasumi Kuroki, Fumito Maruyama, Mari Tohya, Eriko Suzuki, Nachiko Takeshita, Ichiro Nakagawa, Ro Osawa, Tsutomu Sekizaki. Investigation of microbiota in pig farms for understanding the route of *Streptococcus suis* infection. 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(九州大学) 2018.03.27-29.
4. Takayasu Watanabe, Masaki Shibahara, Tsutomu Sekizaki, Ichiro Nakagawa. Investigation of CRISPRs and their immune targets in *Porphyromonas* genomes. 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(九州大学) 2018.03.27-29.
5. Kasumi Kuroki, Takashi Nozawa, Takayasu Watanabe, Hyunjung Kim, Eriko Suzuki, Ichiro Nakagawa, Tsutomu Sekizaki. Induction of cytotoxicity and autophagy of *Streptococcus suis* in human or porcine cells. 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(九州大学) 2018.03.27-29.
6. Eriko Suzuki, Kasumi Kuroki, Takayasu Watanabe, Tsutomu Sekizaki. Visualizing capsule-positive and negative *Streptococcus suis* in infective endocarditis. 第91回日本細菌学会総会 福岡国際会議場(九州大学) 2018.03.27-29.
7. Hyunjung Kim, Sakura Arai, Takayasu Watanabe, Kazunori Murase, Fumito Maruyama, Mari Tohya, Eriko Suzuki, Nachiko Ogata, Ryoko Yamada, Shinichi Dozaki, Tan Hung Vo, Nguyen Thi Phuong Binh, Ngoc Hai Nguyen, Ichiro Nakagawa, Tsutomu Sekizaki. Comparison of *Streptococcus suis* in pig farms and the swine oral microbiota between Japan and Vietnam. XXI LISSSD, Fiji. 2017.11.13.
8. 金炫呈、新井沙倉、渡辺孝康、遠矢真理、鈴木詠律子、小方奈知子、山田良子、堂崎真一、Tan Hung Vo、Thi Phuong Binh Nguyen、Ngoc Hai Nguyen、関崎 勉 日本・ベトナムのブタ

- 口腔内細菌叢解析と養豚場内 *Streptococcus suis* の分布調査 第160回日本獣医学会学術集会 (鹿児島大学) 2017.09.13-15.
9. Hyunjung Kim, Sakura Arai, Takayasu Watanabe, Mari Tohya, Eriko Suzuki, Nachiko Ogata, Ryoko Yamada, Shinichi Dozaki, Tsutomu Sekizaki. Comprehensive analysis for profiling the swine oral and environmental microbiota by sequencing of 16S rRNA gene. International Union of Microbial Society 2017. Singapore. 2017.07.16.
 10. 金炫呈、新井沙倉、渡辺孝康、遠矢真理、鈴木詠律子、小方奈知子、山田良子、堂崎真一、Tan Hung Vo、Thi Phuong Binh Nguyen、Ngoc Hai Nguyen、関崎 勉 日本、ベトナム養豚場内における豚レンサ球菌の分布とブタ口腔内細菌叢の比較 第49回レンサ球菌研究会 (新潟大学) 2017.06.17-18.
 11. 新井沙倉、金炫呈、遠矢真理、渡辺孝康、鈴木詠律子、丸山史人、中川一路、関崎 勉 豚の成長に伴う *Streptococcus suis* と類縁菌 *Streptococcus parasuis* の菌数変化の違い 第90回日本細菌学会総会 仙台国際センター (東北大学) 2017.03.19-21.
 12. 遠矢真理、渡辺孝康、丸山史人、新井沙倉、大田 篤、中川一路、関崎 勉 豚心内膜炎病変部に共存した有および無莢膜豚レンサ球菌の比較ゲノム解析 第90回日本細菌学会総会 仙台国際センター (東北大学) 2017.03.19-21.
 13. 遠矢真理、新井沙倉、富田純子、渡辺孝康、河村好章、勝見正道、牛水真紀子、吉住美奈、鵜澤 豊、井口成一、吉田 敦、菊池 賢、関崎 勉 新菌種 *Streptococcus ruminantium* sp. nov. の提唱 第1回獣医微生物学フォーラム 東京大学・弥生講堂 2017.03.01
 14. 山田良子、新井沙倉、Le Hong Thuy Tien、金炫呈、鈴木詠律子、野本竜平、渡辺孝康、大澤 朗、関崎 勉 *Streptococcus parasuis* 検出を目的とした PCR 法の開発と新たに分離した野外株の性状調査 第1回獣医微生物学フォーラム 東京大学・弥生講堂 2017.03.01
 15. 金炫呈、新井沙倉、渡辺孝康、遠矢真理、鈴木詠律子、小方奈知子、山田良子、堂崎真一、関崎 勉 ブタの成育段階ごとの口腔内および飼育環境の細菌叢調査 第1回獣医微生物学フォーラム 東京大学・弥生講堂 2017.03.01
 16. Hyunjung Kim, Sakura Arai, Takayasu Watanabe, Mari Tohya, Eriko Suzuki, Nachiko Ogata, Tsutomu Sekizaki. Characterization of the oral and environmental microbiota of domestic pigs using 16S rRNA gene sequencing. The 8th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia. National Chung Hsing University, Taiwan. 2017.02.19-21.
 17. Tsutomu Sekizaki. Persistence of *Streptococcus suis* in pigs and its cross contamination to pork. 2016 NTU and UTokyo Joint Conference Searching Solutions for Grand Challenges in East Asia. National Taiwan University, Taipei, Taiwan. 2016.11.30-12.01
 18. Masatoshi Okura, Makoto Osaki, Fumito Maruyama, Takashi Nozawa, Kazunori Murase, Ichiro Nakagawa, Shigeyuki Hamada, Mari Tohya, Takayasu Watanabe, Tsutomu Sekizaki, Daisuke Takamatsu. Differences in genetic competence among *Streptococcus suis* serotype 2 strains and a factor that affects the ability. 3rd International Workshop on *Streptococcus suis*. Hanover, Germany September 8-9, 2016.
 19. 山田良子、新井沙倉、Tien Le、野本竜平、渡辺孝康、大澤 朗、関崎 勉 *Streptococcus parasuis* 検出を目的とした PCR の開発と野外からの *S. parasuis* 分離への応用 第159回日本獣医学会学術集会 日本大学 藤沢 2016.09.06-08.
 20. 遠矢真理、渡辺孝康、新井沙倉、丸山史人、大田 篤、中川一路、関崎 勉 心内膜炎病変部に共存する *Streptococcus suis* 有莢膜菌と無莢膜菌の関係性と表現型分岐のタイミングについて 第48回レンサ球菌研究会 長崎大学 長崎 2016.07.08-09.
 21. 新井沙倉、Hyunjung Kim、遠矢真理、渡辺孝康、鈴木詠律子、山田良子、堂崎真一、関崎 勉 豚個体・飼育環境中の *Streptococcus suis* 検出用 real-time PCR の開発 第48回レンサ球菌研究会 長崎大学 長崎 2016.07.08-09.
 22. Tohya, M., Watanabe, T., Maruyama, F., Arai, S., Ota, A., Nakagawa, I. and Sekizaki, T. Isolation and comparative genome analysis of capsule-positive and -negative *Streptococcus suis* from porcine endocarditis. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2016, The K Hotel Gyeongju, Gyeongju city, Gyeongbuk, Korea, May 12-13, 2016.
 23. Okura, M., Osaki, M., Maruyama, F., Nozawa, T., Murase, K., Nakagawa, I., Hamada, S., Tohya, M., Watanabe, T., Sekizaki, T., Takamatsu, D. Differences in genetic competence among *Streptococcus suis* serotype 2 strains and a factor that affects the ability. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2016, The K Hotel Gyeongju, Gyeongju city, Gyeongbuk, Korea, May 12-13, 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

<https://www.facebook.com/SekizakiLab/>

6. 研究組織

(1) 連携研究者

連携研究者氏名：中川一路

ローマ字氏名：ICHIRO NAKAGAWA

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70294113

連携研究者氏名：野澤孝志

ローマ字氏名：TAKASHI NOZAWA

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：10598858

連携研究者氏名：渡辺孝康

ローマ字氏名：TKAYASU WATANABE

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：70725514

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：黒木香澄

ローマ字氏名：KASUMI ISHIDA-KUROKI

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：学振特別研究員

研究者番号（8桁）：70725514

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。