

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11615

研究課題名(和文)細胞障害性を示すアンギノース群連鎖球菌における可動性遺伝因子の存在意義

研究課題名(英文)Importance for the existence of mobile-genetic elements in cytotoxic Anginosus group streptococci

研究代表者

田端 厚之(TABATA, Atsushi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・講師

研究者番号：10432767

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、ペプチド毒素であるストレプトリジンSを産生して細胞障害性を示すヒト口腔内常在性の日和見病原菌であるStreptococcus anginosus subsp. anginosusを対象として、細菌の病原性や薬剤耐性などの重要な特性を規定する一要因となるプラスミドやバクテリオファージのような可動性遺伝因子の存在とその機能を明らかにすることを目的として行った。その結果、本菌種においてプラスミドと溶原ファージの存在を初めて確認し、それらの塩基配列情報に基づいた分子特性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒト口腔に常在するレンサ球菌であるStreptococcus anginosus subsp. anginosusの中に、可動性遺伝因子であるプラスミドや溶原ファージを保有する株が存在していることを明らかにした。細菌は、可動性遺伝因子の獲得によって表現型が変化する可能性があり、ヒト口腔内に常在する日和見病原菌である本菌種において可動性遺伝因子の存在が確認されたことは、本菌の潜在的な病原性を議論する上で、また適切なオーラルケアを啓蒙する上でも、重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文):Streptococcus anginosus subsp. anginosus is an opportunistic pathogen habitual in the oral cavity of human. Some of this species show cytotoxicity by producing the peptide-type toxin named streptolysin S. This study was conducted to investigate the presence of "mobile-genetic elements", such as plasmids and bacteriophages, that may give the novel characteristics such as pathogenicity and/or antibiotic resistance, and to reveal the functions of these elements in the species. From the result of this study, the presence of plasmid and the induction of lysogenic phage was observed in the strain of S. anginosus subsp. anginosus, and their molecular characters were investigated based on the genetic information of these elements. The results shown in this study will provide the important information to discuss the real pathogenicity of human commensal S. anginosus subsp. anginosus strains and to enlighten the adequate oral health of human.

研究分野：微生物学

キーワード：アンギノース群レンサ球菌 Streptococcus anginosus 溶血 ストレプトリジンS 可動性遺伝因子 プラスミド Toxin-antitoxin system ファージ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アンギノサス群レンサ球菌は、ヒト口腔内に常在している日和見病原性のレンサ球菌である。これまで、アンギノサス群レンサ球菌の病原性は臨床においてもそれほど注目されなかったが、近年では深部臓器における膿瘍形成やその他の様々な疾患の起原菌として報告されることが多くなり、その潜在的な病原性についてあらためて注目されている。しかしながら、ヒトに対する病原菌としての明確な認識が確立されている A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、B 群レンサ球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、そして肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) と比較すると、アンギノサス群レンサ球菌の病原性や臨床的な病態との関連性に関する知見は、国内外をみても十分ではない。

我々はこれまでに、 $\beta$  溶血性を示すアンギノサス群レンサ球菌の溶血因子に関する探索を行い、主に A 群レンサ球菌などの化膿性レンサ球菌群が産生するペプチド性毒素であるストレプトリジン S (SLS) が唯一の  $\beta$  溶血因子であることを明らかにし、この SLS が細胞障害因子としても作用することを確認している(引用文献①, ②)。そして、 $\beta$  溶血性を示す *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* (アンギノサス群レンサ球菌の一構成菌種) について研究を進めていく過程で、新規のプラスミドを保有している株 (0430-08 株) を見出した。プラスミドは菌株間を移動可能な遺伝因子であり、可動性遺伝因子 (mobile-genetic elements) と総称される遺伝因子の一つである。このような可動性遺伝因子を獲得した菌の表現型は獲得した可動性遺伝因子にコードされている遺伝子により影響を受けることがあり、例えば非病原性細菌が毒性因子を産生することによって病原性を示したり、抗生剤感受性菌が抗生剤耐性遺伝子を獲得することによって抗生剤耐性菌へと変化したりすることがある。本研究の開始時において、*S. anginosus* subsp. *anginosus* を含むアンギノサス群レンサ球菌が保有するプラスミドに関する報告は国内外でも成されていなかったため、我々が見出した新規プラスミドを含めたアンギノサス群レンサ球菌由来の可動性遺伝因子を対象とし、その存在意義について、アンギノサス群レンサ球菌が示す細胞障害性との関連にも注目して明らかにすることを動機として、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\beta$  溶血性を示す *S. anginosus* subsp. *anginosus* が保有する新規プラスミドの分子特性や機能を明らかにすると共に、このプラスミドの存在と  $\beta$  溶血性 *S. anginosus* subsp. *anginosus* の病原性、具体的には SLS 依存的な細胞障害性との関連についても検討することを申請時における当初の研究目的として研究を計画し、実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 0430-08 株が保有する新規プラスミドの配列解析とその分子特性の検討

0430-08 株が保有する新規プラスミドをプラスミド精製キットにより精製し、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) を用いて精製プラスミドの全塩基配列情報を決定した。得られた配列情報に基づいて、GENETYX Mac を用いて新規プラスミド上の遺伝子配列 (ORF) の推定を行い、Nucleotide BLAST による塩基配列情報に基づいた相同性検索の結果により ORF の特徴付けを行った。また、Protein BLAST によるアミノ酸配列情報に基づいた相同性検索も行い、ORF の転写翻訳産物の機能を推定した。また、各 ORF の発現量について、リアルタイム PCR による相対定量解析を行い、ORF1 の発現量を基準とした相対発現量として算出して検討を行った。

#### (2) *S. anginosus* subsp. *anginosus* のプラスミド保有状況の確認と保有プラスミドの配列特性の検討

研究室で保有している *S. anginosus* subsp. *anginosus* 株を対象として、上記(1)の検討により明らかにした新規プラスミドの部分配列 (ORF9 コード遺伝子から ORF1 コード遺伝子に渡る領域) を標的配列とし、PCR を用いてプラスミドの保有状況を確認した。プラスミドの保有が確認された株について、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) を用いて *de novo* ゲノム解析を行い、プラスミド保有株のドラフトゲノム情報及びプラスミドの全塩基配列情報を取得した。さらに、得られたプラスミドの全塩基配列情報に基づいて、前出の方法と同様に ORF の推定を行うと共に、その特徴付けも行った。

#### (3) *S. anginosus* subsp. *anginosus* の自然形質転換システムとプラスミド保有との関連性に関する検討

*S. anginosus* subsp. *anginosus* は、肺炎球菌の自然形質転換 (natural competence) システムをコードしている *com* オペロン (*comCDE*) のホモログをゲノム上に保有しており、*comC* の転写翻訳産物である受容能促進ペプチド (competence stimulating peptide, CSP) の存在下で形質転換感受性を示すという特徴を有す。そこで、*S. anginosus* subsp. *anginosus* のプラスミド保有株を対象とし、次世代シーケンサーによる解析で得られたドラフトゲノム情報に基づいて受容能促進ペプチドのアミノ酸配列情報の比較を行うと共に、このペプチドの受容ユニット (ComD) 及びシグナル伝達ユニット (ComE) のアミノ酸配列情報についても比較検討した。

#### (4) 細胞との共培養条件下におけるプラスミド保有株に特徴的な応答反応の検討

*In vivo* 環境を想定した細胞との共培養条件下におけるプラスミド保有株に特徴的な菌体内反応について検討するために、*S. anginosus* subsp. *anginosus* のプラスミド保有株に対して、プラスミドの不和合性と高温培養によるプラスミドキュアリングを併用した手法によって、プラスミド欠落株を作製した。このプラスミド欠落株とプラスミド保有株 (野生株) のそれぞれについて、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 (HSC-2) との所定時間の共培養後における菌体内の遺伝子発現状況について、RNA-seq 解析により検討した。

(5) *S. anginosus* subsp. *anginosus* における溶原ファージの配列解析とその分子特性の検討

プラスミドと同様に、被検菌の表現型に影響を及ぼしうる可動性遺伝因子である溶原ファージにも注目し、*S. anginosus* subsp. *anginosus* における存在の有無を検討した。溶原ファージの誘導剤として代表的なマイトマイシン C を被検菌の培養培地に添加することにより確認される菌液濁度の低下現象を指標として、*S. anginosus* subsp. *anginosus* における溶原ファージの誘導を確認した。溶原ファージの誘導が確認された宿主株のゲノム DNA と培養上清中に誘導された溶原ファージのゲノム DNA について、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) を用いて解析を行い、宿主株のドラフトゲノム情報及び溶原ファージの全塩基配列情報を決定した。得られた配列情報に基づいて GENETYX Mac を用いて新規プラスミド上の遺伝子配列 (ORF) の推定を行い、BLAST プログラムを利用して ORF の特徴付けや転写翻訳産物の機能の推定を行った。

4. 研究成果

(1) 0430-08 株が保有する新規プラスミドの配列解析とその分子特性の検討

次世代シーケンサーによる塩基配列解析の結果より、0430-08 株が保有する新規プラスミド (pSAA0430-08) の塩基数は 7,038bp であり、10 個の ORF の存在が推定された (図 1)。各 ORF の転写翻訳産物に対する Protein BLAST プログラムによる検索結果を、表 1 にまとめた。pSAA0430-08 の複製に必須の構造単位を特定するために、必須単位の候補 ORF を欠失させた変異プラスミドを作製してその菌体内での保持の可否により評価を行った。その結果、複製タンパク質をコードしていると推定される ORF1、プラスミドの安定維持に寄与している Toxin-antitoxin system をコードしていると推定される ORF9 及び ORF10、さらにそれらのユニット間に存在する AT 配列に富んだ反復配列である iteron が、pSAA0430-08 の複製必須ユニットであることを特定した。

続いて、pSAA0430-08 がコードしている各 ORF の発現量を検討した結果 (図 2) より、転写調節因子をコードしていると推定される ORF7 と、Toxin-antitoxin system の Antitoxin をコードしていると推定される ORF9 の発現量が多いことが確認された。ORF9 の発現量が多いことは、Toxin-antitoxin system の機能によってこの pSAA0430-08 を菌体内で安定的に保持していることを意味しており、ORF7 の発現量が多いことは、このプラスミドを保持していることによって菌体内で何らかの遺伝子発現の調節が行われている可能性が示唆された。

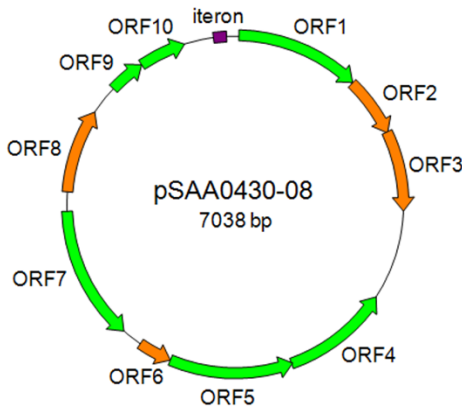


図 1. pSAA0430-08 の ORF マップ

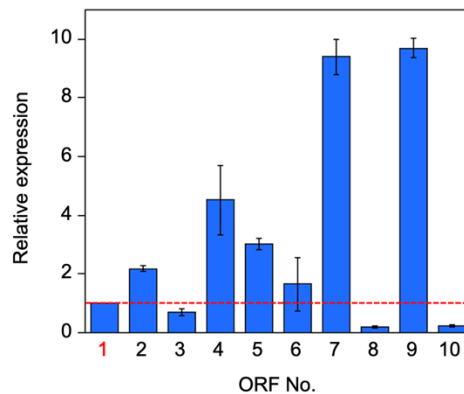


図 2. pSAA0430-08 における各 ORF の相対発現量

表 1. pSAA0430-08 を構成する ORF の転写翻訳産物に対する Protein BLAST 検索結果

ORF No.	配列相同性が確認されたタンパク質	配列相同性 (%)
ORF1	RepB family plasmid replication initiator protein	71%
ORF2	Hypothetical protein (機能未知タンパク質)	72%
ORF3	Hypothetical protein (機能未知タンパク質)	70%
ORF4	ABC-2 type transporter	86%
ORF5	ABC transporter, ATP-binding protein	83%
ORF6	Hypothetical protein (機能未知タンパク質)	69%
ORF7	Transcriptional regulator	89%
ORF8	Hypothetical protein (機能未知タンパク質)	86%
ORF9	Putative Phd_YefM superfamily antitoxin	94%
ORF10	Putative toxin	84%

(2) *S. anginosus* subsp. *anginosus* のプラスミド保有状況の確認と保有プラスミドの配列特性の検討  
続いて、研究室で保存している 153 株の *S. anginosus* subsp. *anginosus* を対象とし、PCR を用いてプラスミドの保有の有無を確認した。その結果、新たに 8 株についてプラスミドの保有を確認した。これらのプラスミド保有株から精製したプラスミドについて、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を用いて配列解析を行った結果、各プラスミドの塩基配列は pSAA0430-08 と非常に高い相同性を示した (塩基配列相同性 97%以上)。よって、*S. anginosus* subsp. *anginosus* が保有しているプラスミドは高度に保存されており、*S. anginosus* subsp. *anginosus* に特有のプラスミドであることが示唆された。

(3) *S. anginosus* subsp. *anginosus* の自然形質転換システムとプラスミド保有との関連性に関する検討  
*S. anginosus* subsp. *anginosus* におけるプラスミドの獲得メカニズムについて検討を行うため、本菌種が保有している自然形質転換システムに注目した。計 8 株のプラスミド保有株のドラフトゲノム情報より、自然形質転換システム (ComCDE) を構成する各ユニットのアミノ酸配列の相同性を検討した。その結果、自然形質転換システムにおける応答調節因子である ComE のアミノ酸配列は高度に保存されていた。一方、受容能促進ペプチド (ComC 由来の成熟型ペプチド) については、アミノ酸配列の相違に基づいて 2 群に分けられた。さらに、リン酸化酵素である ComD についても、アミノ酸配列の相違に基づいて受容能促進ペプチドと同様の 2 群に分けられた。なお、この 2 群間の配列の差異とプラスミドの保有状況との間に関連性は見出されておらず、*S. anginosus* subsp. *anginosus* における自然形質転換システムとプラスミド保有との関連性に関しては更なる検討が必要である。

(4) 細胞との共培養条件下におけるプラスミド保有株に特徴的な応答反応の検討  
*S. anginosus* subsp. *anginosus* のプラスミド保有株 (0430-08 株) 及びその株からプラスミドを欠落させたプラスミド欠落株について、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 (HSC-2) との共培養条件下における菌体内の遺伝子発現状況を RNA-Seq により検討した。なお、本解析のリファレンスゲノムとして、すでに全ゲノム配列が解読されている *S. anginosus* J4206 株のゲノム情報を用いた。その結果、HSC-2 との共培養条件下において、0430-08 株におけるプラスミドの有無で 19 種の遺伝子に発現量の差異が確認され、その中の 15 遺伝子についてはプラスミド欠落株で発現量の低下が確認された。今回の RNA-Seq により発現量の変動が確認された 19 種の遺伝子に関しては、被検菌の細胞障害性や病原性に対して直接的な影響を示す遺伝子は残念ながら確認されなかったが、各遺伝子の間接的な機能や影響については確認が必要であり、引き続き検討を行っている。

(5) *S. anginosus* subsp. *anginosus* における溶原ファージの配列解析とその分子特性の検討  
マイトマイシン C 存在下において菌液の濁度低下が確認される *S. anginosus* subsp. *anginosus* 株として、被検株の中から J4209 株を見出し、培養上清中に誘導した溶原ファージ (phJ4209) より精製したゲノムの全塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を用いて決定した。その結果、phJ4209 のゲノムサイズは 34,523bp であり、42 個の ORF より構成されていることが推定された (図 3)。推定 ORF の中には、ファージの溶原化に必要な Transposase や Lysin をコードする ORF が確認され、塩基配列情報からも phJ4209 が機能型の溶原ファージであることが予想された。さらに、この phJ4209 の宿主株 (J4209) のドラフトゲノム配列との比較解析により、宿主ゲノムへの phJ4209 の挿入位置を特定し、その推定アタッチメント配列 (*attB*) も特定した。興味深いことに、この *attB* 配列は *S. anginosus* を含むアンギノーサス群レンサ球菌だけでなく、アンギノーサス群レンサ球菌と同様にヒト口腔内に常在しているミティス群レンサ球菌にも保存されていることが確認された。この結果より、phJ4209 はヒト口腔に常在するレンサ球菌間を移動している可能性が示唆された。



図 3. J4209 株由来溶原ファージ (phJ4209) の ORF マップ

本研究では、アンギノーサス群レンサ球菌における可動性遺伝因子に注目し、その存在意義について、特に細胞障害性との関連より明らかにすることを目指して研究を展開した。本研究によって、アンギノーサス群レンサ球菌の一構成菌種である *S. anginosus* subsp. *anginosus* において、プラスミドと溶原ファージという 2 種の可動性遺伝因子の存在を初めて明らかにし、このうちプラスミドに関しては既に論文発表も行った (引用文献③)。アンギノーサス群レンサ球菌に属する菌種の殆どは日和見病原菌であり、その病原性などについてはこれまで注目されることは少なかったが、*S. anginosus* の一部の株は病原性や薬剤耐性などの表現型を変化させる要因となりうる可動性遺伝因子を保有していることが本研究によって明らかになった。幸い、今回見出したプラスミド及び溶原ファージの配列情報からは、明確な病原因子や薬剤耐性因子をコードする配列は確認されなかったが、アンギノーサス群レンサ球菌における可動性遺伝因子の存在とその機能については、今後も注目すべき要因であると考えられる。引き続き、アンギノーサス群レンサ球菌における可動性遺伝因子の存在意義について、特に本菌の細胞障害性への影響について注目しながら、研究を展開していく予定である。

【引用文献】

- ① Tabata A, Nakano K, Ohkura K, Tomoyasu T, Kikuchi K, Whiley RA, Nagamune H. *J Bacteriol.* 2013. **195**(5):1090-1099.
- ② Tabata A, Sato Y, Maya K, Nakano K, Kikuchi K, Whiley RA, Ohkura K, Tomoyasu T, Nagamune H. *Microbiology.* 2014. **160**(5):980-991.
- ③ Tabata A, Deutsch D, Otsuka S, Verratti K, Tomoyasu T, Nagamune H, Fischetti VA. *Plasmid.* 2018. **95**:16-27.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsushi Tabata, Douglas Deutsch, Seiya Otsuka, Kathleen Verratt, Toshifumi Tomoyasu, Hideaki Nagamune, Vincent A. Fischetti	4. 巻 95
2. 論文標題 A novel plasmid, pSAA0430-08, from <i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> strain 0430-08	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plasmid	6. 最初と最後の頁 16~27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plasmid.2018.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabata Atsushi, Yamada Takuya, Ohtani Hiromi, Ohkura Kazuto, Tomoyasu Toshifumi, Nagamune Hideaki	4. 巻 11
2. 論文標題 -Hemolytic <i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> causes streptolysin S-dependent cytotoxicity to human cell culture lines in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1609839 ~ 1609839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20002297.2019.1609839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田端厚之、大塚誠也、Douglas Deutsch、菊池賢、Vincent A. Fischetti、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 <i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> が保有するプラスミドとその特徴
3. 学会等名 第50回レンサ球菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Tabata, Douglas Deutsch, Seiya Otsuka, Kathleen Verratt, Toshifumi Tomoyasu, Hideaki Nagamune, Vincent A. Fischetti
2. 発表標題 Characterization of a novel plasmid discovered in a clinical isolate of <i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>
3. 学会等名 20th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田端 厚之、大塚 誠也、菊池 賢、友安 俊文、長宗 秀明
2. 発表標題 S. anginosus subsp. anginosusにおけるプラスミドの保有状況とそれらの特性
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田端 厚之、友安 俊文、長宗 秀明
2. 発表標題 Streptococcus anginosus由来溶原性ファージの特性
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端厚之、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 Streptococcus anginosus subsp. anginosus由来溶原性ファージの遺伝子的特性
3. 学会等名 第51回レンサ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端厚之
2. 発表標題 アンギノース群レンサ球菌が産生するペプチド溶血毒素Streptolysin Sの特徴と細胞障害性
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	友安 俊文  (TOMOYASU Toshifumi)  (20323404)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・准教授   (16101)	
研究 分担者	長宗 秀明  (NAGAMUNE Hideaki)  (40189163)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・教授   (16101)	