

令和 2 年 4 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：2015～2019

課題番号：15K09575

研究課題名(和文) 近年出現したA群レンサ球菌新型株のゲノム解析を利用した劇症型感染症発症機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of a streptococcal toxic shock syndrome to non-streptococcal toxic shock syndrome transition in the novel-type *Streptococcus pyogenes* isolates

研究代表者

立野 一郎 (Tatsuno, Ichiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：50311642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌新型株(特徴として、SalR-SalK遺伝子を含む領域を欠損している)には病原性の高い株と病原性の低い株の2種類が存在する。この病原性の違いが、fabT遺伝子の変異に依存していることを突き止め、解析結果を論文として発表した(2016)。但し、この論文内で実施したゲノム解析は不完全な状態(一本の環状DNAとしてつながっていない)であった。そこで、論文で使用した新型株である10-85を再度Pac-Bioを用いてシーケンスし、一本の環状DNAとしてつなげることに成功した(Accession No.AP019548)。この結果は、論文として発表済み(2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A群レンサ球菌新型株(特徴として、SalR-SalK遺伝子を含む領域を欠損している)には病原性の高い株と病原性の低い株の2種類が存在する。この病原性の違いが、fabT遺伝子の変異に依存していることを突き止めた。fabT遺伝子に変異を持つ株が一定の割合で出現することは、海外のグループからも報告された。しかし、病原性が低下するようなfabT遺伝子の変異が自然界で起こる理由についてはいまだ不明である。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pyogenes is a causative agent of streptococcal toxic shock syndrome (STSS). Recently, we showed that the regions encoding the SalR-SalK, a two-component regulatory system, were deleted in some emm 1-type isolates (named as "novel-type"). In this study, the two novel "STSS" isolates 10-85 and 11-171 were more virulent than the two novel "non-STSS" isolates 110-2 and 11T-3 when examined using a mouse model of invasive infection. Genome sequencing experiments using the three strains 10-85, 11-171, and 110-2 detected only one single nucleotide polymorphism that causes a non-synonymous mutation in fabT encoding a transcriptional regulator in strain 110-2. Loss of fabT reduced the high level of virulence observed in the STSS isolates to that in the non-STSS isolates, and introduction of an intact fabT compensated the lower virulence of 110-2, suggesting that the mutation in fabT is involved in the differential virulence among the novel-type clinical isolates.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 病原性 ゲノム fabT

## 1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌は、咽頭炎等の比較的軽微なものから致死的な侵襲型（劇症型感染症を含む）のものまで様々な疾患の起原菌として知られている。特に、劇症型感染症（人喰いバクテリア）は致死率が45%にも達する危険な疾患であり、近年再興感染症の一つとして注目されている（現代医学 51 巻2号 2003, 243-251）。本菌はヒトを唯一の自然宿主とする細菌であり、河川や土壌といった自然環境には存在しないと考えられている。よって、菌は宿主内で生存するための様々な（病原）因子を保有している。さらに、これらの因子の発現量を宿主環境（感染場所、宿主免疫機構の発動状態等）の変化に応じて正確に調節することが、本菌の生存に寄与すると考えられている。細菌において、外界環境の変化に応じてタンパク質の発現を調節する機構は主として二成分制御系（Two-component regulatory system）に依存している。この機構は、細胞外シグナルを感知するSensor histidine kinase（センサータンパク質）とセンサータンパク質からリン酸化という形で情報を受け取り結果として遺伝子の発現を調節するResponse regulator によって構成される（J Biol Chem. 2011 Dec 2;286(48):41368-80）。本菌の場合、13 種類の二成分制御系を保有しているが、其々が外界のどのようなシグナルを認識するためのセンサーなのかについてはほとんど明らかにされていない。一方、過去数年に渡って我々は、愛知県内の病院において患者から分離された菌株を収集し解析してきた。その結果、2010 年頃から *salR-salk* 遺伝子（13 種類の二成分制御系の一つをコードしている）を含む領域を欠損した株が出現し、その分離頻度が増加していることを発見した。この株は *salR-salk* 近傍に存在するRestriction modification system をコードする領域も同時に欠損しており、外界からの新たな遺伝子導入が容易になっていることが予想される（Okada *et al.*, APMS, 2014, 122: 914-921）。さらに我々は、この新型A 群レンサ球菌が、過去の研究結果では説明できない様々な病原性に関する特徴をもっていることを以下のように明らかにしている（未発表）。

- (1) 新型株を侵襲型疾患由来のものと、比較的軽微な疾患由来のものに分けるとともに、それらの病原性の強さをマウスに投与することで評価した。その結果、侵襲型疾患由来株の病原性がより高度であることが示された（未発表）。
- (2) 本菌が致死的な侵襲型（劇症型感染症を含む）の疾患を引き起こすか、咽頭炎等の比較的軽微な疾患で止まるかは、菌側と宿主側の両方の要因に依存する。菌側の因子としては、CovRS と Rgg の2 つの遺伝子調節因子（をコードする遺伝子）のいずれかに突然変異が導入されることにより病原性が上昇することがこれまで報告されてきた（*PLoS Pathog* 2010,6:e1000832）。しかし、新型株ではCovRS と Rgg の何れも変異がないにもかかわらず、人に対して致死的な侵襲型疾患を引き起こし且つ、マウスに対する病原性が高い株が存在している。この結果は、それらの新型株がCovRS 系やRgg 系以外の未知の機構によって高病原性を獲得している可能性を示唆している。

## 2 . 研究の目的

この研究の目的は、疾患と病原因子の関係、特に劇症型感染症に必須の病原因子を一つでも多く同定することである。本菌は多様な疾患（咽頭炎、猩紅熱、丹毒、産褥熱、リウマチ熱、急性糸球体腎炎、膿痂疹、蜂巣織炎、中耳炎、肺炎、化膿性関節炎、骨髄炎、髄膜炎、劇症型感染症など）の起原菌となりうる。それらの疾患由来の臨床分離株（或いは、健常者由来の常在菌）はいずれも多数の病原因子（SlaA, Fba, Pilus, Spy0252, MalT, LacE, MalE, Hyaluronic acid capsule, DNase, Sic, SpeB, M protein, LTA, PrtF2, SdaD1, ScpA, Slo, Ska, Sse, Mac1/IdeS, SpeA, SpeI, SpeC, NADase 等）を同時に保有している。そのため、疾患と病原因子の関係は基本的に不明である。

本研究において予想される結果は以下の2通りである。

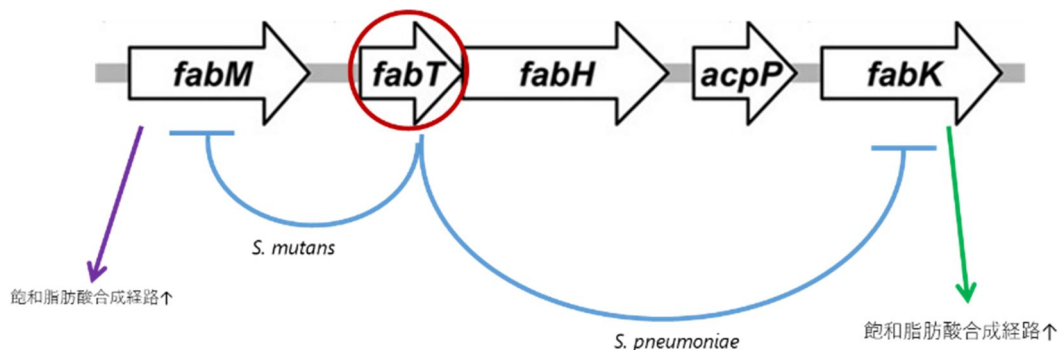
- (1) 低病原性新型株と比較したとき、高病原性新型株に特異的な構造遺伝子が同定された場合。劇症型感染症に特異的に関与する病原因子を明らかにすることができる。
- (2) 低病原性新型株と比較したとき、高病原性新型株に特異的な調節遺伝子が同定された場合。既知の病原因子のうち、どれが劇症型感染症に関与しているのかを絞り込むための助けとなる。すなわち、（上記のとおり）covRS（或いはrgg）調節遺伝子に突然変異が導入されると劇症型感染症を引き起こす可能性が上昇することが知られている。その知見をもとに、covRS 変異株において発現が上昇している複数の病原因子が劇症型感染症に関与していると考えられてきた。しかしながら、それら複数の病原因子のうち全てが劇症型感染症に関与しているのか、あるいは一部のみが関与しているのかは明らかではない。本研究の結果調節遺伝子が同定された場合、その（欠損）変異株を作成し、発現が上昇する病原因子のパターンをcovRS 変異株のパターンと比較することで劇症型感染症に関与している病原因子を絞り込むことが期待できる。

## 3 . 研究の方法

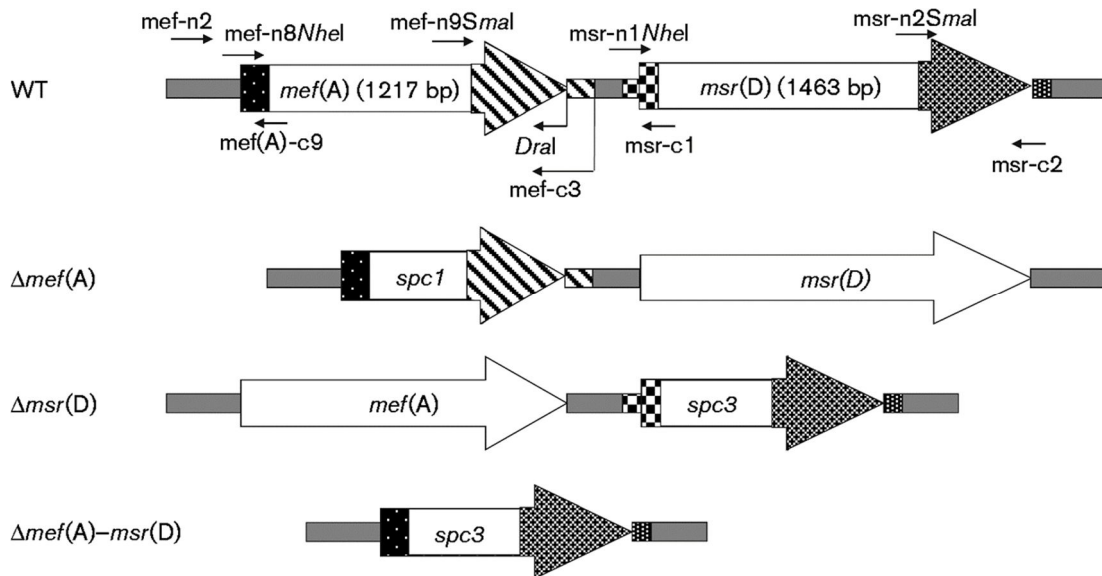
次世代シーケンサを用いて新型A 群レンサ球菌全ゲノム配列を決定する。得られた配列情報に基づいて新型株の特徴に影響を与えている可能性のある遺伝子及び領域を選択し、アミノ酸配列から機能（遺伝子調節因子、各種酵素等）の推定を試みる。さらに、候補遺伝子を新型株において欠損させた株、あるいは旧型株に候補遺伝子を導入した株の作成を行う。得られた株についてマウスモデル等を用いて解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサ (Ion torrent 社) を用いて全ゲノム配列を決定し、マウスに対する病原性の強い株と弱い株を比較した。そして、強毒株、或いは弱毒株に特異的な遺伝子及び領域を選択し、アミノ酸配列から機能の推定を試みた。その結果、新型株の特徴 (病原性の違い) に影響を与えている可能性のある遺伝子 *fabT* を同定した。*S. pneumoniae* と *S. mutans* の研究から *fabT* を含む *fab* 領域は脂肪酸合成 (Fatty Acid Biosynthesis : FAB) に関わる酵素をコードしていると推測する。*fabT* 自身は転写調節因子をコードしていると予想される。低病原性株は、*fabT* にアミノ酸置換を生じるような点突然変異を持っていた。高病原株の *fabT* を欠損させると、病原性と増殖能が大きく低下した。報告によると、*S. pneumoniae* と *S. mutans* では FabT の機能が正反対である。*S. pneumoniae* では *fabK* の転写を抑制することにより、不飽和脂肪酸の割合を増加させている。これに対し、*S. mutans* では *fabM* の転写を抑制することで、不飽和脂肪酸の割合を減少させている。本菌 *S. pyogenes* では高病原株の *fabT* 欠損株の解析の結果、*fabK* の mRNA 量が増加していた。そして、不飽和脂肪酸を培地に添加することで、増殖能が回復した。これらのことから、*S. pyogenes* の *fabT* の機能は *S. pneumoniae*-type であると推測された (APMIS. 2016 May;124(5):414-24)。



(2) 全ゲノム配列決定の副産物として、新型株では強毒株、弱毒株に関係なく *mefA* を含むファージ領域を保持していることを発見した。既報によると *mefA* はマクロライド系抗生物質の排出ポンプとして機能し、*S. pneumoniae* にマクロライド耐性を付与する責任遺伝子であるとされている。しかし、我々の解析の結果、*mefA* を欠損させてもマクロライド耐性に大きな変化はなく、*mefA* 直後に存在する *msrD* が新型株のマクロライド耐性により大きな貢献を果たしていることが明らかになった (Microbiology. 2016 Jan;162(1):46-52, Microb Drug Resist. 2018 Oct;24(8):1089-1097)。



(3) 上記の次世代シーケンサ (Ion torrent 社) を用いて実施したゲノム解析は不完全 (一本の環状 DNA としてつながっていない) な状態であった。そこで、上記 (1) の実験で使用した新型株 10-85 を再度 Pac-Bio を用いてシーケンスし直した (Accession No. AP019548)。その結果、200kb 付近に位置する “region A” と 1600kbp 付近に位置する “region B” の位置が SF370 株や A20 株と比較した時入れ替わっていることが判明した (Microbiol Resour Announc. 2019 Jun 13;8(24). pii: e00453-19、Microbiol Immunol. 2019 Oct;63(10):413-426)。

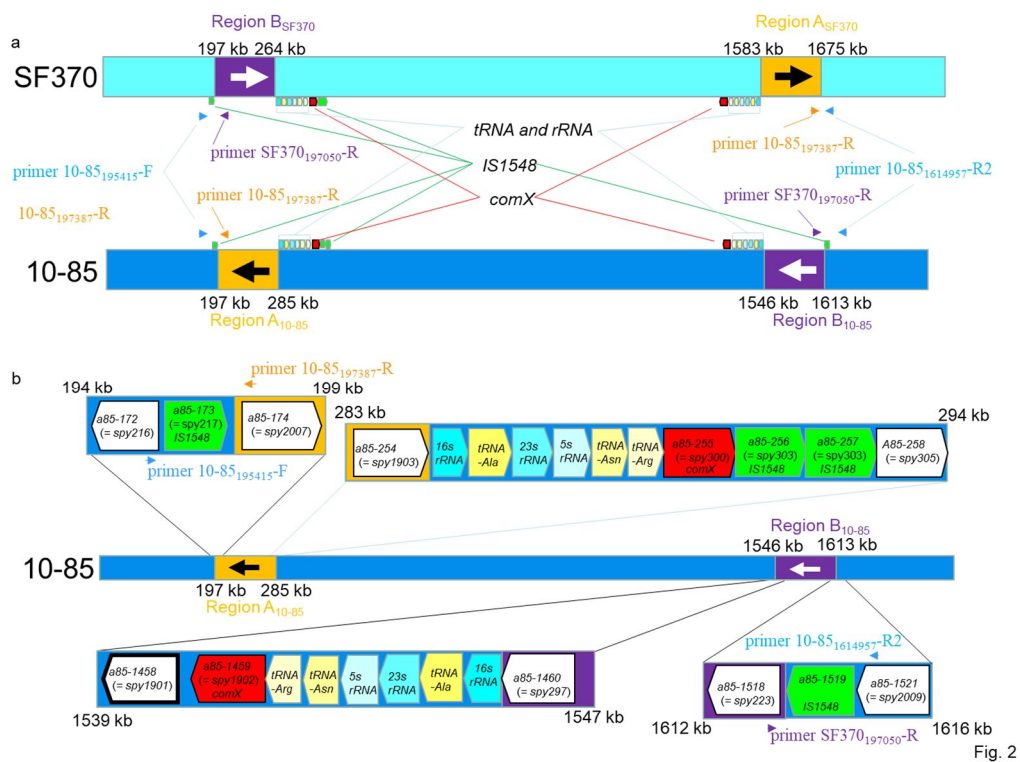


Fig. 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsumoto Takahiro, Kikojima Rika, Fukuoka Tomomi, Tatsuno Ichiro, Hasegawa Tadao	4. 巻 11
2. 論文標題 Total Internal Reflection of Deep-Ultraviolet Light in a Water Waveguide and Its Application to Water Disinfection Technologies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 294 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/w11020294	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 -

1. 著者名 Matsumoto Takahiro, Tatsuno Ichiro, Hasegawa Tadao	4. 巻 11
2. 論文標題 Instantaneous Water Purification by Deep Ultraviolet Light in Water Waveguide: Escherichia Coli Bacteria Disinfection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 968 ~ 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3390/w11050968	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 -

1. 著者名 Tatsuno Ichiro, Isaka Masanori, Matsumoto Masakado, Nishio Naomi, Matsui Hideyuki, Hasegawa Tadao	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of emm1 Streptococcus pyogenes 10-85, a Strain Isolated from a Patient with Streptococcal Toxic Shock Syndrome in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00453-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00453-19	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 -

1. 著者名 Tatsuno Ichiro, Isaka Masanori, Matsumoto Masakado, Hasegawa Tadao	4. 巻 63
2. 論文標題 Prevalence of emm1 Streptococcus pyogenes having a novel type of genomic composition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 413 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12739	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 Hasegawa T, Matsumoto M, Hata N, Yano H, Isaka M, Tatsuno I.	4. 巻 127
2. 論文標題 Homologous role of CovRS two-component regulatory system in NAD <sup>+</sup> -glycohydrolase activity in <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> as in <i>Streptococcus pyogenes</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 APMIS	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apm.12914	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 -

1. 著者名 Tatsuno I, Isaka M, Masuno K, Hata N, Matsumoto M, Hasegawa T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Functional Predominance of <i>msr(D)</i> , Which Is More Effective as <i>mef(A)</i> -Associated Than <i>mef(E)</i> -Associated, Over <i>mef(A)/mef(E)</i> in Macrolide Resistance in <i>Streptococcus pyogenes</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microb Drug Resist.	6. 最初と最後の頁 1089-1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2017.0277	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 Nishio Naomi, Hasegawa Tadao, Tatsuno Ichiro, Isaka Masanori, Isobe Ken-ichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Female GADD34 mice develop age-related inflammation and hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 2593 ~ 2601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13080	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 Hasegawa Tadao, Hata Nanako, Matsui Hideyuki, Isaka Masanori, Tatsuno Ichiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Characterisation of clinically isolated <i>Streptococcus pyogenes</i> from balanoposthitis patients, with special emphasis on <i>emm89</i> isolates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 511 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.000460	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 Kawada-Matsuo M, Tatsuno I, Aarii K, Zendo T, Oogai Y, Noguchi K, Hasegawa T, Sonomoto K, Komatsuzawa H.	4. 巻 82
2. 論文標題 Two-Component Systems Involved in Susceptibility to Nisin A in <i>Streptococcus pyogenes</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 5930-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01897-16	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 -

1. 著者名 Isaka M, Tatsuno I, Maeyama JI, Matsui H, Zhang Y, Hasegawa T.	4. 巻 124
2. 論文標題 The YvqE two-component system controls biofilm formation and acid production in <i>Streptococcus pyogenes</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 APMIS	6. 最初と最後の頁 574-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apm.12538.	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 Tatsuno I, Okada R, Matsumoto M, Hata N, Matsui H, Zhang Y, Isaka M, Hasegawa T.	4. 巻 124
2. 論文標題 Relevance of spontaneous fabT mutations to a streptococcal toxic shock syndrome to non-streptococcal toxic shock syndrome transition in the novel-type <i>Streptococcus pyogenes</i> isolates that lost a salRK.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 APMIS	6. 最初と最後の頁 414-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apm.12521	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 Matsumoto M, Yamada K, Suzuki M, Adachi H, Kobayashi S, Yamashita T, Minagawa H, Tatsuno I, Hasegawa T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Description of the Pathogenic Features of <i>Streptococcus pyogenes</i> Isolates from Invasive and Non-Invasive Diseases in Aichi, Japan.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 338-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2015.334	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 -



1. 著者名 Zhang Y, Tatsuno I, Okada R, Hata N, Matsumoto M, Isaka M, Isoke K, Hasegawa T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Predominant role of msr(D) over mef(A) in macrolide resistance in Streptococcus pyogenes.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 microbiology	6. 最初と最後の頁 46-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.000206	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tatsuno Ichiro, Masanori Isaka, masakado Matsumoto, Tadao Hasegawa
2. 発表標題 Prevalence of emm1 Streptococcus pyogenes having a nobel type of genomic composition
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会 名古屋
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuno Ichiro, Masanori Isaka, masakado Matsumoto, Tadao Hasegawa
2. 発表標題 Prevalence of emm1 Streptococcus pyogenes having a nobel type of genomic composition
3. 学会等名 第56回 日本細菌学会中部支部総会 名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Isaka, Tatsuno Ichiro, Junichi Maeyama, Tadao Hasegawa
2. 発表標題 SPY1588, two component sensor ptein of Streptococcus pyogenes, senses proton and is phosphorylated
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会 札幌
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立野一郎、松本昌門、松井秀之、井坂雅徳、長谷川忠男
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会 福岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井坂雅徳、立野一郎、前山順一、長谷川忠男
2. 発表標題 Two component sensor system SPY1588 regulates biofilm production and promotes transcription of mga gene
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 立野一郎、松本昌門、松井秀之、井坂雅徳、長谷川忠男
2. 発表標題 Characterization of spontaneous fabT mutations in the novel-type Streptococcus pyogenes isolates
3. 学会等名 第89回日本細菌学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松尾美樹、立野一郎、長谷川忠男、小松澤均
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第89回日本細菌学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 張顔、立野一郎、松本昌門、井坂雅徳、長谷川忠男
2. 発表標題 Predominant role of msr (D) over mef (A) in macroride-resistance in Streptococcus pyogenes
3. 学会等名 第89回日本細菌学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長谷川忠男、立野一郎、井坂雅徳
2. 発表標題 A群レンサ球菌におけるマクロライド系抗生物質耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回東海乳酸菌研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 立野一郎
2. 発表標題 A群レンサ球菌に関する研究
3. 学会等名 第52回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2015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	長谷川 忠男  (Hasegawa Tadao)  (10314014)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

