

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580348

研究課題名 (和文) 豚レンサ球菌ゲノムの網羅的比較による新規病原マーカー遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Genome-wide screening for the virulence markers of *Streptococcus suis*

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・教授

研究者番号：70355163

研究成果の概要 (和文)：本研究では、遺伝的に異なる2つの強毒株集団から選んだ *S. suis* 株のゲノム DNA に対して、弱毒株集団に属する株のゲノム DNA を用いて遺伝子サブトラクション法 (遺伝子の引き算) を行い、強毒株にのみ存在する 23 遺伝子を選抜した。1 回相同組換えによる遺伝子破壊変異株を作製し、明らかにマウスに対する病原性が低下した変異株 1 株を見つけたが、その 2 回相同組換え変異株の病原性は親株と同じだった。

研究成果の概要 (英文)：Genomic DNAs of two *S. suis* virulent strains belonging two genetically different clones were subtracted by a genomic DNA of an avirulent strain. Twenty-three genes selected were found to exist in only virulent strains. These genes were knocked out via single-cross over, and one of the mutants showed remarkable loss of virulence. However, virulence of the knock out mutant via double-cross over was the same as its parent stain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：獣医細菌学、分子遺伝学、レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) 感染症は若齢豚を中心に敗血症、髄膜炎、心内膜炎等を起こす疾病である。本病は世界中の養豚国で発生しており、また、人にも髄膜炎など重篤な症状を起こすことが報告されているが、従来は散発的な発生に留まっていた。しかし、近年養豚が盛んなアジア諸国で人への集団発生が続発し、人獣共通感染症としての本病の重要性が世界的に注目されてきている。すなわち、1998 年には中国江蘇省で豚 8 万頭に及ぶ本病の発生があり、その際 25

名の患者が発生し、うち 14 名は死亡した。また、2005 年には中国四川省で 215 名の患者発生に対して 39 名が死亡し世界を震撼させた。タイやベトナムなどのアジア諸国においても豚あるいは豚肉等を原因とする人の集団発生と死亡例が報告されている。日本でも誌上に報告されていないものも含め少なくとも 9 名の患者 (うち 2 名は死亡) が確認されているが、現在のところ人の集団発生は日本以外のアジア諸国が中心である。しかし問題は、これらの発生がいずれも世界的に共通な系統の品種の豚に由来するもので、同じ

保菌豚は我が国にも輸入されていることである。実際、日本においても40~60%の豚が *S. suis* を扁桃に保菌している。豚レンサ球菌は、保菌している豚あるいはその生肉や内臓肉を介して人へ感染すると考えられ、本病の予防策は農場および食肉検査所で強毒株を摘発し清浄化を進めることである。従って、本菌感染症による被害の軽減と食の安全を確保するためには強毒株と常在する弱毒株を簡便に見分ける技術の開発が不可欠である。

(2) *S. suis* には、病原関連マーカーとして muramidase released protein (MRP), extracellular factor (EF)、溶血毒素スリジン(SLY)などが報告されている。しかしながら、これらマーカー分子の遺伝子はヨーロッパで分離される強毒株では保有率が高い傾向にあるが、北米で分離される強毒株の多くはこれらの因子を保有していない。従って、これら古典的な病原関連マーカー分子あるいはその遺伝子は、強毒株識別のためのマーカーとしては利用することができず、これまでのところ強毒株を簡便に見分ける適切な遺伝子マーカーは確立していない。このような株間における遺伝的多様性は、*S. suis* が様々な外来遺伝子を他の菌からゲノム上に取り込んでいることが一因であると考えられている。中でも、ゲノム上の同じ部位に病原性とは関係ない機能不明な、菌株ごとに異なる8種類の外来遺伝子が存在する例は、株間における遺伝的多様性の著しさを象徴している。従って、由来の異なる2株だけの *S. suis* ゲノムを網羅的に比較し、両者の間の保有遺伝子の差異を見出すことができて、多くはこのような意味のない外来遺伝子である可能性が高い。すなわち、強毒株と弱毒株のゲノムを遺伝子サブトラクション法(2つの遺伝子群の引き算を行う方法)などによって比較しても、病原性とは関係ない多くの機能不明な外来遺伝子に埋もれてしまい、目的の病原マーカー遺伝子を同定することは極めて難しいと予想される。

(3) 一方、近年開発された Multilocus Sequence Typing (MLST)では、どの株にも基本的に存在する house-keeping 遺伝子の配列比較によるため、そのような外来遺伝子の影響は受けにくい。その結果、*S. suis* 株の集団は主に3つの遺伝的にクローナルな集団(ST1 complex, ST27 complex, ST87 complex)から構成されていることが明らかとなってきた。このうち、特に ST1 complex には人や豚に髄膜炎や敗血症など重篤な疾病を引き起こした強毒株が多数含まれており、強毒株の集団と考えられている。さらに我々の最近の研究では、ST27 complex に属

する株も地域によっては死亡例を含む人の *S. suis* 感染症の主要な原因菌となっており、この2つの遺伝集団を見分けることが公衆衛生上特に重要と思われた(13)。しかし、MLSTによる株の型別には時間と費用がかかり、さらに高価な機器が必要なため、現場での *S. suis* 強毒株識別手法としては適切でなく、これらの遺伝集団に属する強毒株を簡便に検出できる有用なマーカー遺伝子の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究課題では、*S. suis* には強毒株の多い2つの主要な遺伝集団の代表株と弱毒株とのゲノムの網羅的比較をゲノムサブトラクション法によりそれぞれ行い、それら2通りの成績を組み合わせて両方の強毒株に共通な遺伝子を探索し、その遺伝子と病原性との関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝的に異なる2つの強毒株集団 ST1 complex および ST27 complex に属する強毒株として、英国 Sanger Institute および米国 TIGR においてゲノム配列決定が進行中だった P1/7 株 (ST1 complex) および 89-1591 株 (ST27 complex) の2株と、これらと対比する健康豚由来の弱毒株 (使用する株については、マウスに対する病原性を検証してから選定した) のゲノム DNA を用いて、市販の遺伝子サブトラクションキットを利用して、2株の強毒株に特有の遺伝子を集めたサブトラクトライブラリーを作製した。次に、サブトラクトライブラリーを構築したベクタープラスミドに対するユニバーサルプライマー2つを用いて、ライブラリーのショットガンシーケンスを行った。

(2) これまで収集した由来の異なる様々な *S. suis* 菌株約 100 株のゲノム DNA を抽出し、メンブランヘプロットした後、上記の共通クローンの遺伝子断片をプローブとして、ドットハイブリダイゼーションにより、ST1 complex および ST27 complex の株に共通して存在する遺伝子を特定し、サンガー法によるダイレクトシーケンスで遺伝子の全長配列を決定した。決定した配列は、データベースと照合してアノテーションを行い、その機能を推定した。

(3) 選択した新規病原マーカー遺伝子を double cross-over 法 (または single cross over 法) により欠失させた変異株を作製した。変異株の作製には、当該遺伝子の上流および下流領域の適当な長さの断片を増幅し、PCR を利用して両者を結合させた断片を作製する。これを、温度感受性ノックアウトベクタ

一に連結し、*S. suis*に導入してから薬剤存在下の高温培養と薬剤なしでの低温培養を組み合わせるによりベクター上の断片とゲノム上の遺伝子が入れ代わった変異株を作製し、培養細胞への接着、侵入、あるいはマウスを用いた病原性試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 強毒株集団の代表として、欧州で分離された P1/7 株およびカナダで分離された 89/1591 株を強毒株として、また、弱毒株としては我々が日本の健康豚から分離した株の中から弱毒と思われるものを数株選び、実際にマウス接種試験によって弱毒性を確認し、適切な株を選択した。これらを用いて、それぞれサブトラクションを行い、クローンを収集した。計画では、同じクローンの重複を想定して各 1000 クローンを収集する予定であったが、作業の効率を考えて、クローンが取れ次第順次塩基配列を決定し、重複するものは排除していったので、それぞれ 200 以上の重複しないクローンが得られたところで収集を終了した。次に、P1/7 株および 89/1591 株が実際にこれらクローンに含まれる遺伝子配列を保有し、弱毒株にはないことを確認するため、これら 200 以上のクローンの遺伝子断片をそれぞれプローブとして、3 株に対してドットプロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、弱毒株には存在せず、2 つの強毒株に共通に存在する異なる遺伝子クローンを 29 クローン確認した。

(2) その塩基配列を決定してアノテーションを行った。連続した共通の遺伝子の上流・下流が別々なクローンとして取れていたり、莢膜抗原 (2 つの強毒株が共通の莢膜抗原を有する)、偽遺伝子、トランスポゾンの遺伝子であったりした結果、それらを除いた 16 遺伝子と、さらに 1 つの強毒株にのみ存在する 7 遺伝子を加えた 23 遺伝子を選抜した。そこで、これらについて、を作製した。選抜した遺伝子数が多いため、single cross-over によって遺伝子ノックアウト変異株を 23 遺伝子すべてについて作製し、それらの変異株について、マウスを用いた感染試験により病原性を検定した。その結果、明らかに病原性が低下したと思われる変異株を 1 株見出した。この変異株での標的遺伝子は、ROK family の調節遺伝子とアノテーションされたが、既報の遺伝子とは相同性が低く、この family の遺伝子と病原性との関連についての報告もなく、新規の病原遺伝子と期待された。しかし、この遺伝子の double cross-over 変異株を作製し、マウスによる病原性検定を行ったところ、親株との差は見いだせなかった。これらの成果のうち、病原性に関連すると思われる遺伝子とその産物の性状について解析した

結果は、それぞれ学術論文及び学会にて公表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Okura, M., Osaki, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Sekizaki, T., and Takamatsu, D. The minor pilin subunit Sgp2 is necessary for assembly of the pilus encoded by the *srtG* cluster of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.*, 193:822-831, 2011. 査読有
- ② Fittipaldi, N., Takamatsu, D., Doínguez-Punaro, M., Lecours, M., Montpetit, D., Osaki, M., Sekizaki, T., and Gottschalk, M. Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis srtF* cluster result in pili formed by the major pilin subunit only. *PLoS ONE*, 5:e8426, 2010. 査読有
- ③ Takamatsu, D., Nishino, H., Ishiji, T., Osaki, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Tharavichitkul, P., Takai, S., and Sekizaki, T. Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.*, 138:132-139, 2009. 査読有
- ④ 関崎 勉 「動物に潜む病原レンサ球菌 *Streptococcus suis* について」 BMSA 会誌 2(1):7-12, 2010. 査読無
- ⑤ 関崎 勉 「豚レンサ球菌の病原因子と強毒株マーカーについて」 日生研たより 56(1):5-12, 2010. 査読無
- ⑥ 関崎 勉 「動物に潜在する病原レンサ球菌について」 宮城県獣医師会会報 62(4):213-217, 2009. 査読無
- ⑦ 関崎 勉 「豚レンサ球菌の多様性と病原性に関する解析」 化学療法領域 25(11):119-126, 2009. 査読無
- ⑧ Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Domínguez-Punaro, M. C., Harel, J., Bui, N. K., Vollmer, W., and Gottschalk, M. Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of 2 *Streptococcus suis*. *Mol. Microbiol.* 70:1120-1135, 2008. 査読有
- ⑨ Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., Domínguez-Punaro, M. C., Von Aulock, S., Draing, C., Marois, C., Kobisch, M., and Gottschalk, M. D-alanylation of the lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 76:3587-3594, 2008. 査読有
- ⑩ Takamatsu, D., Osaki, M., Tharavichitkul, P., Takai, S., and Sekizaki, T. Allelic variation and the prevalence of serum opacity factor

- among *Streptococcus suis* population. *J. Med. Microbiol.* 57: 488-494, 2008. 査読有
- ⑪ Vanier, G., Sekizaki, T., Domínguez-Punaro, M., Esgleas, M., Osaki, M., Takamatsu, D., Segura, M., and Gottschalk, M. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Vet. Microbiol.* 127:417-424, 2008. 査読有
- ⑫ Takamatsu, D., Wongsawan, K., Osaki, M., Nishino, H., Ishiji, T., Tharavichitkul, P., Khantawa, B., Fongcom, A., Takai, S., and Sekizaki, T. *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 14:181-183, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Okura, M., Osaki M., Fittipaldi N., Gottschalk M., Sekizaki T., and Takamatsu, D. Significant Contribution of Minor Pilin Subunit Sgp2 to Efficient Assembly of the Pilus Encoded by *srtG* Cluster of *Streptococcus suis*. US-Japan Co-Operation of Natural Resources, Conference on Animal Hygiene and Infectious Diseases, National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA. 2010.10.5.
- ② Okura, M., Osaki, M., Sekizaki, T., and Takamatsu D. Requirement of the Minor Pilin Subunit Sgp2 for Assembly of the Pilus Encoded by the *srtG* Cluster of *Streptococcus suis*. Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan. 2010.9.7-10.
- ③ Sekizaki, T. Streptococcus infection. Workshop, Infectious Diseases in Animal and Food Safety in East Asia, 9th International Veterinary Immunology Symposium (Tower Hall Funabori, Tokyo) 2010.8.16-20.
- ④ Sekizaki, T. Threat of *Streptococcus suis* infection. International Conference on Food Security During Challenging Times (Universiti Putra Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia) 2010.7.5-7.
- ⑤ 高松大輔, 大西英高, 大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉. 線毛関連遺伝子のプロファイリングによる豚レンサ球菌強毒株の識別. 第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 国立国際医療センター研究所, 東京, 2010.6.25-26.
- ⑥ 大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉, 高松大輔. *srtG* 遺伝子群による *Streptococcus suis* の線毛形成及び線毛組立てに必要なマイナーサブユニット Sgp2 についての解析. 第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 国立国際医療センター研究所, 東京, 2010.6.25-26.

- ⑦ 大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉, 高松大輔. *Streptococcus suis* の *srtG* 遺伝子群の線毛形成に関する解析第 83 回日本細菌学会総会, パシフィコ横浜 (東京大学医科研), 2010.3.27-29.
- ⑧ 大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉, 高松大輔. *Streptococcus suis* の *srtG* 遺伝子群による線毛様構造の発現及びマイナー線毛サブユニット Sgp2 の線毛形成に重要な領域の特定. 第 92 回日本細菌学会関東支部総会, 東京医科歯科大学(東京医科歯科大学医学部), 2009.11.5-6.
- ⑨ 大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉, 高井伸二, 高松大輔. *Streptococcus suis* の線毛関連遺伝子群の分布及び *srtG* 遺伝子群の線毛形成に関する解析. 第 82 回日本細菌学会, 名古屋国際会議場 (名古屋大学医学部), 2009.3.12-14.
- ⑩ 高松大輔, 大崎慎人, 高井伸二, 関崎 勉. *Streptococcus suis* の *ofs* 遺伝子の多様性と人および豚由来株内での遺伝子の分布状況. 第 91 回日本細菌学会関東支部総会, 千葉県「生命の森リゾート」(千葉大学薬学部), 2008.10.23-24.
- ⑪ 大倉正稔, 大崎慎人, 関崎 勉, 高井伸二, 高松大輔. *Streptococcus suis* の線毛関連遺伝子群の分布および *srtG* 遺伝子群の線毛形成に関する解析. 第 91 回日本細菌学会関東支部総会, 千葉県「生命の森リゾート」(千葉大学薬学部), 2008.10.23-24.
- ⑫ 関崎 勉 「Zoonosis としての豚レンサ球菌症」日本細菌学会関東支部会 2008 年第 1 回シンポジウム(国立国際医療センター研究所), 2008.10.17.

[図書] (計 3 件)

- ① 関崎 勉 「第 9 章 動物感染症の制御と畜産物の安全」、 “世界の食料・日本の食料 (シリーズ 21 世紀の農学)”、日本農学会編、p.151-166、養賢堂、2010.
- ② 関崎 勉 「第 2 章 動物由来レンサ球菌の脅威」、 “食の安全科学の展開—食のリスク予測と制御に向けて—”、 『東京大学 食の安全研究センター』 編、 p.20-27、シーエムシー出版、2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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・教授
研究者番号：70355163

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大崎慎人 (OSAKI MAKOTO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・動物衛生研究所・主任研究員
研究者番号：80355164
高松大輔 (TAKAMATSU DAISUKE)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・動物衛生研究所・主任研究員
研究者番号：60414728