

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2011
課題番号：20790345
研究課題名（和文） 劇症型溶連菌感染症臨床分離株で発現が増加している毒素の機能とその発現機構の解明
研究課題名（英文） Study on expression mechanism and function of toxin increasing in streptococcal toxic shock syndrome isolates
研究代表者
池辺 忠義（IKEBE TADAYOSHI）
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：20333362

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）
キーワード：病原性

1. 研究計画の概要

(1) 劇症型溶連菌感染症臨床分離株と咽頭炎患者分離株のゲノムの比較

分子疫学上クローナルである劇症型溶連菌感染症臨床分離株NIH1と咽頭炎患者分離株患者K33のゲノムを比較するため、それぞれのゲノムDNAを抽出し、一塩基多型解析（SNPs解析）を行う。それぞれの株におけるゲノムの塩基配列の違いを見出し、リシーケンスによりゲノム上の塩基配列の違いを決定する。K33株とNIH1株のゲノムで塩基配列の異なった遺伝子を選択し、これらの遺伝子の塩基配列を、*csrS*遺伝子に変異が起こっていない劇症型溶連菌感染症分離株4株と咽頭炎患者分離株4株で決定し、比較する。劇症型溶連菌感染症臨床分離株に特異的に変異の見られる遺伝子（A遺伝子）を選択する。

このA遺伝子が、特定の毒素タンパク質の分泌量の増加に影響を与えているか調べるため、劇症型溶連菌感染症臨床分離株に咽頭炎患者分離株由来の *intact* のA遺伝子を導入した株、および、咽頭炎患者分離株のゲノム上に存在するA遺伝子を変異させた株を作製し、分泌タンパク質を抽出し、毒素タンパク質の分泌量を調べる。劇症型溶連菌感染症臨床分離株に *intact* のA遺伝子を導入することにより、分泌タンパク質の泳動パターンが咽頭炎患者分離株のパターンと同じになり、咽頭炎患者分離株のA遺伝子を変異させることにより、分泌タンパク質の泳動パターンが劇症型溶連菌感染症臨床分離株のパターンと同じになることを確認する。

(2) *in vivo*におけるA遺伝子の変異の影響

A遺伝子の変異が、*in vivo*で病原性に影響を与えるか調べるため、マウスをもちいた動物

実験を行う。マウスに対する致死性、各臓器の病理組織を調べる。

(3) A遺伝子変異における病原性遺伝子の発現の影響

劇症型溶連菌感染症臨床分離株、咽頭炎患者分離株、劇症型溶連菌感染症臨床分離株に *intact* のA遺伝子を導入した相補株、咽頭炎患者分離株のA遺伝子変異株のRNAを抽出し、RT-PCRを行う。咽頭炎患者分離株の発現量より劇症型溶連菌感染症臨床分離株、および咽頭炎患者分離株のA遺伝子変異株の発現量が高く、*intact* のA遺伝子を劇症型溶連菌感染症臨床分離株に導入した相補株でその発現量の上昇が打ち消させるものを選択し、これらの遺伝子をA遺伝子により制御されている遺伝子群として同定する。

(4) 劇症型溶連菌感染症に関与する病原性遺伝子の探索

劇症型溶連菌感染症に関与する病原性遺伝子を探索するため、A遺伝子あるいは、*csrR/csrS*遺伝子に変異の見られる株に特異的に発現の上昇がみられる毒素遺伝子を同定する。これらのタンパク質について、遺伝子破壊株を作製する。作製した破壊株を用いて、マウスを用いた動物実験、あるいは、さまざまな細胞を用いた感染実験を行い、病原性遺伝子の同定、およびその機能を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) 劇症型溶連菌感染症臨床分離株と咽頭炎患者分離株のゲノムの比較

分子疫学上クローナルである劇症型溶連菌感染症臨床分離株 NIH1 と咽頭炎患者分離株患者 K33 のゲノムを比較するため、それぞれのゲノム DNA を抽出し、一塩基多型解析

(SNPs 解析)を行った。それぞれの株におけるゲノムの塩基配列の違いを見出した後、リシーケンスによりゲノム上の塩基配列の違いを決定した結果、劇症型溶連菌感染症臨床分離株において、共通して転写因子をコードする *rgg* 遺伝子に変異が起きていることが判明した。劇症型溶連菌感染症臨床分離株に *intact* の *rgg* 遺伝子を導入すると、分泌タンパク質の泳動パターンが咽頭炎患者分離株のパターンと同じになり、咽頭炎患者分離株の *rgg* 遺伝子を変異させると、分泌タンパク質の泳動パターンが劇症型溶連菌感染症臨床分離株のパターンと同じになったことから、この *rgg* 遺伝子の変異が、病原性電子の分泌パターンを変える原因遺伝子であることが明らかとなった。

(2) *in vivo*における*rgg*遺伝子の変異の影響

劇症型溶連菌感染症臨床分離株 (NIH34)、咽頭炎患者分離株(K33)をもとに、劇症型溶連菌感染症臨床分離株に *intact* の *rgg* 遺伝子を導入した相補株(NIH34*rgg*+)、咽頭炎患者分離株の *rgg* 遺伝子を破壊した株(K33*rgg*)を作成した。これらの株についてマウスに対する生存曲線を調べた。その結果、*rgg* 遺伝子に変異のある株(NIH34, K33*rgg*)は、変異のない株(K33, NIH34*rgg*+)に比べて致死率が高いことが判明した。また、それぞれの菌を腹腔内に接種し、1 日後の腎臓を摘出し、ホルマリン固定後、HE 染色により、それぞれの臓器の病理像を観察した結果、*rgg* 遺伝子に変異がある株(NIH34, K33*rgg*)を接種したマウスで菌の集積がみられ、その周りに細胞の壊死がみられた。それぞれの菌を皮下接種した後、マウスの腫脹の大きさを経時的に測定した結果、*rgg* 遺伝子に変異がある株(NIH34, K33*rgg*)を接種したマウスのほうが、変異のない株に比べ、腫脹が広がり、病巣が広範囲に広がっていることが判明した。劇症型感染症では、好中球の浸潤がみられないことが臨床的にみられる。そこで、好中球に対する影響を調べた結果、*rgg* 遺伝子の変異株において、好中球の殺傷能の増加がみられた。このことから、*rgg* 遺伝子の変異は、マウスを用いた動物実験においても、劇症型感染症に重要な役割をしていることが示唆された。

(3)*rgg*遺伝子変異における病原性遺伝子の発現の影響

この *rgg* 遺伝子の変異によって、どのような病原性遺伝子の発現が上昇するか調べるため、*rgg* 遺伝子に変異のある株(NIH34, K33*rgg*)、変異のない株(K33, NIH34*rgg*+)から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、*rgg* 遺伝子に変異がある株において、細胞障害毒素をコードする *slo*、*nga* 遺伝子、ストレプトキナーゼをコードする *ska* 遺伝子、コラーゲン様タンパクをコードする *sclA* や *sclB* 遺伝子遺伝子の発現が上昇していた。一方、

csrS 遺伝子変異株で上昇していた IL-8 プロテアーゼをコードする *scpC* 遺伝子は、*rgg* 遺伝子の変異にかかわらず発現の上昇は見られなかった。このことは、マウスへ菌を接種したときみられた腎臓の病理像の結果と一致するものであった。また、*csrS* 変異株同様、*rgg* 変異株においても、溶血毒素をコードする *sagA* 遺伝子やシステインプロテアーゼをコードする *speB* 遺伝子の発現量が、減少していた。

3. 現在までの達成度

①当初の計画通りに進展している。

(理由)

劇症型溶連菌感染症臨床分離株において、共通して転写因子をコードする *rgg* 遺伝子に変異が起きていることを見出し、この変異により様々な病原性遺伝子の発現が上昇され、マウスに対する病原性が上昇することを解明したから。

4. 今後の研究の推進方策

rgg および *csrS/csrR* 遺伝子変異株に共通して遺伝子発現が上昇する病原性因子に注目し、これらの病原性因子が、マウスの致死性にどれだけ寄与しているか調べるとともに、これらの病原性因子がどのように劇症型溶連菌感染症に関与するかを調べる。まず、遺伝子発現が上昇していた病原性因子をコードする遺伝子の破壊株を作製する。作製した変異株をマウスに接種し、マウスに対する致死性の変化を調べる。それぞれのマウスから臓器を採取し、病理組織を解析する。それぞれの病原性因子が、どのような影響を与えているかを調べ、作用機序を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

- ① Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog* 6, e1000832, 2010, 査読有
- ② Ikebe T, Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, The Working Group for β -hemolytic Streptococci in Japan. Surveillance of severe invasive group G streptococcal infections during 2002–2008 in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63, 372-375, 2010, 査読有
- ③ 池辺忠義, 阿戸学, 小林和夫, 渡辺治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序—菌の免疫回避機構と菌の特性—. *感染症学雑誌*, 83, 485-489, 2009, 査読有

- ④ Ato M, Ikebe T, Kawabata H, Takemori T, Watanabe H. Incompetence of neutrophils to invasive group A *streptococcus* is attributed to induction of plural virulence factors by dysfunction of a regulator. PLoS ONE 3, e3455, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 池辺忠義、阿戸学、松村隆之、長谷川秀樹、小黒祐子、嶋智子、奥野ルミ、大屋日登美、勝川千尋、富永潔、緒方喜久代、佐多徹太郎、小林和夫、大西真、渡邊治雄。劇症型溶レン菌感染症臨床分離株で高頻度で見られる負の転写制御因子の変異。第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 42 回レンサ球菌感染症研究会合同学会、東京、2010 年 6 月 25-26 日
- ② 池辺忠義、緒方喜久代、奥野ルミ、嶋智子、大屋日登美、渡邊治雄。日本における劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の *emm* 遺伝子型と *csrS* 遺伝子の変異頻度。第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月 27-29 日。
- ③ 池辺忠義。劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる病原因子の解明。第 21 回日本臨床微生物学会総会、東京、2010 年 1 月 30-31 日。
- ④ 阿戸 学、松村隆之、池辺忠義、渡邊治雄、小林和夫。劇症型溶血性レンサ球菌感染症における遺伝子発現調節因子の変異と好中球傷害。第 8 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2010 年 2 月 11-13 日。
- ⑤ 池辺忠義、阿戸学、川端寛樹、小林和夫、渡邊治雄。劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株における *csrS* 変異の解析。第 82 回日本細菌学会総会、愛知、2009 年 3 月 12-14 日。
- ⑥ Ikebe, T., Ato, M., Kobayashi, K., Watanabe, H. Impairment of global regulatory network of *Streptococcus pyogenes* virulence genes provokes neutrophil incompetence and subsequent streptococcal toxic shock-like syndrome. Forum of the network of research centers on infectious diseases. Hanoi. 2008.

[図書] (計 0 件)

[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]