

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21590503

研究課題名（和文） レンサ球菌のスーパー抗原の起源に関する研究

研究課題名（英文） Evolutionary path of streptococcal and staphylococcal superantigens

研究代表者

秋山 徹（AKIYAMA TORU）

独立行政法人・国立国際医療研究センター（研究所）・室長

研究者番号：20246466

研究成果の概要（和文）：レンサ球菌やブドウ球菌(SA)の病原性に寄与するスーパー抗原(SAG)の分子進化過程は明らかになっていない。本研究ではレンサ球菌のうち G 群レンサ球菌(GGS)の全ゲノム配列を世界で初めて解明し、同菌が A 群レンサ球菌(GAS)と高度類縁菌であることを明らかにした。この類縁性を元にした GGS と GAS のゲノムワイドのシンテニー比較解析、および SA のシンテニー解析で、レンサ球菌の SAG の直系子孫が SPEG および SMEZ であること、および SA の祖先 SAG の直系子孫が SELW および SSL であることを強く示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Molecular evolution path of bacterial superantigen (SAG), which contribute the virulence of Streptococcus and Staphylococcus aureus (SA) remains to be elucidated. In the present study, whole genome sequence of group G streptococcus (GGS) was determined for the first time. It was found that GGS is closet relative of GAS in the bacteria ever sequenced. Based on synteny analysis of GGS and GAS, as well as SA, it is strongly suggested that SPEG and SMEZ are the direct descendant of common ancestor of streptococcal SAG while SELW and SSL are the direct descendant of common ancestor of staphylococcal SAG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：レンサ球菌、スーパー抗原、ゲノム、進化

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌やレンサ球菌などの細菌はス

スーパー抗原(SAG)と呼ばれる強力なT細胞活性化因子を産生する。これらの因子は毒素性ショック症候群、新生児発疹症、猩紅熱の原因として知られ、また致死性の高い劇症型レンサ球菌感染症への関与も示唆されている。SAGによるT細胞活性化では、通常の抗原とは異なり、T細胞の抗原認識特異性の枠を超え、T細胞抗原受容体の β 鎖可変領域(V β)に対して特異的な結合を行うことで、通常の抗原では起こりえない大量のT細胞の活性化を誘導する。活性化された大量のT細胞から放出されるサイトカインなどの因子や活性化されたT細胞自体による作用などによる免疫系の混乱が、SAGを原因とする疾患の本体と考えられている。

現在では、ゲノム解析技術の進歩により、SAGと考えられる遺伝子は100個以上知られている。また一つの菌株ゲノムに複数のSAG遺伝子が存在していることは、SAGの興味深い特徴である。このような機能の類似した因子が一つの菌株に複数存在することとなった機構は、SAG遺伝子を包含したファージやプラスミド、挿入配列といった移動性エレメントによるSAGの菌株間での水平伝播の繰り返しとそれに伴う変異の蓄積、であると考えられている。一方、これらの起源となったSAGの始祖遺伝子がどのような形で存在していたのかについてはほとんど明らかになっていない。筆者等はこれまでレンサ球菌由来のSAGの解析を行っており、SDMおよびSPEGGと名付けた新規SAGの精製・クローン化やT細胞活性化能について検討を行ってきた(業績3, 5, 7)。一方、これまでに実施されたGAS12菌株のゲノム解析で、GASの有するSAGのほとんどが染色体中の溶原化ファージにコードされているのに対し、例外的にSPEGというSAGが可動性エレメント以外の染色体上にコードされていることが明らかとなってい

る(右図)。筆者はレンサ球菌のうち血清型G群に属する菌株(GGS)のゲノム解析を実施している。GGSは近年、高齢者を中心に死亡率が30~50%におよぶ劇症型感染症の起原菌としての分離頻度が増加しており、その臨床的重要性が認識されつつある。筆者等はGGSのゲノム解析の過程で、同菌がGASとゲノムレベルで64%の相同性を示し、GASと同様、SPEGを可動性エレメント以外の染色体上に保有するという予備的な結果を得ている。またほとんどのGGS菌株はGASとは異なりSAG遺伝子としてSPEGのみを保有している。これらの知見および結果は、1)SPEGが菌種の壁を越えて存在し、2)両菌種においてSPEGが可動性エレメント以外の染色体上に存在することから、SPEGがレンサ球菌のSAGの始祖遺伝子の直系の子孫である可能性を示唆する。

2. 研究の目的

病原性細菌である黄色ブドウ球菌やA群レンサ球菌(GAS)などはスーパー抗原(SAG)と呼ばれる種々の疾患の要因となっている強力なT細胞活性化因子を産生する。SAGはこれまでに50種類以上が知られており、それぞれの分子は相同性を示す。このようなSAG分子の多様性はファージなどの移動性エレメントによるSAG分子の菌株間水平伝播とそれに伴う変異の蓄積により獲得されたと考えられるが、その起源、すなわち始祖遺伝子の存在様式についてはまったく明らかになっていない。これまでにGASの13菌株のゲノム解析の知見から、GASの保有するSAGであるSPEGおよびSMEZが移動性エレメント以外の染色体上にコードされていることが明らかとなっている。一方、筆者はレンサ球菌のうちLancefield血清型でG群に属する菌株(GGS)のゲノム解析を実施しており、その過程で、同菌がGASとゲノムレベルで64%の相同性を示し、GASと同様、SPEGを移動性エレ

メント以外の染色体上に保有するという予備的な結果を得ている。これらの知見は SPEG、そして場合によっては SMEZ もレンサ球菌の SAG の始祖遺伝子の直系の子孫である可能性を示唆する。そこで、本研究では 10 株程度の GGS のゲノムの SPEG 部分と SMEZ 部分を詳細に解析することで、この仮説を検証し、SAG の分子進化の起源を明らかにする。

3. 研究の方法

SPEG が GGS および GAS の始祖 SAG 遺伝子の直系の子孫であるかどうかを明らかにするため、両菌の SPEG およびその近傍遺伝子の構成をゲノム解析の結果を元に比較する。GGS と GAS の SPEG 近傍のほぼファージのサイズに相当する 50kb を比較した予備的解析で、両菌株の SPEG 付近の遺伝子構成が高度に保存されており、また両菌の SPEG とも可動性エレメント内に存在しないことが明らかとなっている。その一方、GGS の約 50%の菌株は SPEG を欠落していることが明らかになっているが、この場合でも SPEG の欠落を除いて、SPEG 近傍の構造は GAS との間で保存されているという実験結果を得ている。このようなゲノム構造の高度保存性が GAS および GGS に一般化できるかどうかを検証するため、GGS 株についてはさらに 10 菌株程度で SPEG を含む前後 50kb 程度までの塩基配列解析を行う。また GGS と GAS の SPEG 周辺の遺伝子の発現解析を行い、遺伝子としての機能性を確認することで、ゲノム構造が保存されている意義を検証する。

4. 研究成果

筆者らはレンサ球菌のうち Lancefield 血清型で G 群に属する菌株(GGS)の全ゲノム配列を世界で初めて解明し、同菌が GAS と高度類縁菌であることを明らかにしている。この類縁性を元にした GGS と GAS のゲノムワイドのシntenニー比較解析、および SA の *in silico*

でのシntenニー解析で、レンサ球菌の祖先 SAG の直系子孫が SPEG および SMEZ であること、および SA の祖先 SAG の直系子孫が SELW および SSL であることを強く示唆する結果を得た。アミノ酸の同義変異と非同義変異の頻度解析でもこれらの SAG は正の選択圧を受けており、染色体上の一定位置に保持されるのに同選択圧が寄与していると考えられた。また Bayes 法を利用した事後確率に基づく系統樹解析で、SA 由来の SAG がレンサ球菌に移動し、分子進化を遂げることで、現在の SAG 多様性が獲得されてきたことも明らかとなった。

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 3 件)

1. Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a Strain That Shows an Unusual Growth Profile and Is Representative of an Endemic Cluster in Japan. Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T. *J Bacteriol.* 2012 194(11):3014. (doi: 10.1128/JB.00437-12)

2. Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T. *J Bacteriol.* 2011 193(15):4029-30. (doi: 10.1128/JB.05151-11)

3. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. *BMC Genomics.* 2011

12:17. (doi:10.1186/1471-2164-12-17)

[学会発表] (計 6 件)

1. Complete Genome Sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Strain RE378. 村山そう明, 秋山徹, 下村有美, 切替照雄, 岡田圭祐, 生方公子. 第 83 回日本細菌学会. 横浜, 3 月, 2009..
2. Experimental model of SDSE infection in CD46 transgenic mice. 岡田圭祐, 松井英則, 吉田春乃, 村山そう明, 高橋哲史, 中村正彦, 秋山徹, 切替照雄, 内山竹彦, 生方公子. 第 83 回日本細菌学会. 横浜, 3 月, 2009.
3. ゲノム解析からみた *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の病原性. 秋山徹. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 / 第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10 月, 2009.
4. レンサ球菌に存在するスーパー抗原の起源に関する解析. 奥村香世, 下村有美, 村山そう明, 八木淳二, 生方公子, 切替照雄, 秋山徹. 第 83 回日本細菌学会. 横浜, 3 月, 2009.
5. 下村有美, 奥村香世, 村山そう明, 八木淳二, 生方公子, 切替照雄, 秋山徹. 黄色ブドウ球菌・溶連菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124 株の全ゲノム配列の決定. 第 82 回日本細菌学会. 横浜, 3 月, 2009.
6. Origin of Streptococcal Superantigens Based on Mass Genome Comparison among *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Miyoshi-Akiyama T, K. Okumural, Y. Shimomural, S. Murayama, J. Yagi, K. Ubukata, T. Kirikae. American Society of Microbiology, 109th General Meeting, Philadelphia, USA. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 徹 (AKIYAMA TORU)

独立行政法人・国立国際医療研究センター
(研究所)・室長

研究者番号：20246466

(2) 研究分担者

切替 照雄 (KIRIKAE TERUO)

独立行政法人・国立国際医療研究センター
(研究所)・部長

研究者番号：50291963