

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780310

研究課題名（和文）豚レンサ球菌莢膜関連遺伝子群の網羅的解析及び遺伝学的血清型別法の開発

研究課題名（英文）Genetic analysis of the *cps* gene clusters in *Streptococcus suis* and development of a novel genetic typing method that contributes to serotyping

研究代表者

大倉 正稔（OKURA MASATOSHI）

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・細菌・寄生虫研究領域・研究員

研究者番号：60508315

研究成果の概要（和文）：豚レンサ球菌は豚やヒトに重篤な疾病を引き起こす重要な人獣共通感染症起因菌であり、莢膜多糖の抗原性の違いにより30以上の多様な血清型に分類されている。本研究では現在、血清型別に使用されている全35血清型参照株の莢膜多糖合成に関わる遺伝子群〔Capsular polysaccharide synthesis (*cps*) gene cluster〕について比較・解析を行った。その結果、本菌の血清型は「*cps* gene cluster の交換による大規模な変異」及び「*cps* gene cluster 内の少数の遺伝子の塩基配列置換や欠失・挿入などによる小規模な変異」の両方により多様性を創造していることが示唆された。さらに、解析により明らかとなった、複数血清型共通遺伝子及び血清型特異的遺伝子を利用し、2回のマルチプレックスPCRにより分離株の血清型を推定する型別法を開発した。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus suis* is an important bacterium which can cause severe disease in pigs and humans. *S. suis* strains are classified into more than 30 serotypes on the basis of the antigenicity of their capsular polysaccharides (CPs). In this study, we analyzed the complete set of *S. suis cps* gene clusters. Our data implied the possibility of the transfer of the entire or partial *cps* gene clusters among *S. suis* strains, as well as the influence of spontaneous mutations in a single or a few genes on the antigenicity of some serotypes. Accumulation of these gene transfers and small-scale mutations may have generated the antigenic diversity of *S. suis* CPs. In addition, by targeting the genes conserved in several serotypes and the serotype-specific genes identified in our analysis, we have developed multiplex PCR-based *cps*-typing method composed of 2 steps that contributes to the serotyping of *S. suis*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：人獣共通感染症・獣医細菌学・レンサ球菌・血清型別

1. 研究開始当初の背景

豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) は豚に髄膜炎や敗血症、心内膜炎等を引き起こすため、養豚産業において多大な経済的損失を与えている。本菌は人にも感染し、重篤な場合、死に至る。人への感染は豚や豚

肉との接触に起因しており、その感染事例は世界各地で起こっているものの散発的であった。しかし、近年、アジア諸国で人の集団発生が続発し、死亡例も増加しており、人獣共通感染症起因菌として本菌の重要性が国内外で注目されている。

本菌は菌体表層を覆う多糖体である莢膜の抗原性の違いにより、35の血清型が現在までに知られている。病豚からは様々な血清型が分離されるが、2型が最も多く、人患者由来株もほとんどが2型である。そのため、2型株に対する豚用ワクチンが開発され、市販されているが、このワクチンには他の血清型株に対する防御効果は期待できないという欠点がある。すなわち、ワクチンの普及・使用状況によっては、ワクチン抗体を回避できる新たな血清型株の出現を含めた2型以外の株が今後台頭する事も十分考えられる。したがって、病豚や人患者で分離される現在の流行血清型を把握する事は非常に重要であり、検査現場での血清型別は必要不可欠である。しかし、市販の研究用型別抗血清は高価なため、現状では検査現場での血清型別実施は困難である。

一方、一部の菌種では抗原決定遺伝子の配列を基に血清型間の遺伝学的な解析が行われている。同じレンサ球菌属で *S. suis* と同様に莢膜多糖の抗原性で血清型別が行われている肺炎レンサ球菌では、全90血清型株の莢膜合成関連遺伝子領域 (*Capsular polysaccharide synthesis locus*) が同定されており、この領域はゲノム上の決まった位置に存在する事が明らかになっている。*S. suis* に関しても、血清型2型株については既に全ゲノム配列が複数株で決定されており、*cps locus* も同定されている。また、ごく限られた血清型(1型、7型、及び9型)についても各 *cps locus* の一部が同定されているが、*S. suis* の *cps locus* についての遺伝的な情報は限られており、各血清型が分化・出現したメカニズムについては全くの謎であった。そこで、我々が独自に決定した1型、14型及び1/2型株の全ゲノムドラフト配列と既知の2型株の配列を比較・解析したところ、本菌の *cps locus* も肺炎レンサ球菌のように配列は血清型により異なり、ゲノム上の特定位置に存在する事が示唆された。

2. 研究の目的

本菌における血清型の変異獲得メカニズムを解明し、検査現場で利用できる型別法を開発することは、学術的にも実用的にもきわめて価値のある成果となるだけでなく、今後流行する可能性のある血清型を予想して、細菌が「対応」する前に先回りして、本菌感染症を制御する事にもつながると期待される。

そこで、本研究課題では、全35血清型参照株の莢膜合成関連遺伝子群を網羅的に解析し、血清型が35型に多様・分化した遺伝的背景を明らかにすると同時に、その

情報から検査現場で利用可能な遺伝学的血清型別法も開発することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 全血清型の *cps locus* の塩基配列決定及び比較・解析

4血清型の参照株の全ゲノム配列を比較・解析する事で明らかにした *cps locus* の上流及び下流の保存領域の塩基配列を基に、全血清型株の *cps locus* 全長をPCRにより増幅し、その塩基配列を決定した。PCRによる増幅ができなかった血清型については全ゲノムドラフト配列を決定し、その配列より抽出した。そして、各 *cps locus* の遺伝子構成や血清型間の相同性を詳細に解析し、*cps locus* 間が多様化・分化した遺伝的背景を調べた。

(2) 血清型別用PCR法の開発

cps locus 間の比較・解析により明らかとなった各血清型株特異的遺伝子や複数の血清型株間で共通する遺伝子の配列を基にPCR法による型別法を開発した。続いて、200株以上の野外株を用い、本法の信頼性・実用性を検証した。

4. 研究成果

(1) 全血清型の *cps gene cluster* の配列決定及び、比較解析

研究開始後、海外の研究グループにより15血清型の *cps gene cluster* の配列が明らかとなったので、本研究では、残り20血清型の *cps gene cluster* 配列を決定した。これらの配列情報についてはDNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession no. AB737816-AB737838)。全35血清型の *cps gene cluster* から見出された全遺伝子産物について相同性に基づくクラスタリング解析を行った。全672の *cps* 遺伝子産物は291のhomology group (HG) に分類され、このうち4つのHGに属する遺伝子産物は全血清型で、78については複数血清型間で保存されていることが明らかになった。一方、残りの209については血清型特異的な産物であった。この全291のHGの保有の有無に基づくデンドログラムを作製した結果、図1のようになった。さらに、デンドログラムに基づきblastによる相同性解析を実施したところ、図1のように *cps gene cluster* の上流側の4遺伝子が全血清型で保存されており、下流側についても非常に相同性が高い血清型間があることが明らかになった。すなわち、*cps gene cluster* の一部あるいは全体の交換が起こっていることが示唆された。

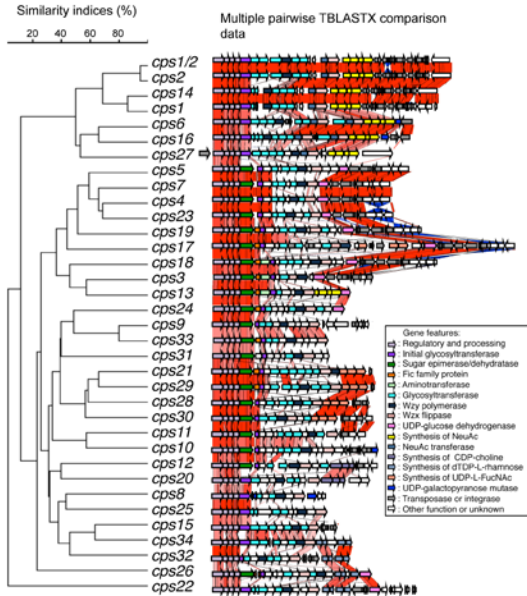


図 1. 全 291HG の有無に基づく全血清型 *cps* gene cluster のデンドログラム

実際、*cps* gene cluster が他とは異なる位置に存在する血清型も認められた（血清型 27 型など；図 2）。

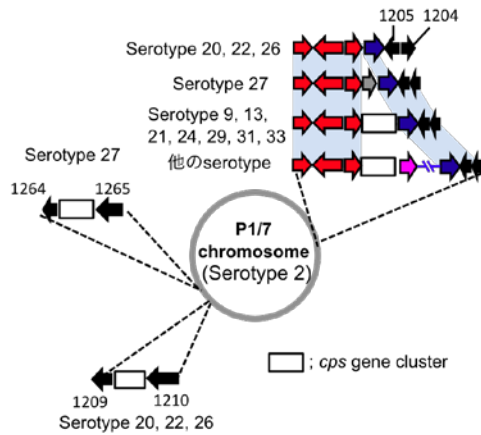


図 2. 各血清型参照株における *cps* gene cluster の位置

また、1 型と 14 型及び 2 型と 1/2 型については *cps* gene cluster の配列はほぼ一致していた。しかし、1 型や 1/2 型は一部の遺伝子に塩基の欠失や挿入、置換によりフレームシフト変異やナンセンス変異が起きていることが明らかになった(図 3)。

A. *cps1* と *cps14* gene cluster

B. *cps2* と *cps1/2* gene cluster

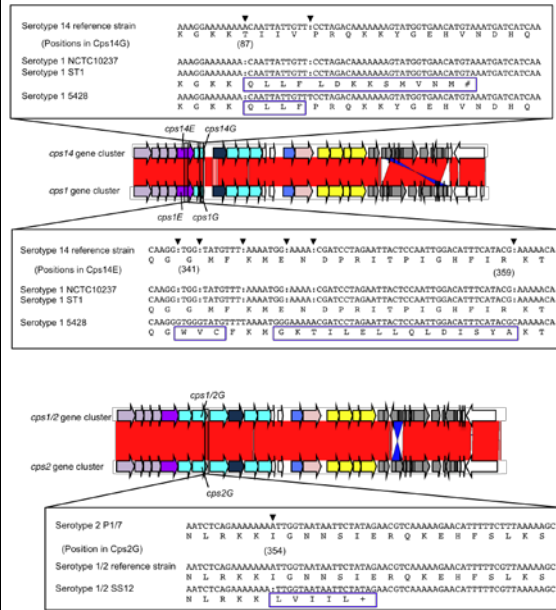


図 3. *cps1* 及び *cps14* gene cluster 間 (A) と *cps2* 及び *cps1/2* gene cluster 間 (B) で認められた塩基置換

以上から、*cps* gene cluster の交換のような大規模な変異や少数の遺伝子の塩基配列レベルの小規模な変異が、血清型の多様化に寄与していることが示唆された。

(2) 遺伝学的血清型別法の開発

上記クラスタリング解析により明らかになった複数血清型共通遺伝子及び血清型特異的遺伝子を利用し、i) 複数血清型共通遺伝子を標的とした Grouping-PCR の後 ii) 血清型特異的遺伝子を標的とした Typing-PCR を実施し、供試株の血清型を推定する 2 ステップの Multiplex-PCR 法を開発した (図 4)。

Step 1 Grouping-PCR

Group 共通遺伝子を標的とした PCR → Group I-VIII に分類

Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI	Group VII
Serotype 3	Serotype 1	Serotype 21	Serotype 4	Serotype 8	Serotype 9	Serotype 31
Serotype 13	Serotype 2	Serotype 28	Serotype 5	Serotype 15	Serotype 10	Serotype 32
Serotype 18	Serotype 1/2	Serotype 29	Serotype 7	Serotype 20	Serotype 11	Serotype 34
	Serotype 6	Serotype 30	Serotype 17	Serotype 22	Serotype 12	Untypable
	Serotype 14		Serotype 19	Serotype 25	Serotype 24	
	Serotype 16		Serotype 23		Serotype 26	
	Serotype 27				Serotype 33	

Step 2 Typing-PCR

型特異的遺伝子を標的とした PCR

→ Group 内のいずれであるかを型別 (型別不能の場合もある)

・1 型と 14 型及び 2 型と 1/2 型は識別できない

図 4. Multiplex-PCR based *cps* typing 法

200 株以上の野外株について本法を実施した結果、血清型が決まっている株で、異なる型に推定された株は認められなかった。

以上から、本法が血清型別に資する有用な型別法として、今後利用されることが期待さ

れる。

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 1 件)

(1) Masatoshi Okura, Daisuke Takamatsu, Fumito Maruyama, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa, Makoto Osaki, Tsutomu Sekizaki, Marcelo Gottschalk, Yumi Kumagai and Shigeyuki Hamada. Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*: Potential Mechanisms for Generation of Capsular Variation. Applied and Environmental Microbiology (査読有), Vol. 79, p. 2796-2806. 2013.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大倉正稔「アジアを中心に広がりをもせる人獣共通感染症・豚レンサ球菌感染症」宮崎大学・IR 推進機構セミナー「食の安全を脅かす病原体そのコントロールを目指して」(招待講演)、2013 年 04 月 24 日、宮崎大学農学部(宮崎)
- ② 大倉正稔、高松大輔、丸山史人、野澤孝志、中川一路、大崎慎人、関崎勉、浜田茂幸「*Streptococcus suis* 全血清型の莢膜関連遺伝子群の解析第 86 回日本細菌学会総会」2013 年 03 月 18 日～2013 年 03 月 20 日、幕張メッセ(千葉)
- ③ 大倉正稔、大崎慎人、関崎 勉、高松大輔「*Streptococcus suis* 血清型 1 型、2 型、1/2 型及び 14 型の莢膜合成遺伝子領域の比較解析」第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 29 日、長崎ブリックホール(長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉正敏 (OKURA MASATOSHI)

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・細菌・寄生虫研究領域・研究員

研究者番号：60508315