

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390109

研究課題名(和文) 次世代シーケンサを用いたレンサ球菌の自発的変異誘発による高病原性獲得機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of acquisition mechanism of hyper virulence by spontaneous mutation mechanism of group A streptococcus using next generation sequencers.

研究代表者

秋山 徹 (Miyoshi-Akiyama, Tohru)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：20246466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌の宿主内変異誘発に寄与する可能性のある10因子を個別破壊した変異株を調製した。マウス投与によるin vivoでの変異誘発実験では、sdn1やcsn1をノックアウトすると、covSでの変異発生率が大きく低下した。SDSE感染後の菌側の遺伝子発現変化をSDSEの全遺伝子を対象とした網羅解析により実施した。その結果、SDSEはin vivoでは、溶血毒素などの病原性遺伝子、そして宿主由来の糖類を分解する酵素系とそれらを利用する酵素系の発現を上昇させていることが明らかとなった。臨床分離株の解析では、日本人から高頻度に分離される遺伝子型であるst6297型で、溶血毒素活性が有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：Ten genes related to in vivo spontaneous mutation of group A streptococcus were deleted individually, and the mutants were tested for in vivo mutation spectral by using a mouse infection model. Deletion sdn1 or csn1 resulted in reduction of covS mutation rate. After inoculation in mouse, gene expression profile of SDSE was analyzed comprehensively. The results showed that expression of virulence factors such as hemolysins, and enzymes degrading sugars were elevated. SDSE clinical isolates harboring st6297-type emm gene, which is prevalent type in Japanese patients, produced significantly higher amount of hemolysins in comparison with isolates harboring other types of the emm genes.

研究分野：細菌学・感染症学

キーワード：次世代シーケンサー レンサ球菌 マウスモデル 自発的変異

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌 (GAS) は非常に重篤な症状を示す劇症型レンサ球菌感染症 (STSS) から比較的良性的咽頭炎まで非常に多彩な感染症の原因となる細菌である。特に STSS の致死率は高く、予後も不良であるため精力的な研究が行われているが、その発症・重篤化機構は完全には明らかになっていない。また近年では筆者等が実施してきた厚生労働省研究班の疫学調査により、GAS 以外の血清型のレンサ球菌、例えば G 群や C 群の血清型のレンサ球菌 (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, (SDSE)) による劇症型感染症を始めとする侵襲性疾患が増加していることが明らかになっている。これらの侵襲性疾患は高齢者や糖尿病などの基礎疾患を有する患者が特に高リスクであることが明らかとなっており、これからの日本社会を考えるとそれらの対策は重要である。また筆者等は世界に先駆けて SDSE の全ゲノム配列を明らかにし、SDSE が GAS と非常に近縁であることを明らかにしている。

GAS による STSS などの侵襲性疾患の研究上の障害の一つは、レンサ球菌が有する病原因子が非常に多岐に渡り、それぞれの因子が細菌感染の基盤的プロセスである定着・侵入・病態発症、の各段階で順次それらの機能を発揮することで感染病態が成立することである。このことはレンサ球菌病原性の全容を特定の病原因子のみの解析では明らかにできないことを意味する。しかしながら、近年の解析で GAS が有する 2 成分制御系の一つである *csrRS* がレンサ球菌の全遺伝子の少なくとも 15% の発現を負の制御因子であることが明らかにされ、筆者等や他の研究者により、*csrRS* 系の破壊で、複数の病原因子の発現が同時に増加し、その結果、GAS 病原性を 1 万倍以上増強することが明らかになっている。さらに、STSS 症例から分離された GAS の解析、および GAS 球菌感染のマウスモデルを用いた研究で、

GAS は宿主感染時に *csrRS* 遺伝子を積極的に破壊することで、病原性を高めていることが明らかにされた (Nature, 2009, 461(7263):546-9)。筆者等が行った全ゲノム解析により、*csrRS* システムは GGS でも高度に保存されており、GAS と同様、GGS でも *csrRS* システムは病原因子発現を制御し、宿主感染時のその破壊が病原性上昇に寄与する可能性がある。以上のように、レンサ球菌は宿主感染に際して自身の遺伝子を破壊するというユニークな様式で感染性を高めていると考えられる。このような変異の機構として、レンサ球菌では *mutL-mutS* 系の破壊による変異効率の増加の可能性が示唆されている (J Bacteriol. 2008, 190(19):6290-301)。また前述の *csrRS* 破壊プロセスには、レンサ球菌ゲノム上の溶原化ファージ部分にコードされる DNase の一種が寄与し、その破壊で変異効率が低下することが報告されている (Nature, 2009, 461(7263):546-9)。しかしながら、誘発される変異の詳細は明らかにされておらず、このような遺伝子破壊が *csrRS* 以外の遺伝子にも及ぶのか、もしそうであれば他の破壊される遺伝子が病原性にどのように影響しているのか、またどのような前述の因子がどのような機構で遺伝子を破壊するのかは明らかになっていない。

GAS による STSS などの侵襲性疾患の研究上の障害の一つは、レンサ球菌が有する病原因子が非常に多岐に渡り、それぞれの因子が細菌感染の基盤的プロセスである定着・侵入・病態発症、の各段階で順次それらの機能を発揮することで感染病態が成立することである。このことはレンサ球菌病原性の全容を特定の病原因子のみの解析では明らかにできないことを意味する。しかしながら、近年の解析で GAS が有する 2 成分制御系の一つである *csrRS* がレンサ球菌の全遺伝子の少なくとも 15% の発現を負の制御因子であることが明らかにされ、筆者等や他の研究者により、

csrRS 系の破壊で、複数の病原因子の発現が同時に増加し、その結果、GAS 病原性を 1 万倍以上増強することが明らかになっている。さらに、STSS 症例から分離された GAS の解析、および GAS 球菌感染のマウスモデルを用いた研究で、GAS は宿主感染時に *csrRS* 遺伝子を積極的に破壊することで、病原性を高めていることが明らかにされた (Nature. 2009. 461(7263):546-9)。筆者等が行った全ゲノム解析により、*csrRS* システムは GGS でも高度に保存されており、GAS と同様、GGS でも *csrRS* システムは病原因子発現を制御し、宿主感染時のその破壊が病原性上昇に寄与する可能性がある。以上のように、レンサ球菌は宿主感染に際して自身の遺伝子を破壊するというユニークな様式で感染性を高めている。

2. 研究の目的

致命率の高い劇症型感染症 (STSS) の原因菌となる A 群レンサ球菌 (GAS) は、宿主感染時に、自身の保有する多数の病原因子の発現の負の調節因子である CsrRS 系の遺伝子を破壊することで、病原因子の発現を劇的に増加させて高病原性化することが報告されている。しかしながら、この遺伝子破壊の機構や、同破壊システムの前述の調節因子以外の遺伝子への影響は明らかになっていない。SDSE は GAS と同様の STSS の原因菌となる新興病原体であり、筆者等の全ゲノム解析で GAS と最も近縁であることが明らかとなっている。本研究ではマウスモデルに GAS および SDSE の野生型株および遺伝子破壊機構の欠損変異株を感染させて、遺伝子破壊誘発を行った菌株 400 株について、それらの全ゲノム情報を次世代シーケンサにより取得し、変異のプロファイリングを行って、遺伝子破壊の機構とその影響下にある遺伝子の破壊の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

GAS と SDSE の宿主感染時の変異誘発機構とその病原性への寄与を明らかにするため、変異

誘発に寄与すると考えられる DNase と *mutL-mutS* 系の変異株を作製する。変異株および野生株をマウスに接種し、一定期間後に菌を回収する。遺伝子変異の有無を、すでに変異が高頻度で発生することが報告されている *csrRS* 系の変異および自然薬剤耐性獲得頻度を指標に予備的に解析後、少なくとも 400 株について次世代シーケンサにて全ゲノム情報を取得する。大規模遺伝子情報が取り扱い可能な大型コンピューターを用いて、各菌株の変異発生点を特定し、その発生頻度を算定して、野生株と変異株間で比較する。また変異発生点の特性 (蛋白質コード領域であるのかなど) を解析し、病原性との関連について検討する。特定の病原因子などに変異が集約されている場合には、その因子の意義を変異株作製などでさらに解析する。

4. 研究成果

GAS の宿主内変異誘発に寄与する因子の欠損変異株の作製：新たに *csn1* と *int1* を加えて 10 種類の因子を個別に破壊した変異株を調製した。

マウスへの投与による *in vivo* での変異誘発と菌株回収：作出した変異株と野生株をマウス背部に皮下・皮内投与し、1 日と 3 日と 6 日時点で、菌株を回収した。*covRS* の自然誘発破壊頻度は、ムコイド型コロニーの出現頻度で確認した。変異株の *in vivo* 変異のスペクトラムを野生型下部のそれと比較すると、野生型では *covRS* のうち、特に *covS* に高頻度に変異が発生していたが、*sdn1* や *csn1* をノックアウトすると、*covS* での変異発生率が大きく低下した。しかしながら、ほとんどの自然発生変異は、発現制御系因子に存在していた。

in vivo での SDSE 遺伝子発現解析：すでに構築したマウスモデルを利用して、SDSE 感染後の菌側の遺伝子発現変化を SDSE の全遺伝子を網羅する RNA-seq により解析した。その結果、SDSE は *in vivo* では、溶血毒素などの病

原性遺伝子、そして宿主由来の糖類を分解する酵素系とそれらを利用する酵素系の発現を上昇させていることが明らかとなった。これらの因子の一部は2成分制御系として知られる *covRS* により制御されていることを、*covS* のノックアウト変異体を用いて明らかにした。臨床分離株を用いた疫学的解析では、日本人から高頻度に分離される遺伝子型である st6297 型で、溶血毒素活性が有意に高いことを明らかにし、これらの知見をまとめ、論文化した。

これらの解析により、劇症型感染症で、レンサ球菌が病原性を発揮する機構に関する手がかりを得ることができた。特に SDSE の病原性機構に関する知見は、ごくわずかであったが、今回溶血毒素が重要な役割を果たしていることを解明できた意義は大きい。

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 7件)

1. Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *J Vet Med Sci*. 2014 Apr;76(4):491-8. Epub 2013 Dec 10.
2. Takamatsu D, Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Okura M, Kirikae T, Kojima A, Osaki M. Identification of mutations involved in the requirement of potassium for growth of typical *Melissococcus plutonius* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Jun;79(12):3882-6. doi10.1128/AEM.00598-13.
3. Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 carrying Lancefield group C antigen and comparative genomics of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains. *Genome Biol Evol*. 2013;5(9):1644-51. doi10.1093/gbe/evt117
4. Watanabe S, Shimomura Y, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Concomitant regulation of host tissue-destroying virulence factors and carbohydrate metabolism during invasive diseases induced by group g streptococci. *J Infect Dis*. 2013 Nov 1;208(9):1482-93. doi10.1093/infdis/jit353.
5. Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T. Complete genome sequence of *Streptococcus pyogenes* M1 476, isolated from a patient with streptococcal toxic shock syndrome. *J Bacteriol*. 2012 Oct;194(19):5466. doi 10.1128/JB.01265-12.
6. Okumura K, Shimomura Y, Murayama SY, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens. *BMC Genomics*. 2012 Aug 17;13:404. doi 10.1186/1471-2164-13-404.
7. Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a strain that shows an unusual growth profile and is representative of an endemic cluster in Japan. *J Bacteriol*. 2012 Jun;194(11):3014. doi 10.1128/JB.00437-12.

〔学会発表〕(計 5件)

1. 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山 徹. G群レンサ球菌による劇症型感染症発症機構の解明・第7回細菌学若手コロッセウム・2013年8月7日～9日・広島県三原市
2. 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山 徹. マウス感染モデルを用いたG群レンサ球菌の二成分制御因子 CsrRS の解析・第22回Lancefieldレンサ球菌研究会・2013年6月28日～29日・東京
3. Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Transcriptomic profiling of group G streptococci using murine infection model. 113th General Meeting of American Society for Microbiology・2013年5月18日～5月21日、米国・デンプター
4. Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. The transcriptional response of group G streptococci to various stress condition. 114th General Meeting of American Society for Microbiology・2014年5月17日～5月20日、米国・ボストン
5. 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山 徹. Regulatory network analysis of group A streptococci during severe invasive diseases. 第88回日本細菌学会総会・2015年3月27日～29日、岐阜

〔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:

出願年月日:

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

秋山 徹 (Miyoshi-Akiyama Tohru)

国立研究開発法人・国立国際医療研究センター・室長

研究者番号: 20246466

(2)研究分担者

切替照雄 (Kirikae Teruo)

国立研究開発法人・国立国際医療研究センター

研究者番号: 50192563

(3)連携研究者

渡邊真弥 (Watanabe Shinya)

国立研究開発法人・国立国際医療研究センター

研究者番号: 60614956