

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305013

研究課題名(和文) レンサ球菌属のCRISPRスペーサー配列解析による新規流行株予測法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new prediction methods of epidemic strains in Group A Streptococcus by CRISPR typing.

研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, ICHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：タイ保健省に収集されたタイ国内の分離株349株についてMタンパク血清型を決定した。内訳は、タイの各地の保健所57箇所から2010年から分離された菌株234株およびタイ国内における劇症型感染症サーベイランスにより2011年より分離された菌株115株あった。これらの菌株を通報を用いてM型を決定したところ、66種類のM型に分類された。日本や欧米で報告されている菌株とは大きく様相が異なり、日本や欧米で主流とされているM1型はほとんど検出されず、emm44型が12%、emm104型 6.8%などが検出された。また、CRISPRのスペーサー配列の解析により、新規流行株の予測が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Group A streptococcus (GAS) is one of the most widely distributed bacterial pathogens in the world. We examined the emm genotypes of clinical isolates of GAS collected in Thailand during two 5-year periods (1999-2003 and 2007-2011). In total, 339 clinical GAS isolates were obtained: 98 during 1999-2003 and 241 during 2007-2011. The major emm genotypes identified were emm44 (10.9%), emm81 (5.3%), emm104 (5.3%), and emm1-2 (5.0%). The emm44- and emm81-type isolates were consistently predominant in both groups of isolates. The GAS isolates possessed various combinations of superantigen genes, and the three most-frequent superantigen gene profiles (accounted for 32% of isolates) contained no bacteriophage-encoded superantigen genes. Overall, we found that the emm types and superantigen gene distribution of GAS isolates in Thailand have unique patterns that are different from those reported in other countries.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 emmタイピング CRISPR

1. 研究開始当初の背景

本研究では、日本・タイで流行するレンサ球菌感染症の原因菌である A 群レンサ球菌、肺炎球菌、ブタレンサ球菌を対象として、これらの新規流行株のこれまで行われている血清型分類に加え、CRISPR スペーサー領域の遺伝子配列を比較解析することにより、新規の流行を予測する方法を開発することが目的である。そのため、どのような外来性遺伝子が挿入されるかを予測する基盤を創出する本研究は、病態に応じた安全で有効性の高い治療を提供できることから高齢者、患者の長寿命化、QOL の向上を見込むことができる。また、日本・タイにおける流行株の予測は、東アジアだけでなく世界的な流行の予測も可能となる可能性を秘めており、社会的にも重要な研究になると考えられる。

2. 研究の目的

レンサ球菌感染症は、日本では、A 群レンサ球菌で年間患者数が 30 万人程度となり、また、肺炎球菌感染症では、高齢化による肺炎の死亡者数が、全死亡原因の上位となっており、社会的に問題となっている（厚生労働省感染症情報センター、<http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>）。また、ブタレンサ球菌は、世界中の養豚国で発生しており単に食肉産業に影響があるだけでなく、人畜共通感染症として、中国では 2005 年に 215 名の患者中 39 名が死亡する感染も発生している。さらに、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、2012 年度では、例年の 1.6 倍と増加傾向にあるが、その原因はまったく分かっていない。また肺炎球菌では、市中分離株のほとんどが抗生物質耐性を獲得していること、高齢者だけでなく乳幼児の髄膜炎での患者が増加していることから、莢膜抗原に対するワクチンが日本でも接種が勧められている。ところが、2000 年から PCV7 ワクチンが導入された米国では、ワクチン投与後に肺炎球菌が新たな形質を獲得してワクチンが奏功しない株が急速に流布したことがゲノムレベルで解析された結果、現行のワクチンでは不十分であることが示唆されている（Golubchik et al, Nature Genetics 2012）。そのため、新規に流行を予測する方策が模索されている。A 群レンサ球菌感染症では、菌体表層に存在する M タンパクの血清型分類あるいは遺伝子型によって流行を解析されることが多い(M タイピング)。M タイピングは世界的に用いられることから世界的な流行株の経過を過去に遡って解析するこ

とができる。例えば日本で流行する株は、M1/T1 に分類される菌株が最も多く、M4、M12 などがそれに続いて多い。しかし、同じ血清型の菌株間であっても病原性は異なり、特に近年の劇症型感染症の増加はこれだけでは説明ができない。

申請者らは、これまで A 群レンサ球菌やブタレンサ球菌(*S. suis*)などのレンサ球菌属の血清型分類や多株比較ゲノム解析を、タイ保健省に設置された大阪大学タイ拠点やタイ・チュラロンコン大学と共同で行ってきた。その結果、タイで流行する A 群レンサ球菌は、欧米型とアフリカ・オセアニア型の中間型の性質を示すことが明らかとなった。すなわち、日本で流行する欧米型とタイで流行する中間型の菌の双方を解析することで、世界的な流行を予測することが可能になることが考えられる。また、申請者らは、これらのレンサ球菌の外来性遺伝子排除機構である CRISPR に着目し、その解析を行ってきた(Nozawa et al, PLoS One, 2011, Eguchi et al, Appl Environ Microbiol, In press 2012)。その中で、i)外来性遺伝子の伝播は CRISPR を介して制限がかけられていること、ii)CRISPR のスペーサー配列は、直近に受けたファージ感染の履歴が記憶されており M タイピングに関連なくスペーサー配列を比較することで、流行株を分類することができることを報告してきた(図 2)。これらの情報から、日本で流行する菌株の CRISPR スペーサー配列とタイで流行する菌株の配列を比較することで、新たな流行を予測できるのではないかという着想に至った。

そこで、本研究では、日本・タイで流行するレンサ球菌感染症の原因菌である A 群レンサ球菌、肺炎球菌、ブタレンサ球菌を対象として、これらの新規流行株のこれまで行われている血清型分類に加え、CRISPR スペーサー領域の遺伝子配列を比較解析することにより、新規の流行を予測する方法を開発することに目的がある。特に、タイ北西部、タイ北東部は、インドから東南アジアに向けた不法労働者の流入窓口となっており、他の感染症の流入口となっていることが予測される。そのため、申請者らのグループは、タイ保健省およびチュラロンコン大学の協力のもとに、タイ、特に北部山岳地帯で流行するレンサ球菌感染症の原因菌を収集し、血清型などを解析するとともに、

CRISPR スペーサー配列を解析することにより、新規流行株を予測するための技術的基盤を創出する。そのため、研究開始の初年度では、出来る限りの菌株を収集し、スペーサー配列の塩基情報を解析して次年度の予測が可能かどうかの判定を行う。タイでの菌株の収集は、タイ保健省・チュラロンコン大学での解析を可能とするため、現地での解析体制を整え得られるデータ（メタデータ、塩基配列データ）をデータベース化し、使用できる環境を整える。

本研究では、これまで血清型などで行われてきた病原性細菌のタイピングを、外来性遺伝子に対する獲得免疫系として機能する CRISPR のスペーサー情報に基づいて新規の流行予測を行うという極めて独創的な研究である。このスペーサー配列に記憶される情報は、異なる血清型の菌株であっても同時期に存在していれば、同じ配列を取り込んでいる可能性が高いことから、どの時期にどの地点で新しい外来性遺伝子に暴露されたのかを解析することができる。A 群レンサ球菌やブタレンサ球菌では、ファージを介して新しい病原性遺伝子が導入されることで病原性が変化されること、また肺炎球菌では natural competency が高く、比較的容易に外来性遺伝子を取り込むことが古くから知られていることから、どのような遺伝子が挿入されるかを予測する基盤を創出する本研究は、高齢者、患者の長寿命化、QOL の向上を見込むことができる。また、日本・タイにおける流行株の予測は、東アジアだけでなく世界的な流行の予測も可能となる可能性を秘めており、社会的にも重要な研究になる。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下の実験を行う。

- (1) A 群レンサ球菌、肺炎球菌、ブタレンサ球菌の各菌株については、各菌の担当者（A 群レンサ球菌：中川、池辺、岡田と Tanittha Chatsuwana）が、タイでの収集を行う。現地でのサンプリングでは、岡田（大阪大学タイ拠点）および Tanittha Chatsuwana（チュラロンコン大学）にて血液寒天培地、アジ化ナトリウム添加寒天培地（いずれも A 群レンサ球菌の選択培地）を調整し、各地点で滅菌綿球を用いたサンプリングを行う。B 群レンサ球菌については、小川、岡田、Tanittha Chatsuwana が中心となり、

同様に血液寒天培地を現地にて調整し、各地点でのサンプリングを行う。ブタレンサ球菌については、野澤、岡田、Chanarrong Rodkhum が中心となり同様にサンプリングを行う。血液寒天培地状のコロニー形態、溶血斑の性状から、候補菌株をピックアップし、得られた各菌株は、16s rRNA シーケンスによってどの菌株に相当するのかを相同性検索にて確認する。また、現地での寒天培地が困難な場合は、移送用培地に、分離に使用する滅菌綿球を浸して分離後 24 時間以内に寒天培地に播種する。また、日本・タイの各地の保健所で分離された菌株については、タイでは、タイ保健省あるいは、チュラロンコン大学に、日本では国立感染症研究所に集める。

- (2) 各菌株の血清型の確認

A 群レンサ球菌については、アメリカ CDC により報告されている emm typing method (http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/m-proteingene_typing.htm) に準じて、各菌株の M タイプを決定する。肺炎球菌についても同様に PCR 法を用いて血清型を決定する (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>)。ブタレンサ球菌については、申請者らが報告した莢膜抗原関連遺伝子群の塩基配列情報を用いて (Eguchi et al, Appl Environ Microbiol, In press 2012) 解析を行う。(丸山)

- (3) 各菌株の CRISPR 配列決定のための比較ゲノム解析

上記 1) で得られた菌株のうち、各地点で分離され、かつ血清型の異なる菌株についてそれぞれ 10 株を選択し、イルミナ GAIIX にて 101bp paired-end でシーケンスを行う。このシーケンスについては、東京医科歯科大学に設備があるため、タイの分離株は、タイでゲノム DNA の調整、感染研の株は感染研でゲノム DNA に調整した後に、東京医科歯科大学で解析を行う。得られた配列情報から、CRISPR 配列に相当する部分を抽出し、そのスペーサー配列の詳細を、またその前後の塩基配列からスペーサー部分のみを選択的に増幅するプライマーを設計した後に、サンガーシーケンスにて決定する。

- (4) CRISPR 配列の決定による分布構成の比較 (図 4 H, I) CRISPR のスペーサー配列には、これまで各菌が感染を受けた外来性遺伝子情報が記録されている。そのスペーサー配列を、各データベースに照合に、どのような外来性遺伝子

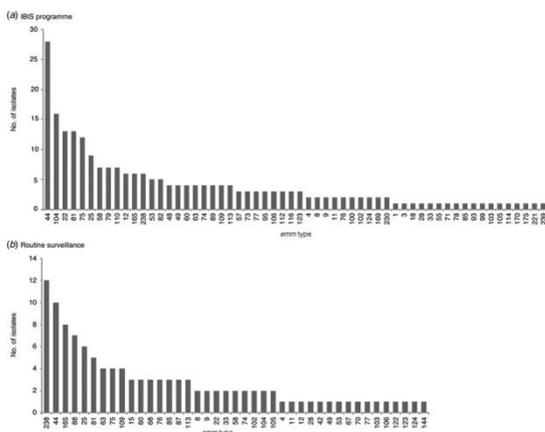
が記憶されているのかについて解析する。CRISPR では、構成される Cas 遺伝子の直下に、最も近年に記憶された配列が挿入されているため、その配列が入っている位置関係、菌株の分離された地理的状況を加味して、どのような菌が、いつ外来性遺伝子の侵入を受けたのかを解析する。

- (5) CRISPR 配列からの新規流行株の予測
平成 26 年に行った収集菌株の CRISPR 解析から、平成 27 年度の流行株の予測を行う。これは、平成 25 年度と 26 年度の分離株を比較した場合に、新規のスペーサーを獲得している株がどの程度拡大しているのかについて、平成 27 年度に分離される株から予測をする。レンサ球菌に感染するファージは血清型で制限されているため、この新規配列を持つ株により新規流行予想が可能になる。

4. 研究成果

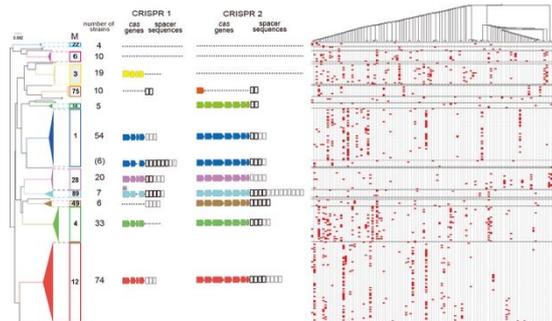
- (1) タイで分離される A 群レンサ球菌の血清型について

タイ保健省に収集されたタイ国内の分離株 349 株について M タンパク血清型を決定した。内訳は、タイの各地の保健所 57 箇所 2010 年から分離された菌株 234 株(血液分離株 230 株、関節膜腔由来 1 株、滑膜由来株 2 株、髄膜由来株 1 株)およびタイ国内における劇症型感染症サーベイランスにより 2011 年より分離された菌株 115 株(膿由来 51 株、血液由来 40 株、咽頭由来株 14 株、尿由来株 3 株、喀痰由来株 2 株、関節膜腔由来 1 株、喉頭由来株 1 株、耳管由来株 1 株、創傷部由来株 1 株および由来不明株 1 株)であった。これらの菌株を通報を用いて M 型を決定したところ、66 種類の M 型に分類された。日本や欧米で報告されている菌株とは大きく様相が異なり、日本や欧米で主流とされている M1 型はほとんど



検出されず、emm44 型が 12%、emm104 型 6.8%などが検出された(図 1)

- (2) CRISPR タイピングによる流行株予測
次に、日本での分離株、タイでの分離株を用いて、CRISPR による分類を行った。A 群レンサ球菌には CRISPR が 2 種類知られて



おり、両方を保持している株、どちらか一方のみを保持している株、CRISPR が存在していない株がある。そこで既存の emm タイピングの結果も合わせて解析を行った(図 2)

A 群レンサ球菌では CRISPR はほぼ全てが、プロファージに対する防御機構として機能していることが明らかとなったが、emm タイピングによる系統樹とファージの分布が非常に似通っていることが明らかとなった。すなわち、emm タイプが同じ菌株では、すでに CRISPR によって感染できるファージが規定されていた。しかし、スペーサー配列の有無を調べることにより、次に感染

図 2 CRISPR タイピングによる系統解析 図左は emm タイピングによる系統樹、図左にはファージの種類とそれに対応する CRISPR のスペーサー配列による分類を示した。

しうるであろうファージが予測できることが明らかとなった。すなわち、emm タイピングと平行してスペーサー配列の配列を取得することにより、その菌に感染できないファージ群を抽出することが可能であることが示唆された。また、CRISPR を持たない菌株では emm のタイプに関わらずプロファージ領域のバリエーションが多く、次に感染するファージを予測することが困難であった。このことから、emm タイピングだけでなく、

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 16 件)以下、代表論文
Nakagawa, I. Streptococcus pyogenes escapes from Autophagy. Cell Host Microbes. 14:604-606, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.chom..2013.11.012

Ito, C, Saito, Y, Nozawa, T., et al. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol. Cell.* 52, 794-804. 2013 (査読有り)
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.024

Haobam, B., Nozawa, T., et al. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. *Cell Microbiol.* 16: 1806-1821, 2014 (査読有り)
DOI: 10.1111/cmi.12329

S. Oda, Nozawa, T., et al. Golgi-resident GTPase Rab30 promotes the biogenesis of pathogen containing autophagosome. *PLoS One.* 11 e0147061, 2016 (査読あり)
DOI: 10.1371/journal.pone.0147061

〔学会発表〕(計 39 件) 以下, 代表発表
中島慎太郎, 今村拓朗, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 細菌感染特異的オートファジーを制御する細胞制御因子の同定と機能解析
第 87 回日本細菌学会総会(2014 年 3 月 26~28 日, 東京)
野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路, Atg5 independent Rab9a dependent target of intracellular group A streptococcus
第 87 回日本細菌学会総会(2014 年 3 月 26~28 日, 東京)

Bijiya Haobam, 野澤孝志, 野澤敦子, 尾田誠一郎, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路
Contribution of recycling endosome in Group A Streptococcus induced autophagosome formation.
第 87 回日本細菌学会総会(2014 年 3 月 26~28 日, 東京)

野澤敦子, 野澤孝志, 相川知宏, 中川一路
Rab35 regulates teh ubiquitin binding

図 1 タイ分離株における emm タイプ

(a)保健所からの分離株 (b)劇症型感染症サーベイランスによる分離株

adaptor protein NDP52 in selective autophagy.
第 88 回日本細菌学会総会(2015 年 3 月 26-28 日, 岐阜)

野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 中川一路
Rab17-mediated recycling endosomes contribute to antibacterial autophagosome formation.

第 88 回日本細菌学会総会(2015 年 3 月 26-28 日, 岐阜)

中島慎太郎, 野澤孝志, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路
細菌感染特異的オートファジーにおけるアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-xL の機能解析
第 89 回日本細菌学会総会(2015 年 3 月 23-25 日, 大阪)

野澤孝志, 野澤敦子, 中川一路
A disrupted PI4P-entiched TGN induced by Group A Streptococcus contributes to xenophagy
第 89 回日本細菌学会総会(2015 年 3 月 23-25 日, 大阪)

〔図書〕(計 2 件)
Nozawa, T, I. Nakagawa
Rab proteins in Autophagy: Streptococcus model (in Autophagy, Infection, and the immune response) 2015, Wiley

Maruyama F, Watanabe T, Nakagawa I.
Strepotoccus pyogenes, Basics Biology to Clinical Manifestation 2015, ASM

〔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)

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
<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織
(1)研究代表者
中川一路 (NAKAGAWA ICHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70294113

(2)研究分担者

丸山史人 (Maruyama Fumito)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 30423122

(3)連携研究者

野澤孝志 (NOZAWA TAKASHI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号： 10598858