



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1623号
学位記番号	第1158号
氏名	増野 功章
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	<p>Simultaneous isolation of emm89-type <i>Streptococcus pyogenes</i> strains with a wild-type or mutated <i>covS</i> gene from a single streptococcal toxic shock syndrome patient (同一の劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者からの野生型 <i>covS</i> と変異型 <i>covS</i> を有する emm89 タイプの A 群溶血性レンサ球菌の同時分離)</p> <p>Journal of Medical Microbiology (2014), 63, 504-507</p>
論文審査担当者	主査： 田中 靖人 副査： 山崎 小百合, 長谷川 忠男

論文内容の要旨

【研究目的】

A 群レンサ球菌は小児の急性咽頭炎の起炎菌であるとともに、劇症型レンサ球菌感染症など多彩な病態を引き起こすことが知られている。劇症型レンサ球菌感染症は、全身性の重篤な病態を引き起こす再興感染症として近年特に問題となっている。この菌の病原性において、病原因子として産生する毒素が重要な役割を果たしている。また、病原因子の発現には、遺伝子発現を制御する機能が重要な役割を果たしている。一般に細菌には二成分制御系という遺伝子発現制御系が存在する。二成分制御系とは外界の環境変化を感知するセンサー蛋白質と、そのセンサー蛋白質のもつ **histidine kinase** 活性によって修飾されるレギュレーター蛋白質からなる。これまで個々の二成分制御系のうちレギュレーター蛋白質の解析は精力的に解析されているが、センサー蛋白質の解析はあまり進んでいない。二成分制御系の一つ **CovR-CovS** のセンサー蛋白質の **CovS** は病原性との関連が強く示唆されてきた。すなわち非劇症株と、劇症型感染症由来株ではアミノ酸の変異が認められるものもあり、これらの変異がある種の DNA 分解酵素、溶血毒素、NAD 分解酵素と言った病原性に深く関与する毒素蛋白質の発現を上昇することが判明していた。しかし、これらの解析は別々の患者から分離された株の解析結果であり、この変異が実際の患者内で起きているか否かの証明がされてこなかった。そこでこの変化が実際の患者で起きているか否かを検証する目的で、同一患者の複数個所から分離された株の解析を行った。

【方法】

1. S 県の S 病院で治療を受けた一人の劇症型レンサ球菌感染症患者の咽頭、喀痰、関節液、髄液、血液から分離された 5 株の A 群レンサ球菌を解析した。
2. これらの 5 株は 0.3% yeast extract 添加 brain-heart-infusion 液にて 37 度静置培養し、菌体、培養上清液を実験に供した。また経時的な増殖を観察した。
3. 菌体をアクロモペプチダーゼ処理後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によりゲノムを抽出した。
4. 抽出したゲノムを鋳型とし、*emm* 遺伝子を PCR により増幅し、シーケンス反応により *emm* 型別を決定した。
5. 七つの housekeeping 遺伝子の配列を決定し比較検討を行う multilocus sequence typing (MLST) 解析を実施した。
6. 培養上清液を用いて、SDS-PAGE、二次元電気泳動により産生する蛋白質の量的、質的検討を行った。
7. *covR-covS* 領域を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。
8. 血液より分離された株に咽頭由来の *covR-covS* 遺伝子を導入し、導入された影響を培養上清中の蛋白質の変化を指標に検討した。

【結果】

1. 5 か所から分離された菌株はすべて A 群レンサ球菌であり、すべてが *emm89* タイプであった。また MLST 解析ではすべての株が 101 (*gki-16*, *gtr-2*, *murI-8*, *mutS-3*, *recP-1*, *xpt-13*, *yqiL-3*) であり、同一の遺伝子型だった。
2. 5 株の増殖曲線を検討したところ、血液、髄液由来株は咽頭、喀痰由来株よりも増殖が明らかに遅いことが判明した。

3. 培養上清中の蛋白質を SDS-PAGE により検討したところ、咽頭、喀痰由来株では SpeB と考えられる顕著なバンドが認められたが、その他 3 株（関節液、髄液、血液由来株）ではそのバンドが消失していた。またその SpeB と思われるバンドは二次元電気泳動により SpeB であることが確認された。
4. 5 株の *covR-covS* 領域の塩基配列を決定したところ、*covR* 遺伝子に差異は見出されなかったが、咽頭株、喀痰株 *covS* 遺伝子の 575 番目の塩基が T であるのに、その他 3 株は G に変化しておりその結果、その部位のアミノ酸がロイシンからアルギニンに変化していることが判明した。
5. 咽頭由来株の *covR-covS* 遺伝子を血液由来株に導入し、培養上清蛋白質の検討を行ったところ、SpeB 蛋白質の発現の回復が確認された。

【考察】

従来の研究において、CovS 蛋白質の変化が重要な病原因子の発現を増強し、劇症型レンサ球菌感染症発症に重要な役割を果たすことは示唆されていた。しかしながら、この変化が実際の人の中で起こっているか否かの実証は存在しなかった。本研究により、この変化が実際の患者内で起きていることが世界で初めて実証された。すなわち無菌部位への侵入に CovS が大きな役割を果たしていることが確認された。従って、咽頭など表在性の部位に感染した A 群レンサ球菌の *covR-covS* 領域の塩基配列が変異することにより、病原性が変化し無菌部位への侵入を可能にし、劇症型レンサ球菌感染症が発生するメカニズムの一つであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【研究目的】A群レンサ球菌は小児の急性咽頭炎の起炎菌であるとともに、再興感染症である劇症型レンサ球菌感染症など多彩な病態を引き起こすことが知られている。この菌の病原性において、病原因子として産生する毒素が重要な役割を果たしている。病原因子の発現には、遺伝子発現を制御する機能が重要な役割を果たし、その中に二成分制御系という遺伝子発現制御系が存在し、その一つCovR-CovSが病原性との関連が強く示唆されてきた。すなわち非劇症株と、劇症型感染症由来株ではアミノ酸の変異が認められるものもあり、これらの変異がある種の毒素蛋白質の発現を変化させることが判明していた。しかしこれらの解析は別々の患者から分離された株の解析結果であり、この変異が実際の患者内で起きているか否かの証明がされてこなかった。そこでこの変化が実際の患者で起きているか否かを検証する目的で、同一患者の複数個所から分離された株の解析を行った。

【方法】S県のS病院で治療を受けた一人の劇症型レンサ球菌感染症患者の咽頭、喀痰、関節液、髄液、血液から分離された5株のA群レンサ球菌を解析した。これらの5株は0.3% yeast extract 添加 brain-heart-infusion 液にて37度静置培養し、経時的な増殖を観察した。菌体より抽出したゲノムを鋳型とし、*emm* 遺伝子をPCRにより増幅し、シーケンス反応により *emm* 型別を決定した。七つの housekeeping 遺伝子の配列を決定し比較検討を行う multilocus sequence typing (MLST) 解析を実施した。培養上清液を用いて、SDS-PAGE、二次元電気泳動により産生する蛋白質の量的、質的検討を行った。*covR-covS* 領域をPCRにより増幅し、塩基配列を決定した。血液より分離された株に咽頭由来の *covR-covS* 遺伝子を導入し、導入された影響を培養上清中の蛋白質の変化を指標に検討した。

【結果】5か所から分離された菌株はすべてA群レンサ球菌であり、すべてが *emm89* タイプであった。またMLST解析ではすべての株が101 (*gki-16, gtr-2, murI-8, mutS-3, recP-1, xpt-13, yqiL-3*) であり、同一の遺伝子型だった。5株の増殖曲線を検討したところ、血液、髄液由来株は咽頭、喀痰由来株よりも増殖が明らかに遅いことが判明した。培養上清中の蛋白質をSDS-PAGEにより検討したところ、咽頭、喀痰由来株ではSpeBと考えられる顕著なバンドが認められたが、その他3株(関節液、髄液、血液由来株)ではそのバンドが消失していた。またそのSpeBと思われるバンドは二次元電気泳動によりSpeBであることが確認された。5株の *covR-covS* 領域の塩基配列を決定したところ、*covR* 遺伝子に差異は見出されなかったが、咽頭株、喀痰株 *covS* 遺伝子の575番目の塩基がTであるのに、その他3株はGに変化しておりその結果、その部位のアミノ酸がロイシンからアルギニンに変化していることが判明した。咽頭由来株の *covR-covS* 遺伝子を血液由来株に導入し、培養上清蛋白質の検討を行ったところ、SpeB蛋白質の発現の回復が確認された。

【考察】従来の研究において、CovS蛋白質の変化が重要な病原因子の発現を増強し、劇症型レンサ球菌感染症発症に重要な役割を果たすことは示唆されていた。しかしながら、この変化が実際の人の中で起きているか否かの実証は存在しなかった。本研究により、この変化が実際の患者内で起きていることが世界で初めて実証された。すなわち無菌部位への侵入にCovSが大きな役割を果たしていることが確認された。従って、咽頭など表在性の部位に感染したA群レンサ球菌の *covR-covS* 領域の塩基配列が変異することにより、病原性が変化し無菌部位への感染が成立し、劇症型レンサ球菌感染症が発生するメカニズムの一つであると考えられる。

【審査の内容】約20分間のプレゼンテーションの後に、第一副査の山崎教授より変異が起こるメカニズムは何か、変異を見出すことにより治療に結びつく可能性はないか、など8項目、主査の田中教授より変異が起こる時間的な問題、変異株と病原性及び増殖部位との関連、など8項目、そして第二副査の長谷川教授からはCREは何か、など2項目の専門領域における質問がなされた。各々の質問に対して学位申請者からは概ね満足の出来る回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると共に専門領域の知識を有すると判断した。本研究は、劇症型レンサ球菌感染症の発生機序における二成分制御系 *covS* の変異が実際の人体で起こりうることを世界で初めて示した論文であり、重要な意義がある。以上より、審査委員会は申請者に対して博士(医学)の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 田中 靖人 副査 山崎 小百合 長谷川 忠男