The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A群レンサ球菌のゲノム構造と遺伝子の多様性の解析
Author(s)	冨安, 祐介
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45194
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【30】

氏　　名	富　安　祐　介（とみ　やす　ゆう　すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１８６０１　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**A 群レンサ球菌のゲノム構造と遺伝子の多様性の解析**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　浜田　茂幸 （副査） 教　授　天野　敦雄　　助教授　新谷　誠康　　講　師　豊澤　　悟

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

A 群レンサ球菌（GAS）は咽頭炎に代表される種々の炎症や猩紅熱の原因菌となるほか、1980 年代後半以降に劇症型の感染症である毒素ショック様症候群（STSS）を起こすことで注目されている。しかしこのような病態の出現が本菌の新規遺伝子の獲得によるものか、あるいはゲノムの構造変化によるものかについては明らかではない。

本研究では、劇症型患者分離株である SSI-1 株の全ゲノム解析を行い、既報の GAS ゲノムと比較検討を行った。さらに由来及び分離年度の異なる GAS を用いて全ゲノム PCR スキャニング及び DNA マイクロアレイを行い、近年の GAS の劇症化について比較ゲノム解析を試みた。

【方法】

1. ゲノム配列の決定

SSI-1 株（M3 型劇症株）のゲノム DNA を用いて物理地図の作製及び、全ゲノムショットガン法による全塩基配列決定を行った。推定機能遺伝子の同定は、Gene Gambler 及び Glimmer を用いて 30 アミノ酸以上の ORF を抽出し、既に J. Ferretti らのグループにより報告されている SF370 株（M1 型皮膚感染由来株）のデータベース及び GenBank との比較により行った。

2. 全ゲノム PCR スキャニングを用いた GAS ゲノムの多様性の比較

GAS SF370 株（M1 型）及び SSI-1 株（M3 型）の全ゲノム情報より選び出した ORF の塩基配列をもとに、約 7－10 kb 毎に全ゲノムを包括する 330 ペア及び 319 ペアのプライマーセットを設計した。次に GAS116 菌株を 1985 年以前に分離された 19 菌株、1990 年以降に STSS の患者より分離された 40 菌株（STSS 株）、1990 年以降に STSS 以外の疾患より分離された 57 菌株（非 STSS 株）に分別してゲノム DNA を抽出し、330 及び 319 領域の PCR を行った。得られた PCR 産物を用いて電気泳動を行いそのバンドのサイズ及び遺伝子領域の有無を確認した。

3. DNA マイクロアレイを用いた各遺伝子の有無の解析

SSI-1 株の全 ORF と SF370 株に特異的な ORF の塩基配列をもとに 100－600 bp の ORF 断片を PCR 法により増幅し、ガラススライド上にスポットして cDNA マイクロアレイを作製した。次に各菌株のゲノム DNA を制限酵素 *Rsa* I で処理した後に蛍光色素 Cy3 で標識し、さらにコントロールとして SSI-1 株を Cy5 で標識した。これら

のプローブ DNA と cDNA マイクロアレイをハイブリダイズ後にアレイスキャナーで蛍光シグナルを検出し、各遺伝子の存在の有無について検討した。

【結果と考察】

SSI-1 株の全ゲノムは 1,894,275 bp より成り、既報の菌株と比較してサイズの差異は微少なものであった。同ゲノムには 1861 個の ORF が存在しその大部分が菌株間で保存されていた。しかしながら SSI-1 株では複製軸に対象に存在する *rrn-con* X 領域及び２つのファージ部位で染色体に大規模なリアレンジメントが生じていることが示された。このようなゲノム構造の大規模な変化は GAS とその類縁属である *S. pneumoniae* 及び *S. agalactiae*（B 群レンサ球菌）との間でも認められ、*Streptococcus* 属が進化の過程で複製軸を対称としたゲノムのリアレンジメントを頻繁に引き起こしていることが示された。

GAS ゲノムに存在する多様性と STSS の発生時期との関連を明らかにするため、1985 年以前と 1990 年以降に分離された菌株について全ゲノム PCR スキャニングによる比較を行った。1985 年以前の分離株のゲノムでは 1990 年以降の分離株と比して明らかに多様性を示した。多様性を示す領域は SSI-1 株におけるファージ遺伝子の挿入領域に集中して観察され、中でもファージ SPs P3 の領域は 1985 年以前の分離株では存在が認められず、同領域が 1985 年以降に GAS のゲノムに取り込まれた可能性が示唆された。また *rrn-comX* 領域でリアレンジメントを生じた頻度について調べると、STSS 株では 85%（34 株/40 株）、非 STSS 株では 59%（34 株/57 株）であるのに対し、1985 年以前の臨床分離株では 31%（6 株/19 株）であった。したがって、リアレンジメント自体は劇症株に特異的なものではないが、ゲノム構造の置換は GAS において 1985 年以降にも生じたことが示唆された。

cDNA マイクロアレイを用いて各遺伝子の分布を調べたところ、1990 年以降の M3 型菌株の遺伝子はほぼ完全に保存されているのに比して、1985 年以前の菌株では 6 菌株中 5 菌株で SPsP3 の領域の遺伝子が存在しなかった。これらの結果は全ゲノム PCR スキャニングの結果と相関があり、従って GAS には 1985 年前後にゲノムのリアレンジメントやファージの挿入といったゲノム構造の変化が生じていることが示唆された。

以上の結果より、GAS ゲノムの多様性にはファージの挿入の有無やゲノムのリアレンジメントが大きく関与し、またこのように獲得された多様性が GAS のビルレンスを亢進させ、STSS の発症に何らかの形で関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、A 群レンサ球菌（GAS）について比較ゲノム解析を試みたものである。毒素ショック様症候群（STSS）に由来する SSI-1 株のゲノムは 1,894,275 bp より成り、既報の GAS ゲノムと類似のサイズを示した。しかしながら、SSI-1 株は非 STSS 由来株に比して、ゲノム構造に大規模なリアレンジメントが生じていること、さらにそのさいファージの挿入が GAS ゲノムのリアレンジメントと多様性の発現に関与していることを明らかにした。以上の結果は、近年の GAS の劇症化について重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。