



Title	遺伝統計学的解析によるemm89型化膿レンサ球菌侵襲性感染症の発症機構の解明
Author(s)	大野, 誠之
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/91844">https://hdl.handle.net/11094/91844</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 大 野 誠 之 )	
論文題名	遺伝統計学的解析による <i>emm89</i> 型化膿レンサ球菌侵襲性感染症の発症機構の解明
論文内容の要旨	
<p><b>【研究目的】</b></p> <p>化膿レンサ球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) は咽頭炎や膿痂疹などの非侵襲性感染症の原因菌である一方で、壊死性筋膜炎やレンサ球菌性毒素性ショック症候群 (STSS) などの致死的な侵襲性感染症を引き起こす。化膿レンサ球菌の分類には、病原因子であるMタンパクをコードする遺伝子の配列に基づく<i>emm</i>分類がなされている。なかでも近年、先進国において<i>emm89</i>型化膿レンサ球菌が侵襲性感染症患者から分離される頻度が高まっている。世界的に侵襲性感染症由来の<i>emm89</i>型株の大部分には、莢膜ヒアルロン酸合成遺伝子群<i>hasABC</i>の欠失と、病原因子NADaseおよびストレプトリジンOの発現増加をもたらす<i>nga-ifs-slo</i>オペロンのプロモーター領域に生じた変異が検出されている。しかし、少なくとも日本において近年分離された非侵襲性感染症由来株でも<i>clade 3</i>に分類される菌株の割合が高く、侵襲性感染症特異的な変異ではないことが示唆されている。本研究では、侵襲性感染症の発症機構の解明を目的として、<i>emm89</i>型化膿レンサ球菌の全ゲノム情報から病態に相関する細菌因子の遺伝統計学的探索を行った。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>国立感染症研究所および全国の公衆衛生研究所等から、日本で2016年から2021年にかけて分離された<i>emm89</i>型化膿レンサ球菌株などの分与を受け、次世代シーケンサーにて全ゲノム情報の解読を行った。さらに、全世界の<i>emm89</i>型化膿レンサ球菌のゲノムデータを収集した。侵襲性感染症由来株420株、非侵襲性感染症由来株246株の合計666株の解析を実施した。パンゲノム解析およびゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study; GWAS) のためのパイプラインを構築し、<i>de novo</i> assembly, Multilocus sequence typing 型の決定、および遺伝子のアノテーションを行ったのちにパンゲノム解析を実施した。コア遺伝子群から一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) を抽出するとともに、全ゲノムにわたって<i>k-mer</i>を抽出した。さらに得られたSNP、遺伝子および<i>k-mer</i>の存在と病態との相関について、GWASを実施した。また、構造遺伝子領域に生じた病態と相関する変異について、タンパク質の機能に及ぼす影響をAlphaFoldを用いたタンパク質の立体構造予測により検討した。さらに、病態と相関する変異を化膿レンサ球菌に導入した変異株を作製し、ヒト血中における生存試験を実施した。</p>	

#### 【結果と考察】

パンゲノム解析の結果、666株の*emm89*型化膿レンサ球菌臨床分離株より合計4,743遺伝子が検出され、うち1,327遺伝子がコア遺伝子であった。コア遺伝子から抽出したSNPをバリエーションとしたGWASにより、90箇所が存在するSNPが侵襲性感染症に有意に相関することが示唆された。病態に相関したシデロフォア輸送パーミターゼをコードする*fhuB*遺伝子およびFe<sup>3+</sup>-フェリクローム複合体結合タンパク質をコードする*fhuD*遺伝子に存在するSNPは、日本で分離された株のみに認められる変異であった。病態に相関する遺伝子をGWASにて探索したところ、プロフェージや可動性遺伝因子に関連する遺伝子群など合計140遺伝子が検出された。また、k-merを用いて病態に相関する変異をGWASにて探索した結果、全ゲノム上における5領域に存在する変異が同定された。特に*fhuB*遺伝子領域において特定された変異はSNPをバリエーションとしたGWASで検出された変異と同一であった。*fhuB*遺伝子のSNPによるFhuBの機能への影響を立体構造予測モデルを作製して検討したところ、SNPにより置換されるアミノ酸残基は膜タンパク質であるFhuBにおいて細胞外に露出し、フェリクローム結合タンパク質FhuDとの相互作用に関与する可能性が示された。そこで、*fhuB*遺伝子におけるSNPを化膿レンサ球菌に導入した点変異株を作製し、健康なヒト血液と混和して生存試験を実施した。その結果、*fhuB*遺伝子点変異株は野生株および復帰変異株と比較して有意に低い生存率を示した。

#### 【結論】

GWASにより探索された病態に相関する細菌因子の一つである*fhuB*遺伝子におけるSNPが、ヒト血中における化膿レンサ球菌の生存を低下させることが示唆された。本研究で用いた遺伝統計学的手法は侵襲性感染症の発症機構の解明に寄与する有効なアプローチであると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 大 野 誠 之 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 川端 重忠
	副 査	教 授 野田 健司
	副 査	准教授 久保庭 雅恵
	副 査	講 師 大嶋 淳
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>化膿レンサ球菌は咽頭炎や膿痂疹などの非侵襲性感染症の原因菌である一方で、壊死性筋膜炎やレンサ球菌性毒素性ショック症候群などの致死的な侵襲性感染症を引き起こす。なかでも近年、先進国において <i>emm89</i> 型化膿レンサ球菌が侵襲性感染症患者から分離される頻度が高まっている。本研究では、侵襲性感染症の発症機構の解明を目的として、<i>emm89</i> 型化膿レンサ球菌の全ゲノム情報から病態に相関する細菌因子の遺伝統計学的探索を行った。</p> <p>日本で分離された <i>emm89</i> 型化膿レンサ球菌 150 株を収集して全ゲノム情報の解読を行ったほか、全世界の <i>emm89</i> 型化膿レンサ球菌のゲノムデータを収集し、侵襲性感染症由来株 420 株、非侵襲性感染症由来株 246 株の合計 666 株のパンゲノム解析およびゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study; GWAS) を行うこととした。病態と相関する遺伝要因を検出するため、パンゲノム解析により算出したコア遺伝子群から一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) を抽出するとともに、全ゲノムにわたって遺伝子および k-mer を抽出し、GWAS を実施した。</p> <p>GWAS の結果、90 箇所が存在する SNP、140 遺伝子の存在および全ゲノム上における 5 領域に存在する変異が侵襲性感染症に相関することが示唆された。病態に相関したフェリクローム輸送パーミアーズをコードする <i>fhuB</i> 遺伝子に存在する SNP は、日本で分離された株のみに認められた。AlphaFold による立体構造予測モデルから、<i>fhuB</i> 遺伝子の SNP により置換されるアミノ酸残基は細胞外に露出する部位に位置し、他の分子との相互作用に関与する可能性が示された。次に、<i>fhuB</i> 遺伝子における SNP を化膿レンサ球菌に導入し、点変異株を作製した。ヒト血液と化膿レンサ球菌を混和して生存試験を実施した結果、<i>fhuB</i> 遺伝子点変異株は野生株および復帰変異株と比較して有意に低い生存率を示した。</p> <p>以上の結果から、GWAS により探索された <i>fhuB</i> 遺伝子における SNP が、ヒト血中における化膿レンサ球菌の生存を低下させることが示唆された。本研究で用いた遺伝統計学的手法は侵襲性感染症の発症機構の解明に寄与する有効なアプローチであると考えられる。</p> <p>よって、博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		