研究成果報告書

1．研究課題名：新興病原菌 *Streptococcus pseudoporcinus* が産生する病原性因子の機能解析

2．研究代表者氏名：田中　愛海

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

成果発表に向けて、現在、学術論文の投稿準備中である。また、学会発表についても準備を進めている。

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

【背景・目的】

β溶血性レンサ球菌（β-hemolytic *Streptococcus*）は、強い溶血活性をもち、ヒトに対する病原性が高い場合が多い。特に、A 群β溶血性レンサ球菌（Group A Streptococci, GAS）や *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*（SDSE）は、世界的に流行した劇症型レンサ球菌感染症の原因菌であり、劇症型症例の死亡率は 30%を超える（Public Health Rep 687-94, 2022）。申請者は、これらの菌を含むβ溶血性レンサ球菌の文献解析を行う中で、2006 年に新菌種として提唱された *S. pseudoporcinus* に関する侵襲性感染症例の報告が増加していることに気が付いた。この中には、死亡例も含まれていたが、本菌の病原性に関する報告はない。そこで、申請者は、本菌のゲノム情報をもとに、既知の病原因子と比較解析を行ったところ、β溶血性レンサ球菌のもつ病原因子と相同性のある因子を複数見出した。

以上のような経緯から、本研究では、新興病原菌 *S. pseudoporcinus* が産生する様々な病原性因子の機能解析を行い、本菌の病原性に寄与する因子を明らかにすることを目的とした。

【研究実施内容】

1．候補病原性因子の抽出

予備解析で抽出した *S. pseudoporcinus* の候補病原性因子について精査し、β溶血性レンサ球菌の中でも特に病原性が高い GAS や SDSE のもつ病原因子との相同性を解析した。

表 1．*S. pseudoporcinus* の候補病原因子

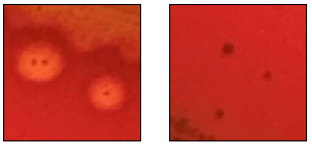
	S. pseudoporcinus locus tag	Homological protein name in GAS	Putative function	Homology (%)	
				GAS	SDSE
Adhesion, immune evasion, tissue invasion factors	NCTC13786_00437	FbpS	Fibronectin-binding protein	**80.6**	**80.0**
	NCTC13786_00961	Lmb	Laminin-binding protein	73.9	**76.1**
	NCTC13786_00254	ScpA/B	C5a peptidase	37.4	34.6
	NCTC13786_01861	Ska	Streptokinase	29.9	31.9
	NCTC13786_00405	SclB	collagen-like protein	35.8	ND
Toxins	NCTC13786_00952	SagA	Streptolysin S (Cytolysin)	**81.5**	**88.9**
	NCTC13786_00963	SpeB	Pyrogenic exotoxin B	**75.2**	ND
Gene regulatory factors	NCTC13786_00776	Mga	Virulent gene activator	31.8	38.1
	NCTC13786_01681	CovR	Virulence associated two-component regulator system	**89.3**	**87.7**
	NCTC13786_01682	CovS		73.0	74.4
	NCTC13786_00962	RopB	SpeB regulator	**81.7**	ND

その結果、GAS や SDSE の代表的な病原因子と高い相同性を示す遺伝子を複数保有していることが明らかとなった（表 1）。これらのうち、本研究では、GAS の病原因子と相同性の高い遺伝子に着目し、機能解析を行うこととした。

2．候補病原性因子欠損株の作成

解析 1 で抽出した *S. pseudoporcinus* の病原性候補因子について、機能を解析するために、表 1 に示した候補因子のうち、GAS のもつ病原因子と 75%以上の相同性を示す因子（*locus 00437*, *00952*, *00962*, *00963*, *01681*）の欠損株を相同組み換え法で作成した（図 1）。作成した欠損株の増殖能を親株と比較したところ、すべての株が親株と同等の増殖能を示した。

図 1．血液寒天培地上での溶血性（左：親株、右：*00952* 欠損株）



3．候補病原性因子の機能解析

解析 2 で作成した候補病原性因子の欠損株を用いて、溶血活性、細胞障害性、細胞侵入性について評価したところ、*00952* 欠損株で溶血性が消失した（図 1）。加えて、細胞障害性および細胞侵入性が有意に低下した。このことから、*locus 00952* は、本菌の病原性に重要な役割をもつことが示された。現在は、*locus 00952* の機能を明らかにするために、その調節因子や他の候補病原性因子との相互作用について検討を行っている。

また、GAS の発赤毒素 SpeB は細胞接着因子やヒト免疫グロブリンを分解することが報告されており（J Biol Chem 13317-24, 2013）、申請者らも以前 SpeB が IgA を分解することを報告した（Microbiol Spectr e0245024, 2025）。そこで、*S. pseudoporcinus* の *speB* 様因子（*locus 00963*）の機能を解析するために、親株および *00963* 欠損株の培養上清を用いてヒト免疫グロブリンの分解能を SDS-PAGE およびウエスタンブロットで評価した。その結果、IgA に対する分解は認められなかったのに対して、IgG の分解が認められた。すなわち、本菌の *locus 00963* についても免疫グロブリンプロテアーゼとして働くことが示唆された。現在は、IgG の分解について、より詳細に解析するために、大腸菌を用いて *locus 00963* 組換えタンパクを作成し、IgG 分解実験やプロテアーゼ阻害剤を用いた検討を行っている。

4．3 次元皮膚組織モデルへの感染実験

β溶血性レンサ球菌は、3 次元皮膚組織モデルを用いた感染実験により、組織障害性を評価できることが示されているため（Sci Rep 16945, 2015）、本モデルを用いて *S. pseudoporcinus* の感染実験を実施した。その結果、感染 24 時間後に、皮膚組織モデルの上皮層に本菌が感染・侵入している様子がヘマトキシリン・エオジン染色像により観察された。上皮層への侵入は、一部の箇所を起点に起きている様子が観察され、宿主細胞への付着や穿孔に寄与するような因子の関与が予測された。そこで、解析 3 で病原性への関与が示された *00952* 欠損株を同様に組織モデルに感染させたところ、組織への侵入は観察されず、*locus 00952* の感染初期の組織侵入への寄与が示唆された。

加えて、感染時の宿主因子の変化について解析を行うために、感染 8 時間後と 24 時間後の組織モデルから総 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を実施した。その結果、感染 8 時間では明らかな宿主因子の変動は認められなかったが、感染 24 時間で炎症性サイトカインなど複数の因子の発現上昇が認められた。現在、解析サンプル数を増やして、より詳細な解析を実施している。

【考察・今後の展望】

本研究では、新興病原菌 *S. pseudoporcinus* の病原性因子に着目した解析を行い、*locus 00952* が溶血活性、細胞障害性、細胞侵入性に関与するとともに、3 次元皮膚組織モデルへの侵入にも関与する可能性が示された。これらの結果から、*locus 00952* は本菌の病原性発現に関与する主要な因子であることが示唆された。

また、*speB* 様因子（*locus 00963*）については、ヒト IgG に対する分解活性が認められ、本菌と宿主免疫との相互作用に関与する可能性が示された。詳細な分子機構や感染成立への寄与についてはさらなる検討が必要である。

今後は、各病原性因子の機能および相互作用の詳細な解析を進めるとともに、感染に伴う宿主応答の解析を継続する予定である。これにより、*S. pseudoporcinus* の病原性に関する理解が深まり、本菌による感染症のリスク評価や病態解明の一助となることが期待される。