

—最近における動物衛生研究情報 (XII)—

線毛関連遺伝子のプロファイリングによる疾病リスク
の高い *Streptococcus suis* 株の識別高松大輔[†] (動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域主任研究員)

1 はじめに

Streptococcus suis は豚レンサ球菌症の主要な原因菌の1つで、豚に髄膜炎、敗血症、心内膜炎などを引き起こす [1]。本菌は養豚産業に経済的被害を与えるだけでなく、人にも感染して髄膜炎や敗血症を引き起こすことがある [1, 2]。特に養豚業や食肉処理業など生きた豚や生の豚肉を扱う職業に就く人は、その他の職業に就く人に比べ感染リスクが高く、豚肉産業に関連した人獣共通感染症としても認識されている [1, 2]。*S. suis* は血清学的にも遺伝学的にも多様な株の集団から構成されているが、全ての株が豚や人にレンサ球菌症を引き起こすわけではない。実際に病原性は株によって異なり、髄膜炎などの侵襲性の高い疾病を引き起こす強毒株からほとんど無毒な株まで様々な株が存在する。また、例えば豚が強毒株を保菌していたとしても発症しないことが多いのも *S. suis* の特徴である。このような健康豚に保菌されている強毒株は他の豚や人への感染源にもなり得る。従って、効果的な *S. suis* 感染症対策を行うためには、多様な病原性を示す *S. suis* 株の中から疾病リスクの高い株を見分け、それらがどのように分布し、伝播しているのかを把握する必要がある。しかし、*S. suis* の病原因子や豚レンサ球菌症の発病機構に関しては不明な点が多く、疾病リスクの高い株を識別する有効な方法は確立されていなかった。

近年、*S. suis* においても Multilocus Sequence Typing (MLST) 法による遺伝子型別が盛んに行われるようになり、遺伝的に近縁な特定の株集団が豚や人に疾病を起こしやすいことが明らかになってきた [3-6]。中でも、ST1 complex 及び ST27 complex と呼ばれる株集団は、家畜衛生・公衆衛生上特に注意を要する集団であり、これらの complex に属する株の分布や動態を調べることが、*S. suis* 感染症対策を考える上で重要である。

しかし、MLST法は時間と費用がかかるため、多検体を解析する方法としては適さない。そこで本稿では、MLSTによる *S. suis* 型別法とそこから得られてきた情報について概要を解説するとともに、各株が属する complex をより迅速・簡便に推測する線毛関連遺伝子プロファイリング法について紹介する。

2 MLSTによる *S. suis* 型別法

MLSTとは、どの株にも基本的に存在するハウスキーピング遺伝子の塩基配列を調べ、それぞれの株の配列パターンを Sequence Type (ST) として番号付けすることにより菌株の遺伝的類縁性を整理・比較する方法である。具体的な手順としては、1) 7種のハウスキーピング遺伝子のPCRでの増幅、2) PCR増幅産物の塩基配列の決定、3) コンピューター上での塩基配列データの整理、4) MLSTデータベース上での結果の判定、の4ステップが必要となる。*S. suis* では、ハウスキーピング遺伝子として *aroA*, *cpn60*, *dpr*, *gki*, *mutS*, *recA*, *thrA* の7遺伝子がMLSTに利用されている。各遺伝子は1塩基でも差異があれば異なる配列として認識され、allele番号を付けて整理されている。従って、7遺伝子の塩基配列を決定することにより、各株は7つのallele番号の並び(プロファイル)でパターン化されることになる。各プロファイルにはそれぞれ1つのST番号が付与されており、例えばある株のプロファイルが1,1,1,1,1,1,1ならST1と型別され、プロファイルが2,30,5,34,31,3,25ならST28と型別されることになる。さらに型別された株のプロファイルを eBURST (<http://eburst.mlst.net>) [7] で解析することにより、各株を遺伝学的に近縁な株の集団 (complex) にグループ分けし、その結果を図示することができる。図1は2010年10月時点で *S. suis* のMLSTデータベース (<http://ssuis.mlst.net>) に登録されていた全データを用いて eBURST によって作製した図である。図上では各STは1つの点として表され、点の大きさが大きくな

[†] 連絡責任者：高松大輔 (動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7754 E-mail : p1013dt@affrc.go.jp

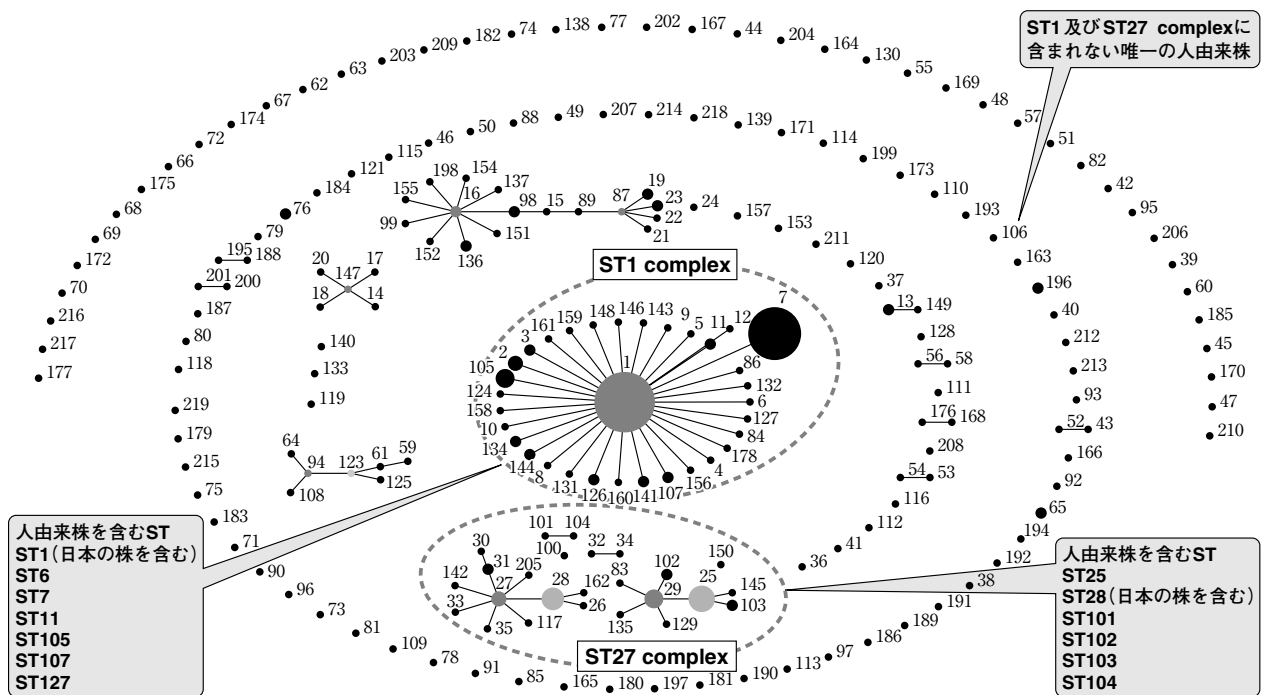


図1 MLST 型別結果に基づく *S. suis* 株の類縁関係

本図ではST1 complexは7つの遺伝子配列のうち6つの配列が一致するSTの集団、ST27 complexは7つのうち5つの配列が一致するSTの集団と定義している。

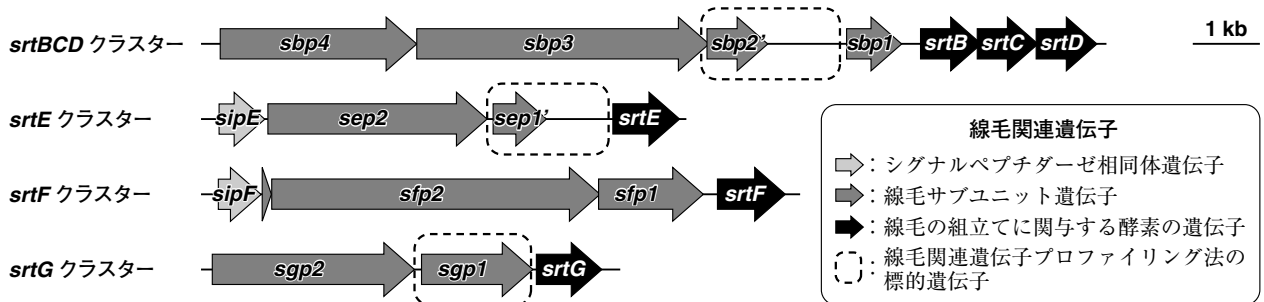


図2 *S. suis* の線毛関連遺伝子群の構成

srtBCD 及び *srtF* クラスターの遺伝子構成は *S. suis* P1/7 株の配列を基に、*srtE* 及び *srtG* クラスターの遺伝子構成はそれぞれ *S. suis* NCTC 10237 株及び 89/1591 株の配列を基に作製した。P1/7 株と NCTC 10237 株では、線毛関連遺伝子プロファイリング法の標的とする遺伝子のうちそれぞれ *sbp2* と *sep1* に変異が確認されているため、図中では *sbp2*' 及び *sep1*' という表記にしている。

るほど、そのSTに型別された株の数が多くを示している。また、祖先型と思われるSTを起点にして、7つの遺伝子配列のうち6つの配列が完全に一致するST同士が線で繋がれており、その結果、線で繋がった複数のSTの集団 (complex) が形成される。各 complex は祖先型のST番号によって、ST1 complex, ST27 complex などと呼ばれることとなる。

現在、*S. suis* のMLSTデータベースには600株以上の型別結果が登録されているが、これらを eBURST によって解析すると、図1に示す様にいくつかの complex の存在が明らかになってくる。中でも、図の中央に位置するST1 complexには、豚に髄膜炎や敗血症などの侵

襲性の高い疾病を引き起こした株が多く含まれ、さらに、人由来株の大半が含まれていることから、最も強毒な株集団だと考えられている [3-6]。また、グループ分けの条件を緩やかにし、7遺伝子中5遺伝子の配列が一致するSTの集団と定義すると、ST27を祖先型とした complex が形成される。このST27 complexにも病豚由来株に加え、北米やタイの人由来株の多くが含まれることから、家畜衛生・公衆衛生上重要な株集団であることが示唆されている [3-6]。病豚由来株は、これら2つの complex 以外にも型別されることがあるが、人由来株に関しては、ST106の1株を除く全ての株がST1またはST27 complexに型別されている。そのため、これら

表1 線毛関連遺伝子のプロファイリングに用いるPCRプライマー

標的遺伝子	プライマー	塩基配列	増幅産物の大きさ
<i>sbp2</i>	sbp2-F	5'-GGTGCAACATTCCTACTAGC-3'	462 bp
	sbp2-R	5'-CCACGTACAGTTTGTGTCAA-3'	
<i>sep1</i>	sep1-F	5'-GAAAGTTGTCTGGAGATGCAG-3'	739 bp
	sep1-R	5'-GTAACCACTTGGAGTGGTAG-3'	
<i>sgp1</i>	sgp1-F	5'-ACTGCAACCTATAGAGCGAC-3'	477 bp
	sgp1-R	5'-GCCATTGCCAACTTTAACTG-3'	

表2 PCR反応液の調整 (50 μ l*)

試薬	容量
10×PCRバッファー	5 μ l
25 mM MgCl ₂	3 μ l
dNTP (2.5 mM each)	4 μ l
プライマー-F (20 μ M)	1.25 μ l
プライマー-R (20 μ M)	1.25 μ l
Ex Taq DNA ポリメラーゼ (Takara)**	0.5 μ l
サンプルDNA	適量
蒸留水で全量が50 μ lになるように調整する	

* 反応液は20 μ lまで減量可能

** 他の酵素でも応用可能

2つの株集団をモニタリングすることが、*S. suis* 感染症の被害を低減化する上で特に重要であると考えられている。

3 線毛関連遺伝子プロファイリング法によるST1及びST27 complexに属する株の推定

上記のようにMLSTによる型別法は、疾病リスクの高い*S. suis*株の識別に有効な方法である。また、解析したデータとデータベースに登録されている世界中の株のデータをコンピューター上で比較できるという利点もある。しかし、MLST法では1株につき7種類の遺伝子の塩基配列を決定する必要があるため、多検体を型別する方法としては適していない。そこで我々は、MLST法より迅速・簡便に疾病リスクの高い株を識別する方法の開発を目的として、*S. suis*の線毛関連遺伝子に着目した。細菌の線毛は菌体表層に存在する糸状の構造物で、多くの菌では宿主への付着因子として機能していることが知られている。我々のグループは、*S. suis*においても線毛形成に関与すると思われる遺伝子群が少なくとも4種類(*srtBCD*, *srtE*, *srtF*, *srtG*クラスター)存在し(図2)、株によって保有する遺伝子群の種類が異なることを見いだした[8]。さらに、健康豚、病豚及び人由来株における各線毛関連遺伝子の分布とこれらの株のMLST型別結果を比較したところ、いくつかの線毛関連遺伝子の有無を調べることで、ST1またはST27 complexに属する株の大半を識別できることも明らかにした[8]。この成績を基に開発したのが、線毛関連遺伝子プロファイ

表3 PCR条件

反応ステップ	反応温度	反応時間	反応サイクル
前熱変性	95 °C	2分	1サイクル
熱変性	95 °C	20秒	30サイクル
アニーリング	58 °C	10秒	
伸長反応	72 °C	30秒	1サイクル
後伸長反応	72 °C	1分	

表4 線毛関連遺伝子プロファイルから予想されるMLST型別結果

線毛関連遺伝子プロファイル			プロファイルから予想されるMLST型別結果
<i>sbp2</i>	<i>sep1</i>	<i>sgp1</i>	
+	-	-	ST1 complex
-	-	+	ST27 complex
その他のプロファイル			ST1及びST27 complex以外

*少数の例外的な株も存在する。

リング法である。この方法は、個々の*S. suis*株について3種の線毛関連遺伝子(*sbp2*, *sep1*, *sgp1*)の有無をPCRで確認するだけで、その株がST1またはST27 complexに属する可能性が高いか否かを推測できる方法である。プライマーの配列及び具体的なPCRの条件は表1~3に示す。PCRの結果、*sbp2/sep1/sgp1*のプロファイルが+/-/-ならST1 complexに、-/-/+ならST27 complexに属する可能性が高く、それ以外のプロファイルであればこれら2つのcomplexには属していない可能性が高いという判定になる(表4)。野外分離株を用いた試験では、いくつかの例外的な株は存在したものの、非常に高い確率でST1及びST27 complexに属する株を識別することができており、本法が疾病リスクの高い*S. suis*株を識別する方法として有用であることが確認されている。

4 注意点と今後の課題

線毛関連遺伝子プロファイリング法は、各株が属するST complexを推測する方法であり、各株のST自体が決定できるわけではない。また、ST1またはST27 complexに属する可能性が高いと判定された場合、その株は“疾病リスクが高い株”であると考えられる

が、感染実験のデータ無しでは、その株が“強毒株”であるとは断言できない。しかしながら、本法を用いれば、PCRのみで多くの検体を型別できるため、疾病リスクの高い *S. suis* 株が野外でどのように分布し、どのように伝播しているかを知る上では有効な解析手段になる。今後は、本法によって得られたデータをどのように *S. suis* 感染症対策に繋げるかが課題であり、豚肉産業の現場との連携を図りながら最適な方法を模索していく必要がある。

最後に、株の収集及び解析にご協力いただいた、家畜保健衛生所、食肉衛生検査所、大学及び動物衛生研究所の諸先生に感謝する。

参 考 文 献

- [1] Higgins R, Gottschalk M : Streptococcal diseases, Diseases of swine, Straw BE, et al ed 9th ed, 769-783, Blackwell Publ, Ames, Iowa (2006)
- [2] Arends JP, Zanen HC : Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans, Rev Infect Dis, 10, 131-137 (1988)
- [3] King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM : Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis* identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange, J Clin Microbiol, 40, 3671-3680 (2002)
- [4] Chang B, Wada A, Ikebe T, Ohnishi M, Mita K, Endo M, Matsuo H, Asatsuma Y, Kuramoto S, Sekiguchi H, Yamazaki M, Yoshikawa H, Watabe N, Yamada H, Kurita S, Imai Y, Watanabe H : Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan, Jpn J Infect Dis, 59, 397-399 (2006)
- [5] Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M, Nishino H, Ishiji T, Tharavichitkul P, Khantawa B, Fongcom A, Takai S, Sekizaki T : *Streptococcus suis* in humans, Thailand, Emerg Infect Dis, 14, 181-183 (2008)
- [6] 関松大輔 : プタレンサ球菌感染症, 医学のあゆみ, 235, 196-202 (2010)
- [7] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG : eBURST : inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data, J Bacteriol, 186, 1518-1530 (2004)
- [8] Takamatsu D, Nishino H, Ishiji T, Ishii J, Osaki M, Fittipaldi N, Gottschalk M, Tharavichitkul P, Takai S, Sekizaki T : Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*, Vet Microbiol, 138, 132-139 (2009)