

公衆衛生上重要な豚レンサ球菌血清型 2 型および 14 型株を 識別可能な遺伝子の検索

大倉正稔¹⁾, 大崎慎人¹⁾, 高松大輔¹⁾

Search for genes that can distinguish *Streptococcus suis* serotype 2 and serotype 14 strains from the others

Masatoshi OKURA¹⁾, Makoto OSAKI¹⁾ & Daisuke TAKAMATSU¹⁾

背景および目的

豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) は、豚に髄膜炎や敗血症、心内膜炎等の様々な症状を起こしうる細菌で、養豚産業に経済的な損失を与えている。本菌は人獣共通感染症起因菌でもあり、その感染経路のほとんどは *S. suis* に感染した豚およびその生豚肉への接触である。豚レンサ球菌は表層の抗原性の相違により 35 の血清型 (1 型～ 34 型および 1 型と 2 型の両方の抗原性を有する 1/2 型) が知られており、病豚およびヒト患者から高頻度に分離されるのは 2 型である。病豚からは 2 型以外にも様々な血清型の株が分離されるが、ヒト患者由来株の場合、ほとんどは血清型 2 型で、近年、血清型 14 型株による事例がアジアを中心に増加傾向にあるが、それ以外の血清型に関しては散発的な報告が少数あるのみである。したがって、豚レンサ球菌血清型 2 型および 14 型株の検出は公衆衛生の観点から非常に重要である。しかし、*S. suis* の型別用抗血清は高価であるため、全血清型について整備することは検査現場では難しく、また、交差反応がみられるため判定が難しい場合もある。以上から、より実用的で、簡便にこれらの血清型を判定できる方法が求められている。

本菌の血清型は菌体表層の莢膜多糖の相違に基づくと考えられており、2 型については関連遺伝子群 [capsular polysaccharide synthesis (*cps*) gene cluster] が同定されている¹⁾。さらに、血清型 2 型株については複数株のゲノム配列が決定されている。そこで、本研究では 14

型参照株に加え、14 型抗血清と交差反応する 1 型および 2 型抗血清と交差反応する 1/2 型の参照株の全ゲノムドラフト配列を決定し、*cps* gene cluster を中心に比較・解析することにより、血清型 2 型および 14 型株を識別できる遺伝子を検索した。

材料と方法

3 血清型参照株の全ゲノム配列については次世代シーケンサーにより決定した。配列の決定およびアセンブルについては北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。

3 株の *cps* gene cluster については血清型 2 型の全ゲノム解読株との相同性解析により抽出した。複数コンティグが抽出された場合、コンティグ間を PCR により増幅し、その塩基配列を決定することにより、ギャップを埋め、*cps* gene cluster の全長配列を決定した。比較・解析は blast プログラム²⁾ により行い、Artemis comparison tool (ACT)³⁾ により図示した。

ゲノム配列間の比較についても同様に行い、各株に特異的な遺伝子領域を抽出した。抽出遺伝子領域よりプライマーを設計し、各血清型参照株を含む血清型 2 型 9 株、1/2 型 2 株、1 型 2 株、14 型 2 株を用いて PCR により保有状況を調べた。

研究の概要

(1) *cps* gene cluster の比較・解析

14 型、1 型、および 1/2 型参照株の *cps* gene cluster の全長配列を決定し、国際的なデータベース (DDBJ; DNA Data Bank of Japan) に登録した (*cps14* gene

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

cluster ; AB737822, *cps1* gene cluster ; AB737817, *cps1/2* gene cluster ; AB737816)。

cps gene cluster の比較・解析を行った結果, 14 型と 1 型および 2 型と 1/2 型の塩基配列はそれぞれほぼ一致しており (図 1), *cps* gene cluster の塩基配列のみでは 2 型を 1/2 型と, または 14 型を 1 型と識別することは難しいと考えられた。

また, *cps14* および *cps1* gene cluster では *cps2* および *cps1/2* gene cluster の一部の領域 (約 7.5 kbp) が異なる配列 (約 4.5 kbp) に置き換わっている構造をしていた (図 1)。しかし, 1/2 型のゲノム配列中には 1 型あるいは 14 型に特異的な *cps* gene cluster の領域は存在せず, 1/2 型株が有する 1 型の抗原性が何に由来するかは明らかにならなかった。

1 型と 14 型の *cps* gene cluster について, さらに解析した結果, *cps14G* に相当する遺伝子が 1 型ではフレームシフト変異により, 2 つの遺伝子に分かれていることが明らかになった (図 2)。この変異は 1 型参照株とは異なる血清型 1 型株 (ST1 株) にも存在しており (図 2), この変異が抗原性の相違に寄与している可能性も考えられたが, その証明にはさらなる解析が必要である。

一方, 1/2 型と 2 型の *cps* gene cluster の比較からは, どちらかの血清型に特異的なナンセンス変異やフレームシフト変異, ミスセンス変異は *cps* 遺伝子中には認められなかった。したがって, 1 型特異的な抗原性については莢膜以外の抗原が寄与している可能性が示唆された。

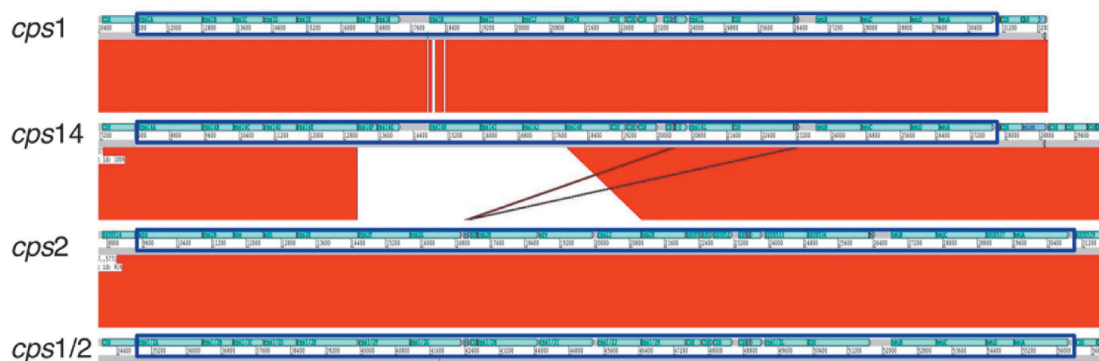


図 1. 4 血清型の *cps* gene cluster の比較 (blastn による比較を ACT により作図)
青で囲んだ領域が *cps* gene cluster。上段から *cps1*, *cps14*, *cps2*, *cps1/2* gene cluster を示す。
2 株間で相同性がある領域は赤で示されている。

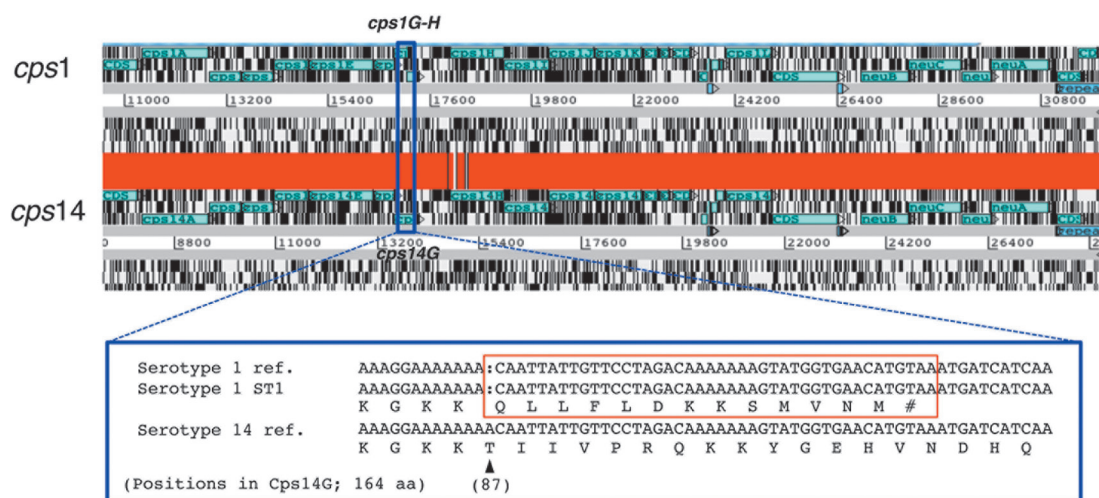


図 2. *cps14G* と *cps1G-H* の比較 (blastn による比較を ACT により作図)
上段から *cps1*, *cps14* gene cluster を示す。2 株間で相同性がある領域は赤で示されている。
cps1 gene cluster では *cps14G* に相当する遺伝子にフレームシフト変異 [Cps14G (164 アミノ酸) が 1 型では Cps1G (99 アミノ酸) と Cps1H (39 アミノ酸) に]。

(2) ゲノム配列の比較・解析

1 型の抗原性に *cps* gene cluster 以外の領域が関連している可能性を考慮し、4 血清型参照株間の全ゲノム配列を比較した。その結果、*cps* gene cluster 以外で 1/2 型と 1 型参照株に共通して存在し、2 型および 14 型参照株に存在しない遺伝子領域が複数認められた。そこで、その配列を基にプライマーを設計し、参照株で見つかった 1 型と 1/2 型に特異的な領域がその他の 1 型および 1/2 型野外株にも保存されているか否かを PCR で検索したが、血清型参照株以外ではそのような遺伝子領域の存在は証明できなかった。また、2 型および 14 型参照株に共通して存在し、1/2 型と 1 型参照株に存在しない領域を用いても、2 型と 1/2 型株および 1 型と 14 型株の識別はできなかった。

以上から、特異的な遺伝子領域を利用して、2 型と 1/2 型株および 1 型と 14 型株を識別することは困難であることが明らかになった。

血清型 2 型と 14 型については莢膜多糖の構造が推定されており、1 型についてもその糖組成が明らかになっている^{4) 6)}。これらの報告によると、1 型と 14 型の糖組成は異なっていることから、両者の糖鎖構造は異なることが示唆されている。今後、血清型 1 型および 1/2 型の莢膜多糖の構造が推定されれば、1 型の抗原性の詳細の解明につながることを期待される。また、上記で明らかにした変異が抗原性の相違に寄与するかについても明らかになると考えられる。

今後の展望

豚レンサ球菌血清型 2 型感染症については、豚用ワクチンの市販が開始されている。本ワクチンは 2 型以外の血清型株に対する効果は低いと考えられ、ヒトにおける肺炎球菌の事例でみられるようにワクチンの選択圧などにより、異なる血清型や新たな血清型の株の台頭や出現が懸念される。実際、ワクチンの選択圧によるかは不明であるが、アジアで増加しているヒト事例で分離される血清型 14 型株は、血清型 2 型の強毒株が *cps* gene cluster の交換により分岐／出現した可能性が指摘されている⁷⁾。すなわち、本菌においても血清型の交換が起こりうることを示唆している。

したがって、*S. suis* の臨床分離株における血清型の変遷をモニタリングすることは、今後起こりうる本菌の新興血清型を予知し、対策を講じる上で非常に重要となる。我々は本研究課題と並行して、全 35 血清型の *cps* gene

cluster の塩基配列を決定し、本研究課題で比較・解析した血清型 2 型と 1/2 型および 1 型と 14 型を除く血清型のすべてにおいて、*cps* gene cluster に特異的な遺伝子が存在することを明らかにした⁸⁾。現在、この成果および本研究成果を活用し、*cps* 遺伝子を利用した遺伝子型別法を開発中である。将来的に簡便かつ安価に血清型をスクリーニングする方法として活用できればと考えている。

謝 辞

本研究は平成 22～23 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

引用文献

- 1) Smith, H.E., de Vries, R., van't Slot, R., et al.: The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microb. Pathog.* 29, 127-134 (2000).
- 2) Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., et al.: NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 36, W5-9 (2008).
- 3) Carver, T.J., Rutherford, K.M., Berriman, M., et al.: ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics.* 21, 3422-3423 (2005).
- 4) Van Calsteren, M.R., Gagnon, F., Lacouture, S., et al.: Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem. Cell. Biol.* 88, 513-525 (2010).
- 5) Van Calsteren, M.R., Gagnon, F., Calzas, C., et al.: Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem. Cell. Biol.* 91, 49-58 (2013).
- 6) Elliott, S.D. & Tai, J.Y.: The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.* 148, 1699-1704 (1978).
- 7) King, S.J., Leigh, J.A., Heath, P.J., et al.: 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).
- 8) Okura, M., Takamatsu, D., Maruyama, F., et al.: Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters from all serotypes of *Streptococcus suis*: potential mechanisms for generation of capsular variation. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2796-2806 (2013).

