

研究助成 2019 – 感染症領域 –
研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	大阪大学 大学院歯学研究科 口腔細菌学教室
氏 名	山口 雅也
研究テーマ	進化解析を用いた肺炎球菌による侵襲性疾患成立機構の解明

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
（図表、写真などの貼付を含む）

目的

現在、薬剤耐性菌の蔓延や重篤な感染症の増加が世界的な問題となっている。一方で、収益性の悪化から多くの製薬企業が新規抗菌薬の開発から撤退している。特に肺炎球菌は、国際的に耐性化が強く懸念されている病原細菌の一つである。本研究では、無症候的に定着しうる肺炎球菌が重篤な感染症を引き起こす機構について、大規模ゲノム解析による相関関係の解析を行い、得られた候補分子について分子生物学的解析を行うことで因果関係の解明を試みる。なお、進化の選択圧に着目した病原因子の解析は、申請者が確立した手法である。相関関係と因果関係の両者を明らかにすることで、ヒトにおける実際の病態をもっとも反映した分子機構の解明につながることが期待される。

方法

肺炎球菌のゲノムライブラリは欧米先進国を中心に整備されている。しかし、世界規模での解析には、報告の少ない東南アジアなどの臨床分離株が必要となる。そこで我々は、肺炎球菌のゲノム情報の報告がないミャンマー国の急性呼吸器感染症の患児 300 症例のうち、60 症例から分離された *mitis* 群レンサ球菌についてドラフトゲノム解読とゲノムプロファイリングを行った。また、数千株単位のゲノムワイド関連解析を行うため、公的データベースから肺炎球菌の臨床情報とゲノムデータを収集し、情報解析を行うためのパイプラインを構築した。

また、分子進化による解析で、進化的に変異が制限されているが病原性に果たす役割が不明である *bgaA* に着目し、遺伝子欠失株を作製して細胞モデルならびにマウス感染モデルに及ぼす影響を検討した。さらに、変異が制限されている分子のうち、自己溶解酵素 *LytA* を阻害剤探索標的として、ハイスループットの低分子阻害剤スクリーニングを実施した。

成果

ゲノム配列に基づく菌種同定から 60 株中 58 株が肺炎球菌で、2 株が *Streptococcus mitis* であることが示唆された。また、莢膜型と MLST、耐性遺伝子の分布を決定した。パンゲノム解析から、ミャンマーの集団が持つ遺伝子はさらに多様性があることが示唆された。大規模解析を行うため、3,000 株の肺炎球菌ゲノムデータについてパンゲノム解析とゲノムワイド関連解析を行い、複数の病態と相関する因子を得た。

BgaA の構造と進化的に保存された残基を重ね合わせたところ、構造の安定性に寄与するループ構造上のプロリン残基ならびに活性中心を構成する残基についても進化的な保存性が高いことが示唆された。次に *bgaA* 遺伝子欠失株を作製し、得られた欠失株と野生株を用いて、それぞれマウスに経静脈感染を行った。その結果、*bgaA* 欠失株感染群が、野生株感染群と比較して致死率が有意に低下した。一方で感染後のマウスの各臓器における菌数は差が認められなかった。さらに RNA-seq 解析と血液凝固試験を行ったところ、*bgaA* 欠失により自然免疫応答と血液凝固能の抑制が緩和されることが示唆された。

LytA の阻害剤に関して、384 well プレートと自動分注機を用いて室温で反応させ、酵素活性を評価する実験条件を得た。得られた条件に基づいて、22,000 化合物セットのスクリーニングを完了した。

今後はゲノムワイド関連解析をすすめるとともに、低分子阻害剤による感染制御の可能性を検討していく。

研究助成 2019 – 感染症領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	大阪大学 大学院歯学研究科 口腔細菌学教室
氏	名	山口 雅也

1. 論文発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
1		Wu Z.Y., Campeau A., Liu C.H., Gonzalez D.J., <u>Yamaguchi M.</u> , Kawabata S., Lu C.H., Lai C.Y., Chiu H.C., Chang Y.C. Unique virulence role of post-translocational chaperone PrsA in shaping <i>Streptococcus pyogenes</i> secretome. Virulence , Vol. 12. 2633-2647. 2021. 査読あり
2		<u>Yamaguchi M.</u> [†] , Kinjo Y. [†] Nizet V. [†] Editorial: Host-pathogen Interactions During Pneumococcal Infection. Front. Cell. Infect. Microbiol. , Vo. 11. 752959. 2021. [†] corresponding author. Editorial. 査読あり
3		Sumitomo T., Nakata M., Nagase S., Takahara Y., Honda-Ogawa M., Mori Y., Akamatsu Y., <u>Yamaguchi M.</u> , Okamoto S., Kawabata S. GP96 drives exacerbation of secondary bacterial pneumonia following influenza A virus infection. mBIO , Vol. 12. e0326920. 2021. 査読あり
4		Hirose Y., <u>Yamaguchi M.</u> , Sumitomo T., Nakata M., Hanada T., Okuzaki D., Motooka D., Mori Y., Kawasaki H., Coady A., Uchiyama S., Hiraoka M., Zurich R.H., Amagai M., Nizet V., Kawabata S. <i>Streptococcus pyogenes</i> upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. Cell Rep. , Vol. 34. 108924. 2021. 査読あり
5		<u>Yamaguchi M.</u> [†] , Myo Win H. P., Higashi K., Ono M., Hirose Y., Motooka D., Okuzaki D., Aye M. M., Htun M. M., Thu H. M., Kawabata S. [†] Epidemiological analysis of pneumococcal strains isolated at Yangon children's hospital in Myanmar via whole-genome sequencing-based methods. Microb. Genomics , Vol. 7. 2021. [†] corresponding author 査読あり
6		Hirose Y., <u>Yamaguchi M.</u> , Takemoto N., Miyoshi-Akiyama T., Sumitomo T., Nakata M., Ikebe T., Hanada T., Yamaguchi T., Kawahara R., Okuno R., Otsuka H., Matsumoto Y., Terashima Y., Kazawa Y., Nakanishi N., Uchida K., Akiyama Y., Iwabuchi K., Nakagawa C., Yamamoto K., Nizet V., Kawabata S. Genetic characterization of <i>Streptococcus pyogenes emm89</i> strains isolated in Japan from 2011 to 2019. Infect. Microbe Dis. , Vol. 2. 160-166. 2020. 査読あり
7		<u>山口雅也</u> , 肺炎球菌による病態形成機構の解明. 日本細菌学雑誌 . Vol. 75. pp173-183. 2020. 査読あり
8		<u>Yamaguchi M.</u> [†] , Takemura M., Higashi K., Goto K., Hirose Y., Sumitomo T., Nakata M., Uzawa N., Kawabata S. [†] , Role of BgaA as a pneumococcal virulence factor elucidated by molecular evolutionary analysis. Front. Microbiol. , Vol. 11. 582437. 2020. [†] corresponding author. 査読あり
9		<u>山口雅也</u> , 川端重忠, 第 III 編 第 3 章 肺炎と微生物叢. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. シーエムシー出版. pp.158-164. 2020. 査読なし
10		Otsuki M., Wada M., <u>Yamaguchi M.</u> , Kawabata S., Maeda Y., Ikebe K. Evaluation of decontamination methods of oral biofilms formed on screw-shaped, rough and machined surface implants: an <i>ex vivo</i> study. Int. J. Implant Dent. Vol. 6. 18. 2020. 査読あり
11		Sankar S., <u>Yamaguchi M.</u> , Kawabata S., Ponnuraj K., <i>Streptococcus pneumoniae</i> surface adhesin PfbA exhibits host specificity by binding to human serum albumin but not bovine, rabbit and porcine serum albumins. Protein J. , Vol. 39. 1-9. 2020. 査読あり

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2021年12月2日	The 3rd Asian Pneumococcal Symposium. <u>Yamaguchi M.</u> Exploring pneumococcal virulence factors via molecular evolutionary analysis.
2	2021年8月30日	第15回細菌学若手コロッセウム. <u>山口雅也</u> , 内橋俊大, 川端重忠. シングルセル解析を用いた口腔細菌叢のゲノムプロファイリング.
3	2021年6月24-25日	1st International Turkish Japanese Dental Congress. <u>Yamaguchi M.</u> Molecular evolutionary and microbiological approach to investigate pneumococcal infection.
4	2021年3月23-25日.	第94回日本細菌学会総会. <u>山口雅也</u> , Hpoo Pwint Myo Win, 大野誠之, 東孝太郎, 広瀬雄二郎, Mya Mya Aye, Moh Moh Htun, Hlaing Myat Thu, 川端重忠. ミャンマーで分離された肺炎球菌のシーケンス情報を用いた遺伝子プロファイリングとパンゲノム解析.
5	2020年8月19-21日.	第94回日本感染症学会総会・学術講演会. <u>山口雅也</u> , 川端重忠. ミャンマーで分離された肺炎球菌のゲノム情報に基づいた分子疫学解析.
6	2020年2月19-21日.	第93回日本細菌学会総会. <u>山口雅也</u> . 肺炎球菌の菌体表層タンパク質群に着目した病態形成機構の解明.
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2021年12月投稿	Front. Cell. Infect. Microbiol.誌 (Invited, Original paper)
2	2022年3月	第95回日本細菌学会総会
3		
4		