

# ゲノムワイド関連解析を用いた *emm89* 型化膿レンサ球菌による 侵襲性感染症の発症因子の探索

EX22701



大阪大学  
OSAKA UNIVERSITY

## Investigation of bacterial pathogenic factors of invasive *emm89* *Streptococcus pyogenes* infection with genome-wide association study

○大野誠之<sup>1,2</sup>, 山口雅也<sup>1</sup>, 広瀬雄二郎<sup>1</sup>, 東孝太郎<sup>1,3</sup>, 秋山徹<sup>4</sup>, 住友倫子<sup>1</sup>, 池辺忠義<sup>5</sup>, 山口貴弘<sup>6</sup>, 河原隆二<sup>6</sup>, 奥野ルミ<sup>7</sup>, 大塚仁<sup>8</sup>, 松本裕子<sup>9</sup>, 賀澤優<sup>10</sup>, 中西典子<sup>11</sup>, 中川力<sup>12</sup>, 川端重忠<sup>1</sup>

<sup>1</sup>阪大・院歯・口腔細菌, <sup>2</sup>阪大・院歯・クラウンブリッジ, <sup>3</sup>阪大・院歯・義歯高齢, <sup>4</sup>国際医療研究セ・感染症制御, <sup>5</sup>感染研・細菌第一部, <sup>6</sup>大阪健安研・微生物, <sup>7</sup>東京健安研セ・微生物, <sup>8</sup>山口環保セ・保健科学, <sup>9</sup>横浜衛研・微生物, <sup>10</sup>福島衛研・微生物, <sup>11</sup>神戸健科研・感染症, <sup>12</sup>京都衛環研

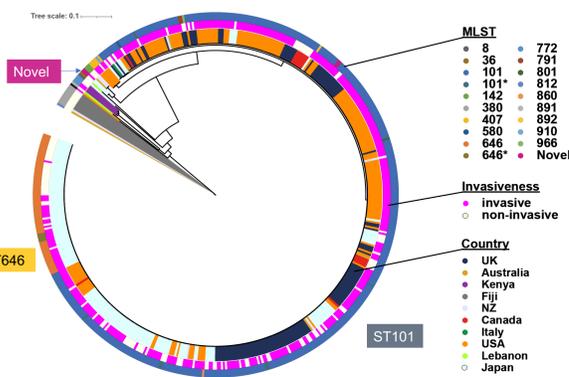
### 背景

*Streptococcus pyogenes* はヒトの咽頭や皮膚などに常在するグラム陽性球菌である。咽頭炎などの非侵襲性感染症に加え、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の原因菌であり、「人喰いバクテリア」とも呼ばれている。*S. pyogenes* の分類には *emm* 遺伝子の型別が用いられている。近年、世界各地で侵襲性感染症患者から *emm89* 型 *S. pyogenes* が分離される頻度が高まっている。本研究では、国内外で分離された *emm89* 型の侵襲性感染症および非侵襲性感染症由来株の全ゲノム情報から、侵襲性感染症の発症に寄与する因子の探索を行うこととした。

### 結論

日本および海外の *emm89* 型化膿レンサ球菌に対するゲノムワイド関連解析の結果、37のゲノム上の領域に存在する変異と9箇所の一塩基多型がそれぞれ有意に侵襲性感染症に関連すると示唆された。それらのうち *yfiZ*, *lacC\_1* の各遺伝子に含まれていた変異はアミノ酸の置換を伴い、立体構造や他分子との相互作用が変化し病原性に影響する可能性が示唆された。

### コアゲノムに基づく *emm89* 型化膿レンサ球菌516株の系統関係



当教室が保有する日本の臨床分離株161株に加えて、海外の分離株の全ゲノム情報を fastq-dump v.2.9.6 でダウンロードした。

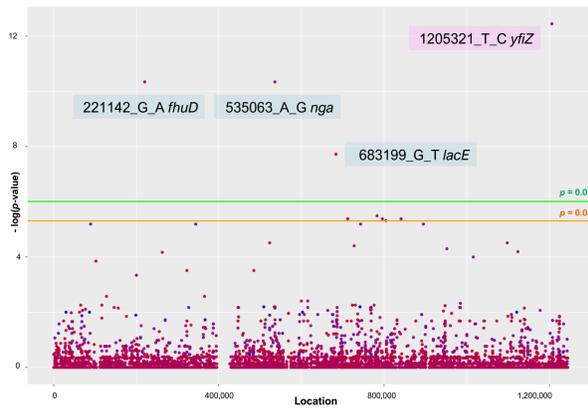
パンゲノム解析プログラム Roary v.3.12.0 にて、ゲノムよりコアゲノム (99%以上の株に存在する遺伝子) を抽出し、コアゲノムアライメントを作成した。

Kakusan4, MrBayes にて系統関係を計算 iTOL (https://itol.embl.de) にて系統樹を描画した。Sequence typing (ST) は、プログラム MLST v.2.4.0 を使用して決定した。

全ての解析には大阪大学 SQUID および国立遺伝学研究所スーパーコンピュータシステムを使用した。

解析した臨床分離株516株のうち、侵襲性由来株は374株、非侵襲性由来株は142株であった。欧米や日本の株の多くは ST101 に分類される一方で、ST646 は日本においてのみ認められる系統であった。侵襲性由来株は系統に依存せずほぼ一様に分布していた。

### SNP関連解析



プログラム snp-sites v.2.5.1 を用いてコアゲノムアライメントから SNP を抽出し、これをバリエーションとして侵襲性感染症との関連について Pyseer v.1.3.4 を用いたゲノムワイド SNP 関連解析を行った。Manhattan plot は R v.4.1.2 にて描画した。

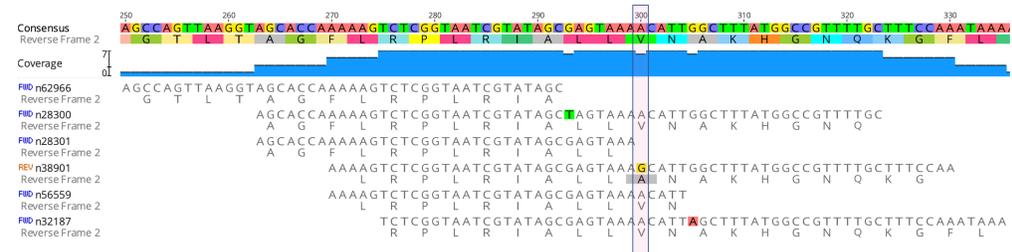
各プロットはそれぞれ SNP を表し、横軸はコアゲノムアライメント上での SNP の位置を示す。赤は各 SNP の存在が侵襲性に、青は非侵襲性にそれぞれ関連することを示す。全部で9箇所の SNP が侵襲性感染症に有意に関連すると示唆された。

Genes	Function
<i>yfiZ</i>	Ferrichrome transport system permease
<i>fhuD</i>	Ferrichrome binding protein
<i>nga</i>	NADase
<i>lacE</i>	Lactose phosphotransferase
<i>murI</i>	Glutamate rasemase
<i>lnrL</i>	ABC transporter
<i>mvaA</i>	Coenzyme A reductase
<i>oppD_2</i>	ABC transporter
<i>naIP</i>	Sugar transporter

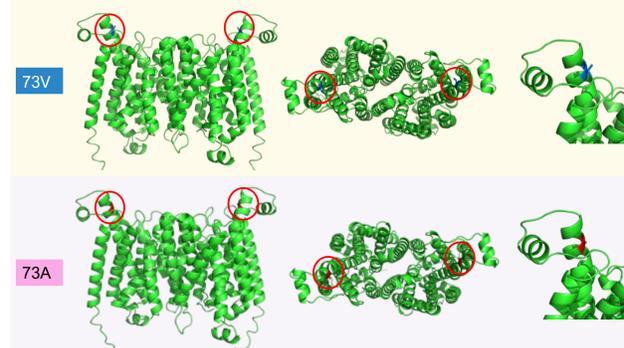
有意に病態に関連した SNP を保有する株をオレンジ色で示し、その SNP の存在する遺伝子名と機能を左に示す。最も *p* 値の低かった *yfiZ*, *fhuD* の各遺伝子に存在する SNP は k-mer 関連解析でも最も *p* 値が低く、さらにこれらは日本で分離された株においてのみ存在する変異だった。YfiZ と FhuD は複合体を形成し、シデロフォアを介した鉄イオンの取り込みに関与することが報告されている。

### YfiZの立体構造予測

#### YfiZ 遺伝子領域における侵襲性に関連する変異



#### 細胞膜に平行な方向 細胞膜に垂直な方向 拡大図

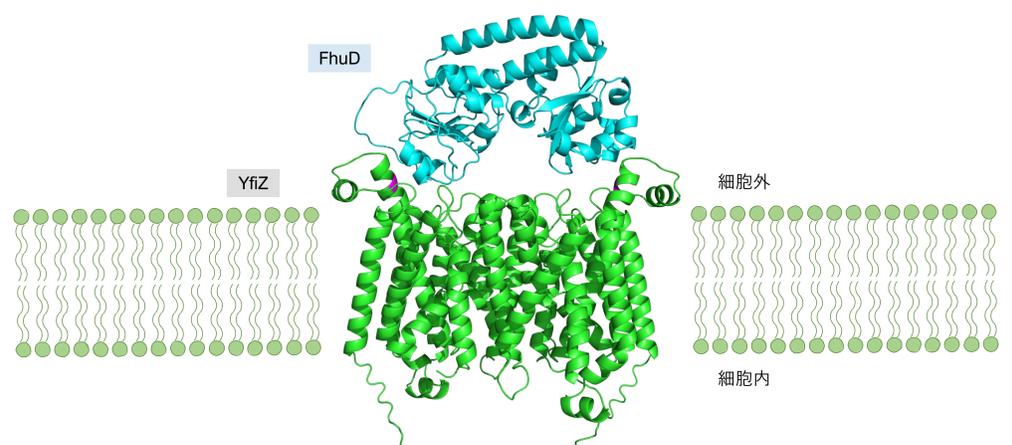


病態に有意に関連したのは *yfiZ* 遺伝子における A217G の SNP であり、これは V73A のアミノ酸の置換を引き起こす。

YfiZ はホモ2量体を形成して細胞膜上に存在する鉄イオン輸送タンパク質である。AlphaFold2 により2量体 YfiZ の構造予測を行い、細胞膜にそれぞれ平行な方向と垂直な方向から見た立体構造を描画した。

73番目のアミノ酸残基は細胞外に露出すると推定される領域に位置していた。VからAへのアミノ酸置換により細胞外領域の疎水性の低下が予測される。

#### YfiZ-FhuD複合体のAlphaFold2による立体構造予測



YfiZ-FhuD 複合体についても AlphaFold2 により立体構造の予測を行った。YfiZ における73番目のアミノ酸残基は細胞外の鉄輸送タンパク質 FhuD との相互作用に関与する可能性のある位置に存在していた。以上から、SNP によるアミノ酸置換に伴う疎水性の変化から鉄輸送機能が変化し、病原性に影響することが示唆された。

### k-mer関連解析

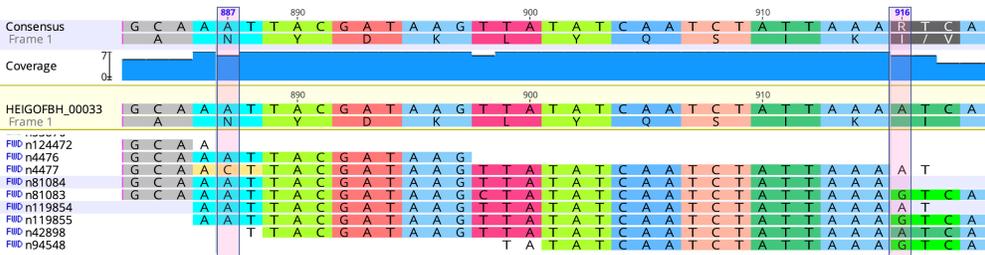
Comp.	p-value	q-value	Genes
Comp_2	2.35E-07	2.39E-03	<i>yfiZ</i> , <i>fhuD</i>
Comp_26	7.96E-07	2.95E-03	<i>group_143</i> , <i>group_141</i> , <i>group_393</i> ...
Comp_9	7.97E-07	2.95E-03	<i>group_3132</i> , <i>group_693</i> , <i>group_3590</i> ...
Comp_23	3.82E-06	4.92E-03	<i>group_591</i>
Comp_1	4.94E-06	4.92E-03	<i>group_2023</i>
Comp_5	1.66E-05	1.12E-02	<i>ftsK</i>
Comp_6	2.06E-05	1.33E-02	<i>group_715</i> , <i>group_1632</i> , <i>group_3592</i> ...
Comp_11	7.60E-05	4.11E-02	<i>group_70</i> , <i>group_69</i> , <i>group_2503</i> ...
Comp_24	1.81E-04	7.30E-02	<i>group_1299</i>
Comp_15	4.09E-04	1.40E-01	<i>lacC_1</i> , <i>lacD_2</i>
Comp_19	5.92E-04	1.84E-01	<i>group_18</i> , <i>group_23</i> , <i>group_21</i>
Comp_10	6.69E-04	2.04E-01	<i>group_2892</i> , <i>group_979</i> , <i>group_1769</i> ...
Comp_4	7.19E-04	2.15E-01	<i>group_104</i> , <i>sasA_3</i> , <i>arlR_2</i>
Comp_22	1.07E-03	2.86E-01	<i>rexB</i>
Comp_12	1.09E-03	2.86E-01	<i>group_666</i> , <i>group_667</i> , <i>group_671</i> ...
Comp_33	1.15E-03	2.95E-01	<i>araR</i>
Comp_0	1.18E-03	2.97E-01	<i>group_3874</i> , <i>group_3138</i> , <i>group_2305</i> ...

全ゲノムから31塩基対の領域を抽出し、これをバリエーションとして侵襲性感染症との関連について DBGWAS v.0.5.4 を用いたゲノムワイド k-mer 関連解析を行った。

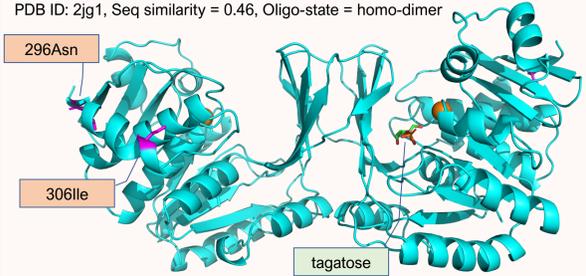
全部で37の領域が侵襲性感染症に有意に関連することが示唆された。中でも *yfiZ*, *lacC\_1*, *rexB*, *araR* の各遺伝子領域に含まれる変異はアミノ酸の置換を伴うミスセンス変異であった。さらに、一つの機能未知のタンパク質をコードする遺伝子 *group\_715* の上流にある推定プロモーター領域における変異も侵襲性に相関することが示唆された。

### LacC\_1の立体構造予測

#### LacC\_1 遺伝子領域における侵襲性に関連する変異



#### LacC\_1のSWISS-MODELによる構造予測



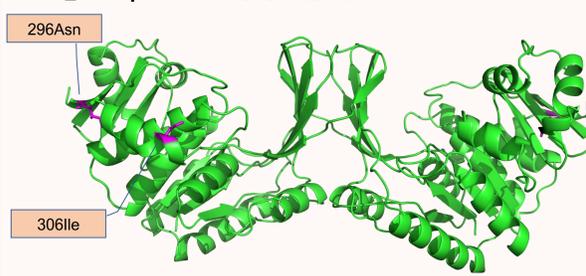
k-mer は Geneious Prime @2021.2.2 でリファレンス (pan\_genome\_reference.fasta generated with Roary) にマッピングした。

アミノ酸の置換を伴う変異について、変異が立体構造と機能に及ぼす影響を予測するために SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org) を用いたホモロジーモデリングを実行した。

LacC\_1, YfiZ について、AlphaFold2 を用いて構造予測を行った。

立体構造は PyMOL v.2.3.5 にて描画した。

#### LacC\_1のAlphaFold2による構造予測



LacC\_1 はラクトースの代謝産物であるタガトースのリン酸化を触媒する酵素であり、2量体として機能する。

侵襲性感染症に有意に関連したのは *lacC\_1* 遺伝子における 887A/916A アレルであり、296N/306I のアミノ酸の組み合わせが侵襲性と関連することが示唆された。これらのアミノ酸残基は活性部位とは異なる位置に存在した。SWISS-MODEL と AlphaFold2 でそれぞれ生成された構造はよく類似していた。