

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 長田 真規子

本研究は、細菌間で保存された新規病原性因子 CvfA に着目し、黄色ブドウ球菌が病原性を発現する分子機構について解析したものである。

病原性細菌は宿主に感染する際に、毒素や接着因子などの種々の病原性因子を発現する。これを制御する機構の解明は、細菌感染症を理解しこれに対策する上で重要である。しかしながら病原性因子の発現を制御する機構の理解は十分にはなされていない。

この機構の解明を目指して、申請者は、所属研究室において同定された新規病原性制御因子 CvfA に着目した。CvfA は、カイコ感染モデル系を利用した黄色ブドウ球菌の病原性関連遺伝子のスクリーニングより、カイコ殺傷力に必要な機能未知因子として得られた。cvfA 遺伝子は毒素等の発現に寄与しており、マウスに対する殺傷力にも必要である。また cvfA 遺伝子は、多くの病原性細菌に保存された遺伝子であり、A 群連鎖球菌においても病原性に必要である。しかしながら、これまでに CvfA の生化学的活性は不明であった。

申請者は、CvfA タンパク質にはホスホジエステラーゼドメインが存在することから、CvfA タンパク質がホスホジエステラーゼ活性を有するのではないかと考え、この活性を指標として CvfA タンパク質の精製を行った。界面活性剤を用いて CvfA タンパク質を膜画分より可溶化し、数段階の分画の後、最終段階のイオン交換クロマトグラフィーにおけるホスホジエステラーゼ活性と CvfA タンパク質の挙動の一致から、CvfA タンパク質がホスホジエステラーゼ活性を有することを示した。

また、五種類の点変異型 CvfA タンパク質を用いた解析から、ホスホジエステラーゼ活性を示さない CvfA は、黄色ブドウ球菌の毒素産生およびカイコに対する殺傷力が低下することを明らかにし、CvfA のホスホジエステラーゼ活性が黄色ブドウ球菌の病原性に必要であることを示唆した。

さらに申請者は、CvfA がターゲットとする分子の検討を行い、2',3'-サイクリ

ックプリンヌクレオチドに対して、そのホスホジエステル結合を CvfA が分解すること、3',5'-サイクリックヌクレオチドに対しては分解しないことを見出した。ヌクレオチドの 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合は、RNA がエンドヌクレアーゼで切断された際の 3'末端に生じる構造である。CvfA タンパク質には RNA 結合ドメインが存在することから、CvfA は RNA の 3'末端の 2',3'-サイクリックヌクレオチドの分解に働くのではないかと、申請者は考えた。CvfA の 2',3'-サイクリックモノヌクレオチドに対する K_m 値が 15 mM と高いものであったが、RNA の 3'末端の 2',3'-サイクリックヌクレオチドに対しては高い親和性で反応するのではないかという予想のもと、これについて検討したところ、CvfA は RNA の 3'末端の 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合を分解し、その K_m 値は 1.1 μ M であった。従って、CvfA は RNA の 3'末端の 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合の分解に働くことが明らかとなった。

申請者は、CvfA が病原性発現に働く分子機構を知るために、*cvfA* 欠損株において発現量が変動する RNA を同定した。その結果、CvfA は既知の主要な病原性制御経路の上流で働くことが示唆された。さらに、*cvfA* 欠損株では病原性制御因子 Agr の mRNA の半減期が短縮することを見出した。この結果より、CvfA による RNA 3'末端の構造変換は、Agr mRNA の安定化をもたらすことを示唆した。

以上、本研究では、細菌間で保存された新規病原性因子 CvfA が、RNA 3'末端の 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合を分解することにより病原性を制御する、という新規な病原性発現機構を担うことを見出した。2',3'-サイクリックホスホジエステラーゼは多くの生物が有する酵素であるが、その生理的意義はほとんど解明されていない。本研究は、これが病原性に働くことを初めて提唱するものである。病原性の発現機構の理解、および、広く生物が有する生体内反応の果たす役割の解明という点で、本研究は細菌感染学、基礎分子生物学に貢献するところが大きく、博士（薬学）の学位に値すると判断した。