

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 大前陽輔

申請者の論文は、黄色ブドウ球菌の移動能力であるコロニスプレッディングについて、黄色ブドウ球菌自身が分泌する阻害因子をはじめ同定したというものである。コロニスプレッディングとは鞭毛をもたない黄色ブドウ球菌が有する、増殖に伴い軟寒天上を拡散するという移動能力である。細菌の移動能力は細菌が病原性を発揮する上で重要と考えられており、黄色ブドウ球菌の臨床分離株のコロニスプレッディングにおいても菌株のコロニスプレッディング能力の強さと病原性の強さとの対応が見られる。しかしながら、黄色ブドウ球菌が自己のコロニスプレッディング能力を調節する分子機構は不明であった。本論文は黄色ブドウ球菌の細胞外分泌因子に着目し、黄色ブドウ球菌のコロニスプレッディングの調節に働く分子機構の解明を目指した。

申請者はまず、本論文の第1章において、黄色ブドウ球菌の細胞外分泌因子のコロニスプレッディングに対する効果を検討した。そして、黄色ブドウ球菌の液体培養上清を軟寒天培地中に添加する事によりコロニスプレッディングを阻害される事を見出した。そして、コロニスプレッディング阻害活性を独自に定義するとともに、阻害活性を担う因子の性状解析を行い、阻害因子が黄色ブドウ球菌の細胞外分泌タンパク質発現を制御する *agr* 遺伝子領域依存に分泌されるタンパク質であることを明らかにした。

次に申請者は、第2章において、コロニスプレッディング阻害活性を担う因子の実体を生化学的に明らかにするため、コロニスプレッディング阻害活性を指標とした精製を行った。そして、黄色ブドウ球菌の液体培養上清中から数段階の分画の後、最終段階の陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにおけるコロニスプレッディング阻害活性とタンパク質量の挙動の一致から、 δ 溶血毒素をコロニスプレッディング阻害因子として同定した。さらに、 δ 溶血毒素をコードする *hld* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的解析から、*hld* 遺伝子破壊株において培養上清中のコロニスプレッディング阻害活性が野生株の10分の1以下に低下すること、*hld* 遺伝子破壊株のコロニスプレッディング能力が野生株に比べ上昇することを見出した。これらの結果より、 δ 溶血毒素がコロニスプレッディング阻害因子であることを遺伝学的に確認するとともに、黄色ブドウ球菌が自己の移動能力を δ 溶血毒素により負に制御していることを明らかにした。

さらに申請者は、第3章において、*hld* 遺伝子破壊株の培養上清中に野生株より低いものの依然としてコロニスプレッディング阻害活性が残存することに着目し、今度は *hld* 遺伝子破壊株の培養上清を出発材料とした精製により Map タンパク質を同定した。さらに、*map* 遺伝子破壊株を作出し、*map* 遺伝子 *hld* 遺伝子 2 重破壊株の培養上清中で *hld* 遺伝子単独破壊株よりもコロニスプレッディング阻害活性が低下することを明らかにし、Map がコロニスプレッディング阻害因子であることを遺伝学的に確認した。さらに第4章において、

*map*遺伝子*hld*遺伝子2重破壊株においても検出されるコロニスプレッディング阻害活性を担う因子として、 δ 溶血毒素と類似した二次構造を示すPSM α タンパク質に着目し、PSM α タンパク質の軟寒天培地への添加により黄色ブドウ球菌のコロニスプレッディングが阻害される事、*map*遺伝子*hld*遺伝子2重破壊株から*psm α* 遺伝子を破壊すると培養上清中のコロニスプレッディング阻害活性が4分の1に低下し、3重破壊株の阻害活性は野生株の0.3%まで低下する事を示した。以上の結果より、黄色ブドウ球菌の細胞外に分泌するコロニスプレッディング阻害活性の大部分を担う因子として、 δ 溶血毒素、Map、PSM α が同定された。

最後に第5章において申請者は、同定された因子の中で最も多くの活性を担った δ 溶血毒素について、そのコロニスプレッディング阻害の分子機構を検討した。そして、変異型の δ 溶血毒素を用いた解析により、 δ 溶血毒素がその界面活性により黄色ブドウ球菌の細胞表面の疎水性を低下させることでコロニスプレッディングを阻害することを示唆した。

以上、本研究は、黄色ブドウ球菌のコロニスプレッディングについて、黄色ブドウ球菌の細胞外分泌因子に着目し、生化学的、遺伝学的に解析することにより、黄色ブドウ球菌のこれまで宿主細胞に対する作用が報告されてきた病原性因子 δ 溶血毒素、Map、PSM α が、黄色ブドウ球菌自身に対しても作用を有していることを明らかにした。細菌が自己の移動能力を負に制御することは本研究が初めて明らかにすることであり、細菌の生存戦略において新たな知見を提供している。また、これらコロニスプレッディング阻害因子群の同定と機能解析に関わる結果は、黄色ブドウ球菌の移動能力調節に関わる分子基盤を解明する上で細菌学上、生物系薬学上、重要な知見を提供している。よって申請者は、博士（薬学）の学位を受けるに十分な資格を有すると判定した。