

## 論文の内容の要旨

# カイコの体液タンパク質 ApoLp による黄色ブドウ球菌の病原性抑制機構の解明

花田 雄一

### [序論]

宿主と病原性細菌との相互作用を明らかにすることは、感染症の発症メカニズムを理解する上で重要である。哺乳動物と無脊椎動物とにおいて、細菌に対する自然免疫機構はよく保存されている。近年、新しい感染防御システムとして、哺乳動物の血液中のタンパク質が細菌の病原性発現機構を転写段階で抑制するメカニズムが報告された。無脊椎動物において細菌の病原性発現を転写段階で抑制するシステムがあるかは不明である。

私の所属する研究室においては、黄色ブドウ球菌の病原性評価系としてカイコ感染モデルが確立されている。黄色ブドウ球菌の産生する溶血毒素はカイコを殺傷する活性をもつにもかかわらず、溶血毒素遺伝子を欠損した黄色ブドウ球菌のカイコ殺傷能力は野生株と比べて低下しない。この原因はカイコ体液中において黄色ブドウ球菌が溶血毒素を産生できないからだとは私は考え、研究に着手した。本研究において私は、カイコ体液を出発原料として黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を阻害する因子を精製し、それがカイコ体液タンパク質 apolipoprotein (ApoLp) であると同定した。

### [本論]

#### 1. カイコ体液からの黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を阻害する因子の精製

修士課程において、私は、カイコの体液が黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を阻害する現象を見出している。私はカイコの体液から黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を阻害する活性を指標として、この因子の精製を行った (表 1)。Mono S カラムによる分画により得られた活性画分の比活性の上昇は 28 倍、活性の回収率は 59%であった。Mono S カラム画分をゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ、活性は約 300kDa の溶出画分に回収され、活性とタンパク質との挙動の一致がみられた。この活性画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ、220kDa と 74kDa のタンパ

ク質がみとめられた。N 末端配列から、これらのタンパク質はカイコの脂質輸送タンパク質である apolipoprotein-I (ApoLp-I) と apolipoprotein-II (ApoLp-II) と同定した。以上の結果は、カイコ体液中の ApoLp が溶血毒素産生阻害因子であることを示唆している。

表 1 カイコ体液中の黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を阻害する因子の精製

## 2. ApoLp は黄色ブドウ球菌の溶血毒素の発現を転写段階で抑制する

次に私は、ApoLp が黄色ブドウ球菌の溶血毒素をコードする遺伝子の発現を抑制しているかを検討した。α 溶血毒素をコードする *hla*、β 溶血毒素をコードする *hnb* の mRNA 量は、ApoLp 添加により、およそ 1/10 に低下した (図 1A)。さらに、*hla* のプロモーター活性は ApoLp 添加により低下した (図 1B)。以上の結果は、ApoLp が黄色ブドウ球菌による溶血毒素の発現を転写の開始段階で阻害することを示唆する。

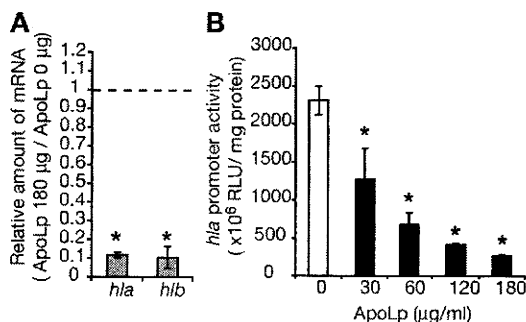


図1 ApoLp による溶血毒素をコードする遺伝子の発現抑制 (A) Buffer 添加群を 1 としたときの *hla*、*hnb* の mRNA 量比 (B) *hla* プロモーター活性 \*、 $p < 0.05$ 。

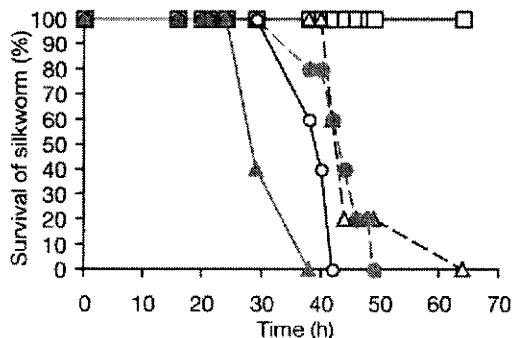


図2 抗 ApoLp 抗体によるカイコの感染抵抗性の低下 ●: WT + control IgG, ▲: WT + anti-ApoLp IgG, ○: Δ*hla* Δ*hnb* + control IgG, △: Δ*hla* Δ*hnb* + anti-ApoLp IgG

## 3. ApoLp はカイコの黄色ブドウ球菌に対する感染抵抗性に寄与する

次に、私は ApoLp がカイコの黄色ブドウ球菌に対する感染抵抗性の発現に寄与するかを検討した。カイコに黄色ブドウ球菌と抗 ApoLp 抗体、もしくは黄色ブドウ球菌とコントロール抗体をそれぞれ注射した。抗 ApoLp 抗体を注射したカイコにおいては、コントロール抗体を注射したカイコと比べて、カイコの生存時間が短縮した。一方、溶血毒素をコードす

Fraction	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
I Hemolymph	3500	8500	2.4	100	1
II Ammonium sulfate	3300	7900	2.4	93	1
III Phosphocellulose	92	6000	65	71	27
IV Mono S	75	5000	66	59	28

る *hla* と *hnb* を二重に破壊した黄色ブドウ球菌を注射した場合、抗 ApoLp 抗体を注射したカイコの生存時間の短縮はみられなかった (図 2)。以上の結果は、ApoLp が黄色ブドウ球菌の溶血毒素の産生を阻害し、カイコの黄色ブドウ球菌に対する感染抵抗性に寄与することを示唆する。

## 4. ApoLp は黄色ブドウ球菌のもつ 2 成分制御系 *sae* を介して溶血毒素の産生を阻害する

ApoLp が溶血毒素発現を促進する制御因子の発現を抑えるかを検討した。*sae* は病原性を制御する 2 成分制御系をコードし、溶血毒素をはじめとする細胞外毒素の産生に必須とされている。*agr* 遺伝子は機能性 RNA である RNAIII を

コードしており、溶血毒素の発現を正に調節することが報告されている。ApoLp 添加群において *sae* mRNA と RNAIII の量が減少した (図 3A)。

ApoLp による溶血毒素発現阻害に、*sae* と *agr* が必要であるかを知るために、*sae* と *agr* の遺伝子破壊株の ApoLp に対する感受性を調べた。*sae* 破壊株に ApoLp を添加しても *hla* と *hly* の発現は低下しなかった。一方、*agr* 破壊株は、ApoLp 添加により *hla* と *hly* の発現が低下した (図 3BC)。以上の結果は、ApoL による黄色ブドウ球菌の溶血毒素の発現阻害には *sae* が必要であることを示唆する。

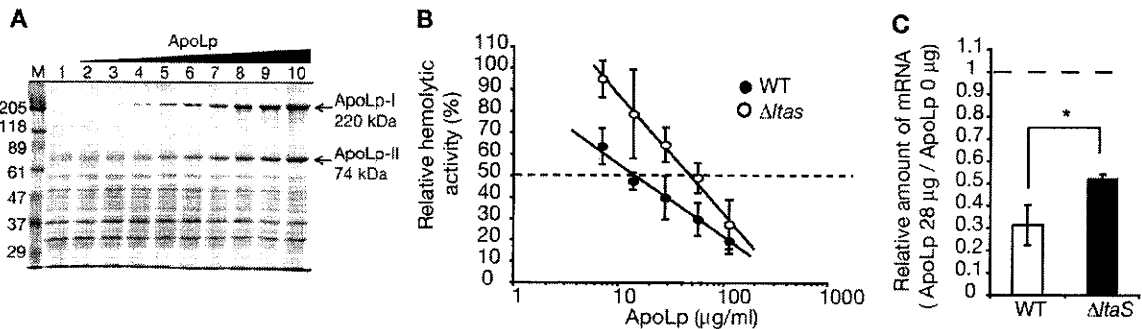


図4 ApoLp の LTA を介した *sae* の発現抑制 (A) ApoLp と共培養した黄色ブドウ球菌の菌体画分についての SDS-PAGE. Lane 2-10 が ApoLp 添加群 (B) ApoLp 添加時の *ltaS* 破壊株における溶血毒素産生 (C) Buffer 添加群を 1 としたときの *sae* の mRNA 量 \*,  $p < 0.05$ .

### 5. ApoLp はリポタイコ酸に結合し、2 成分制御系 *sae* の活性化を阻害する

ApoLp を黄色ブドウ球菌とインキュベートすると ApoLp は菌体画分に回収される (図 4A)。細菌表層を構成するリポタイコ酸(LTA)の添加により、ApoLp による黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生阻害効果が消失したが、ペプチドグリカン (PGN)の添加では、消失しなかった。以上の結果は、ApoLp が菌体の LTA と相互作用して溶血毒素産生阻害効果を示すことを示唆する。

そこで私は、黄色ブドウ球菌の LTA が ApoLp による黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生阻害に必要であるかを検討した。LTA の合成酵素をコードする *ltaS* を破壊した黄色ブドウ球菌は、野生株と比べて溶血毒素産生を阻害するのに必要な ApoLp の量が約 4 倍に増加した (図 4B)。さらに、*ltaS* 破壊株においては ApoLp による *sae* の発現低下の程度が減弱した (図 4C)。以上の結果は、ApoLp が LTA に結合することにより、2 成分制御系 *sae* の活性化を抑制し、溶血毒素の産生を阻害することを示唆する。

### 6. カイコの ApoLp の機能は哺乳動物の Mucin に保存されている

哺乳動物の Mucin はカイコの ApoLp とアミノ酸の一次配列上約 30% の相同性を示す領域をもつ。そこで、Mucin が黄色ブドウ球菌に対する溶血毒素の発現を抑えるかについて検討した。Mucin 添加により、黄色ブドウ球菌の *hla*、*hly*、および *sae* の発現が低下した (図 5A)。また、*hla* プロモーターの活性も低下した (図 5B)。以上の結果は、ApoLp による溶血毒素産生阻害効果が Mucin において保存されていることを示唆する。

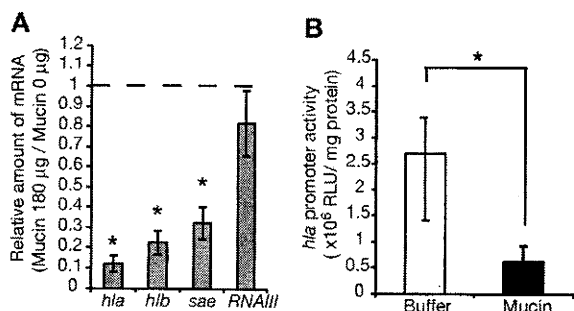


図5 プタ胃由来 Mucin による黄色ブドウ球菌の病原性抑制 (A) Buffer 添加群を 1 としたときの Mucin 添加群における各遺伝子の RNA 量 (B) Mucin 添加群の *hla* プロモーター活性 \*,  $p < 0.05$ .

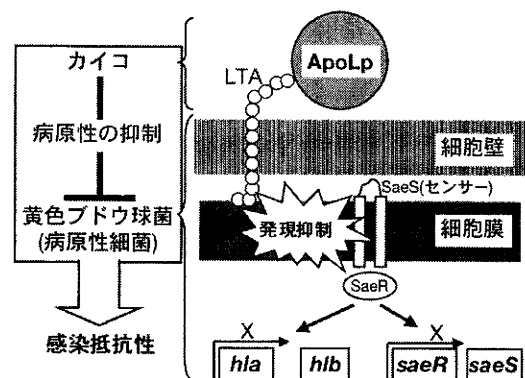


図6 モデル図

#### [結論]

本研究において私は、カイコ体液中の ApoLp が黄色ブドウ球菌の病原性抑制因子として、カイコの感染防御に寄与すること、ApoLp は細菌表層の LTA に結合し、*sae* 経路を不活性化することを明らかにした (図 6)。黄色ブドウ球菌の *sae* を標的とした病原性抑制因子は哺乳動物においても報告がなく、ApoLp は病原性抑制因子として新規の活性をもつ。これまでに、*sae* がコードしている2成分制御系のセンサーが認識している実体は不明であったが、私は LTA をその候補として提示した。また、ApoLp による病原性抑制効果は哺乳動物の Mucin に保存されていることを明らかにした。Mucin は粘液の主成分であり、ヒトの鼻腔粘膜は黄色ブドウ球菌が最も多く局在する場所でもある。粘膜組織に豊富に存在する Mucin が病原性抑制効果をもつことは、宿主が黄色ブドウ球菌へ抵抗性を示す上で有用であると考えられる。

#### [発表論文]

Hanada Y, Sekimizu K, and Kaito C. Silkworm Apolipoprotein Protein Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence.

*J Biol Chem.* 286: 39360-9. (2011)