

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 花田 雄一

黄色ブドウ球菌による感染は敗血症や髄膜炎などの重篤な疾患を引き起こすため临床上問題となる。黄色ブドウ球菌は宿主を障害する病原性細菌である一方で、健康人の約 30%の皮膚や鼻腔に存在する常在性細菌である。これらの結果から、宿主は黄色ブドウ球菌による病原性の発揮を抑えるしくみをもつと推察される。しかしながら、宿主が黄色ブドウ球菌の病原性を抑えるしくみは十分に理解されていない。したがって、そのしくみを分子レベルで明らかにすることは、感染症の発症メカニズムを理解し、新たな治療法を確立するために重要である。

黄色ブドウ球菌の産生する溶血毒素は、赤血球などの宿主細胞を破壊する病原性因子である。本研究では、昆虫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活性をもつことに着目し、本因子の精製に着手した。このカイコ体液を出発原料とした精製により、溶血毒素産生を阻害する活性の実体が Apolipoprotein-II/I (ApoLp) であることが明らかとなった。さらに、ApoLp は溶血毒素をコードする *hla* ( $\alpha$  溶血毒素)、*hly* ( $\beta$  溶血毒素) の遺伝子発現を抑制することを見出した。Apolipoprotein は昆虫の体液中に豊富に存在する脂質輸送タンパク質である。1969年に単離・精製されて以来、ApoLpの生理機能は広く研究されてきた。近年になり、ApoLpの免疫系への関与が着目されているが、ApoLpが細菌の病原性発揮に影響を与えるという報告例はない。本研究により見出された細菌による毒素産生を阻害する効果は、ApoLpのもつ新規機能ということができる。

ApoLpが黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を阻害することにより、宿主の感染防御に寄与するかを検討した。黄色ブドウ球菌の病原性評価モデルであるカイコ感染モデルを用いた。ApoLpに対する抗体を作用させたカイコは、コントロール抗体を作用させたカイコに比べて、黄色ブドウ球菌により殺傷されやすくなった。ApoLp抗体によりカイコの黄色ブドウ球菌の感受性が上昇したことから、ApoLpが黄色ブドウ球菌に対する感染防御に寄与することが示唆された。次に、溶血毒素遺伝子を破壊した黄色ブドウ球菌に対するカイコ感染実験を行った。その結果、溶血毒素遺伝子破壊株では、ApoLp抗体による黄色ブドウ球菌に対する感受性の上昇はみられなかった。これらの結果から、ApoLpは黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を抑えることにより、カイコの感染防御に寄与することがわかった。

黄色ブドウ球菌の溶血毒素遺伝子の発現は、*sae* (*Staphylococcus aureus* exoprotein expression)、*agr* (accessory gene regulator) という病原性制御因子により正に調節されることが報告されている。そこで、ApoLpが *sae*、*agr* の発現を抑えるかを検討した。*sae*、*agr* の mRNA 量をリアルタイム PCR により測定した。

その結果、ApoLp の添加群では Buffer 添加群と比べて、*sae*、*agr* の mRNA 量の低下がみとめられた。さらに、*sae* 破壊株では ApoLp による溶血毒素遺伝子の発現抑制効果が消失した。これらの結果から、ApoLp は *sae* 経路を不活性化することにより、溶血毒素遺伝子の発現を抑えることがわかった。

次に、ApoLp が *sae* 経路を抑制するメカニズムを解析した。本研究では、ApoLp が黄色ブドウ球菌に結合することに着目し、細菌表層の構成因子の中から ApoLp と結合する因子を探索した。その結果、リポタイコ酸が ApoLp と結合することを見出した。さらに、リポタイコ酸合成酵素をコードする *ItaS* 破壊株では親株と比べて、ApoLp による *sae* 経路の不活性化が減弱することがわかった。これらの結果は、ApoLp が細菌表層のリポタイコ酸を介して *sae* 経路を不活性化することを示唆する。これまでの研究では、*sae* を不活性化する宿主由来因子、ならびに *sae* 経路へのリポタイコ酸の寄与はわかっていない。したがって、本研究で見出された ApoLp による溶血毒素産生抑制反応は新規の病原性抑制メカニズムを提示する。

宿主が黄色ブドウ球菌の病原性を抑えるしくみを明らかにすることを目的とした本研究において、昆虫体液中の ApoLp が黄色ブドウ球菌の *sae* 経路を不活性化することにより溶血毒素遺伝子の発現を抑制する機序が明らかとなった。さらに、*sae* 経路の不活性化には細菌表層のリポタイコ酸への ApoLp の結合が寄与していることが示唆された。本知見は、黄色ブドウ球菌が疾患を誘起する上で重要な制御因子の発現を抑える新規の病原性抑制メカニズムを示すものである。これにより、これまでの殺菌的な治療法とは異なる、非殺菌的な治療法という新たなアプローチの可能性を示すものである。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。