

論文の内容の要旨

論文題目

糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性発現機構の解明

氏名 宮崎 真也

【序論】

糖尿病は慢性的な高血糖を主な特徴とする代謝性疾患である。糖尿病患者はヒトの常在菌である黄色ブドウ球菌を含む様々な細菌による感染症に罹患しやすくなる。糖尿病患者において細菌感染症により足部の壊疽や敗血症が重篤化するため、糖尿病患者の細菌感染症の克服は临床上、重要な課題となっている。しかしながら、細菌が糖尿病宿主に感染する分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。細菌が糖尿病状態の宿主に感染する機構を明らかにすることは、糖尿病患者の感染症の治療法や予防法の確立に貢献することが期待される。これまでに、私が所属する研究室では、無脊椎動物であるカイコを用いて、黄色ブドウ球菌、緑膿菌などの病原性細菌の感染モデルが確立されている。また、グルコースを多量に含む高カロリー餌の摂食により、カイコが高血糖になるカイコ高血糖モデルも確立されている。本研究において、私はカイコ感染モデルとカイコ高血糖モデルを組み合わせた高血糖カイコ感染モデルを確立し、これを用いて高血糖宿主に対する病原性に必要な黄色ブドウ球菌の遺伝子の同定と分子機構の解析を行った。

【結果と考察】

1. 高血糖カイコ感染モデルの確立

高血糖カイコが、糖尿病患者の感染症の原因となる病原性細菌による感染に感受性であるかを検討した。その結果、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、サルモネラ、リステリアの投与により高血糖カイコの半数が死亡するまでに有する時間は通常カイコより短いことが判明した (図 1A-D)。また、これらの菌が高血糖カイコの半数を殺傷するために必要な菌数 (LD₅₀) はいずれも通常カイコより低下していた (図 1E)。さらに、高血糖カイコは黄色ブドウ球菌の種々の臨床分離株 (MSSA : Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) による感染に対しても感受性であった (図 1F)。これらの結果は、高血糖カイコが様々な種類の病原性細菌による感染に対して、通常カイコより感受性であることを示唆している。

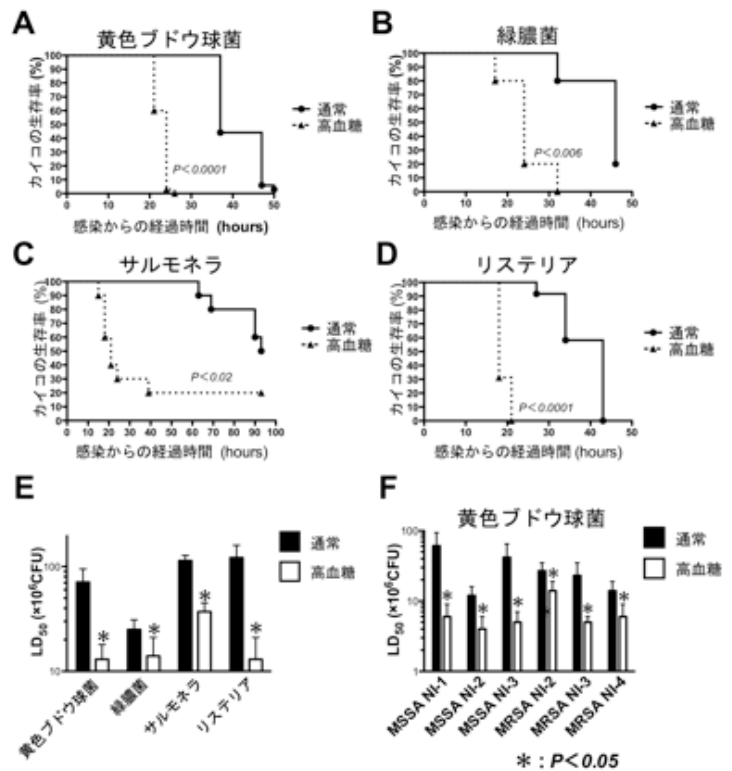


図 1 病原性細菌の高血糖カイコ殺傷能

2. 高血糖カイコに対する病原性に必要な黄色ブドウ球菌の遺伝子の同定

次に私は黄色ブドウ球菌の遺伝子欠損株ライブラリー200株を用いたスクリーニングにより、糖尿病宿主に対する病原性に必要な遺伝子の同定を試みた。菌体細胞へのヘム取り込みに関与する *iron-regulated surface determinant A (isdA)*、細胞内シグナル伝達分子である cyclic-di-GMP の生合成に関与するドメインを有している *GDEF domain containing protein from Staphylococci (gdpS)* に加えて、機能が未知の遺伝子 11 個が候補として挙げられた。私はこれらの黄色ブドウ球菌の機能未知遺伝子を *diabetic state dependent*

virulence factor in silkworm (ddv) A~K 遺伝子と命名した。候補遺伝子のうち、*isdA*, *gdpS*, *ddvA* に着目して、さらなる解析を行った。これらの遺伝子を欠損した株の高血糖カイコに対する LD₅₀ は野生株に比べて上昇していたが、通常カイコに対する LD₅₀ は野生株と同程度であった (図 2)。さらに *gdpS* 遺伝子、*ddvA* 遺伝子を導入することにより、*gdpS* 欠損株、*ddvA* 欠損株の高血糖カイコに対する病原性の低下は相補された。以上の結果は、*isdA* 遺伝子、*gdpS* 遺伝子、*ddvA* 遺伝子が高血糖カイコに対する病原性に必要であるが、通常カイコに対する病原性には必要でないことを示唆している。

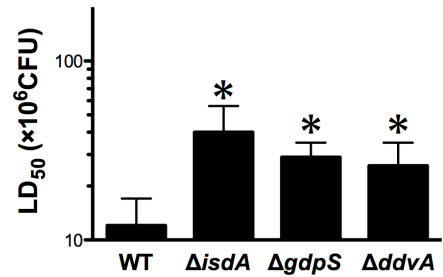


図 2 *isdA* 欠損株、*gdpS* 欠損株、*ddvA* 欠損株の高血糖カイコ殺傷能

3. 糖尿病マウスに対する病原性に必要な黄色ブドウ球菌の遺伝子の同定

次に私は *isdA* 遺伝子、*gdpS* 遺伝子及び *ddvA* 遺伝子が黄色ブドウ球菌の糖尿病マウスに対する病原性に必要であるかを検討した。その結果、*isdA* 欠損株、*gdpS* 欠損株及び *ddvA* 欠損株は糖尿病マウスに対する殺傷能が低下していることが判った (図 3)。

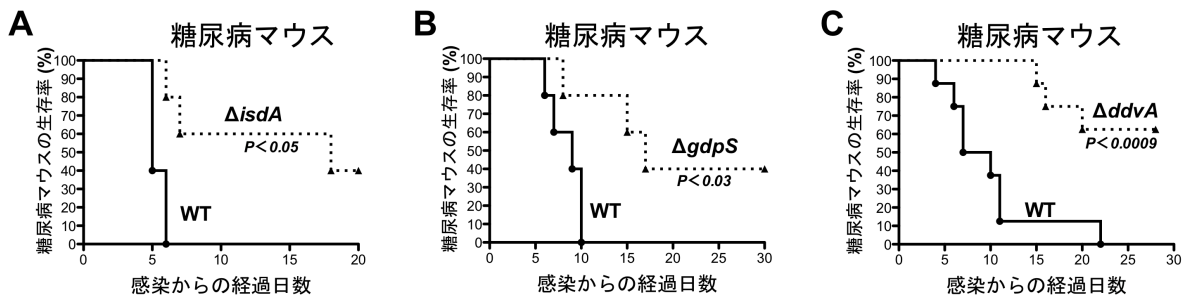


図 3 *isdA* 欠損株、*gdpS* 欠損株、*ddvA* 欠損株の糖尿病マウス殺傷能

4. 糖尿病宿主に対する病原性発現における細菌の Isd システムの役割

糖尿病状態により生じる宿主の変化に应答して作動する病原性発現システムを明らかにするために、私は *isdA* 遺伝子に着目して解析した。IsdA は、黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在するタンパク質であり、菌体外から菌の細胞膜近辺までのヘムの輸送に関与することが報告されている。ヘムの輸送は、IsdB, IsdC, IsdH といった Isd タンパク質から構成される Isd システムによってなされる。また Sortase A (SrtA) は Isd タンパク質を細胞壁に移行させる。IsdB, IsdC, IsdH, SrtA をそれぞれ欠損する黄色ブドウ球菌の高血糖カイコに対する LD₅₀ は上昇していたが、通常カイコに対する LD₅₀ は野生株と同程度であった (図 4AB)。加

えて、高血糖カイク感染時に黄色ブドウ球菌の *Isd* システムの発現が誘導されていた (図 4C)。さらに *isdA* 欠損株における高血糖カイク殺傷能の低下は、カイク血液中へのヘム (PPIX-Fe) の供給により抑圧された (図 4D)。ヘムの利用に関わるヘムトランスポーターである Heme transport system (HtsA) ならびにヘムの認識に関わる細胞膜受容体である Heme sensing system S (HssS) の欠

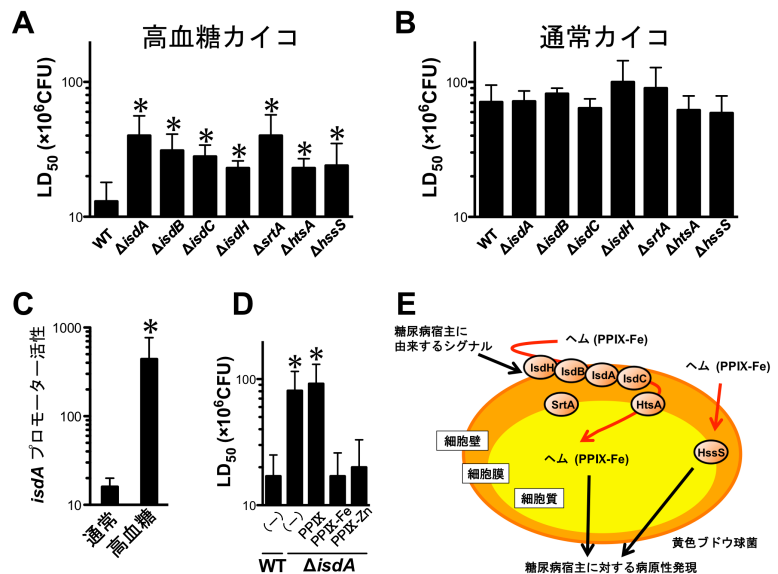


図 4 *Isd* システムの機能解析

損株も高血糖カイクに対する殺傷能が低下していた (図 4A)。以上の結果は *Isd* システムによるヘムの利用が黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性の発現に必要なことを示唆している。

【結論】

本研究において、私は初めて高血糖カイク感染モデルを確立した。さらに、この系を用いて糖尿病宿主に対する病原性に必要な細菌の遺伝子として *isdA* 遺伝子、*gdpS* 遺伝子及び *ddvA* 遺伝子を同定した。加えて *Isd* システムを介したヘムの利用が黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性発現に必要なことを私は明らかにした (図 4E)。宿主が糖尿病になったときの生理状態の変化に対応して、病原体がその感染システムを巧みに変化させることを示唆したのは本研究が初めてである。

【発表論文】

1. Miyazaki S, Matsumoto Y, Sekimizu K, Kaito C. *FEMS Microbiology Letters*. 2012 Jan;326(2):116-24.
2. Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga D, Shimizu K, Kawamoto S, Sekimizu K. *Journal of Applied Microbiology*. 2012 Jan;112(1):138-46.
3. Matsumoto Y, Xu Q, Miyazaki S, Kaito C, Farr CL, Axelrod HL, Chiu HJ, Klock HE, Knuth MW, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Sekimizu K, Wilson IA. *Structure*. 2010 Mar 14;18(4):537-47.
4. Usui K, Miyazaki S, Kaito C, Sekimizu K. *Microbial Pathogenesis*. 2009 Feb;46(2):59-62.