



| | |
|--------------|---|
| Title | Streptococcus pneumoniaeの定着機構ならびに抗貧食能の解析 |
| Author(s) | 山口, 雅也 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49758 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【27】

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | やま ぐち まさ や 山 口 雅 也 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (歯 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 2 2 8 4 9 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 21 年 3 月 24 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 歯 学 研 究 科 分 子 病 態 口 腔 科 学 専 攻 |
| 学 位 論 文 名 | Streptococcus pneumoniae の定着機構ならびに抗貧食能の解析 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 川 端 重 忠 (副査) 教 授 雫 石 聰 講 師 佐 藤 淳 講 師 仲 野 和 彦 |

論文内容の要旨

肺炎は、わが国の死亡原因の第4位を占める疾患である。重症肺炎を発症した後期高齢者から最も高頻度に分離される微生物が、*Streptococcus pneumoniae* である。したがって、高齢者人口の増加により、今後 *S. pneumoniae* 感染症が増加すると考えられている。しかしながら、*S. pneumoniae* は、ペニシリンをはじめとする化学療法剤に耐性を示す傾向が高まっている。これらのことから、病因論に基づく新たな予防法ならびに治療法の基盤となる *S. pneumoniae* の病原因子の解析が重要となっている。多くのレンサ球菌において、ヒトの細胞外マトリクスに結合する細菌由来のタンパクは、細胞への付着因子などの病原因子として働く。そこで、*S. pneumoniae* 感染の第一段階である菌の細胞付着に関する分子機構を解明するため、ヒトの細胞外マトリクスと結合する *S. pneumoniae* の菌体表層タンパクを同定し、分子生物学的・免疫学的な解析を試みた。

グラム陽性菌の菌体表層タンパクは、カルボキシル末端側のロイシン-プロリン-任意のアミノ酸-X-スレオニン-グリシン (LPXTG) モチーフを介して細胞壁に架橋する。そこで、新規の菌体表層タンパクを見出すため、*S. pneumoniae* R6 株のゲノムデータベースから、LPXTG 配列を含むオープンリーディングフレーム (ORF) を検索した。それらの中から推定シグナル配列を有し、カルボキシル末端側に LPXTG モチーフの存在する親水性の高い ORF を選出した。選出した ORF について、組換えタンパクおよび特異的抗血清を作製した。

作製した組換えタンパクを用いたリガンドプロット分析により、ヒト由来のプラスミン、プラスミノゲンおよびフィブロネクチンと結合する *S. pneumoniae* のタンパクを同定し、plasmin- and fibronectin-binding protein A (PfbA) と命名した。次に、*pfbA* 遺伝子の欠失株を作製し、標的タンパクの菌体表層における発現について、抗血清を用いた共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターにて観察したところ、PfbA が菌体表層に局在することが示された。そこで、蛍光標識したヒト細胞外マトリクスを用いたフ

ローサイトメトリ解析法で、野生株と遺伝子欠失株の生菌体表層におけるフィブロネクチン結合能を比較した。その結果、*pfbA* 遺伝子の欠失により、フィブロネクチンの菌体表層への結合能が低下することが明らかとなった。続いて、*S. pneumoniae* と、PfbA を標識した蛍光マイクロビーズを調製し、ヒト咽頭上皮細胞株および肺上皮細胞株への付着能・侵入能を測定した。*pfbA* 遺伝子欠失株のヒト咽頭由来の上皮細胞株および肺上皮細胞株への付着・侵入率は、野生株と比較して 50%に低下した。PfbA を固相化した蛍光マイクロビーズは、対照群の蛍光マイクロビーズと比較し、有意に多く肺上皮細胞へ付着することが示された。次に、*S. pneumoniae* のヒト末梢血中における抗食能を測定した結果、*pfbA* 遺伝子欠失株は、野生株と比較して培養 3 時間後に 57%まで低下した。また、抗 PfbA ウサギ IgG の添加により、非免疫ウサギ IgG を添加した場合に比べて、*S. pneumoniae* の血中生存率は培養 3 時間後に 50%低下した。同様の所見は、タイムラプス顕微鏡を用いたリアルタイム解析でも観察された。

以上の結果から、*S. pneumoniae* R6 株の菌体表層タンパク PfbA は、ヒト上皮細胞に対する付着・侵入因子であり、血中で抗食能を発揮する多機能タンパクであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、肺炎の主たる原因菌である *Streptococcus pneumoniae* から、新規菌体表層タンパク PfbA を同定し、さらに、PfbA の性状を詳細に解析したものである。すなわち、分子生物学的および生化学的手法に加え、バイオインフォマティクスならびにバイオイメージング技術を用いて、PfbA が複数のヒト宿主タンパクと結合し、*S. pneumoniae* のヒト上皮細胞への付着および侵入に寄与することを明らかにした。さらに、PfbA がヒト末梢血中において、*S.*

pneumoniae の抗食能を亢進させることも示した.

以上より, 本研究は博士 (歯学) の学位に値するものと認める.