OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Streptococcus pneumoniae のコリン結合タンパク質CbpJが肺炎発症に果たす役割の解析
Author(s)	後藤, 花奈
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72250
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（後藤　花奈）	
論文題名	*Streptococcus pneumoniae* のコリン結合タンパク質 CbpJ が肺炎発症に果たす役割の解析

【研究目的】

*Streptococcus pneumoniae*は，肺炎や敗血症の主たる原因菌として知られている．*S. pneumoniae* が産生するコリン結合タンパク質（Choline-binding protein : Cbp）は，細胞壁に含まれるホスホリルコリンへの結合を介して菌体表層に局在し，様々な生物学的機能や病原性に重要な役割を果たす．本研究では，コリン結合タンパク質のうち，詳細な機能が不明である CbpL および CbpJ に着目した．*S. pneumoniae* の病態形成に果たす役割を検証することを目的として，CbpL および CbpJ の機能解析を行った．

【材料および方法】

1. ゲノムデータベースを用いたコリン結合タンパク質の検索と遺伝子欠失変異株の作製

S. pneumoniae のゲノムデータベースより，コリン結合リピート配列を持つタンパク質を選出した．選出したコリン結合タンパク質のうち，これまでに詳細な機能が報告されていないCbpL および CbpJ について，シグナル配列および機能ドメインの検索を行った．さらに，*cbpL* 遺伝子および *cbpJ* 遺伝子について *S. pneumoniae* TIGR4株を親株として，相同組換えにより欠失変異株を作製した．

2. マウス感染実験

マウス肺炎モデルとして，3.0〜5.0 × 10^7 CFUのTIGR4野生株または遺伝子欠失変異株の菌懸濁液をマウスの鼻腔からそれぞれ感染させ，感染後14日間，12時間毎に生存状態を確認した．また，経鼻感染後24時間後に，マウスを安楽死させ，肺胞洗浄液または肺を採取した．採取した肺胞洗浄液は，段階希釈後，THY血液寒天培地に播種し，一晩培養して菌数を算定した．肺組織は，ヘマトキシリン・エオジン染色し，組織像を観察した．さらに，競合経鼻感染試験として *S. pneumoniae* 野生株および *ΔcbpJ* 株を混和した2.5 × 10^7 CFUの菌液を，麻酔下で経鼻感染させた．感染24時間後に肺胞洗浄液を回収し，菌数を算定した．

マウス敗血症モデルとして，6週齢の ICR 雌マウスに2.0 × 10^6 CFUの各菌株の菌懸濁液をマウスの尾静脈から感染させ，感染後14日間の生存状態を比較した．

3. 好中球殺菌試験

健常成人から分離した好中球もしくは好中球様に分化誘導させた HL-60 細胞と各菌株を MOI = 0.05となるように混和し，37℃，5% CO_2条件下で 1〜3 時間培養した．1 時間毎に培養液を THY 血液寒天培地に播種し，37℃で一晩培養し，生菌率を算定した．

4. マウス血液殺菌試験

マウスを安楽死させ，血液を採取した．180 μLの血液に各菌株 1.0 × 10^4 CFUを混和した．37˚C，5% CO_2存在下で 1

～3 時間培養し，生菌率を算定した．

5. ヒト血漿存在下における *cbpL* および *cbpJ* の転写量測定

血漿成分存在下における *cbpL* 遺伝子，*cbpJ* 遺伝子の発現量を比較するため，対数増殖期初期まで培養したTIGR4野生株を，ヒト血漿を0，10もしくは50％含むRPMI 1640培地に添加した．37℃，5% CO_2条件下で3時間後培養した後に全 RNA を抽出した. 得られた全 RNAについて逆転写反応を行い, 相補鎖 DNA を合成した. その後, 相補鎖 DNA を鋳型として，16S rRNA，*cbpL* および *cbpJ* に特異的なプライマーを用い，定量PCRを行った．得られた結果について，16S rRNAを内部標準遺伝子として用い，$\Delta\Delta C_t$ 法にて相対定量を行った．

【結果および考察】

S. pneumoniae TIGR4株のデータベースよりコリン結合リピート配列を持つタンパク質は 16 種類選出された．文献検索の結果，16 種類のコリン結合タンパク質のうち，CbpL および CbpJ の詳細な機能は不明であった．全ゲノムが解読されている *S. pneumoniae* において *cbpL*, *cbpJ* の各遺伝子の分布は 28 株中 28株，18 株に遺伝子が存在した．*cbpL* には 28 株中 7 株にフレームシフト変異が存在する一方で, *cbpJ* にはフレームシフト変異を持つ株は存在しなかった．

マウス肺炎モデルにおいて，TIGR4野生株感染マウスと比較して *ΔcbpJ* 株感染マウスの生存率は有意に上昇した．また, 肺胞洗浄液中の菌数は, 野生株感染マウスと比較して *ΔcbpJ* 株感染マウスで有意に減少した. 肺組織の HE 染色像において，野生株感染マウスは，著しい好中球の浸潤や出血を認めたが，*ΔcbpJ* 株感染マウスは野生株感染マウスと比較し，炎症性細胞の浸潤は軽度であった．一方で，*ΔcbpL* 株感染マウスの肺組織像の炎症度は，野生株感染マウスより弱く，*ΔcbpJ* 株感染マウスより強い炎症像を示した．さらに，競合経鼻感染試験においても，*ΔcbpJ* 株は野生株と比較し，肺胞洗浄液中の菌数は有意に少なかった．これらの結果から，*S. pneumoniae* の集団において，*cbpJ* を欠失した菌体が選択的に排除される可能性が示された．ヒト好中球および HL-60 細胞中における培養 1, 2, 3 時間後の生菌率を比較した結果, *ΔcbpL* 株および *ΔcbpJ* 株はすべての時点においてTIGR4野生株に比較し，有意に低い生菌率を示した．また，*ΔcbpJ* 株に組換え CbpJ を添加することで，*ΔcbpJ* 株の生菌率は，組換え CbpJ の濃度依存的に有意に上昇した．このことから，CbpJ が好中球に直接的に作用して殺菌能を抑制することが示唆された．

マウス敗血症モデルでは，TIGR4野生株感染マウスと比較して，*ΔcbpL* 株感染マウスおよび*ΔcbpJ* 株感染マウスの生存率に有意な差は認められなかった．マウス血液中では，野生株と比較し，培養1時間後のみで*ΔcbpJ* 株で有意に低い生菌率を示した．定量PCRの結果から，血漿成分存在下において，*cbpL* および *cbpJ* ともに転写量の有意な減少を認めた．このことから，血中において*cbpJ*, *cbpL* ともに発現量が低下し，病態形成に関与しない可能性が示された．

【結論】

S. pneumoniae のコリン結合タンパク質 CbpJ は，肺感染時に好中球による殺菌回避に寄与し，肺炎発症における病原因子として働くことが示唆された．一方で，CbpL は好中球からの殺菌回避に抵抗性を示すものの，マウス感染モデルでは病原性に有意な影響を与えなかった．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　後藤　花奈　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教　授	川端　重忠
	副 査　教　授	野田　健司
	副 査　准教授	久保庭　雅恵
	副 査　講　師	村上　智彦

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* のコリン結合タンパク質 CbpJ および CbpL に着目し，病原性に果たす役割を解析したものである．細胞株またはヒト正常細胞を用いた実験から，CbpJ および CbpL が好中球による殺菌からの回避に寄与する一方で，肺胞上皮細胞への付着因子としては働かない事が示された．また，マウス肺炎感染モデルの結果から，CbpJ は病原因子として働くが，CbpL は病原性に寄与しないことが示唆された．さらに，CbpJ および CbpL がマウス血流感染における病原性に寄与しないこと，血漿成分の存在により *cbpJ* 遺伝子および *cbpL* 遺伝子の発現量が低下することが示された．これらのことから，CbpJ が *S. pneumoniae* の肺感染時において，好中球の殺菌回避に寄与することで病原因子として働くことが示唆された．

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．