

氏 名 牛島 由理
 学位の種類 博士 (医学)
 学位記番号 博甲第 7840 号
 学位授与年月 平成 28 年 3 月 25 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 審査研究科 人間総合科学研究科
 学位論文題目 黄色ブドウ球菌の酸化ストレス応答における核様体ダイナミクス

主	査	筑波大学講師	博士 (理学)	小林 麻己人
副	査	筑波大学准教授	博士 (医学)	松坂 賢
副	査	筑波大学講師	博士 (医学)	田原 聡子
副	査	筑波大学准教授	博士 (工学)	奥脇 暢

論文の内容の要旨

(目的)

黄色ブドウ球菌は、ヒトの体表面（鼻腔内、皮膚など）に常在し、化膿症から敗血症などの致死的なものまで多様な感染症を惹起する、細菌性日和見感染の代表的な起因菌である。本菌は好中球やマクロファージなどの食細胞ファゴソーム内で長期生存する。ファゴソーム内で酸化ストレス等の殺菌因子に耐えて増殖することは感染を成立させるために重要な最初のプロセスである。本菌の核様体と環境適応・病原性との関係は不明な点が多い。本菌のみならず細菌の核様体構成成分のほとんどは分かっていない。また、本菌の場合は、酸化ストレス下で核様体を凝集するが、その意義は不明である。

本研究は、黄色ブドウ球菌の酸化ストレス応答において核様体がどのような役割を担うのか明らかにすることを目的とした。具体的には、1)酸化ストレス下、非ストレス下の黄色ブドウ球菌の核様体構成成分を明らかにすること、2)本菌の酸化ストレス耐性に必須の核様体凝集因子 MrgA(Metallo regulon gene A)による酸化ストレス耐性メカニズムを明らかにすること、の 2 点を目的とした。

(対象と方法)

1) 核様体構成成分の解明

黄色ブドウ球菌をはじめとする 4 種類の細菌（他は大腸菌、緑膿菌、枯草菌）の対数増殖期、定常期、酸化ストレス下の核様体を単離し、核様体上に局在するタンパク質 NAPs(Nucleoid-associated proteins)を液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS/MS)によって網羅的に同定した。

2) 核様体凝集因子 MrgA による酸化ストレス耐性メカニズムの解明

MrgA は多くの細菌で保存されている Dps ファミリータンパク質に属し、フェロキシダーゼ活性及び DNA 結合能を持つことが予想された。そこで、MrgA の機能を実験的に明らかにし、1) フェロキシダーゼ活性、及び、2) DNA 結合（こちらは MrgA の DNA 結合領域が特定できなかったため、MrgA のオーソログであり、DNA 結合領域が既知の大腸菌 Dps を代用した）の変異株を作製して酸化ストレス感受性試験を行った。

(結果と考察)

黄色ブドウ球菌をはじめとする 4 種類の細菌の核様体上に局在するタンパク質を csNAPs(contaminant-subtracted NAPs)として 700 種類以上同定した。csNAPs にはグローバル制御因子（局所的な転写制御に関わる転写因子ではなく、ゲノム各所に存在して多数の遺伝子発現に関わる因子）、酸化還元酵素、脂肪酸合成酵素が豊富に含まれていた。これらの特徴は、大腸菌、黄色ブドウ球菌で、対数増殖期、定常期を問わず共通しており、酸化ストレス下の黄色ブドウ球菌においても当てはまる特徴であった。しかし、個々の csNAPs については、菌種間及び対数増殖期と定常期の間で種類・量が異なっていた。黄色ブドウ球菌の酸化ストレス前後の csNAPs も種類・量が異なっていた。

核様体凝集因子 MrgA がフェロキシダーゼ活性及び DNA 結合能を持つことを明らかにした。MrgA は、核様体だけでなく、細胞質及び膜にも広く分布していた。フェロキシダーゼ活性が約半分に減少した変異株 (N315mrgA*) の過酸化水素(H₂O₂)感受性は、mrgA 欠損株と同程度に高かった。大腸菌 Dps は DNA 結合能を欠損させても黄色ブドウ球菌 mrgA 欠損株の H₂O₂ 感受性を回復した。

MrgA 依存的な酸化ストレス耐性メカニズムは、フェントン反応を介する場合(H₂O₂)においてフェロキシダーゼ活性部位の重要性が明らかになったが、黄色ブドウ球菌に特徴的な「酸化ストレスに応答した核様体凝集」の役割は、酸化ストレス耐性への寄与ではない可能性を示した。

(結論)

これまで不明であった細菌核様体の構成成分を核様体特異的タンパク質 csNAPs として明らかにし、それらは種類・量ともに菌種間で異なり、環境依存的にも変化することを明らかにした。csNAPs にグローバル制御因子、酸化還元酵素、脂肪酸合成酵素が含まれることは菌種、環境を問わず共通した特徴であった。また、黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に重要な MrgA は、核様体だけでなくその他画分にも分布する因子であった。MrgA の酸化ストレス耐性には Fe²⁺結合/フェロキシダーゼ活性部位が重要であり、DNA 結合能は重要でないことが強く示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、黄色ブドウ球菌を含む 4 種の細菌の核様体局在タンパク質の網羅的同定と解析を行ったものであり、特に、1) 核様体局在タンパク質が生育環境で変化することを明らかにした点と、2) MrgA の酸化ストレス耐性には Fe²⁺結合/フェロキシダーゼ活性部位が重要であり、DNA 結合能は重要でないことを示唆した点で、独創性のある優れた研究であると判断された。

平成 27 年 12 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を

審査様式 2 - 1

求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。