

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	小泉 祐真
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from furunculosis carrying two hyaluronate lyase genes, <i>hysA</i> and <i>hysB</i> (2つのヒアルロン酸リアーゼ遺伝子、 <i>hysA</i> および <i>hysB</i> を保有する癰腫症由来黄色ブドウ球菌)			
論文審査担当者			
主査	教授	小松澤 均	印
審査委員	教授	坂口 剛正	
審査委員	教授	太田 耕司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】臨床分離された黄色ブドウ球菌 202 株を対象とした比較ゲノム解析の結果、癰から分離された黄色ブドウ球菌株は高い割合でヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロン酸リアーゼ(<i>hys</i>)遺伝子を 2 つ保有することがわかった。黄色ブドウ球菌の保有する一般的なヒアルロン酸リアーゼ遺伝子を <i>hysA</i> と呼称するのに対し、その相同性から、2 つ目の <i>hys</i> 遺伝子を <i>hysB</i> と命名した。<i>hys</i> 遺伝子を 2 つ保有する癰由来黄色ブドウ球菌 JP025 株を用いて、<i>hysA</i> 遺伝子と <i>hysB</i> 遺伝子の酵素学的特徴および病態形成における寄与の違いを検討した。</p> <p>【方法】臨床分離された、<i>hys</i> 遺伝子を 2 つ(<i>hysA</i> および <i>hysB</i>)保有する癰由来黄色ブドウ球菌 JP025 株を実験に用いた。相同組換えを用いて <i>hysA</i> 遺伝子、<i>hysB</i> 遺伝子の片方若しくは両方を欠損した株を作製した。作製した株をヒアルロン酸含有培地に播種・培養し、形成された halo の直径を測定することで菌株におけるヒアルロン酸分解能を測定した。シグナルペプチドを除いた組換え HysA を精製し、酢酸ナトリウムバッファー中でヒアルロン酸と混和し、ヒアルロン酸分解能および至適 pH、酵素反応速度を測定した。ヒアルロン酸分解の作用様式を比較するため、Hys とヒアルロン酸を混和した後、ゲル浸透クロマトグラフィーにて分離分析を行い、得られた産物を分画し、ヒアルロン酸分解における主要な生成物を解析した。<i>hys</i> 遺伝子の発現量およびその時期を比較するため、各 <i>hys</i> の C 末端に His-tag を付加した JP025 株(JP025 His-<i>hys</i>)を作製し、JP025 His-<i>hys</i> 株を Trypticase soy broth (TSB)培地で培養後、His-tag 抗体を用いた Western blotting にて Hys の発現量を比較した。マウスの皮下感染モデルを用いた実験では、各 Hys の病態形成における機能を明らかにするため、蛍光タンパク質 GFP を形質転換した JP025 野生株および変異株を作製し、Hos:HR-1 マウスの右腋窩に感染させ、7 日毎の蛍光シグナルおよび潰瘍の大きさを測定した。また、感染初期における病態形成への寄与を比較するため、JP025 野生株および変異株を感染後、2 日目の組織を採取し、免疫組織化学染色およびフローサイトメトリー (FACS)解析、生菌率の測定を行った。免疫組織化学染色ではヒアルロン酸および黄色ブドウ球菌を染色した。FACS 解析では、Ly6G⁺、CD11b⁺細胞を好中球として分画した。生菌率の測定は、採取した組織をホモジネーションし、TSA プレート上で培養し、組織重量当たりの生菌数を測定した。</p>			

【結果】ヒアルロン酸含有培地を用いたアッセイでは、*hysB* 遺伝子を欠損させると halo の直径が有意に減少することが示された。精製した Hys を用いたヒアルロン酸分解能の差は、pH6.0 においては HysA の方が HysB に比べて、ヒアルロン酸分解能、ヒアルロン酸との親和性、酵素反応速度いずれにおいても高いことがわかったが、pH を酸性条件にしていくと HysB の方が、ヒアルロン酸分解能が高いことが示された。分離分析で示されたピークは HysA、HysB どちらも同様の傾向を示した。また、質量分析によって、主要なヒアルロン酸分解産物は 6 脱離した 4 糖であることが示された。発現量解析より、最終的な発現量は HysB が高いことが示された。In vivo においては、*hysA* 遺伝子を欠損させると感染後期の膿瘍・潰瘍の縮小化が、*hysB* 遺伝子を欠損させると潰瘍の形成の遅延、ヒアルロン酸分解量の減少傾向、生菌率の減少傾向が認められた。

【考察】各 Hys のヒアルロン酸分解能の至適 pH は異なるが、その分解様式は同じであることが示唆された、したがって、ヒアルロン酸含有培地を用いたアッセイにおいて *hysB* 遺伝子を保有すると halo の直径が有意に増大したのは、HysB の発現量が高いためであると考えられる。マウス感染モデルを用いたいずれの実験においても、*hysA* 欠損株で認められた結果は野生株に似た傾向を示したが、14 日目以降の膿瘍の治癒が早まる傾向を示した。これより、*hysA* 遺伝子が感染後期の潰瘍の形成に寄与していることが示唆された。また、免疫組織化学染色より、*hysB* を保有していれば組織中のほぼすべてのヒアルロン酸を分解できることが示された。一方で、*hysB* 欠損株では潰瘍形成の遅延傾向およびヒアルロン酸分解量の減少傾向、好中球遊走割合の減少が認められた。これより、*hysB* 遺伝子を保有することが感染初期の膿瘍の形成に関与していることが示唆された。生菌率が野生株および *hysA* 欠損株で多い傾向にあったのは、感染初期にヒアルロン酸を分解して栄養源としている、あるいは何らかの影響で phagocytosis が阻害されている可能性が考えられる。好中球の遊走割合は、野生株および *hysA*&*B* 欠損株では同様の結果が示されたため、*hysB* 欠損株で逆の結果が示された原因は明らかにはなっていない。これは *hysB* 遺伝子を欠損させた遺伝子配列の影響とも、ヒアルロン酸の主要な受容体である CD44 を介した好中球の遊走とは別の経路での好中球遊走が惹起されたとも考えられる。

以上の結果より、*hysA* 遺伝子が感染後期の、*hysB* 遺伝子が感染初期の病態の増悪化に関与していると結論付けた。

これらの研究成果は、癰由来黄色ブドウ球菌株に特徴づけられる遺伝子を明らかにし、それらの遺伝子について酵素学的特徴および病態形成への寄与を明らかにした点で評価される。

よって審査委員会全員は、本論文が小泉祐真に博士（歯学）の学位を授与するに十分価値あるものと認めた。