

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 学術 ）	氏名	杳野 祥子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目 Non-deacetylated poly- <i>N</i> -acetylglucosamine-hyperproducing <i>Staphylococcus aureus</i> undergoes immediate autoaggregation upon vortexing (非脱アセチル化ポリ- <i>N</i> -アセチルグルコサミンを過剰生産する黄色ブドウ球菌は、高速旋回を伴う攪拌によりすぐに自己凝集を引き起こす)			
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>【背景と目的】黄色ブドウ球菌は様々な感染症を引き起こすが、その中でも慢性的な感染症としてカテーテル血流感染症や骨髄炎、心内膜炎といったバイオフィルム感染症が挙げられる。バイオフィルムとは、生成した細胞外高分子物質のマトリックスに細胞が埋め込まれ、互いまたは表面に付着した微生物群集のことである。黄色ブドウ球菌のバイオフィルムは、高分子多糖類であるポリ-<i>N</i>-アセチルグルコサミン（PNAG）が主成分であり、これを合成し細胞外に分泌する主要な機構として <i>icaADBC</i> オペロンが知られている。IcaB は PNAG を部分的に脱アセチル化することで正に帯電させ、負に帯電した細胞表面と相互作用することでバイオフィルム構造体として機能する。Yu らは以前、バイオフィルムの新しい制御因子（Rob）を報告し、Rob が <i>icaA-icaR</i> 間の遺伝子間領域に存在する固有の 5bp モチーフ、TATTT に結合することを明らかにした (Yu L. et al mBio 8(1):e02282-16, 2017)。5bp モチーフの欠失は、過剰な付着性バイオフィルムの形成を誘導するが、5bp モチーフの真の機能はまだ不明である。興味深い事に、5bp モチーフ欠失変異体（$\Delta 5bp$）を作成する過程で、いくつかの非付着性変異体を単離した。これらは、濁ったブロス振とう培養では正常に増殖したが、弱い攪拌ですぐに自己凝集し、塊として沈降し、透明な上清を得た。全ゲノム解析から、その特異な $\Delta 5bp$ には、5bp モチーフの欠失に加え、<i>icaB</i> 遺伝子にも変異があることを見出し、この株の名前を $\Delta 5bpBm$ と名付けた。本研究では FK300$\Delta 5bpBm$ の凝集メカニズムの解明を主な目的とした。</p> <p>【方法】黄色ブドウ球菌の自己凝集とバイオフィルム形成に及ぼす <i>icaB</i> の影響の検討：FK300 を標準株 (WT) として、各バイオフィルム阻害因子（5bp モチーフ、<i>icaR</i>、<i>rob</i>）と <i>icaB</i> の二重欠損株を作成し、凝集の有無と固着性バイオフィルム形成について調査した。また、Real-time PCR を用いて各高バイオフィルム産生株（$\Delta icaR$、$\Delta 5bp$、Δrob）における <i>ica</i> オペロン発現量比較を行った。各株の培養上清と細胞表面から分取した試料についてそれぞれ抗 PNAG 抗血清を用いたドットプロットを行い、PNAG の局在を確認した。</p> <p>細胞の自己凝集を引き起こした物質の調査：凝集の原因物質の所在を明らかにするため、培養上清と菌体を入れ替えての培養攪拌実験と電子顕微鏡像の撮影を行った。$\Delta 5bp\Delta icaB$ の培養上清から得られた菌体を含まない自己凝集体を精製し、元素分析を行った。HPLC を用いて採取した WT と $\Delta 5bp\Delta icaB$ 上清の各分画で、ア</p>			

ミノ糖の比色定量と抗 PNAG 血清ドットプロットを行った。バイオフィーム産生株の表層より抽出した PNAG を比較対象とし、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の上清中のポリマーについて質量分析 (MS) を用いて解析した。

【結果・考察】各バイオフィーム産生株から更に *icaB* を欠損させた二重欠損株では、作成した 3 株全てで固着性バイオフィームが形成されなかった。攪拌実験においては、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ では $\Delta 5bpBm$ と同様の凝集現象が確認されたが、 $\Delta icaR\Delta icaB$ や $\Delta rob\Delta icaB$ 変異体では観察されなかった。これは real time PCR による *icaA* の発現量比較の結果、 $\Delta 5bp$ における *icaA* の発現量は、 Δrob や $\Delta icaR$ における発現よりもはるかに高かったことから、*icaADBC* オペロンの発現量の差によるものではないかと考えられた。この結果は、抗 PNAG 血清ドットプロットにて培養上清中の PNAG 生産量を調べた結果とも一致した。

凝集の原因となる物質の局在を確認するため、WT、 $\Delta 5bp$ 、または $\Delta 5bp\Delta icaB$ の各培養上清と菌体を入れ替えて再懸濁し、攪拌凝集実験を実施した結果、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の培養上清を用いたもののみ自己凝集が確認できた。また、透過型電子顕微鏡を用いて観察した像では、 $\Delta 5bpBm$ の周囲に WT の周囲より多くのひも状の物質が観察された。これらの結果から、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の上清中にその凝集原因物質が存在することが示唆された。凝集原因物質の成分を明らかにするため、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の培養上清から得られた自己凝集体の元素分析を行った結果、炭素、酸素、窒素の比率が PNAG と類似していることが示唆された。WT と $\Delta 5bp\Delta icaB$ 上清について HPLC で得た各分画においてアミノ糖の比色定量と抗 PNAG 血清ドットプロットを行った結果、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の加水分解サンプルにおいてのみアミノ糖の幅広いピークが確認され、またこのピークは抗 PNAG 血清ドットプロットの強いシグナルが観察された $\Delta 5bp\Delta icaB$ 上清の HPLC 分画と一致していた。これらは自己凝集に関与する因子は、*N*-アセチルグルコサミンポリマーであることが強く示唆していた。最後に、質量分析 (MS) を用いた解析により、バイオフィーム産生株から採取した PNAG では、*N*-アセチルグルコサミン分子に対応する一定間隔の MS シグナルの他に部分脱アセチル化ポリマーに対応するシグナルがいくつか観測されたが、 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の培養上清から回収したポリマーは、*N*-アセチルグルコサミンに対応するシグナルしか認められず、脱アセチル化断片に対応するシグナルは認められなかった。これらの結果は、FK300 $\Delta 5bp\Delta icaB$ の上清中に存在する PNAG は脱アセチル化されていない PNAG であることを明確に示した。

以上の結果から、本論文は *icaR-icaA* 間の遺伝子間領域に存在する TATTT モチーフと IcaB 機能の両方を欠く株が、培養上清中に非脱アセチル化 PNAG ポリマーを大量に生成し、これが攪拌という物理的刺激によって自己凝集を起こし、塊を形成することを明らかにした点で高く評価される。また、研究内容はすでに査読を伴う学術雑誌に掲載されている (Kutsuno et al. *Frontier in Microbiol* vol 13 2022 <http://doi.org/10.3389/fmicb.2022.110545>)。このことから本審査委員会は、用いられた手法の的確性、結果から導かれた考察と結論の妥当性はいずれも適切であると判定し、本学位申請論文が、沓野 祥子に博士 (学術) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。