

論文の内容の要旨

論文題目：黄色ブドウ球菌の N-acetylglucosamine
malate 脱アセチル化酵素を介した
糖尿病宿主に対する病原性発揮機構の解明

氏名 石井 雅樹

【導入】

糖尿病は慢性的な高血糖を示す疾患である。その患者数は全世界で 3.8 億人を越え、現在も増加し続けている。糖尿病患者は感染症を併発することが知られており、その予防法および治療法の確立は重要である。黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚や鼻腔に存在する常在菌である。黄色ブドウ球菌が健常人において重篤な感染症を発症することは稀であるが、糖尿病患者では敗血症、心内膜

炎、足部潰瘍などの侵襲性の感染症を引き起こす。病原性細菌の病原性を発揮する機構を理解し、それを担う分子（病原性因子）の機能を知ることは感染症の予防法および治療法を確立するために重要である。宿主環境中での増殖に必要な病原性因子は新規治療薬の標的となると期待される。さらに、病原性因子のタンパク質としての酵素活性を研究することは、その因子の病原性発現における働きを理解するばかりでなく、活性の阻害を指標とした新規治療候補化合物のスクリーニング系の構築にも有用である。当研究室では、カイコを用いた糖尿病モデル並びに様々な病原菌による感染症モデルを確立している。さらに、糖尿病カイコ感染モデルを確立し、糖尿病宿主感染に必要な黄色ブドウ球菌の遺伝子を複数同定することに成功している。私は、同定された黄色ブドウ球菌の機能未知遺伝子の1つである *ddvA* (diabetic state-dependent virulence factor against silkworm A) についての、遺伝学的、生化学的解析により、*ddvA* 遺伝子を介した糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性発揮機構の分子レベルでの理解を目的として、本研究に取り組んだ。

【結果】

1. 糖尿病宿主に対する病原性に必要な黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子は GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素をコードする

黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子破壊株は野生株に比べて糖尿病カイコに対する病原性が低下している（図1）。黄色ブドウ球菌の *DdvA* タンパク質のアミノ酸配列は枯草菌の N-acetylglucosamine malate (GlcNAc-mal) 脱アセチル化酵素と 49%の相同性を有している。 [¹⁴C] N-アセチルグルコサミン含有培地で培養した黄色ブドウ球菌の野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分を TLC で展開後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、*ddvA* 遺伝子破壊株では GlcNAc-mal が蓄積していることが判明した（図2）。

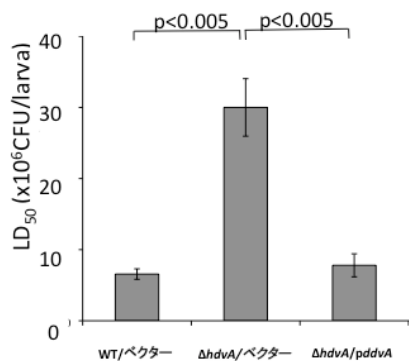


図1 黄色ブドウ球菌 $\Delta ddvA$ 株に *ddvA* 遺伝子を導入した株の糖尿病カイコに対する病原性
縦軸は菌をカイコに投与してから 24 時間後に 50% のカイコを殺すのに必要な菌数を示す。



図2 $\Delta ddvA$ 株の細胞質画分における GlcNAc-mal の蓄積
黒矢印は GlcNAc-mal、白矢印は未同定の N-アセチルグルコサミン誘導体。

さらに黄色ブドウ球菌の野生株の細胞質画分には脱アセチル化酵素活性を見出した。一方、*ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分にはこの活性は検出されなかった。さらに、*ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分にリコンビナント DdvA-His タグ融合タンパク質 (DdvA-His)を添加すると GlcNAc-mal 脱アセチル化活性が検出された (図3)。

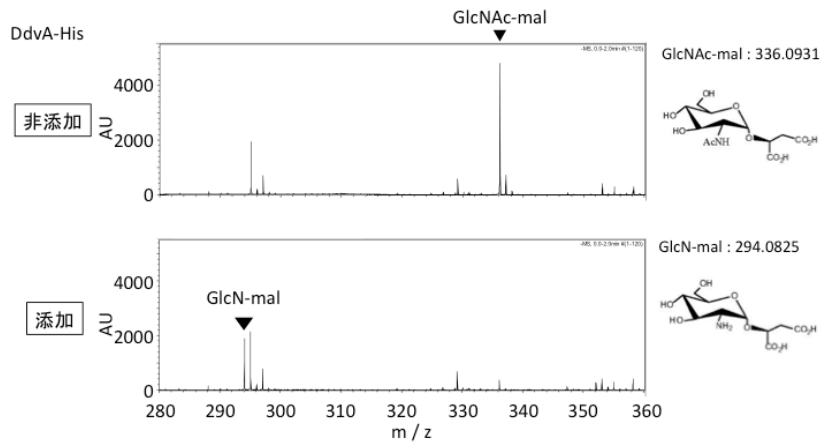


図3 $\Delta ddvA$ 株の細胞質画分への DdvA-His タンパク質の添加による GlcNAc-mal 脱アセチル化活性。GlcNAc-mal と $\Delta ddvA$ 株の細胞質画分に DdvA-His タンパク質を非添加 (上図) もしくは添加 (下図) 条件で反応させ、反応産物を ESI-MS により分析した。

2. 黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性には二価金属が必要である

枯草菌と同じ属の細菌である炭疽菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素の活性の発現には二価の金属イオンが必要であることが報告されている。私は、黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分にリコンビナント DdvA-His タグ融合タンパク質 (DdvA-His)を添加することにより見出される酵素活性が二価金属イオンのキレート剤である 1,10-フェナントロリンにより消失することを見出した。DdvA タンパク質の一次構造から金属の配位に必要と推測されるアミノ酸 (13番目の H) を置換した変異型 DdvA タンパク質は *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分添加条件で GlcNAc-mal 脱アセチル化活性を示さなかった (図4)。さらにこの変異 *ddvA* 遺伝子を有する黄色ブドウ球菌は、野生株よりも病原性が低下していることをカイコの糖尿病感染モデルで確認した。

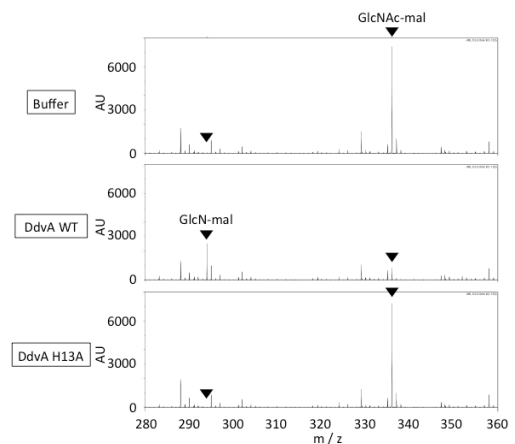


図4 $\Delta ddvA$ の細胞質画分への変異型 DdvA-His タンパク質の添加による GlcNAc-mal 脱アセチル化活性。GlcNAc-mal と $\Delta ddvA$ の細胞質画分に DdvA-His を非添加 (最上段)、添加 (中段) もしくは DdvA H13A を添加 (最下段) した

3. Dbp タンパク質は DdvA タンパク質の GlcNAc-mal の脱アセチル化活性に必要な因子である

DdvA-His リコンビナントタンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化活性には *ddvA* 遺伝子破壊株の細

胞質画分が必要である。私は *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分中に存在する GlcNAc-mal 脱アセチル化活性に必要な因子の同定を試みた。DdvA-His と *ddvA* 破壊株の細胞破碎液をプルダウンアッセイに供した結果、約 13kDa の分子量を有するタンパク質が見出された。このタンパク質を peptide mass fingerprinting 解析に供した結果、黄色ブドウ球菌のゲノム上にコードされる機能未知タンパク質の部分配列に一致した。私はこのタンパク質を DdvA binding protein (Dbp) と命名した。*dbp* 遺伝子は黄色ブドウ球菌のゲノム上で *ddvA* 遺伝子の上流に隣接しており、オペロンを形成している。Dbp と GST を融合させたリコンビナントタンパク質を作成し、DdvA-His と混合して、GlcNAc-mal の脱アセチル化活性を検討したところ、GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性が見出された (図 5)。さらに黄色ブドウ球菌の *dbp* 遺伝子の欠損株は、糖尿病カイコに対する病原性が低下していた (図 6)。

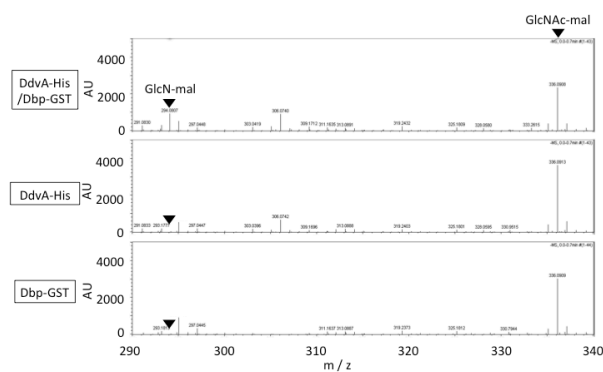


図 5 DdvA-His 及び Dbp-GST の添加による GlcNAc-mal 脱アセチル化活性
GlcNAc-mal に DdvA-His/Dbp-GST (最上段)、DdvA-His (中段) もしくは Dbp-GST (最下段) を添加した条

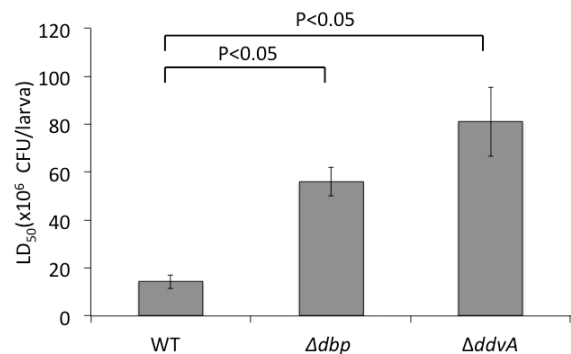


図 6 *Δdbp* 株の糖尿病カイコに対する病原性
縦軸は菌をカイコに投与してから 24 時間後に 50% のカイコを殺すのに必要な菌数を示す。

【総括】

糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性因子である DdvA と Dbp タンパク質は GlcNAc-mal を脱アセチル化する反応を触媒する酵素のサブユニットである。本酵素は、糖尿病に併発する黄色ブドウ球菌感染症の新規治療標的となると期待される。

【文献】

Matsumoto Y, Ishii M, Hayashi Y, Miyazaki S, Sugita T, Sumiya E, Sekimizu K (2015) Diabetic silkworms for evaluation of therapeutically effective drugs against type II diabetes. *Scientific Reports* 5:10722

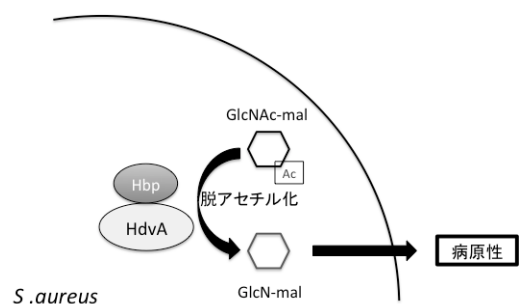


図 7 黄色ブドウ球菌の DdvA-Dbp 複合体の病原性発揮機構