

審査の結果の要旨

氏名 犬飼 達也

本研究は、肺アスペルギルス症の主な原因菌である *Aspergillus fumigatus* の分泌タンパク質に着目して、未解明である血清存在下における菌糸生育機構の解明を目的に、血清中の増殖に必須な遺伝子の同定および増殖制御に関与する血清成分の精製を試み、以下の結果を得ている。

1. 分泌タンパク質 B11b をコードする *B11b* 遺伝子の破壊株は、ウシ胎児血清 FBS 存在下での生育能が著しく低下することを示し、血清存在下の生育に必須な因子であることを明らかとした。
2. FBS 添加条件における本菌の *B11b* 遺伝子は、FBS 非添加条件と比べて発現量が約 4 倍増加し、B11b タンパク質は菌体外に分泌されることを示した。さらに、分泌した B11b タンパク質を含む FBS 存在下の培養液上清を用いて *B11b* 遺伝子破壊株を培養すると菌糸生育が復帰することから、分泌 B11b タンパク質が血清存在下の菌糸生育を可能にする役割を有することが示唆された。
3. 侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルを用いた感染実験および病理解析により、*B11b* 遺伝子破壊株の感染マウス群では親株感染マウス群と比較して生存率が上昇し、*B11b* 遺伝子破壊株の肺臓器内の菌糸増殖能が乏しいことが観察されたことから、B11b が宿主での増殖に関与し、病原性に影響を与える因子であることを明らかとした。
4. マイクロアレイ解析により、親株で FBS 添加によって 2 倍以上増加する遺伝子のうち、*B11b* 遺伝子破壊株では増加が見られない遺伝子が 111 個確認された。111 個の遺伝子の中からシグナルの強度および RT-PCR 解析により 23 遺伝子を選抜し、それぞれの遺伝子破壊株を作製して FBS 存在下での生育を観察したところ、*Gis5*, *Gis22*, *Gis32* 遺伝子それぞれが本菌の血清存在下の菌糸生育に必須であることを同定した。
5. *B11b* 遺伝子破壊株において *Gis5*, *Gis22*, *Gis32* 遺伝子それぞれを恒常的に発現する株 oxGIS5, oxGIS22, oxGIS32 株を作製し、どの株においても FBS 中での生育が復帰することを示し、*B11b* 遺伝子破壊株の血清存在下の菌糸生育低下の原因が *gis5*, *gis22*, *gis32* 遺伝子の発現低下であることを明らかとした。さらに、リアルタイム RT-PCR

による発現定量解析により、FBS 添加により *B11b* が誘導され、*Gis5*, *Gis22*, *Gis32* の順に発現誘導されることを示した。

6. *gis5*, *gis22*, *gis32* 遺伝子破壊株それぞれを、病態モデルマウスに感染させても生存率の低下は観察されなかったことから、これらの因子全てが病原性に関与することを明らかとした。
7. 血清をクロロホルム・メタノール混合液で分画し、*B11b* 遺伝子破壊株に供したところ水層画分において生育阻害が観察されたことから阻害物質が水溶性物質であることを明らかとした。水層画分に含まれる阻害物質は、熱処理およびプロテアーゼ処理に耐性を示し、HPLC により逆相カラムを用いて生育阻害物質を単一のピークにまで精製した。

以上、本論文は *A. fumigatus* が血清存在下で *B11b* 遺伝子を発現誘導し、菌体外へと分泌することで血清存在下の菌糸生育を可能にするメカニズムを明らかとした。*B11b* の機能に関連すると考えられる血清存在下で菌糸生育に必須な因子 *GIS5*、*GIS22*、*GIS32* を同定し、*B11b* が *Gis5*、*Gis22*、*Gis32* 遺伝子の発現を誘導することで血清中の増殖を可能にし、さらにこれらの因子全てが病原性に関与することを明らかとした。本研究は、*A. fumigatus* の血清存在下での生育機構が病原性に寄与するという新しい知見を示し、アスペルギルス症の宿主環境における感染メカニズムの解明に重要な貢献を果たすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。