

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域感染生体防御学教育研究分野 氏名 石合 崇人
<p>(論文題目) Extracellular vesicles of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> downregulate pyruvate fermentation enzymes and inhibit the initial growth of <i>Staphylococcus aureus</i> (緑膿菌由来細胞外小胞による黄色ブドウ球菌のピルビン酸代謝酵素活性阻害効果及びその増殖抑制作用に関する研究)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>黄色ブドウ球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)はグラム陽性球菌で、ヒトの皮膚等に存在する常在細菌としてよく知られており、薬剤耐性株であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA: Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)の出現は臨床上問題になっている。一方、緑膿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)はグラム陰性桿菌で、水環境周辺に存在する自然環境常在細菌として知られているが、高齢者や免疫抑制剤投与中の患者などの易感染性宿主において難治性感染を引き起こすことがある。黄色ブドウ球菌と緑膿菌は慢性創傷部位や嚢胞性肺線維症において頻繁に共感染する日和見感染菌としてよく知られており、共存することによって互いの増殖を制御することや、病原性が増強することが知られている。これまでの研究で、緑膿菌から分泌される細胞外分泌物が黄色ブドウ球菌の増殖や病原性に影響を与えることが報告されているが、その詳細なメカニズムは未だに明らかになっていない。細菌が細胞外に分泌する構造物の1つに、細胞外小胞(Extracellular membrane vesicle)がある。細胞外小胞は細菌由来の分子を保有し、細菌間相互作用に関与していることが近年明らかになってきた。さらに、細胞外小胞を介した菌体間相互作用は共存する細菌の増殖や病原因子を制御することが注目されている。そこで本研究では、緑膿菌由来細胞外小胞(PaEVs)が黄色ブドウ球菌の増殖に与える影響について検討を行った。</p> <p>緑膿菌培養上清から密度勾配超遠心法によって PaEVs を精製し、電子顕微鏡で確認した。さらにナノ粒子マルチアナライザーを用いて PaEVs の粒子径を測定したところ、平均粒子径が 115 nm であった。PaEVs に含有されているタンパク質をプロテオーム解析法によって解析したところ、プロテアーゼや外膜タンパク質を含む 57 種類のタンパク質が同定された。次に PaEVs の黄色ブドウ球菌に対する増殖への効果を確認したところ、鉄キレート効果に依存することなく黄色ブドウ球菌の増殖を抑制することが示された。さらに、この増殖抑制効果が殺菌的か静菌的かを検証するために PaEVs を作用させた黄色ブドウ球菌について、生菌と死菌を各々蛍光色素で染色し、生菌と死菌の比率を算出したところ、PaEVs 作用群と対照群の生菌と死菌の比率が同等であった。このことから、PaEVs は黄色ブドウ球菌に対して殺菌的ではなく、静菌的に働いていることが明らかになった。この増殖抑制効果は MRSA においても確認されたが、アシネトバクター、腸球菌、ネズミチフス菌、大腸菌、リステリア、カンジダでは確認されなかった。これらの結果から、PaEVs の増殖抑制効果は、黄色ブドウ球菌に対して特異的であることが示唆された。PaEVs による黄色ブドウ球菌増殖抑制効果をさらに詳細に分析するために、PaEVs を作用させた黄色ブドウ球菌と未作用の同菌からタンパク質を抽出し、PaEVs 作用後に変動のあったタンパク質を LC-MS/MS 法により解析した。その結果、PaEVs を作用させた黄色ブドウ球菌において、ピルビン酸代謝関連酵素である乳酸脱水素酵素 2 とギ酸アセチルトランスフェラーゼの発現が有意に減少していた。同様に、黄</p>	

色ブドウ球菌において、乳酸脱水素酵素 2 をコードする *ldh2* 遺伝子とギ酸アセチルトランスフェラーゼをコードする *pflB* 遺伝子の遺伝子発現を RT-qPCR 法により解析したところ、PaEVs を作用させた黄色ブドウ球菌では、これらの遺伝子発現が有意に減少していた。乳酸脱水素酵素とギ酸アセチルトランスフェラーゼはピルビン酸を基質とした代謝反応に関与することから、ピルビン酸を添加した条件における PaEVs の黄色ブドウ球菌への作用を調べたところ、ピルビン酸添加後は増殖抑制効果を示さなかった。さらに、これらの酵素が嫌氣的条件下で作動する酵素であることから、好氣的条件における PaEVs の黄色ブドウ球菌への効果を観察したところ、嫌氣的条件で見られた増殖抑制効果は確認することができなかった。このことから、PaEVs の増殖抑制効果は、ピルビン酸と酸素を補充することによって相殺されることが明らかになった。これらの結果により、PaEVs は、嫌氣的代謝におけるピルビン酸の代謝を阻害することで黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

以上の結果から、本研究では、日和見感染症起因菌として高頻度で共存する黄色ブドウ球菌と緑膿菌の菌体間相互作用において、PaEVs が黄色ブドウ球菌の嫌氣的代謝に関わるピルビン酸代謝を阻害することで増殖抑制効果を示すことが初めて明らかになった。本成果は細胞外小胞を介した細菌間相互作用の詳細なメカニズムの解明に有益な知見をもたらすと考えられる。また、本研究結果を基に、PaEVs に含まれる黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する分子とその機序を特定することができれば、今後 MRSA を含む黄色ブドウ球菌感染症の新しい治療手段への応用が期待される。