

学 位 論 文 要 旨

氏名 仲村 岳真

題 目 : Study on the crucial factors related to the pathogenicity and transmission of *Francisella tularensis*.
(野兎病菌の病原性と伝播を決定する重要因子に関する研究)

論文要旨 :

野兎病菌 (*Francisella tularensis* subsp. *tularensis*) は、グラム陰性の通性細胞内寄生菌であり、人に対して致死的な疾患「野兎病」を引き起こす原因細菌である。野兎病菌は自然界においては野ウサギやげっ歯類によって保有されており、同時に節足動物からも分離されることから、主に哺乳類を中心とする野生動物と節足動物によって生活環が維持されていると考えられている。現在、野兎病菌の自然界における維持、またヒトに対する病原性の具体的なメカニズムについては、未だ十分な知見が蓄積されていない。本研究ではこれらの特性における重要な因子を網羅的に探索し、野兎病菌の伝播や病原性の解明を試みた。

本研究室では以前の研究で、野兎病菌の亜種である *F. tularensis* subsp. *holarctica* Live Vaccine Strain (LVS) および *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) の 2 種を用いて、カイコ (*Bombyx mori*) を野兎病菌の節足動物感染モデルとして確立し、*Francisella* の節足動物への適応に関する興味深い知見を得ている。LVS は感染したカイコを死亡させることなく共生関係を構築していたのに対し、*F. novicida* は感染したカイコを死亡させた。こうした表現系の相違は、*Francisella* 亜種間の宿主適応能の差異を反映していると考えられ、その解明は自然界における *Francisella* の維持に関する重要な示唆を与えうる。第 1 章では、節足動物において *F. novicida* が増殖するために必要な因子の同定を試みた。まず、*F. novicida* のトランスポゾンランダム変異株ライブラリを構築し、感染カイコの生死によるスクリーニングを行った。約 750 株規模の変異株ライブラリをスクリーニングした結果、*F. novicida* のカイコ体内における増殖に重要な因子として 7 つの遺伝子が同定された。このうち、ペプチドグリカンの分解に関与する *mltA* 遺伝子に着目し、詳細な解析を試みた。*mltA* 遺伝子を欠損させた *F. novicida* は野生型株と比較して感染カイコの生存期間が延長していたほか、カイコ体内における菌数の減少が認められた。また、*mltA* 欠損株は感染カイコの血リンパより分離した血球や、カイコ卵巢由来細胞株 BmN4 細胞内における増殖もまた野生型株と比較して減少しており、細胞レベルでその増殖能が低下していることが推察された。これらの結果は、*mltA* が *F. novicida* のカイコ体内における増殖に重要な役割を果たす因子であることを示唆している。

病原体感染時、ヒトの貪食細胞は感染局所に集積し病原体を積極的に貪食・消化することで、その排除や抗原提示による適応免疫系をする役割を担う。細胞内寄生菌はこの貪食細胞内で生存することで、細胞の循環に伴う感染拡大や、抗体などの液性免疫からの回避といったメリットを享受できる。細胞内寄生菌の種類によりその戦略は異なるが、野兎病菌において特筆すべ

(別紙様式第 3 号)

き点は宿主自然免疫系の回避/抑制能である。野兎病菌感染によって惹起される宿主免疫反応は、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) などの細胞内寄生菌と比較して微弱であることが知られるほか、野兎病菌の亜種間においてもヒトに対して高い病原性を示す亜種の方が比較的弱い免疫応答を起こすことが知られている。このように、野兎病菌の免疫回避/抑制能はその感染戦略を反映する重要な表現型であると考えられる。よってその包括的な理解は、未だ完全には確立されていないワクチンを開発する上でも不可欠な知見になると考えられる。第 2 章では、野兎病菌の免疫回避/抑制能を決定する因子の同定を目的とし、トランスポゾンランダム変異株ライブラリを用いた ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) スクリーニングを行った。*F. novicida* トランスポゾン変異株が感染した宿主細胞が産生する Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) サイトカインの産生量を指標とし、野生型株と比較して産生量が増加する変異株の探索を行った。約 3500 株のスクリーニングの結果、感染した U937 ヒトマクロファージ様細胞の TNF- α サイトカイン産生が増強されるトランスポゾン変異株が複数分離され、新規 6 遺伝子を含む 10 遺伝子が宿主免疫回避/抑制に関わる因子として同定された。このうちピリミジン塩基の生合成に関わる遺伝子 *pyrC* に着目し、詳細な解析を行った。*pyrC* 遺伝子を欠損させた *F. novicida* は野生型株と比較して TNF- α , interleukin-1 β , interferon- β (IFN- β) 等の野兎病菌感染に重要なサイトカインの産生が増加していた。また、IFN- β の産生増強は stimulator of interferon genes (STING) 分子の阻害薬である H-151 によって抑制されたことから、*F. novicida* は宿主の STING 分子を介した免疫応答を *pyrC* 依存的な機構で回避/抑制していることが示唆された。(2136 字)

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	仲村 岳真
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 度会 雅久
	副 査：山口大学 教授 西垣 一男
	副 査：鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副 査：JRA 競走馬総合研究所 主任研究役 丹羽 秀和
	副 査：山口大学 准教授 清水 隆
題 目	Study on the crucial factors related to the pathogenicity and transmission of <i>Francisella tularensis</i> (野兎病菌の病原性と伝播を決定する重要因子に関する研究)

審査結果の要旨：

野兎病菌 (*Francisella tularensis* subsp. *tularensis*) は、グラム陰性の通性細胞内寄生菌であり、人獣共通感染症である野兎病の原因菌である。野兎病菌は自然界においては野ウサギやげっ歯類によって保有されており、同時に節足動物からも分離されることから、主に哺乳類を中心とする野生動物と節足動物によって生活環が維持されていると考えられている。現在、野兎病菌の自然界における維持、またヒトに対する病原性の具体的なメカニズムについては、未だ十分な知見が蓄積されていない。本研究ではこれらの特性における重要な因子を網羅的に探索し、野兎病菌の伝播や病原性の解明を試みた。

1. カイコ感染モデルを用いた野兎病菌病原因子の解析

先行研究で、野兎病菌の亜種である *F. tularensis* subsp. *holarctica*-Live Vaccine Strain (LVS) および *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) の 2 種を用いて、カイコ (*Bombyx mori*) を野兎病菌の節足動物感染モデルとして確立し、*Francisella* の節足動物への適応に関する興味深い知見を得ている。LVS は感染したカイコを死亡させることなく共生関係を構築していたのに対し、*F. novicida* は感染したカイコを死亡させた。こうした表現系の相違は、*Francisella* 亜種間の宿主適応能の差異を反映していると考えられ、その解明は自然界における *Francisella* の維持に関する重要な示唆を与える。第 1 章では、節足動物において *F. novicida* が増殖するために必要な因子の同定を試みた。まず、*F. novicida* のトランスポゾンランダム変異株ライブラリを構築し、感染カイコの生死によるスクリーニングを行った。約 750 株規模の変異株ライブラリをスクリーニングした結果、*F. novicida* のカイコ体内における増殖に重要な因子として 7 つの遺伝子が同定された。このうち、ペプチドグリカンの分解に関与する *mltA* 遺伝子に着目し、詳細な解析

を試みた。*mltA* 遺伝子を欠損させた *F. novicida* は野生型株と比較して感染カイコの生存期間が延長していたほか、カイコ体内における菌数の減少が認められた。また、*mltA* 欠損株は感染カイコの血リンパより分離した血球や、カイコ卵巣由来細胞株 BmN4 細胞内における増殖もまた野生型株と比較して減少しており、細胞レベルでその増殖能が低下していることが推察された。これらの結果は、*mltA* が *F. novicida* のカイコ体内における増殖に重要な役割を果たす因子であることを示唆している。

2. 野兎病菌の宿主免疫抑制機構に関与する因子の解析

野兎病菌は宿主自然免疫系の回避/抑制能を持つことが知られている。野兎病菌感染によって惹起される宿主免疫反応は、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) などの細胞内寄生菌と比較して微弱であることが知られるほか、野兎病菌の亜種間においてもヒトに対して高い病原性を示す亜種の方が比較的弱い免疫応答を起こすことが知られている。このように、野兎病菌の免疫回避/抑制能はその感染戦略を反映する重要な表現型であると考えられる。よってその包括的な理解は、未だ完全には確立されていないワクチンを開発する上でも不可欠な知見になると考えられる。第 2 章では、野兎病菌の免疫回避/抑制能を決定する因子の同定を目的とし、トランスポゾンランダム変異株ライブラリを用いた ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) スクリーニングを行った。*F. novicida* トランスポゾン変異株が感染した宿主細胞が産生する Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) サイトカインの産生量を指標とし、野生型株と比較して産生量が増加する変異株の探索を行った。約 3500 株のスクリーニングの結果、感染した U937 ヒトマクロファージ様細胞の TNF- α サイトカイン産生が増強されるトランスポゾン変異株が複数分離され、新規 6 遺伝子を含む 10 遺伝子が宿主免疫回避/抑制に関わる因子として同定された。このうちピリミジン塩基の生合成に関わる遺伝子 *pyrC* に着目し、詳細な解析を行った。*pyrC* 遺伝子を欠損させた *F. novicida* は野生型株と比較して TNF- α , interleukin-1 β , interferon- β (IFN- β) 等の野兎病菌感染に重要なサイトカインの産生が増加していた。また、IFN- β の産生増強は stimulator of interferon genes (STING) 分子の阻害薬である H-151 によって抑制されたことから、*F. novicida* は宿主の STING 分子を介した免疫応答を *pyrC* 依存的な機構で回避/抑制していることが示唆された。

以上により、審査委員一同は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。