

学 位 論 文 要 旨

氏名 松本 苑子

題 目 : Identification of Host Factors Regulating *Francisella* Infection and Development of Infection Model

(フランシセラ感染を抑制する宿主因子の探索とモデル構築)

論文要旨 :

細菌感染における感染や病原性メカニズムを解明するため、これまで多くの細菌側の因子について研究がなされ、様々な病原因子が同定されてきた。しかしながら、宿主側の因子については細菌側の因子と比較してあまり多くの研究はなされていない。

また、生物モデルとしては主に病気を発症するマウス感染モデルが使用され、不顕性感染を示す自然宿主についてはあまり着目されてこなかった。しかし、ゾウリムシが *Legionella* のレゼルボアとなっているように、自然宿主が感染を拡げる要因となる例も多く報告されている。そのため、将来的な感染症の拡大防止において自然宿主モデルの研究が重要であると考えられる。私は細胞内寄生性細菌である *Francisella* 感染において重要な宿主因子を同定、および、自然宿主感染モデルを構築するために以下の 2 つのテーマを軸とした研究を行った。

1. 野兎病感染を成立させる宿主因子の同定

Francisella tularensis は人獣共通感染症の一つである野兎病を引き起こす。*F. tularensis* は 100 種以上の動物より検出が報告され、ヒトにおいては日本も含めた北緯 30 度以北の国々で症例が多く報告されている。第一章では真核細胞に対する阻害剤を利用して *F. tularensis* の感染に関わる宿主因子の探索とその機序の解明を試みた。まず、阻害剤ライブラリを利用したスクリーニングを行うことで *F. tularensis* 感染に関与する宿主因子の検索を試みた。GFP 発現 *F. tularensis* 亜種 *novicida* (*F. novicida*) を、阻害剤添加培養液で培養した細胞に感染 24 時間後に蛍光強度を測定した。阻害剤は全てジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解されており、コントロール群には阻害剤と同量の DMSO を添加した。蛍光強度をコントロールと比較して変化なし、促進、抑制の 3 つに分類した。スクリーニング結果より選出された阻害剤のうち、特に抑制が顕著であった Cucurbitacin I に着目して詳細な解析を行った。

Cucurbitacin I は Janus tyrosine kinase 2 (Jak2) を標的にした Jak2/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) 経路阻害剤である。本研究では比較として STAT3 に特異的な阻害剤である Stattic を利用した。Cucurbitacin I と Stattic はいずれも *F. novicida* には顕著な影響を与えず、それぞれの阻害剤を添加した培養液で細胞を培養すると、*F. novicida* の侵入と細胞の貪食を抑制することを見いだした。さらに、Cucurbitacin I は Jak2 の活性化を阻害することでアクチンの脱重合を抑制し、それによって細胞の貪食を抑制するこ

(別紙様式第 3 号)

とが明らかとなった。これらのことより Jak2/STAT3 経路の Jak2 が *F. novicida* 感染予防の新しいターゲットとなる可能性が示唆された。また、Cucurbitacin I の細胞毒性は Stattic と比較し低値を示した。以上より、Cucurbitacin I は *F. novicida* 感染における予防薬の候補としての可能性が示唆された。

2. 細菌の自然宿主となる原生生物モデルとしてのゾウリムシの利用

ゾウリムシは主に淡水域に生息する自由生活型の原生生物である。高い運動性と貪食性を持つ繊毛虫で細胞運動の解析や病原体の宿主モデルとして利用されている。このような生物学的特徴の他に、通常の形態学的、遺伝学的な分類とは異なる Syngen というゾウリムシ特有の生殖交配型で分類されている。そこで本研究では、形態的な区別が困難なゾウリムシの系統をランダム増幅多型 DNA を用いて簡便に同定する方法を開発することを試みた。

P. caudatum, *P. tetraurelia* および *P. bursaria* の各数株からゲノム DNA を複製し、ランダム増幅多型 PCR (RAPD-PCR) によって比較した。結果、*P. tetraurelia* および *P. bursaria* では、ランダムプライマーの増幅パターンにより、特定の系統の区別が可能であった。また、*P. caudatum* を分類するために、RAPD-PCR 解析で得られた配列データをもとに、5 種類の特異的プライマーセットを設計し、Multiplex PCR 法を開発した。*P. caudatum* の標準株 2 株、推奨株 12 株、他 12 株の比較解析を行い、特定株を同定した。この Multiplex PCR 法は、環境からの分離株の簡易な同定や分類に有効な手段であると考えられる。また、感染モデルとしての分析において、*F. novicida* 感染および薬剤に対する反応がゾウリムシの種や株によって大きく異なることが明らかとなり、ゾウリムシの迅速かつ正確な分類は感染モデルにとって重要であることが示された。今後、より多くのゾウリムシの同定・鑑別に本方法を適用することを考慮し、正確性や正当性を検証していく必要がある。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	松本 苑子
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 度会 雅久
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	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	Identification of Host Factors Regulating <i>Francisella</i> Infection and Development of Infection Model (フランシセラ感染を抑制する宿主因子の探索とモデル構築)

審査結果の要旨：

細菌感染における感染や病原メカニズムを解明するため、これまで多くの細菌側の因子について研究がなされ、様々な病原因子が同定されてきた。しかしながら、宿主側の因子については細菌側の因子と比較してあまり多くの研究はなされていない。また、生物モデルとしては主に病気を発症するマウス感染モデルが使用され、不顕性感染を示す自然宿主についてはあまり着目されてこなかった。しかし、ゾウリムシが *Legionella* のレゼルボアとなっているように、自然宿主が感染を拡げる要因となる例も多く報告されている。そのため、将来的な感染症の拡大防止において自然宿主モデルの研究が重要であると考えられる。本研究では細胞内寄生性細菌である *Francisella* の感染において重要な宿主因子を同定、および、自然宿主感染モデルを構築するために以下の 2 つのテーマを軸とした研究を行った。

1. 野兎病感染を成立させる宿主因子の同定

Francisella tularensis は人獣共通感染症の一つである野兎病を引き起こす。*F. tularensis* は 100 種以上の動物より検出が報告され、ヒトにおいては日本も含めた北緯 30 度以北の国々で症例が多く報告されている。第一章では真核細胞に対する阻害剤を利用して *F. tularensis* の感染に関わる宿主因子の探索とその機序の解明を試みた。まず、阻害剤ライブラリを利用したスクリーニングを行うことで *F. tularensis* 感染に関与する宿主因子の検索を試みた。GFP 発現 *F. tularensis* 亜種 *novicida* (*F. novicida*) を、阻害剤添加培養液で培養した細胞に感染させ、24 時間後に蛍光強度を測定した。阻害剤は全てジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解されており、コントロール群には阻害剤と同量の DMSO を添加した。蛍光強度をコントロールと比較して変化なし、促進、抑制の 3 つに分類した。スクリーニング結果より選出された阻害剤のうち、特に抑制が顕著

であった Cucurbitacin I に着目して詳細な解析を行った。

Cucurbitacin I は Janus tyrosine kinase 2 (Jak2) を標的にした Jak2/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) 経路阻害剤である。本研究では比較として STAT3 に特異的な阻害剤である Stattic を利用した。Cucurbitacin I と Stattic はいずれも *F. novicida* には顕著な影響を与えず、それぞれの阻害剤を添加した培養液で細胞を培養すると、*F. novicida* の侵入と細胞の食食を抑制することを見いだした。さらに、Cucurbitacin I は Jak2 の活性化を阻害することでアクチンの脱重合を抑制し、それによって細胞の食食を抑制することが明らかとなった。これらのことより Jak2/STAT3 経路の Jak2 が *F. novicida* 感染予防の新しいターゲットとなる可能性が示唆された。また、Cucurbitacin I の細胞毒性は Stattic と比較し低値を示した。以上より、Cucurbitacin I は *F. novicida* 感染における予防薬の候補としての可能性が示唆された。

2. 細菌の自然宿主となる原生生物モデルとしてのゾウリムシの利用

ゾウリムシは主に淡水域に生息する自由生活型の原生生物である。高い運動性と食食性を持つ繊毛虫で細胞運動の解析や病原体の宿主モデルとして利用されている。このような生物学的特徴の他に、通常の形態学的、遺伝学的な分類とは異なる Syngen というゾウリムシ特有の生殖交配型で分類されている。そこで本研究では、形態的な区別が困難なゾウリムシの系統をランダム増幅多型 DNA を用いて簡便に同定する方法を開発することを試みた。

Paramecium caudatum, *P. tetraurelia* および *P. bursaria* の各数株からゲノム DNA を複製し、ランダム増幅多型 PCR (RAPD-PCR) によって比較した。結果、*P. tetraurelia* および *P. bursaria* では、ランダムプライマーの増幅パターンにより、特定の系統の区別が可能であった。また、*P. caudatum* を分類するために、RAPD-PCR 解析で得られた配列データをもとに、5 種類の特異的プライマーセットを設計し、Multiplex PCR 法を開発した。*P. caudatum* の標準株 2 株、推奨株 12 株、他 12 株の比較解析を行い、特定株を同定した。この Multiplex PCR 法は、環境からの分離株の簡易な同定や分類に有効な手段であると考えられる。また、感染モデルとしての分析において、*F. novicida* 感染および薬剤に対する反応がゾウリムシの種や株によって大きく異なることが明らかとなり、ゾウリムシの迅速かつ正確な分類は感染モデルにとって重要であることが示された。

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。