

## 学位論文の要旨

氏名

俵積田 一樹

学位論文題目

黄色ブドウ球菌におけるTLR2 活性化リポプロテインの同定

本論文は、

黄色ブドウ球菌由来TLR2 活性化リポプロテインの同定

についてまとめたものである。

第1章では、序論を示した。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はグラム陽性細菌で、化膿性の創傷性感染症などの炎症性疾患の起因菌として、高い病原性を有している。特に、薬剤耐性株のMRSAをはじめとして院内感染の原因菌として医療分野で非常に問題となっており、その病原因子の解明が精力的に行われている。これまでに*S. aureus*表層成分による自然免疫の活性化はTLR2 を經由していることが明らかになっている。天然から得られたリポタイコ酸(LTA)画分はTLR2 を介して、自然免疫を活性化することから、これら成分が活性本体であるものと考えられていた。しかし、最近の研究から、繰り返し精製したLTAがTLR2 を活性化しないことが分かり、これら成分による活性化が、何らかの夾雑物に由来している可能性が示唆された。そこで、私は*S. aureus*における真のTLR2リガンドの解析を行った。

第2章は、まずTLR2活性化成分の性質について記述した。乾燥菌体を、リポプロテインの抽出によく用いられるTriton X-114 (TX-114) を用いて抽出し、TX-114抽出画分(Sa-TX)を得た。Sa-TXはTLR2活性を有し、SDS-PAGEの結果、タンパク質成分とLTAを含むが分かった。次にどの分子質量域にTLR2活性化成分が存在するか調べたところ、10 - 40 kDaの分子質量域に活性が見られた。またSa-TXをプロテナーゼKで消化すると、10 kDa以下の分子質量域にのみ活性が強く見られた。次にSa-TX中のLTAを、フッ化水素酸処理により分解したところ、LTAの分解によるTLR2活性成分の低分子化は見られなかった。次にSa-TX中のLTAを分解後、リポプロテインリパーゼで消化すると、TLR2活性化能は著しく減少した。以上の結果は、リポプロテインがTLR2 活性化誘導の本体である可能性を示すものである。

第3章は、*S. aureus*におけるリポプロテインの役割について調べた。Götz, F. らのグループにより作成された、リポプロテイン前駆体のジアシルグリセロール修飾酵素をノックアウトした、*S. aureus* リポプロテイン欠損株 ( $\Delta$ lgt) を用い、LTA画分を精製した。野生株(WT)のLTA画分と比較したところ、TLR2活性は、WTに比べ、 $\Delta$ lgt株が1/100以下にまで低下していた。一方、NMR解析ではLTAの構造に違いは見られなかった。以上の結果は、*S. aureus* TLR2 リガンドがリポプロテインであり、LTA画分中の主要な活性成分であることを裏付けるものである。

第4章は、さらにTLR2活性化リポプロテインの同定について述べた。まず菌体から直接TX-114抽出を行った画分からの同定をIn-gel digestionにより試みたが、リボソームタンパク質などのリポプロテイン以外の夾雑するタンパク質が多く含まれており、リポプロテインを同定できないことが分かった。そこで菌体から膜タンパク質を選択的に抽出した。*S. aureus*からビーズ破碎法により膜タンパク質を抽出後、TX-114抽出を行い、膜タンパク質TX-114抽出物(M-TX)を得た。M-TXの活性を、分子質量ごとに検討したところ、30 - 35 kDaに活性成分が多く存在することが分かった。質量分析の結果、活性の強く見られた25 - 40kDaの分子量域で少なくとも7個のリポプロテインを同定した。さらにリポプロテインを分取SDS-PAGEで単離し、デオキシコール酸ナトリウムで可溶化させてからトリプシン消化を行った。N末端リポペプチドを順相HPLCで単離した。N末端リポペプチドの質量分析の結果、S-(diacyloxypropyl)cysteinを含むリポペプチドであることを決定した。以上の結果から、*S. aureus*の主要なTLR2リガンドがリポプロテインであることを確定した。

第5章は総括である。本論分では、*S. aureus*における主なTLR2リガンドがリポプロテインであることを証明した。そしてグラム陽性菌中のTLR2 活性化リポプロテインのN末端構造を世界で初めて特定した。ジアシルリポプロテインは*S. aureus*による炎症や感染症における病原性に寄与する可能性があるため、この研究成果は*S. aureus*感染に対する予防や治療に貢献すると考えられる。

## 論文審査の要旨

|   |           |           |          |
|---|-----------|-----------|----------|
| 報告番号  | 理工研 第308号 | 氏名        | 俵積田 一樹   |
| 審査委員  | 主査        | 橋本 雅仁 准教授 |          |
|   | 副査        | 隅田 泰生 教授  | 杉村 和久 教授 |
| <p>学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">Identification of TLR2-activating lipoproteins in <i>Staphylococcus aureus</i><br/>(黄色ブドウ球菌におけるTLR2 活性化リポプロテインの同定)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等をもとに学位論文審査を実施した。本論文は、黄色ブドウ球菌由来TLR2 活性化リポプロテインの同定についてまとめたものである。第1章では、序論を示した。黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) はグラム陽性細菌で、化膿性の創傷性感染症などの炎症性疾患の起原菌として、高い病原性を有している。特に、薬剤耐性株のMRSAをはじめとして院内感染の原因菌として医療分野で非常に問題となっており、その病原因子の解明が精力的に行われている。これまでに<i>S. aureus</i>表層成分による自然免疫の活性化はTLR2 を経由していることが明らかになっている。天然から得られたリポタイコ酸(LTA)画分はTLR2 を介して、自然免疫を活性化することから、これら成分が活性本体であるものと考えられていた。しかし、最近の研究から、繰り返し精製したLTAがTLR2 を活性化しないことが分かり、これら成分による活性化が、何らかの夾雑物に由来している可能性が示唆された。そこで、私は<i>S. aureus</i>における真のTLR2リガンドの解析を行った。第2章は、まずTLR2活性化成分の性質について記述した。乾燥菌体を、リポプロテインの抽出によく用いられるTriton X-114 (TX-114) を用いて抽出し、TX-114抽出画分(Sa-TX)を得た。Sa-TXはTLR2活性を有し、SDS-PAGEの結果、タンパク質成分とLTAを含むが分かった。次にどの分子質量域にTLR2活性化成分が存在するか調べたところ、10 - 40 kDaの分子質量域に活性が見られた。またSa-TXをプロテナーゼKで消化すると、10 kDa以下の分子質量域にのみ活性が強く見られた。次にSa-TX中のLTAを、フッ化水素酸処理により分解したところ、LTAの分解によるTLR2活性成分の低分子化は見られなかった。次にSa-TX中のLTAを分解後、リポプロテインリパーゼで消化すると、TLR2活性化能は著しく減少した。以上の結果は、リポプロテインが TLR2 活性化誘導の本体である可能性を示すものである。第3章は、<i>S. aureus</i>におけるリポプロテインの役割について調べた。Götz, F. らのグループにより作成された、リポプロテイン前駆体のジアシルグリセロール修飾酵素をノックアウトした、<i>S. aureus</i>リポプロテイン欠損株 (<math>\Delta</math>lgt) を用い、LTA画分を精製した。野生株(WT)のLTA画分と比較したところ、TLR2活性は、WTに比べ、<math>\Delta</math>lgt株が1/100以下にまで低下していた。一方、NMR解析ではLTAの構造に違いは見られなかった。以上の結果は、<i>S. aureus</i> TLR2 リガンドがリポプロテインであり、LTA画分中の主要な活性成分であることを裏付けるものである。第4章は、さらにTLR2活性化リポプロテインの同定について述べた。まず菌体から直接TX-114抽出を行った画分からの同定をIn-gel digestionにより試みたが、リボソームタンパク質などのリポプロテイン以外の夾雑するタンパク質が多く含まれており、リポプロテインを同定できないことが分かった。そこで菌体から膜タンパク質を選択的に抽出した。<i>S. aureus</i>からビーズ破砕法により膜タンパク質を抽出後、TX-114抽出を行い、膜タンパク質TX-114抽出物(M-TX)を得た。M-TXの活性を、分子質量ごとに検討したところ、30 - 35 kDaに活性成分が多く存在することが分かった。質量分析の結果、活性の強く見られた25 - 40kDaの分子質量域で少なくとも7個のリポプロテインを同定した。さらにリポプロテインを分取SDS-PAGEで単離し、デオキシコール酸ナトリウムで可溶化させてからトリプシン消化を行った。N末端リポペプチドを順相HPLCで単離した。N末端リポペプチドの質量分析の結果、<i>S</i>-(diacyloxypropyl)cysteinを含むリポペプチドであることを決定した。以上の結果から、<i>S. aureus</i>の主要なTLR2リガンドがリポプロテインであることを確定した。第5章は総括である。本論文では、<i>S. aureus</i>における主要なTLR2リガンドがリポプロテインであることを証明した。そしてグラム陽性菌中のTLR2 活性化リポプロテインのN末端構造を世界で初めて特定した。ジアシルリポプロテインは<i>S. aureus</i>による炎症や感染症における病原性に寄与する可能性があるため、この研究成果は<i>S. aureus</i>感染に対する予防や治療に貢献すると考えられる。</p> <p>よって、審査委員会は博士(工学)の学位論文として合格と判定する。</p> |           |           |          |

## 最終試験結果の要旨

|   |           |           |          |
|---|-----------|-----------|----------|
| 報告番号  | 理工研 第308号 | 氏名        | 俵積田 一樹   |
| 審査委員  | 主査        | 橋本 雅仁 准教授 |          |
|   | 副査        | 隅田 泰生 教授  | 杉村 和久 教授 |
| <p>平成 21 年 2 月 12 日 15:00 から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む 12 名の前で学位論文の内容が説明され、その後、以下に示すような質疑応答が行われた。いずれについても満足すべき回答を得ることが出来た。</p> <p>[質問 1] 今後、本研究成果をどのように活かして発展させていくのか？<br/> [回答] 活性に必要な化学構造が明らかにされ、これを化学合成することが可能となった。この合成物を <i>S. aureus</i> ワクチン抗原として用いる、または免疫賦活アジュバントとしての使用も可能となり、医療分野への応用発展が期待される。</p> <p>[質問 2] プロテインレベルとしては 7 つのリポプロテインを同定していたが、リポペプチドとしては 02699 の 1 つしか同定していないが、02699 だけが <i>S. aureus</i> 細胞表層成分の TLR2 活性にとって重要なのか？<br/> [回答] 02699 のみが活性にとって必要というのではなく、その他のリポプロテインも TLR2 活性にとって重要である。M-TX とそれぞれ単離したリポプロテインの濃度と活性を比較してみると、単離したリポプロテインは活性が 100 倍近く強いことから、このことが言える。</p> <p>[質問 3] HF-Sa-Bu をクロロホルム/メタノールで再抽出すると、活性成分は沈殿にのみに回収されるかどうか？<br/> [回答] 活性成分が 100% 沈殿にのみ回収はされていないと考える。クロロホルム/メタノール層にも活性成分が移動することが考えられる。</p> <p>[質問 4] 分取 SDS-PAGE 後、SDS を取り除くために、どのような操作を行い、また完全に SDS は除去できているかどうか？<br/> [回答] SDS を除去する方法としてアセトン沈殿を行った。SDS は完全に取り除かれていることが考えられる。</p> <p>[質問 5] 本研究成果により、LTA には免疫活性は無いと断言できるかどうか？<br/> [回答] 本研究成果でそのように断言することは難しい。LTA に活性がないと断言するには LTA の化学合成を行い、この合成物で活性を測定することが必要である。</p> <p>以上のことから審査委員会は、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士（工学）の学位を与えるに足りる資格を有するものと判定した。</p> |           |           |          |