

## 大林 武久氏の学位論文審査の要旨

### 論文題目

黄色ブドウ球菌放出システインプロテアーゼの凝固系および結合組織破壊作用の研究  
(A study on destruction of the coagulation system and connective tissues by cysteine proteases from *Staphylococcus aureus*)

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、病原性の強いグラム陽性球菌であり、皮膚・蜂窩織炎などの限局性の化膿性巣状感染のみならず、血液凝固異常 (DIC) を伴う難治性敗血症、細菌性心内膜炎等の全身性重症感染や院内感染・日和見感染症の主要な原因菌である。本菌が放出するシステインプロテアーゼである staphopain A と staphopain B は、敗血症などの感染症病態に密接に関与しており、近年、重要な病原因子として認知されつつある。本研究では、凝固異常と組織破壊に直接関与していると考えられる staphopains の病原作用を解明するために、staphopains による血漿凝固異常およびコラーゲン分解のメカニズムについて検討した。

黄色ブドウ球菌培養上清より精製した staphopains を用い、健常人血漿や精製ヒトフィブリノゲンを使って凝固能の指標となる activated partial thromboplastin time (APTT) と thrombin time (TT) への影響を調べた。Staphopains によるヒトフィブリノゲンの分解過程を SDS-PAGE により解析し、かつ分解されたフィブリノゲン断片のアミノ基側末端のアミノ酸配列を決定した。さらに、蛍光標識したウシ I 型コラーゲンを用いて、staphopains のコラーゲン分解活性を測定した。Staphopains は、そのプロテアーゼ活性と濃度に比例して血漿の APTT を延長し、その活性は staphopain B が staphopain A より約 3 倍強かった。Staphopains は血漿の TT も延長したことから、この作用はフィブリノゲン凝固能消失によって引き起こされていることが示唆された。実際、staphopains はフィブリノゲンの A $\alpha$  鎖を直接分解し、staphopain B は A $\alpha$  鎖のカルボキシ末端領域を staphopain A より効率よく迅速に分解した。Staphopains はウシ I 型コラーゲンを 10 nM から濃度依存性に分解したが、この作用では staphopain A, B 間に有為な差はみられなかった。よって、黄色ブドウ球菌由来のシステインプロテアーゼ staphopain A, B が、本菌の強い組織侵襲性の要因となることが示唆された。

審査では、1) staphopain A, B の精製方法、2) staphopain A, B 由来株の特性と菌体からの分泌様態、3) 各プロテアーゼの等電点、基質特異性等の生化学特性、4) staphopain A, B 活性を制御する内因性・外因性プロテアーゼ阻害剤、5) 黄色ブドウ球菌による DIC、組織傷害の特徴、6) 黄色ブドウ球菌感染時の急性反応性物質としてのヒトフィブリノゲンの発現動態、7) 蛋白質切断部位の解析方法、8) コラーゲンのタイプによる分解効率の差異、9) プロテアーゼ阻害剤の感染治療への応用の限界、10) 黄色ブドウ球菌敗血症に伴った DIC への staphopains の実質的な関与、11) 黄色ブドウ球菌敗血症とエンドトキシンショックとの相違点、12) staphopains によるコラーゲン分解産物の血中での検出の可能性、13) staphopains による matrix metalloproteinase (MMP) の活性化を介する間接的な組織破壊能、など実験手技、実験結果、ならびに考察内容に関連して様々な質問がなされ、申請者からは概ね適切な回答がなされた。

本研究は、フィブリノゲンやコラーゲンの分解という staphopains の新たな病態生理活性を解明することにより、黄色ブドウ球菌の組織・血管侵襲性に関与する細菌性プロテアーゼの病原性の一端を明らかにし、プロテアーゼを標的とした難治性黄色ブドウ球菌感染症の治療薬開発の可能性を示した点で学位の授与に値するものと評価した。

審査委員長 微生物学担当教授

赤池 孝章

## 審査結果

学位申請者名：大林 武久

専攻分野：顎口腔病態学

学位論文題名

黄色ブドウ球菌放出システインプロテアーゼの凝固系および結合織破壊作用の研究

(A study on destruction of the coagulation system and connective tissues by cysteine proteases from *Staphylococcus aureus*)

指導：篠原 正徳 教授

指導補助教員：今村 隆寿 准教授

判定結果：

可

不可

不可の場合：本学位論文名での再審査

可

不可

平成23年1月17日

審査委員長 微生物学担当教授

赤池 孝章

審査委員 分子細胞制御学担当教授

小椋 光

審査委員 病態情報解析学担当教授

安東由喜雄

審査委員 脳神経外科学担当教授

倉津 純一