

学 位 論 文 題 名

Iron Acquisition Systems in *Pseudomonas aeruginosa*:  
Their Contribution to Bacterial Growth and Virulence

（緑膿菌の鉄獲得機構：菌増殖および毒力への寄与）

学位論文内容の要旨

鉄は、細菌を含むほとんどすべての生物にとって不可欠な元素である。したがって、病原細菌が宿主体内で鉄を獲得・利用する能力は、その増殖と感染に必須であると考えられる。通常、動物宿主体内で鉄は、種々の蛋白に結合して存在する。このような結合鉄を獲得するため、細菌は特殊な機構を有する。本研究は、緑膿菌の鉄獲得機構が、当該菌の増殖と毒力にいかに寄与するかを明らかにするために企図された。緑膿菌は免疫機能が低下した宿主に重篤な感染症を引き起こすので、日和見感染症の病因として重要である。

緑膿菌は高親和性の鉄獲得機構、即ち、シデロフォアと称される菌自体が産生する鉄キレーターによる鉄獲得系と、ヘム鉄獲得系を有する。当該菌はシデロフォアとして、ピオベルジンおよびピオケリンを産生・分泌する。これらのシデロフォアはいずれも緑膿菌の毒力に寄与することが報告されているが、*in vivo*におけるそれぞれの役割あるいは重要性については系統的な検討が為されていない。そこで、著者はまず、緑膿菌感染におけるこれらシデロフォアの意義をさらに検討するため、野生株 PA01 を親株として、いずれか一方、あるいは両シデロフォアを産生できない変異株を遺伝子相同組換えによって作出した。

ピオケリン非産生株およびピオベルジン非産生株はいずれも、免疫抑制マウスのひ腹筋に接種した場合、PA01 株と同様に接種部位で効率的に増殖し、マウスを死に至らしめた。これに対し、両シデロフォアを産生しない変異株は接種部位の筋肉に感染したが、致死毒力を示さなかった。点鼻接種した場合にはいずれの変異株も肺内で増殖し、免疫抑制マウスに対して致死毒力を示した。しかし、PA01 株に比し、ピオベルジン非産生株および両シデロフォア非産生株の肺における増殖の程度は低く、両シデロフォア非産生株の毒力は有意に弱かった。また、接種ルートにかかわらず、ピオベルジン非産生株および両シデロフォア非産生株の血中菌数は有意に少なかった。さらに、*in vitro* 実験では、アボトランスフェリンの添加によって培地の遊離鉄を制限した場合、両シデロフォア非産生株の増殖は極度に抑制されるが、ヘム鉄源としてヘモグロビンを添加した場合にその増殖抑制は完全に解除されることが明らかとなった。以上の結果は、緑膿菌の *in vivo* 増殖および血行性

播種にはピオベルジンの方が重要であるが、菌の効率的な増殖および十分な毒力発現には、ピオケリンおよびピオベルジンの両方が必要であることを示している。しかし、これらシデロフォアは緑膿菌が宿主に感染するために必須ではなかった。緑膿菌感染では、ヘム鉄獲得系のようなシデロフォアを介する以外の鉄獲得系も重要な役割を演ずるものと考えられる。

一般にグラム陰性菌では、シデロフォアによる鉄獲得およびヘム鉄獲得のいずれにも、菌体外膜に存在する特異的レセプターが関与する。そして、外膜レセプターに結合した鉄-シデロフォア複合体あるいはヘム複合体は、細胞膜にその一端が埋め込まれている TonB 蛋白(TonB)の作用によってペリプラスムに移行すると考えられている。近年、緑膿菌においても *tonB* 遺伝子 (*tonB*) および TonB が同定された。しかし、緑膿菌 TonB の意義については、ピオベルジンによる鉄獲得に必須であることのみが実験的に確認されたにすぎない。そこで著者は、TonB が緑膿菌の鉄獲得にいかに寄与するかを明らかにするために、PA01 株およびそのシデロフォア (ピオベルジンおよびピオケリン) 非産生株から *tonB* 不活化変異株を遺伝子相同組換えによって作出し、実験に供した。

これら *tonB* 変異株は、アポトランスフェリンによって遊離鉄の存在を制限した培地において増殖せず、また、その培地に精製シデロフォアあるいはヘム鉄源(ヘモグロビンあるいはヘミン)を添加しても増殖しなかった。 $[^{59}\text{Fe}]$  トランスフェリンを用いた実験によって、*tonB* の不活化は、ピオベルジンおよびピオケリン、いずれによる鉄獲得も不能にすることがわかった。一方、PA01 株由来 *tonB* 変異株の遊離鉄制限培地における増殖性は、正常 *tonB* を含むプラスミドの導入によって回復した。また、シデロフォア非産生性 *tonB* 変異株の遊離鉄制限培地における増殖性は、当該菌株に正常 *tonB* を含むプラスミドを導入し、かつ、培地にピオベルジン、ピオケリン、ヘモグロビン、あるいはヘミンを添加することによって回復した。さらに動物実験によって、PA01 株由来 *tonB* 変異株は PA01 株とは異なり、免疫抑制マウスの筋肉内および肺内のような *in vivo* 環境で増殖できず、致死毒力を示さないことが明らかとなった。マウスにおける *tonB* 変異株の増殖性および毒力もまた、正常 *tonB* を含むプラスミドの導入によって回復した。以上の結果は、TonB が緑膿菌のピオベルジンおよびピオケリンを介した鉄獲得、およびヘム鉄獲得に必須であることを示しており、また、それ故に TonB は緑膿菌の感染性に必須であることを示唆している。

以上のように、本研究は緑膿菌の *in vivo* 増殖および毒力発現におけるシデロフォアを介した鉄獲得系の意義を明らかにするとともに、ヘム鉄獲得系の重要性を示した。さらに、緑膿菌 TonB がこれらの高親和性鉄獲得系において必須であること、ならびに菌の感染性に寄与することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 主 査 | 教 授 | 喜 田 | 宏   |
| 副 査 | 教 授 | 小 沼 | 操   |
| 副 査 | 教 授 | 高 島 | 郁 夫 |
| 副 査 | 助教授 | 岡 崎 | 克 則 |

## 学 位 論 文 題 名

### Iron Acquisition Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: Their Contribution to Bacterial Growth and Virulence

(緑膿菌の鉄獲得機構：菌増殖および毒力への寄与)

緑膿菌は高親和性鉄獲得系として、鉄キレーターであるシデロフォアによる鉄獲得系とヘム鉄獲得系を有する。当該菌は、2 種のシデロフォア、即ちピオベルジン (Pvd) およびピオケリン (Pch) を産生・分泌する。著者はまず、緑膿菌感染におけるこれらシデロフォアの意義を明らかにするため、緑膿菌野生株 PA01 から遺伝子相同組換えによって、いずれか一方、あるいは両シデロフォアを産生できない変異株を作出した。これらをマウスに実験感染させた結果、in vivo 増殖および血行性播種には Pvd の方が重要であり、菌の効率的な増殖と毒力の発現には Pvd および Pch の両方が必要であることが判明した。さらに、シデロフォアを介する鉄獲得系とは別のヘム鉄利用能が緑膿菌の増殖に寄与することを in vitro 実験で確認し、緑膿菌感染にヘム鉄獲得系のようなシデロフォア非依存的鉄獲得系もまた重要な役割を果たすことが明らかとなった。

一般にグラム陰性菌の内膜蛋白 TonB は、外膜レセプターに結合した鉄-シデロフォア複合体やヘムの外膜透過を触媒し、シデロフォアによる鉄獲得およびヘム鉄獲得に必要であることが示されている。しかし、緑膿菌ではそれが不明確であった。そこで著者は、PA01 株およびその Pvd・Pch 非産生株から tonB 遺伝子不活化株を作出し、それら不活化株に正常 tonB 遺伝子を導入した形質転換体をも用いて、TonB の意義を検討した。実験の結果、緑膿菌 TonB 蛋白は Pvd および Pch による鉄獲得およびヘム鉄獲得に必須であること、さらに、当該蛋白は緑膿菌の in vivo 増殖および毒力発現に必須であることが明らかになった。

以上の成績は、院内・日和見感染症の病因として最も重要な緑膿菌の TonB 非依存鉄イオン獲得機構を明らかにするものである。本研究成果が抗緑膿菌薬開発に資するところが大きい。

で、審査員一同は高瀬浩之氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。