

大阪医科大学

平成26年 秋季学術講演会

プログラム 講演内容抄録

日 時 平成26年11月12日(水)

< 16:00 ~ 17:30 >

場 所 大阪医科大学 臨床第一講堂

————— 当番教室 —————

胸 部 外 科 学 教 室

一 般 ・ 消 化 器 外 科 学 教 室

大阪医科大学医学会

高槻市大学町2番7号・大阪医科大学(大阪医大サービス内)

電 話 072(683)1221番

プログラム

1. 開 会 の 辞
1. 会 長 挨 拶
1. 特 別 講 演

特 別 講 演

ストレプトコッカス属細菌のバイオフィルム
形成阻害薬の開発を目指して 〈16:10～16:50〉

大阪医科大学医学部医学科生命科学講座生化学教室

教授 矢野 貴人

透明な小型脊椎動物モデルをもちいた
神経機能の研究 〈16:50～17:30〉

大阪医科大学医学部医学科生命科学講座生理学教室

教授 小野 富三人

ストレプトコッカス属細菌のバイオフィルム 形成阻害薬の開発を目指して

大阪医科大学医学部医学科生命科学講座生化学教室

教授 矢 野 貴 人

留置カテーテルや人工弁・人工関節に伴う感染など、現在の臨床ではさまざまな慢性・難治性の感染症に遭遇する。これらの感染症は、非病原性細菌が形成するバイオフィルムにより引き起こされると考えられており、完治のためには手術等による病巣部の物理的除去が必要になる。

バイオフィルムとは、細菌が自ら合成・分泌する多糖類などのマトリックスを介して固体表面に付着し、増殖したものである。この状態の細菌は、人工的な培養条件下にて浮遊状態で増殖したものと異なり、抗生物質や免疫反応に抵抗性を示すことが知られている。

このバイオフィルムの形成開始シグナルとして働いているのが Quorum-sensing system (QSS) と呼ばれる細菌の細胞間情報伝達系である。QSS はあらゆる細菌種に備わっておりその生物学的機能は多岐にわたっているが、細菌がさまざまな条件化で“コミュニティ”として生存するための戦略であると考えられている。

ストレプトコッカス属細菌にはさまざまな菌種が含まれている。ヒトにおいては口腔内の常在菌としてデンタルプラーク（歯垢）の主要な構成員であるが、感染性心内膜炎や高齢者における誤嚥性肺炎の原因菌となる。こうした感染症を予防・治療するにはバイオフィルムの形成を阻止することが重要であり、そのためには QSS を阻害することが有効であると考えられる。

グラム陰性菌の QSS シグナル分子は膜透過性の低分子化合物であり、その産生酵素は細胞質中にある通常可溶性タンパク質である。したがって、産生酵素の単離・解析が容易であり、非常に詳細な機能的・構造的が進んでいる。

一方、グラム陽性菌の QSS シグナル分子はペプチドであり、その産生酵素はシグナル産生活性とトランスポーター機能を兼ね備えた膜タンパク質である。一般に膜タンパク質の解析は技術的に非常に困難であるため、グラム陽性菌の QSS 解析は、種々の細菌学的・遺伝学的解析にとどまっていた。つまり、QSS 経路に関与する遺伝子群は多く判明しているものの、シグナル産生に関与する酵素そのものの生化学的解析はまったく行われていなかった。

ストレプトコッカスの QSS シグナル産生酵素は ComA タンパク質と呼ばれている。前述のように、このタンパク質はペプチダーゼ活性を持つドメイン（シグナル前駆体ペプチドからシグナルを切り出す）とトランスポーター部分（ABC トランスポーター・ファミリーの一種）からなる膜タンパク質である。

ComA タンパク質による前駆体ペプチドの切断こそが QSS 伝達経路の初発反応であり、最も重要であると考えられる。そこで、このペプチダーゼ・ドメイン（以下、PEP と省略）を中心に、その機能・立体構造を生化学的手法により解析してきた。

その成果を要約すると：

- a) *S. pneumoniae* の PEP とシグナル前駆体（ComC と呼ばれる）を各々大腸菌内で可溶性タンパク質として発現し、その精製法と活性測定法を確立した。
- b) 他の数種のストレプトコッカスから PEP と ComC を単離し、それらを解析した。また、PEP と ComC の種々の変異体を作製し、解析した。その結果、すべての PEP の基質認識に共通する特徴を見出した。
- c) *S. mutans* の PEP の立体構造を X 線結晶解析によって決定した。それにもとづいて、PEP がどのようなメカニズムで ComC を認識するのかについて、分子レベルでのモデルを提案した。

本講演では、これらの解析結果をもとに、いかにしてバイオフィルムの形成阻害薬の開発に向けた研究を進めているのかについて、その現状を解説する。基礎的な酵素学・タンパク質科学研究が、実際的な応用研究に不可欠であるという一例を示したい。

透明な小型脊椎動物モデルをもちいた神経機能の研究

大阪医科大学医学部医学科生命科学講座生理学教室

教授 小 野 富 三 人

インド原産の熱帯魚であるゼブラフィッシュは近年、医学、生物学上のモデルシステムとして注目されている。ゼブラフィッシュのモデルとしての有用性は、そのいくつかの生物学的特徴にもとづく。それは、まず飼育の容易さと短い繁殖サイクルのため、遺伝学が可能であること。幼小時には体が透明であり、神経系を含む体内の器官が外部から観察できること。子宮内部で発育する必要がないため、受精直後から継続的に観察、操作が可能なこと、外部からの遺伝子導入や遺伝子のノックアウトが容易に行えること、などである。私は1998年アメリカでポストドクとしてこのシステムを用い始めて以来、15年以上神経系のモデル動物として研究を進めてきた。この講演会ではそのうちのいくつかの研究を紹介し、今後大阪医大で進めようとしているプロジェクトについても紹介したい。

私の研究室ではニコチン性アセチルコリン受容体を主要なテーマとして研究を行ってきた。ニコチン性アセチルコリン受容体は生体内の様々な場面で重要な働きをするが、我々がとくに主要なモデル系として用いて来たのは神経筋接合部である。神経筋接合部は歴史的にシナプスの形成と機能を理解する上で、古典的なモデルとして大きな役割を果たしてきた。しかしいまだに不明な点も多く、その単純な構成要素とアプローチのしやすさから、現在にいたるまで貴重な情報を提供し続けている。

私がゼブラフィッシュの神経筋接合部を研究するようになったのは、1990年代にドイツで行われた大規模 Mutagenesis スクリーニングの結果同定された、運動異常を示す突然変異体入手して解析した結果、そのうちのいくつかが神経筋接合部での機能に重要な役割を果たす蛋白に異常があることを見つけたことがきっかけであった (Ono et al., 2001)。特に、シナプスのポスト側に発現し、神経伝達物質であるアセチルコリンに結合して情報を筋肉に伝えるアセチルコリン受容体にかかわる異常が複数同定された。その変異体の一つでは、アセチルコリン受容体そのもののアミノ酸がただ一つ変化することにより、シナプス上のアセチルコリン受容体の発現が全く欠損してしまい、その結果突然変異をホモでもつゼブラフィッシュは完全に運動機能が麻痺してしまう。これは実は人間にも同一の遺伝子に異常をもつ家系が存在することが後に判明し、ホモで変異をもった胎児は妊娠早期に子宮内で死亡してしまう。すなわちゼブラフィッシュはこの疾患の動物モデルであり、我々は、この変異をもつために本来なら完全に運動機能が麻痺して早期に死亡するはずの個体に、外部から正常なアセチルコリン受容体を導

入してやることにより、この個体が成長して生殖可能な段階にまで達せしめることに成功した (Epley et al., 2008)。また、アセチルコリン受容体をシナプス上で高い密度で集積させるために重要な働きをするラプシンという分子があるが、このラプシンに突然変異をもつゼブラフィッシュの系統も同定した。この変異体は筋無力症に似た症状を示すが (Ono et al., 2002)、やはり人間の家系でラプシンに異常をもつ症例が報告され、この場合にも病態生理を研究する上で、ゼブラフィッシュのモデルは有用である。

このような臨床との関わり以外にも、神経機能の基礎的な理解という面でも、これらの突然変異体は重要な情報を提供してくれる。例えば、我々がアセチルコリン受容体の変異体を報告するまで、アセチルコリン受容体はシナプスの形成においてはラプシンその他の、シグナル伝達系の上流に位置する分子から指示を受けとるのみであり、自分では能動的な役割を果たさないと考えられていた。我々はゼブラフィッシュの透明性を生かしてシナプスの形成を生きた個体内で継続して観察することにより、アセチルコリン受容体はラプシンが細胞内小器官を通過して細胞膜まで到達する上で必須の因子であることを初めて示した (Park et al., 2012)。さらに今年度発表された論文では、新たに単離されたアセチルコリン受容体上の単一の遺伝子変異が速筋と遅筋のシナプスで全く異なった発現型を示す事、これはそれぞれのシナプスでのアセチルコリン受容体のサブユニット構成の違いに由来するものと考えられることを示した (Park et al., 2014)。これはほ乳類では今まで全く知られていなかった現象であり、このサブユニット構成の違いがほ乳類でも認められるのかどうか、サブユニット構成の違いを決定する分子的メカニズムは何なのか、今後調べて行く予定である。また現在投稿準備中の論文では、やはりアセチルコリン受容体の突然変異体と外部からの遺伝子導入をもちいて、シナプスのプレ側で、シナプス小胞のダイナミクスの制御に関して、まったく新しい知見がえられたので、それについてもお話ししたい。