

学位授与番号：甲 943 号

氏 名：弘中一平

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 5 月 22 日

学位論文名：

細菌による ATP 分泌機構の解析

主論文名：

Glucose Triggers ATP Secretion from Bacteria in a Growth-Phase Dependent Manner.

（グルコースは増殖期依存的に細菌による ATP 分泌を引き起こす）

学位審査委員長：加藤総夫教授

学位審査委員：高田耕司教授、桑野和善教授

論文要旨

論文提出者名	弘中 一平	指導教授名	水之江 義充
主論文題名			
Glucose Triggers ATP Secretion from Bacteria in a Growth-Phase Dependent Manner			
(グルコースは増殖期依存的に細菌による ATP 分泌を引き起こす)			
Applied and Environmental Microbiology, 79 巻, p.2328~2335, 2013 年			
<p>近年、腸内細菌の分泌する ATP が腸管粘膜固有層における Th17 細胞の分化を誘導し、炎症性腸疾患を悪化させることを示唆する報告がなされた。どの菌種が ATP を分泌するかについては不明であったが、近年、本学細菌学講座ではマウス、ヒトの腸内細菌である <i>Enterococcus gallinarum</i> が ATP を分泌することを見出した。そこで、本研究は細菌の ATP 分泌機構の解析を目的とした。</p> <p>腸球菌属 22 菌種について ATP 分泌の有無を検討したところ、<i>E. gallinarum</i> 以外に 7 菌種が ATP を分泌することを新たに見出した。最も大量に ATP を分泌する <i>Enterococcus mundtii</i> を用い、ATP 分泌に影響を与える培地成分を検討した結果、グルコースが ATP 分泌に必須の成分であることを発見した。嫌氣的培養でも好氣的培養とほぼ同量の ATP を分泌することから、解糖系が ATP の分泌に重要な役割を果たしていることが示唆された。ジニトロフェノールで処理し、菌体内 ATP が枯渇した静止菌体にグルコースを添加すると、対数増殖期の菌体は定常期の菌体よりも多くの ATP を分泌することが判明した。そこで、現在まで ATP を分泌しないとされていた大腸菌や黄色ブドウ球菌などを含む 6 菌種の各増殖相における ATP 分泌について検討したところ、6 菌種全てが対数増殖期に ATP を分泌していることを見出した。</p> <p>以上より、様々な常在菌や黄色ブドウ球菌などの病原菌がグルコース存在下で増殖期依存的に ATP を分泌し、それが細菌間または細菌-宿主間の相互作用を担っていることが示唆された。</p>			

論文審査の結果の要旨

弘中氏提出の主論文は *Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner* で、アメリカ微生物学会が刊行する *Applied and Environmental Microbiology* 誌第 79 巻に掲載された。同誌のインパクトファクターは 3.83、5 年 IMPACT FACTOR は 4.45 である。

学位審査は、5 月 7 日、主論文内容の説明と質疑応答からなる口頭試問で行った。

主論文内容の要旨：アデノシン三リン酸 ATP が、細胞の中でエネルギー基質として重要な役割を担うことはよく知られているが、近年、ATP が細胞外に放出されてさまざまな細胞間相互作用を担う事実がさまざまな系で証明され、注目をあびている。消化管においても、腸内細菌が ATP を細胞外に分泌し、それが腸管粘膜固有層における Th17 細胞の分化を誘導することによって、炎症性腸疾患を悪化させる可能性が報告されている。これに呼応し、マウスおよびヒトの腸内細菌である *Enterococcus gallinarum* が ATP を細胞外分泌する事実が本学細菌学講座の研究によってすでに見出されている。

しかし、他の菌種も ATP を分泌することができるのか、もしそうであれば、どの菌種が、どのような状況において ATP を分泌しうるのか、などの、この機構の普遍性を理解するために避けて通れない緒問題は未解決であった。そこで、弘中氏らは、細菌の ATP 分泌機構の解析を目的として本研究を進めた。

腸球菌属 22 菌種を用いて、それぞれの ATP 分泌を定量的に評価したところ、

Enterococcus gallinarum 以外に 7 菌種が ATP を分泌することを新たに見出した。最も大量に ATP を分泌することが判明した *Enterococcus mundtii* を用い、ATP 分泌に最も顕著な影響を及ぼす培地成分を検討した結果、グルコースが ATP 分泌に必須の成分である事実を見出した。嫌気的および好氣的培養条件のいずれにおいてもほぼ同量の ATP 分泌が観察された結果から、ATP の産生と分泌には解糖系が主な役割を果たしていることが示唆された。さらに、ジニトロフェノール処理によって ATP 産生を阻害し、菌体内 ATP が枯渇した状態の静止菌体にグルコースを添加したところ、対数増殖期において定常期よりも多くの ATP を分泌する事実が判明した。この事実に基づき、ATP を分泌しないとされてきた大腸菌や黄色ブドウ球菌などを含む 6 菌種について、それぞれの増殖相における ATP 分泌を検討したところ、6 菌種全てが対数増殖期に ATP を分泌する事実が明らかになった。

以上より、常在菌や黄色ブドウ球菌などの様々な病原菌が、グルコース存在下、増殖期依存的に ATP を合成・分泌し、それが細菌間または細菌-宿主間の相互作用を担いうる可能性が示された。

以上の報告に続き、審査委員からの以下の質問とそれに対する応答があった

- 細胞内外の ATP 量の比はどのくらいか？
- グルコース非存在下の ATP 産生はどのような合成系に依存しているか？
- グルコース以外のピルビン酸や乳酸や二糖類でも ATP 産生は増えるか？

- ATP の細胞外分泌と細胞内濃度の関係をどう考えるか？
- 細胞内の ATP 濃度をどのように求めたか？ どのような方法がありうるか？
- 菌種ごとに ATP 分泌量が大きく異なるのはどのような機構や特性の違いに起因すると考えるか？
- 増殖相においてのみ ATP 分泌が増えることの生物学的意味は何か？ 進化の過程でのメリットは何か？
- 細胞外に放出された ATP の標的は何か？
- ATP 受容体を標的とした薬物によって大腸炎の症状を緩和するという可能性があるか？
- この細胞外 ATP 放出には生物学的に合目的な意義があるのか？

これら実験技術上の問題から医学生物学的な意義に至る多岐にわたる質問に対し、弘中氏は、自分自身が経験した実験事実、文献的考察、および、医学研究者に相応しい論理的な推論を駆使して、的確に回答した。その後、審査委員会での慎重審議の結果、弘中氏の論文は、学位請求論文の価値あるものと認めた。