

審査の結果の要旨

氏名 吉田整

本研究は、赤痢菌の宿主大腸上皮細胞感染機構の解明を、赤痢菌の機能性分泌蛋白質である VirA 蛋白質に注目して行ない、以下の結果を得ている。

(1) VirA の宿主細胞側の標的因子の同定およびその相互作用について解析を行なった。グルタチオン S-トランスフェラーゼと VirA を連結した融合蛋白質を作成し、これをプローブとしてプルダウンアッセイを行った結果、VirA は β -チューブリンと結合することが分かった。そこで、牛脳から精製したチューブリンを用いて微小管安定性に対する VirA の影響を調べた結果、VirA によって微小管の重合が阻害されるとともに、微小管が断片化されることが明らかとなった。この活性は電子顕微鏡観察、あるいは蛍光ラベルした微小管の経時的变化を蛍光顕微鏡で観察することにより確認することができた。以上の結果より、VirA は β -チューブリンと結合し、おそらく微小管の切断を促進することで、その不安定性を誘導していることが示された。

(2) 赤痢菌の細胞侵入における VirA の役割について解析を行なった。VirA を強制発現させた培養細胞を観察した結果、ラッフル膜形成が誘導され、同時に微小管ネットワークの破壊が生じていることが分かった。さらに、精製した VirA を宿主細胞に微量注入すると一過的なラッフル膜出現が認められた。細胞内において微小管は伸長と短縮の繰り返しを起こしており、伸長時には small GTPase の 1 つ Rac1 の活性とラッフル膜の誘導が観察されることが報告されている。そこで、ラッフル膜が誘導されている VirA 発現細胞の Rac1 の活性を計測した結果、VirA 発現細胞では Rac1 活性がコントロールに比べ有意に増加していた。一方、VirA と不活化型 Rac1 を共発現した細胞ではラッフル膜の誘導が見られなかった。次に、赤痢菌が感染した上皮細胞株を免疫蛍光染色法で観察すると、菌の感染部位には VirA が分泌されており、また、その部位にある微小管は破壊されていることが認められた。この時、野生株赤痢菌が感染した細胞では、virA 変異株に比べ Rac1 活性が上昇していることが認められた。さらに、virA 変異株によって誘導されたラッフル膜の数は、野生株によって誘導されたその数に比べると、およそ 40%程度に減少していることが分かった。一方、薬剤処理により微小管の伸張をあらかじめ生じさせておいた培養細胞に

対して赤痢菌を感染させると、virA 変異株によって低下したラッフル膜誘導能は著しく上昇し、その程度は野生株と同等となった。以上の結果より、VirA は赤痢菌感染の際、感染部位の微小管の動態に変化を生じさせることにより Rac1 の活性を促し、その結果ラッフル膜形成の誘導を通じて、菌の細胞侵入の効率を上げていると推定された。

(3) 赤痢菌の細胞内拡散における VirA の役割について解析を行なった。菌を培養細胞に感染させ、その微小管の動態について観察を行った結果、菌の細胞内拡散によって微小管ネットワークが激しく破壊されているのが明らかになった。この時、菌の表面には VirA が分泌されていることが観察された。また、薬剤処理によって微小管ネットワークが破壊されている細胞に菌を感染させると、正常細胞に感染した場合と比較して、菌はおよそ 1.25 倍の速度で感染細胞内を移動できることが示された。そこで、野生株赤痢菌と virA 変異株赤痢菌を培養細胞に感染させ経時的な観察を行うと、野生株では観察した菌の 80% が細胞内拡散を行っていたのに対して、virA 変異株ではおよそ 15% の菌でしか細胞内拡散を行っていなかった。この時、virA 変異株が感染した細胞を観察すると、菌の周辺の微小管には特に変化が見られなかった。一方、VirA の発現量を調製できるプラスミドを導入した virA 変異株を培養細胞に感染させ、経時的な観察をおこなった結果、VirA の発現量の増大とともに、細胞内拡散を行う菌の比率も上昇することが分かった。さらに、微小管ネットワークが破壊されている細胞に virA 変異株を感染させるとおよそ 50% の菌が細胞内拡散をおこなっていた。以上より、赤痢菌の細胞内拡散において VirA は重要な因子であり、おそらく菌は VirA を細胞質中に分泌することにより菌周辺の微小管を破壊し、細胞質内で菌自身が受ける抵抗値を軽減させることにより細胞内拡散効率をあげていると考えられた。

以上、本論文は、赤痢菌は宿主細胞の微小管ネットワークシステムを利用することで上皮細胞感染を行なっていることを新たにし、その機構における赤痢菌の機能性分泌蛋白質である VirA 蛋白質の役割を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった赤痢菌と微小管ネットワークシステムとの関係について初めて詳細に検討された研究であり、赤痢菌の宿主大腸上皮細胞感染機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。