

論文の内容の要旨

論文題目 赤痢菌の III 型分泌機構依存的に分泌される新規病原因子 IcsB の
機能に関する分子生物学的研究

指導教官 笹川千尋教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 小川道永

赤痢菌は腸管侵入性大腸菌(EIEC)と共に細菌性赤痢の原因菌として知られている。細菌性赤痢の起因菌である赤痢菌は、経口的にヒトの体内に取り込まれた後、腸管下部において M 細胞から侵入し、その下部に常在するマクロファージに感染する。赤痢菌の感染を受けたマクロファージはアポトーシスあるいはオンコーシスにより死滅する。死滅したマクロファージから離脱した菌は吸収上皮細胞に側底面より侵入する。上皮細胞へ侵入した赤痢菌は細胞内を運動しながら隣接上皮細胞へ漸次感染を行い、最終的に血性下痢を惹起する。赤痢菌の感染過程を分子レベルで明らかにすることは、ワクチンを含めた細菌性赤痢の予防法、さらには治療法を開発する上で非常に重要である。

赤痢菌の III 型分泌機構を通じて分泌される病原性蛋白質は宿主細胞の高次機能に様々な方法（促進、修飾、抑制等）で影響を及ぼし、感染に促進的に働くことから「エフェクター蛋白質」と呼ばれている。赤痢菌感染において重要な

[別紙 1]

役割を果たす病原因子は、主に赤痢菌の保有する 220 kb の病原プラスミド上の 31 kb にわたる病原遺伝子塊にコードされている。その病原遺伝子塊には細胞侵入に関わる Ipa 蛋白質群と、その分泌に必要な III 型分泌機構の構成蛋白質である Mxi および Spa 蛋白質群等の遺伝子がコードされている。icsB 遺伝子は ipa オペロンと mxi-spa オペロンの中間に位置し、さら ipa オペロンの最も上流に位置することから、その病原性への関与が予想されてきた。しかし IcsB は DNA およびアミノ酸レベルで既存の蛋白質との相同性が全く認められないことから IcsB のエフェクター蛋白質としての機能は現在までに全く不明であった。

そこで、本研究では icsB 遺伝子非極性欠失変異株を作製することにより、赤痢菌の III 型分泌機構による IcsB の分泌性を調べ、またその安定性と分泌に必要なシャペロン分子を同定することを目的とした。その結果、コンゴレッド色素による III 型分泌機構誘導実験、および培養細胞を用いた感染実験により IcsB は赤痢菌の III 型分泌機構を通じて分泌される蛋白質であることが明らかになった。また、III 型分泌機構による IcsB の分泌には IcsB の N 末端領域に存在する 15 アミノ酸が必要であることを示した。グラム陰性菌の III 型分泌機構により分泌されるエフェクター蛋白質の多くは固有のシャペロン分子を有していることから、IcsB に対するシャペロン分子を化学的な性質をもとに検索した。その結果、病原プラスミド上において icsB 遺伝子の直下に位置している ipgA 遺伝子にコードされている IpgA が IcsB に対するシャペロン分子であることが明らかになった。ipgA 遺伝子非極性欠失変異株では菌体内および分泌物中の IcsB 量が検出限界以下にまで減少した。さらに詳細な解析により IpgA は IcsB の III 型分泌機構による分泌および菌体内での安定化に必須であることを明らかにした。また、IcsB と IpgA は菌体内において結合性を示し、その結合には IcsB の 171 から 247 番目のアミノ酸領域が必要であることを示した。

興味あることに、*icsB* 遺伝子の終止コドン TAG は特定の環境下において他のアミノ酸に置換されるアンバーサプレッシブコドンで、赤痢菌では *icsB* 遺伝子から *ipgA* 遺伝子へ「リードスルー」されて、その結果下流に位置する *IpgA* との融合蛋白質が発現される可能性を見いだした。この融合蛋白質も III 型分泌機構から分泌されることが明らかになったが、その病原性に果たす役割は明確にはできなかつた。いずれにしても、これらの結果は、*IcsB* が赤痢菌の III 型分泌機構により分泌されるエフェクター蛋白質であることを強く示唆するものである。

次に、動物実験モデル、培養上皮細胞、繊維芽細胞、酵母を用いて赤痢菌の感染における *IcsB* の役割を解明するために多角的な機能解析を試みた。まず始めに、*IcsB* が真核細胞に与える影響を、培養上皮細胞および酵母に *IcsB* を発現させて解析をおこなった。その結果、*IcsB* は上皮細胞に対し細胞傷害性を示し、酵母に対しては生育を阻止することが明らかになった。さらに、赤痢菌感染における *IcsB* の役割を明らかにするための一次検索として、モルモットを用いた角膜結膜炎惹起試験をおこなった結果、野生株投与群と比較して、 Δ *icsB* 株投与群では赤痢菌感染による結膜炎の発症が顕著に抑制されていた。また、繊維芽細胞である BHK 細胞を用いた実験の結果、 Δ *icsB* 株感染細胞では野生株感染細胞と比較して、菌体の周囲へのアクチン凝集環の形成率が大幅に上昇していた。次に、細胞間拡散能を、上皮細胞である MDCK 細胞を用いたプラーク形成試験により調べた結果、野生株感染細胞と比較して Δ *icsB* 株感染細胞では形成されたプラークの直径が有意に低下した。そこで、透過型電子顕微鏡を用いた観察をおこなった結果、 Δ *icsB* 株感染細胞では多層のラメラ構造を持ったリソソームが菌体の周囲を取り囲んでいることが明らかになった。蛍光色素を用いてリソソームを染色した結果、菌体の周囲にリソソームが局在するものが観察された。実際に、リソソーム膜上に存在する v-ATPase 阻害剤で

[別紙 1]

あるバフィロマイシン A1 を培地に添加することにより、 $\Delta icsB$ 株の細胞間拡散能は野生株と同程度にまで回復した。さらに、オートファゴゾームに特異的なマーカー分子である LC3 を発現させた MDCK 細胞を作製し、赤痢菌と GFP-LC3 との局在性を調べた結果、 $\Delta icsB$ 株感染細胞では菌体の周囲への GFP-LC3 の局在が認められたのに対し、野生株感染細胞ではこのような局在性は認められなかった。オートファゴゾーム形成阻害剤であるワートマニン処理をおこなった細胞では、菌体の周囲への GFP-LC3 の局在は消失した。以上の結果から、IcsB は赤痢菌の上皮細胞への侵入後、宿主細胞内でオートファジーによる菌の捕捉を抑制していることが強く示唆された。

本研究により、赤痢菌感染によって起こるオートファジーは、動物細胞への細菌感染時に起きることが報告されている「マクロオートファジー」ではなく、リソソームが直接菌体を飲み込む「マイクロオートファジー」であることが示唆された。現在までに、細胞内に侵入した細菌がマイクロオートファジーにより消化殺菌される例は報告されていない。さらに、現在までに動物細胞でのマイクロオートファジーの意義は明らかになっておらず、分子機構もほとんど不明である。しかし近年、酵母を用いた研究からマクロオートファジーとマイクロオートファジーは一部の分子装置を共有している可能性が示唆されている。MDCK 細胞における $\Delta icsB$ 株のマイクロオートファジーにおいて、マクロオートファジーにおいて形成されるオートファゴゾームに局在する分子として報告されている LC3 の関与が示唆されたという本研究の結果は、この仮説を裏付けるものであると同時に、動物細胞におけるマイクロオートファジー研究の発展にも貴重な情報を提供するものであると思われる。