

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 小川 道永

本研究は赤痢菌の病原プラスミド上にコードされている IcsB の III 型分泌機構による分泌性および赤痢菌の病原性における役割を明らかにするために、分子遺伝学的、細胞生物学的および実験病理学的解析により、下記の結果を得ている。

1. 非極性欠失変異株を作製し、IcsB の分泌性をウェスタンブロッティングにより解析を行った結果、IcsB が赤痢菌の III 型分泌機構依存的に分泌されることが示された。
2. *icsB* 遺伝子相補株、および *ipgA* 遺伝子非極性欠失変異株における IcsB の分泌性および安定性の解析から、IcsB に対するシャペロン分子 IpgA を同定した。さらに IpgA の有無による IcsB の分泌性および菌体内での安定性を解析することにより IpgA が IcsB の分泌および安定化に必須であることが示された。
3. アフィニティーカラムを用いた解析の結果、IcsB と IpgA が相互作用し、さらに IpgA に対する IcsB の結合領域が 171 から 247 番目のアミノ酸領域であることが示された。
4. TOF-MS およびサプレッサー-tRNA を用いた解析により *icsB* 遺伝子の終止コドンである UAG がサプレッサー-tRNA によりリードスルーされ、IcsB とその下流にコードされている IpgA との融合蛋白質が発現する可能性が示された。
5. 培養上皮細胞における IcsB の発現解析により、IcsB が哺乳類細胞に対して細胞傷害性を有しており、この細胞傷害性には IcsB の 1-125 番目のア

[別紙 2]

ミノ酸が関与していることが示された。さらに、酵母を用いた IcsB の発現解析により、IcsB が酵母の生育を完全に抑制することが示された。

6. モルモットを用いたセレニー試験により、*icsB* 変異株投与群では赤痢菌感染による角膜結膜炎の発症が顕著に抑制されることを見出し、赤痢菌の病原性において IcsB が重要な役割を果たしていることが示された。
7. 繊維芽細胞である BHK 細胞を用いた感染実験の結果から、*icsB* 変異株感染細胞では、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することが示された。
8. MDCK 細胞を用いたプラーク形成試験を行った結果、*icsB* 変異株では細胞間拡散能が有意に低下していることが示された。また、バフィロマイシン A1 により、*icsB* 変異株の細胞間拡散能が回復することが示された。
9. 透過型電子顕微鏡を用いた観察をおこなった結果、*icsB* 変異株は宿主細胞侵入後に多層のラメラ構造を持ったリソソーム(ミクロオートファゴソーム)により捕食されることが示された。
10. オートファゴソームに特異的なマーカー分子である LC3 を安定発現させた MDCK 細胞株を作製し、赤痢菌と LC3 との局在性を解析した結果、*icsB* 変異株感染細胞では菌体の周囲へ LC3 が集積することが示された。したがって *icsB* 変異株では菌体がオートファゴソームに捕食されるために細胞間拡散能が低下している可能性が示された。

以上、本論文は赤痢菌の保持している新規病原因子 IcsB に関して、分子生物学的および細胞生物学的解析から、IcsB の分泌性およびその機能を明らかにした。本研究は赤痢菌の感染メカニズムの解明および動物細胞におけるミクロオートファジー研究の発展にも重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。