

## 審査の結果の要旨

氏名 豊留孝仁

本研究では赤痢菌の病原因子と想定されるタンパク質 IpaH がⅢ型装置を通じて菌体外へと分泌されているかを解析し（第 1 章）、そして IpaH の一つ、IpaH<sub>9.8</sub> についてその宿主細胞内での動態の解析を試みた（第 2 章）ものであり、下記の結果を得ている。

(i) コンゴレッド存在下における赤痢菌からの IpaH の分泌について解析した結果、IpaH<sub>4.5</sub>、IpaH<sub>7.8</sub>、IpaH<sub>9.8</sub> はいずれも菌体外へ分泌されることが明らかとなった。一方コンゴレッド非存在下では菌体外への分泌は認められなかった。更にⅢ型分泌装置を破壊した株で解析を行った結果、コンゴレッド存在下においても分泌は全く観察されなかった。これらの結果から IpaH はⅢ型分泌装置を介して分泌されることが強く示唆された。

(ii) IpaH<sub>9.8</sub> がⅢ型分泌装置から分泌されるために必要な領域について解析した。欠失変異体の解析から N 末端 60 アミノ酸が分泌に必須であると考えられたが、174 位以降の C 末端領域も効率的な分泌に関与することが考えられた。また、N 末端 60 アミノ酸の大部分をフレームシフトさせ、アミノ酸配列のみを大きく変化させた変異 IpaH<sub>9.8</sub> はⅢ型分泌機構による分泌が認められなかった。このことからⅢ型装置からの分泌に N 末端 60 アミノ酸配列が重要と考えられた。更に欠失変異体を構築して解析した結果、IpaH<sub>9.8</sub> では N 末端の 12 アミノ酸がⅢ型装置を通じて分泌されるために必要な領域であることが示された。

(iii) 赤痢菌の細胞侵入に関わる IpaBCD はコンゴレッド添加後速やかに菌体外液へ分泌されるが、IpaH タンパク質はコンゴレッド添加 2 時間後に初めて分泌が認められた。この結果から IpaBCD が細胞侵入に伴い分泌されるのとは異なり、菌が上皮細胞侵入後に IpaH が分泌されることが強く示唆された。

(iv) IpaH の一つ、IpaH<sub>9.8</sub> に焦点を絞り、宿主細胞内動態を解析した結果、IpaH<sub>9.8</sub> は宿主細胞内において赤痢菌から分泌された後、宿主細胞核内に局在する様子が観察された。更に細胞内に IpaH<sub>9.8</sub> を大量産生させた場合や IpaH<sub>9.8</sub> を直接細胞内に注入した場合も同様に核への移行が観察された。これらの結果から IpaH<sub>9.8</sub> は宿主細胞質内で赤痢菌から分泌された後、細胞核へ移行する核移行性タンパク質であることが強く示唆された。

(v) IpaH<sub>9.8</sub> は核へ移行する以外に細胞質内で核周辺の一極へ集まる様子が観察された。この現象を解析した結果、IpaH<sub>9.8</sub> が微小管形成中心へ集積することが示された。この集積は微小管重合阻害剤ノコダゾールで処理することにより消失するとともに IpaH<sub>9.8</sub> の効率的な核内局在が起こらなくなった。これらの

結果から IpaH<sub>9.8</sub> は微小管に依存した系により微小管形成中心へ集積し、IpaH<sub>9.8</sub> の核内移行を効率的なものとしていることが示唆された。

(vi) 核内への移行を解析するためにジギトニン処理細胞を用いた *in vitro* 核移行アッセイを行った。この実験からも IpaH<sub>9.8</sub> の核内移行能が確認された。IpaH<sub>9.8</sub> はこれまで知られているような核局在化シグナル (NLS) を持つタンパク質と異なり、核内移行反応で宿主細胞質の可溶性画分やエネルギー再生系成分を必要としなかった。また、ATP 要求性は部分的に認められた。更に核膜孔通過を阻害する小麦胚凝集素により核内移行が阻害されたことや 4°C で核内移行が認められなくなったことから、IpaH<sub>9.8</sub> の核内移行は非特異的な拡散によるものではなく、核膜孔を通じた選択的な核内移行であると考えられた。これらの核移行様式は NLS を持つタンパク質と異なり、むしろ  $\beta$ -カテニンの核内移行様式と類似していることが示された。

(vii) IpaH<sub>9.8</sub> の核内移行に関与する領域について解析する目的で、種々の *ipaH<sub>9.8</sub>* 部分欠失遺伝子を宿主細胞で強発現させ、IpaH<sub>9.8</sub> の局在を調べた結果、N 末端 60 アミノ酸を欠失した変異体では核移行が認められなくなった。また、*ipaH<sub>9.8</sub>* 遺伝子のフレームシフトにより N 末端 60 アミノ酸配列が大きく変化した IpaH<sub>9.8</sub> 変異タンパク質も核移行が認められなかった。更にジギトニン処理した細胞を用いた核移行アッセイにより IpaH<sub>9.8</sub> の核内移行に関与する領域の同定を進めた。N 末端 66 アミノ酸を融合した GFP タンパク質は核移行が認められた。これらの結果から、IpaH<sub>9.8</sub> の N 末端 60 アミノ酸が核膜孔を通じた選択的な核内移行に必要な領域であることが明らかとなった。

以上、本論文は IpaH<sub>9.8</sub> が感染細胞中で赤痢菌から III 型分泌装置を通じて分泌され、微小管に依存した系を通じて核近傍の微小管形成中心へと向かい、更に核膜孔を通過して核内に入るという一連の挙動を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった赤痢菌タンパク質 IpaH に関して初めて詳細に解析が行われたものであり、IpaH を赤痢菌の新規病原因子として位置付けると共に、今後の赤痢菌感染機構の解明に大きく貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。