

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 「腸管病原性大腸菌 III 型分泌タンパク質
EspF の機能解析」

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 13 年 入学

医学博士課程

氏名 永井 武

腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli* ; EPEC) は、発展途上国などにおいて現在でも、乳幼児を中心とした重篤な水様性下痢の原因菌として脅威となっている。具体的には、ブラジル、メキシコなど中南米を中心とした地域の乳幼児胃腸炎の患者から、EPEC が検出されることが多い。また、EPEC は成人においでもしばしば下痢症を引き起こし、日本でも毎年数十件の食中毒が発生している。EPEC は主にヒトの小腸上皮細胞に付着する菌であるが、コレラ菌などとは異なり、腸管毒素を産生しない。そのため、EPEC による下痢発症の詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

現在までに明らかとなっている EPEC の定着機構は以下のようなものである。まず、小腸上皮細胞に束状線毛 (bundle forming pilli; BFP) を用いて付着する。次に、III 型分泌装置 (Type III secretion system; TTSS) により、エフェクターと呼ばれる一連の機能性タンパク質が宿主細胞に注入される。細胞内に注入されたエフェクターと宿主因子の相互作用により、菌体直下で細胞骨格の再編成とともに台座様の足場が形成され、菌が付着した上皮細胞の微絨毛が破壊さ

れる。このような現象は、EPEC 感染における病理学的な特徴から、A/E (Attaching and Effacing) 傷害と呼ばれている。この A/E 傷害を引き起こす一連の遺伝子群は、染色体上に存在する病原性遺伝子塊 (pathogenesity island; PAI) の一つである LEE (Locus of Enterocyte Effacement) にコードされている。LEE は約 35kbp の PAI で、41 の ORF から構成されている。LEE には、TTSS の構成成分、シャペロン、調節因子、エフェクター、付着因子であるインティミンがコードされている。また、新興感染症として近年アメリカや日本で大流行した EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*, O157:H7) や、マウス感受性を示す *Citrobacter rodentium* (*C.rodentium*)、ラビット感受性の病原性大腸菌 RDEC-1 にも LEE は高度に保存されている。EPEC や *C.rodentium* は、EHEC よりも毒性が弱いことから、EHEC 感染のモデルとして利用されており、その分子レベルでの感染機構の解析が非常に重要であると考えられる。

EspF は、1998 年に MacNarama らによって最初に報告された。それによると、EspF は、LEE のなかにコードされているエフェクターの一つであり、TTSS を用いて、宿主細胞内に注入される。また、EspF は菌の付着、侵入、菌体直下のアクチン凝集には影響しないことが報告された。その後、EspF の機能として、感染細胞に細胞死を誘導すること (Crane et al., 2001)、およびタイトジャンクションを破壊すること (MacNarama et al. 2001) が報告された。また、最近、EspF は中間系フィラメントの一つであるサイトケラチン18と結合することが報告されたが、その感染における意義はまだ不明な点が多い。さらに、*C.rodentium* の *espF* 欠損株を用いたマウス感染実験の結果、病原性がわずかに低下することが示された。しかし、これらの現象についての詳細な機構や、*in vivo* での病原性については依然不明な点が多い。そこで、本研究では、EspF の *in vitro* および *in vivo* における機能を分子生物学的ならびに細胞生物学的手法を用いて解析した。第1章では、EspF の細胞内局在を明らかにし、そこから細胞死を引き起こすメカニズムについて検討した。続いて、第2章では、*C.rodentium* を用いて、マウス感染モデルにより EspF の病原因子としての役割を解析した。

まず、EPEC より注入された EspF の細胞内局在について検討を行った。EPEC 野性株を HeLa 細胞に感染させ、抗 EspF 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。その結果、EspF は、ミトコンドリアと完全に一致したことから、EspF は EPEC より細胞に注入された後、ミトコンドリアに移行することが明らかとなった。一般的に、ミトコンドリアタンパクの約95%は核染色体にコードされており、その多くは、N 末端側にミトコンドリア移行シグナル (mitochondrial targeting signal; MTS) を有する。そこで、EspF にも MTS が存在するかどうかを検証するため、さまざまな長さの EspF-EGFP 融合タンパクを COS-7 細胞に発現させ、ミトコンドリア移行能を検討した。その結果、EspF の N 末端24アミノ酸と EGFP 融合タンパク質 (EspF (1-24)EGFP) でも、ミトコンドリアに移行した。しかし、1-23 アミノ酸を除いた EspF(24-206)-EGFP では、全く移行しなかった。また、EspF(6-23)の二次構造を予測した結果、MTSに特徴的な正電荷アミノ酸を含む両

親媒性 α ヘリックス様構造を取ることが示唆された。さらに、EspF の MTS に点変異を導入した結果、16th Leu をグルタミン酸に変換した EspF(L16E) もしくは 14th Arg と 22nd Arg をグルタミンに変換した EspF(R14,22Q) は、まったくミトコンドリアには移行しないことが明らかとなった。以上の結果より、EspF の N 末端には MTS が存在し、その移行には 16th Leu および 14th、22nd Arg が重要であることが明らかとなった。

つぎに、*espF* 欠損株 ($\Delta espF$) に pEspF および pEspF(L16E) (EspF、EspF(L16E)) を発現させるプラスミドを導入し、EspF によって引き起こされる現象が、ミトコンドリア移行に依存して起きているか否かを検討した。ここで、ミトコンドリアは、その内膜の膜電位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$) により生体エネルギー物質である ATP を合成するオルガネラであるとともに、細胞の生死を制御している。一方、EspF は細胞死を引き起こすことが報告されているので、細胞死における EspF とミトコンドリアの関係について検討を行った。EPEC 野性株、 $\Delta espF$ 、 $\Delta espF/pEspF$ 、 $\Delta espF/pEspF(L16E)$ を HeLa 細胞に感染させ、細胞死を LDH アッセイ、および $\Delta\Psi_m$ の消失をローダミン 123 ($\Delta\Psi_m$ 依存的にミトコンドリアに取り込まれる蛍光物質) を用いて解析した。その結果、感染による $\Delta\Psi_m$ の消失、およびそれに続くネクローシス様細胞死は、EspF のミトコンドリア移行能に依存して起きていることが明らかとなった。

次に、*C. rodentium* によるマウス感染モデルを用いて、EspF がミトコンドリアに移行することが、病原性を発揮する上で重要であるか否かを検討した。(以後、*C. rodentium* の *espF* を *espF_{CR}* とする) まず、EPEC と同様、 $\Delta espF_{CR}$ 、 $\Delta espF_{CR}/pEspF_{CR}$ および $\Delta espF_{CR}/pEspF_{CR}(L16E)$ を作製した。C3H/HeJ マウスにそれぞれ、 2×10^8 cfu/head を経口投与し、生存率を求めた (n=10)。その結果、野性株では 12 日目までに全てのマウスが死亡するが、 $\Delta espF_{CR}$ では 90% の生存率であった。また、同様に、 $\Delta espF_{CR}/pEspF_{CR}$ 感染では 20%、および $\Delta espF_{CR}/pEspF_{CR}(L16E)$ では 80% の生存率であった。つまり、*espF_{CR}* がミトコンドリアに移行することがマウスに対する病原性に必要であることが示唆された。また、大腸に対する定着菌数、粘膜層の肥厚、大腸の重さおよび TUNEL 陽性細胞数 (死細胞数) などについても、*espF_{CR}* がミトコンドリアに移行することによって増大することも明らかとなった。

以上の結果をまとめると、i) EspF はミトコンドリアに移行する、ii) EspF は N 末端に MTS を有する、iii) EspF がミトコンドリアに移行することで、 $\Delta\Psi_m$ の消失および細胞死が誘導される、iv) *in vivo* においても、EspF がミトコンドリアに移行することが、病原性を発揮する上で重要であることが示された。今後、EspF の機能をより詳細に解析することで、これに基づいた新たな治療法の開発につながるのではないかと考えられる。