

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 永井 武

本研究では、腸管病原性大腸菌 (EPEC) が産生する III 型分泌タンパク質 EspF の病原因子として役割を、分子、細胞および個体レベルで解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

- 1) 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。
- 2) *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。

- 3) *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、本論文では、EspF は病原因子として必須の因子であり、その機能の発揮にはミトコンドリアに移行することが、*in vitro* および *in vivo* において重要であることを明らかにした。よって本研究では、EPEC 感染における病原性の解明に大きく貢献したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。