

## 論文の内容の要旨

論文題目 赤痢菌 III 型分泌装置の構造と機能の解析：

Spa33 のエフェクタータンパク質輸送に果たす役割

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 石原朋子

赤痢菌はグラム陰性細菌の 1 つで、腸管組織侵入性大腸菌と共に、細菌性赤痢の起病因菌として知られている。赤痢菌をはじめとするグラム陰性病原細菌が有する III 型分泌装置は、宿主標的細胞にエフェクタータンパク質を輸送、分泌する装置として感染に重要な役割を果たしている。赤痢菌は針様構造を示す III 型分泌装置を菌体の外膜と内膜を貫き形成している。菌が宿主細胞と接触すると、宿主細胞膜に針先端が挿入され膜穴が形成され、菌は針部を介して菌体内から宿主細胞の細胞質にエフェクターと呼ばれる病原因子を直接注入する。III 型分泌装置は針部、基部、C リングから構成され、サルモネラ属菌および赤痢菌の III 型分泌装置の超微細構造解析から、基部は 2 つの上部リングと 2 つの下部リングより構成され、その基本構造はべん毛タンパク質の輸送装置であるべん毛基部に類似していることが報告されている。また、べん毛基部の直下には C リングと呼ばれるキャップ状の構造体の存在が示唆されている。こ

の C リングは、III 型分泌装置の基部の直下にも存在することが示唆されているが、その構造および構成成分は不明である。興味深いことに、べん毛 C リングの構成成分である FliN は、赤痢菌の Spa33、サルモネラ属菌の SpaO、エルシニア属菌の YscQ、緑膿菌の HrcQ<sub>B</sub> と部分的なアミノ酸相同性を示す。これらの事実は、赤痢菌の Spa33 が III 型分泌装置の C リングの構成成分である可能性を強く示唆している。さらに、III 型分泌装置の C リングは、エフェクタータンパク質の分泌シグナルを認識し、III 型分泌装置を介した分泌タンパク質の無差別な輸送を回避していると考えられている。しかしながら、III 型分泌装置の構成成分によるエフェクタータンパク質の認識および輸送の正確なメカニズムは、いまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、エフェクタータンパク質の輸送において III 型分泌装置の構成成分が果たす役割を解明することを目的として、C リングの構成成分として推測されている Spa33 の赤痢菌 III 型分泌装置における局在と役割について解析を行った。

まず初めに、赤痢菌の *spa33* 遺伝子欠失変異株を作製し、本変異株において形成される III 型分泌装置の構造と機能を解析した。その結果、本変異株は針部を欠いた不完全な III 型分泌装置を形成し、Ipa タンパク質の分泌が不能となった。次に、Spa33 の菌体内局在を調べるために、生化学的解析および電子顕微鏡による観察を行った。その結果、Spa33 は赤痢菌の細胞質中の内膜近傍に局在し、基部の主要な構成成分である MxiG および MxiJ と結合性を示すことが明らかとなった。さらに、Spa33 の III 型分泌装置における局在を詳細に調べるために、架橋試薬を用いて Spa33 の III 型分泌装置に対する結合を安定化した状態で、III 型分泌装置を精製して電子顕微鏡による解析を行った。その結果、基部の直下に巨大な構造体が認められた。その構造体の構成成分を金コロイド染色法を用いて解析した結果、Spa33 が構成成分の 1 つであることが明らかになった。また、III 型分泌装置を介したタンパク質の輸送、分泌にお

ける Spa33 の役割を解明するために、Spa33 と III 型分泌装置関連タンパク質の結合性を調べた。GST-プルダウンアッセイを用いた結合試験の結果、Spa33 は III 型分泌装置の ATPase である Spa47、針部の構成成分の輸送に必要な MxiK と MxiN、針の長さを一定に保つ“分子物差し”として働く Spa32、さらに数種類のエフェクタータンパク質およびそのシャペロンタンパク質との結合性を示した。以上の結果から、Spa33 は C リングの主要な構成成分として III 型分泌装置を介した針部の構成成分やエフェクタータンパク質の輸送、分泌に関与していることが示唆された。

次に、Spa33 の C 末端領域（216-293 アミノ酸領域）がべん毛および III 型分泌装置を有するグラム陰性細菌の Spa33 相同性タンパク質と高い相同性を示すことから、Spa33 の C 末領域の機能を III 型分泌装置の針部の形成能とエフェクタータンパク質の分泌能を指標に解析し、以下の知見を得た。(i) Spa33 の C 末端領域内において、Spa33 の相同性タンパク質（べん毛の FliN、サルモネラ属菌の SpaO、エルシニア属菌の YscQ、緑膿菌の HrcQ<sub>B</sub>）の間で高度に保存されている 9 つのアミノ酸残基中 3 残基が III 型分泌装置の針部の形成およびエフェクタータンパク質の分泌に必須であった。(ii) その 3 つのアミノ酸残基は MxiN（III 型分泌装置の針部の形成に必要）との結合に必須であった。

(iii)  $\Delta spa33$  株のエフェクタータンパク質の分泌不能は、Spa33 の相同性タンパク質では回復しなかった。以上の結果から、Spa33 の C 末端領域は III 型分泌装置の針部の構成成分やエフェクタータンパク質の輸送に関わる重要なアミノ酸残基を含む領域を高度に保存していることが示唆された。そして、III 型分泌装置における Spa33 とその相同性タンパク質の局在と基本的役割は同じであると推測されるが、Spa33 は赤痢菌の III 型分泌装置において特異的に機能していることが明らかになった。