

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 赤痢菌 **IpaB** エフェクターによる上皮細胞の細胞周期停止とその感染に果たす役割に関する研究

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 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 祝弘樹

グラム陰性病原細菌の多くが III 型分泌装置系を通じて一群の宿主細胞移行性タンパク質 (エフェクター) を分泌して宿主 (ヒト、動物、植物) に感染し、様々な疾患が起こることが明らかになってきた。

赤痢菌はエフェクターの一つである **IpaB** を分泌しファゴソーム (食胞) を溶解して最終的にマクロファージを殺傷する。細胞内で **IpaB** は **Caspase-1** を活性化し **IL-1 $\beta$**  (intrleukin-1 $\beta$ ) の分泌を促進する。マクロファージの細胞内から出た赤痢菌は上皮細胞に侵入する際に菌表面の **IpaB** を宿主細胞表面の **CD44** に会合させるが、一部の **IpaB** は上皮細胞内に移行するがその機能は明らかになっていない。

そこで、赤痢菌の上皮細胞への感染における **IpaB** の役割を解明するために、酵母ツーハイブリッド検定を利用して **IpaB** の結合タンパク質を **HeLa** 細胞の cDNA ライブラリーから検索し、**Mad2L2** を同定した。

アフリカツメガエル由来の後期促進複合体 (anaphase-promoting complex; **APC**) の抑制因子として機能することが知られている **Mad2L2** は、**HeLa** 細胞内においても **G2/M** 期に **APC** と相互作用していた。また、この時期に **IpaB** が核内に移行することを明らかにした。

**IpaB** は細胞周期依存的に局在を変化させることから、赤痢菌が細胞周期の進行を調節することが予想されたため、標的細胞である腸管陰窩に赤痢菌が定着していることを確認し、細胞周期マーカー (Proliferating cell nuclear antigen;

PCNA) の染色を行ったところ、赤痢菌の感染により陰窩の細胞増殖が抑制されていることを見出した。

さらに赤痢菌が宿主細胞の細胞周期の進行を調節していることを証明するために、細胞内増殖を制御可能なジアミノピメリン酸要求性赤痢菌株 ( $\Delta dapB$ ) を作製し HeLa 細胞に感染させ、24 時間後に観察したところ球状化した細胞が多数観察され、G2/M 期の細胞集団が増加していた。また、赤痢菌の感染による HeLa 細胞の球状化は、G1/S 期同調後から 6 時間以降に観察され、有糸分裂が抑制されていたことから、赤痢菌は細胞周期を停止させることが示唆された。

赤痢菌の感染により APC の活性が調節されることを示唆するために、赤痢菌 ( $\Delta dapB$ ) を感染させた HeLa 細胞内の APC 基質分子についてウェスタンブロット解析を行い、G2/M 期におけるタンパク質量の蓄積と分解を観察したところ、赤痢菌の感染によりサイクリン B1、Cdc20 および Plk1 の蓄積が観察されなかった。また、G2/M 期に赤痢菌が感染した HeLa 細胞内では APC が活性化しており、この時 APC は Cdh1 と相互作用していた。したがって、赤痢菌は予定外に APC を活性化させることで、細胞周期の進行に必要な分子の分解を導き、その結果、宿主細胞の細胞周期が停止することが明らかとなった。

赤痢菌が引き起こす上皮細胞の細胞周期停止における赤痢菌のエフェクターである IpaB とその宿主内標的である Mad2L2 の役割を解析した。IpaB の Mad2L2 結合部位は N 末端領域 61-70 アミノ酸であったが、この部位は IpaB のシャペロンである IpgC の結合部位でもあったために、IpgC に結合できるが Mad2L2 に結合できない 1 アミノ酸置換した IpaB 変異体 (IpaB<sup>N61A</sup> 変異体) を作製した。

次に、細胞周期特異的なユビキチンリガーゼである APC と相互作用する Mad2L2 が、APC の活性化因子である Cdh1 と直接結合することを示し、IpaB が Mad2L2 と Cdh1 の結合を阻害することを示した。HeLa 細胞から精製した APC を用いて、サイクリン B1 をポリユビキチン化した際に Mad2L2 は APC を抑制することができるが、この Mad2L2 の抑制効果を IpaB が解除することを示した。一方、IpaB<sup>N61A</sup> 変異体は Mad2L2 の APC 抑制効果を解除できなかった。

IpaB により Mad2L2 の機能が解除されることを HeLa 細胞内で模倣するために Mad2L2 のノックダウンを行ったところ、細胞周期の進行が遅延するこ

とが示された。さらに IpaB と Mad2L2 の相互作用が赤痢菌の感染に寄与するか解析するために、IpaB<sup>N61A</sup> を発現した赤痢菌変異体を作製して、野生型 IpaB を発現した赤痢菌との混合感染実験を行い、ウサギ腸管への定着能の低下を確認した。また、GFP-IpaB1-312<sup>WT</sup> および GFP-IpaB1-312<sup>N61A</sup> を発現させた HeLa 細胞の細胞周期解析から、IpaB と Mad2L2 の結合依存的に細胞周期の進行が遅延することが示された。以上の結果から、赤痢菌は上皮細胞の細胞周期を停止させる示唆された。

本研究により、赤痢菌が腸管上皮細胞のターンオーバーを調節することで感染を成立させることが明らかになった。そしてその分子機構は以下の通りである。G2/M 期において APC ユビキチンリガーゼは Mad2L2 によりその活性が抑制されている。このことにより、サイクリン B1、Cdc20 および Plk1 などの APC<sup>Cdh1</sup> の基質分子の分解誘導が細胞周期依存的に阻害されていて、その後、M/G1 期には Mad2L2 が APC と相互作用しなくなると基質分子の分解が誘導される。サイクリン B1、Cdc20 および Plk1 などの蓄積により細胞周期は進行するが、赤痢菌が感染すると IpaB が Mad2L2 と結合し、その APC 抑制効果を解除されてしまう。このことにより、APC<sup>Cdh1</sup> が M/G1 期に活性化するはずが G2/M 期に予定外に活性化し、サイクリン B1、Cdc20 および Plk1 が分解誘導されてしまい細胞周期の進行が停止する。