

[別紙 2]

審査結果の要旨

氏名 祝 弘樹

本研究は、赤痢菌の腸管上皮細胞への感染過程を解明するために、APC (Anaphase-promoting complex) ユビキチンリガーゼによる細胞周期の進行を調節する赤痢菌の IpaB タンパク質の役割について解析を行い、下記の結果を得ている。

1. イーストツーハイブリッドスクリーニングにより IpaB 結合タンパク質を検索し、IpaB が APC インヒビターである Mad2L2 と相互作用することを示した。また、GST プルダウンアッセイにより *in vitro* で IpaB が Mad2L2 と特異的に結合することを示した。
2. IpaB を HeLa 細胞内に過剰発現させた実験から、G2/M 期に APC と Mad2L2 が存在する核内に IpaB が局在することを示した。また、HeLa 細胞の細胞抽出液を用いた免疫沈降実験により、G2/M 期に Mad2L2 と APC が相互作用していることを示した。
3. ウサギ結紮腸管ループ試験により腸管における赤痢菌の局在を調べ、赤痢菌が感染後期に陰窩の細胞に感染していることを示した。また、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) に対する抗体を用いたウサギ腸管の染色により、赤痢菌が腸管陰窩の細胞増殖を抑制していることを示した。
4. HeLa 細胞への感染実験により赤痢菌が細胞へ与える影響を調べ、赤痢菌が細胞周期を停止させることを示した。また、Cdh1 に活性化された APC (APC^{Cdh1}) の基質分子が赤痢菌の感染により分解誘導されることを示した。さらに、赤痢菌の感染した HeLa 細胞内の APC の活性を測定したところ G2/M 期に APC は活性化しており、その時 APC は Cdh1 と結合していることを示した。従って、APC^{Cdh1} の基質分子の分解誘導は赤痢菌の感染依存的であると考えられた。
5. APC ユビキチネーションアッセイにより IpaB が APC^{Cdh1} の活性に与える影響を調べ、IpaB が Mad2L2 の APC^{Cdh1} 抑制効果を解除することを示した。また、293T 細胞に Cdh1 あるいはそのホモログである Cdc20 を発

現させ Mad2L2 との結合性を調べ、Mad2L2 が Cdh1 と選択的に結合することを示した。さらに、*in vitro* で IpaB が Cdh1 と Mad2L2 の結合へ与える影響を調べ、IpaB が濃度依存的に Cdh1 と Mad2L2 の結合を阻害することを示した。

6. IpaB による HeLa 細胞への影響を模倣するために Mad2L2 の RNAi を行い、FACS による細胞周期解析により Mad2L2 が細胞周期の進行に寄与していることを示した。また、APC^{Cdh1} の基質分子の量を調べ、Mad2L2 の RNAi により基質分子の分解が誘導されることを示した。
7. イーストツーハイブリッドアッセイにより IpaB と Mad2L2 の結合部位を調べ、IpaB の N 末端領域 61~70 アミノ酸残基が Mad2L2 との結合に必要なことを示した。また、IpaB の Mad2L2 結合部位は赤痢菌内で IpaB が正常に発現するのに必要なシャペロン IpgC との結合部位であることを示した。さらに、IpaB 点変異体を作製しイーストツーハイブリッドアッセイおよび MBP プルダウンアッセイにより Mad2L2 への結合に必要な IpaB の 1 アミノ酸残基を調べ、61 番目のアスパラギンをアラニンに置換した IpaB 点変異体 (IpaB^{N61A}) が IpgC には結合するが Mad2L2 には結合しないことを示した。
8. IpaB^{N61A} を発現した赤痢菌 (*ipaB*^{N61A}) が正常にエフェクタータンパク質を分泌していることを調べ、エフェクター IpaB、IpaC、IpaD、IcsB および IpgB1 が野生型株および *ipaB* 相補株 (*ipaB*^{WT}) と同様に分泌されることを示した。また、*ipaB*^{N61A} の細胞侵入効率を調べ、*ipaB*^{N61A} は *ipaB*^{WT} と同様に細胞侵入することを示した。
9. Mad2L2 への結合能が低下した IpaB を発現した赤痢菌が細胞周期の進行に影響を与えるか調べるために、PCNA に対する抗体を用いてウサギ腸管の染色を行い、*ipaB*^{N61A} の感染により腸管陰窩の細胞増殖が抑制されないことを示した。また、*ipaB*^{N61A} が HeLa 細胞の細胞周期の進行に与える影響を HeLa 細胞を用いた感染実験により調べ、*ipaB*^{N61A} が *ipaB*^{WT} に比べ細胞周期の進行を遅延させないことを示した。したがって、赤痢菌の感染した上皮細胞の細胞周期の進行は IpaB と Mad2L2 の結合に依存的であると考えられた。
10. IpaB と Mad2L2 の結合依存的に赤痢菌が腸管上皮細胞へ定着することを調べるために、ウサギ腸管ループ試験による混合感染実験を行った。腸管上

皮細胞へ細胞侵入し定着した赤痢菌の生菌数から競合指数 (Competitive index) を算出し、*ipaB*^{N61A} は *ipaB*^{WT} に比べ腸管上皮への定着能が低下していることを示した。したがって、赤痢菌は *IpaB* を介した細胞周期の停止すなわち腸のターンオーバーの抑制により腸管上皮へ定着すると考えられた。

以上、本論文は赤痢菌が細胞周期を停止させることおよびそのメカニズムを明らかにした。本研究は腸粘膜上皮を感染の場とする病原細菌が有する細胞周期調節分子 (サイクロモジュリン) の研究の発展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。