

論文の内容の要旨

論文題目 赤痢菌 *IpgB1* 蛋白質による上皮細胞侵入機構の解析

指導教員 笹川 千尋 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月 入学

医学博士課程

氏名 半田 浩

赤痢菌属菌は A 群から D 群の 4 菌種からなる主要な病原性細菌の一つである。今なお発展途上国において乳幼児を中心に年間一億人が赤痢菌に感染しており、死者は数十万にのぼる。国内においては、衛生環境の改善や抗生剤の普及により赤痢菌の患者数は減少したが、近年では多剤耐性赤痢菌の出現も確認されており、有効なワクチンが存在しない事から、今後感染者が増加に転じる可能性もある。このような状況下に置いて、赤痢菌の感染機構を分子レベルにて解明する事は新たな治療薬を開発する上で非常に重要である。

赤痢菌は飲料水や食物を介して経口より体内に侵入する。菌はその後、大腸へと到達し腸管に散在している M 細胞から粘膜上皮下に侵入する。赤痢菌はその後、M 細胞直下の常在マクロファージにより貪食されるが、マクロファージにアポトーシスを誘導する事により脱出する。マクロファージから脱出した赤痢菌は腸管上皮細胞の側底面から侵入を果たす。侵入した赤痢菌は細胞の一極に F-

アクチンを凝集させる。この F-アクチンの凝集とブラウン運動を利用する事により赤痢菌は駆動力を得て細胞内拡散を行ない、隣接細胞へと感染部位を拡散している。

このような一連の出来事には赤痢菌の保有する 230kDa の大プラスミド上にコードされている III 型分泌装置とそれにより分泌されるエフェクターと呼ばれる蛋白質が必須である。III 型分泌装置により分泌されるエフェクターはおおよそ 30 あり赤痢菌の感染に重要な役割をもっている。赤痢菌が腸管上皮細胞へ接触すると、III 型分泌装置から IpaB、IpaC、IpaD 蛋白質が分泌される。IpaB は IpaC と複合体を形成し腸管上皮細胞上のインテグリンや CD44 と結合しアクチン骨格の再編成を誘導するとともに、腸管上皮細胞に III 型分泌装置のニードルを挿入するための小孔を形成する。その後、赤痢菌はニードルを通してエフェクターを腸管上皮細胞へと分泌することにより感染に必要な様々な現象を誘導する。赤痢菌感染時において最初のステップは腸管上皮細胞への侵入である。赤痢菌はエフェクターを用いて腸管上皮細胞にアクチン重合の再編成を誘導し、ラッフル膜と呼ばれる巨大な波状仮足を誘導し、それに取り込まれる事により腸管上皮細胞へと侵入する。これまでに、腸管上皮細胞へと侵入するために必須なエフェクターとして IpaC、VirA、IpgB1 が存在するが、その中においても IpgB1 は赤痢菌のラッフル膜形成誘導に最も重要な因子であることが報告されている。

赤痢菌のエフェクターの一つである IpgB1 は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの一つで細胞運動に中心的な役割をしている Rac1 を活性化させる事により腸管上皮細胞にラッフル膜を誘導し赤痢菌の宿主細胞侵入を促進する事が報

告されているが、その詳細な機構は不明であった。そこで、本研究では一章で IpgB1 のラッフル膜誘導機能の解明を分子生物学的、細胞生物学的な手法を用いて解析を行なった。

IpgB1 の Rac1 活性化機構を解明するために IpgB1 の宿主標的因子を検索した結果、Engulfment and Cell Motility (ELMO) が同定された。ELMO は N 末端にて低分子量 G 蛋白質ファミリーの一つで細胞運動に関わっている RhoG の活性化体と結合し、C 末端では Rac1 の特異的 GEF である Dock180 と結合する。RhoG が活性化されると細胞質に局在している ELMO-Dock180 複合体が RhoG と結合し、細胞質から細胞膜へと移行され、その結果 Rac1 が活性化されることが報告されている。IpgB1 が活性化 RhoG と同様に ELMO-Dock180 のシグナル経路を介して Rac1 を活性化しているのかを検討するために、様々な ELMO 変異体を作製した。その結果、Dock180 と結合しない ELMOT625 を IpgB1 と共発現した細胞ではラッフル膜の誘導が減少した。また、Rac1 と結合できない Dock180ISP 変異体を IpgB1 と共発現した時も同様にラッフル膜形成能は減少した。siRNA を用いた内在性 ELMO、Dock180 のノックダウンでも IpgB1 によるラッフル膜誘導は減少した。赤痢菌感染においても ELMO 変異体の強発現や siRNA による内在性 ELMO ノックダウンにより IpgB1 依存的な赤痢菌の細胞侵入が減少した。また、IpgB1 による Rac1 活性化を検討した結果、IpgB1 は活性化 RhoG と同様に細胞質に局在している ELMO-Dock180 細胞膜へと移行する事により Rac1 を活性化している事が示された。以上の結果より、赤痢菌により分泌された IpgB1 は宿主細胞内において活性化 RhoG と同じ機構を用いて

Rac1 を活性化させ、ラッフル膜を誘導する事により宿主細胞内に侵入する事が明らかとなった。

IpgB1 により上皮細胞に誘導されたラッフル膜は赤痢菌侵入後に素早く消失する。本研究では、二章にてラッフル膜消失機構の解明を行なった。その結果、赤痢菌により分泌された IpgB1 が侵入後速やかに分解されているのを発見した。IpgB1 のホモログであり IpgB1 ファミリーに属している IpgB2 も同様に分解されていた。IpgB1、IpgB2 がどのような機構を用いて分解されているのかを検討した結果、IpgB1、IpgB2 は宿主細胞内にてユビキチン化されていた。プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加した所、IpgB1、IpgB2 の分解は阻害されたことから、IpgB1、IpgB2 はユビキチン-プロテアソーム系により分解されていることが示唆された。基質蛋白質がユビキチン化されるためにはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3) が必要であり、この中において、E3 リガーゼは基質となる標的蛋白質の選別を行なうのに必要である。IpgB1、IpgB2 をユビキチン化するために必要な E3 リガーゼの同定を行なった所、IpgB1、IpgB2 の E3 リガーゼとして HECT 型 E3 リガーゼである Smurf1、Smurf2 が同定された。プルダウンアッセイと免疫沈降により IpgB1、IpgB2 と Smurf1、Smurf2 が結合する事が判明した。さらに、それぞれの蛋白質を精製して In vitro ユビキチンアッセイを行なった結果、IpgB1 と IpgB2 がユビキチン化された。以上の事から、赤痢菌により分泌された IpgB1、IpgB2 は宿主細胞内で E3 リガーゼである Smurf1、Smurf2 と結合する事によりユビキチン化され、プロテアソームに速やかに分解され、その結果 IpgB1 依存的なラッフル

膜が消失する事が判明した。

本研究では以下の事を発見した (i) **IpgB1** は **ELMO** と結合する、(ii) **IpgB1** は活性化 **RhoG** と同様に細胞質の **ELMO-Dock180** 複合体を細胞質から細胞膜へと移行させる事によりラッフル膜形成を誘導する、(iii) 赤痢菌感染下において宿主細胞へと移行した **IpgB1** は速やかに分解される、(iv) **IpgB1** は宿主細胞内でユビキチン化されプロテアソームにより分解される、(v) **Smurf1**、**Smurf2** は **IpgB1**、**IpgB2** の E3 リガーゼであり、宿主細胞内に分泌された **IpgB1**、**IpgB2** をユビキチン化し分解する。本研究により、赤痢菌の巧妙な感染機構の一端が明らかとなった。