

## 論文の内容の要旨

論文題目 赤痢菌の細胞間拡散機構に関する研究

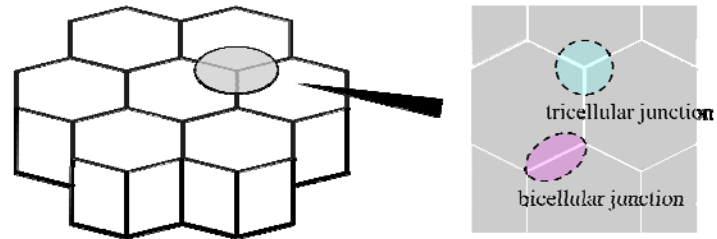
氏名 福松 真

腸管粘膜病原細菌である赤痢菌が引き起こす細菌性赤痢は、発展途上国において乳幼児の死亡原因の1つとなっており、今なお国際的視野から重要な感染症として知られている。さらに、多剤耐性赤痢菌の感染症例も近年増加し、抗生剤による治療が困難な場合も多い。このような状況下において赤痢菌の感染過程を分子レベルで明らかにすることは、ワクチンを含めた細菌性赤痢の予防および治療方法を開発する上で非常に重要である。

経口的に体内に取り込まれた赤痢菌は大腸に達した後、グラム陰性病原性細菌に特有の III 型分泌機構からエフェクタータンパク質と呼ばれる一連の病原タンパク質を分泌し吸収上皮細胞に側底面から侵入する。上皮細胞へ侵入した赤痢菌はファゴソームから脱出し、細胞質内で次々と分裂するとともに菌の一極にアクチンコメットと呼ばれる F-アクチンの凝集束の形成を誘起し、このアクチン重合を原動力として細胞内で活発に運動する。アクチンコメットにより運動する菌は形質膜から偽足となって突出し、その先端に菌を包む偽足を隣接細胞へ挿入する。挿入された突起は隣接細胞により取り込まれ、二重の形質膜に一時取り囲まれた後に膜から脱離し再び分裂拡散を繰り返し、次々と隣接細胞へ感染を繰り返すことにより感染を成立させる。これまでに、アクチンコメットの形成に伴う *actin-based motility* については比較的研究が進んでいるが、偽足の取り込みを介した細胞間拡散能は赤痢菌の感染拡大に必須な機能であるにもかかわらず、その分子メカニズムについては不明な点が多く残っている。そこで本研究では、赤痢菌の細胞間拡散に関与する因子を探索し、赤痢菌の細胞間拡散メカニズムを分子レベルで解明することを目的に研究を行った。

まず、感染細胞から隣接細胞への赤痢菌の拡散経路を明らかとするために、タイム

ラプスイメージングにより赤痢菌が隣接細胞に拡散する様子を観察した。その結果、約80%の赤痢菌が **tricellular tight junctions (tTJs)** と呼ばれる細胞間接着において3つ以上の細胞が接着する部位（図参照）を通して隣接細胞に感染を広げることが観察された。



れた。Tricellulin は tight junction

の構成タンパク質の一つで tTJs に主に局在している。また、Tricellulin は3つ以上の細胞の角を結びつける役割をしており tTJs の保持に寄与している。そこで、Tricellulin が赤痢菌の拡散能に与える影響を明らかにするために、Tricellulin をノックダウンした細胞を用いてプラークアッセイにより赤痢菌の細胞間拡散能について検討した。その結果 Tricellulin ノックダウン細胞では赤痢菌の細胞間拡散によるプラークの形成が顕著に抑制された。さらに、Tricellulin ノックダウン細胞での赤痢菌による偽足の形成を観察したところ、Tricellulin のノックダウンにより tTJs を経由して隣接細胞へ拡散する赤痢菌の割合は減少した。以上の結果から、tTJs での偽足の形成は赤痢菌の細胞間拡散に重要であることが示唆された。

Phosphoinositide (PI) 3-kinase は膜構造の再構築、膜小胞の輸送や情報伝達、さらに細胞骨格の再構築など細胞膜が再構築される様々な局面に関わっている。そこで、赤痢菌を含む偽足の形成に伴う PI 3-kinase の役割について検討した。PI 3-kinase の活性化により産生される phosphatidylinositol (PtdIns) (3,4,5)P<sub>3</sub> に結合する Akt の pleckstrin homology (PH) 領域と GFP を融合させたプローブ(GFP-Akt-PH)を一過性に発現させた細胞に、赤痢菌を感染させ偽足の形成を経時的に観察したところ、偽足を形成する膜上で一過性の PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> の産生が認められた。この PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> の産生は PI 3-kinase の阻害剤である LY294002 で抑制された。次に赤痢菌の細胞間拡散と PI 3-kinase 活性化の関係を明らかにするために、LY294002 で処理し8時間後の赤痢菌の拡散能を検討した。その結果、LY294002 処理で偽足の形成は阻害されなかったが、赤痢菌の細胞間拡散は顕著に阻害された。また、LY294002 存在下で赤痢菌を感染させた細胞を、ギムザ染色により観察したところ、隣接細胞による偽足の取り込みが阻

害され、偽足の先端に赤痢菌が集積している様子が観察された。これらの結果は PI 3-kinase の活性化は隣接細胞による赤痢菌を含む偽足の取り込みの引き金となっていることを示唆している。

上皮細胞のエンドサイトーシスについては主に Clathrin、または Caveolin に依存的なエンドサイトーシス、そしてマクロピノサイトーシスの経路が知られている。これらの経路のなかで、赤痢菌の細胞間拡散においてどの経路が機能しているかそれぞれの経路に対する阻害剤を用いて検討した。その結果、Clathrin に依存したエンドサイトーシスの経路を阻害した時に、赤痢菌の細胞間拡散は顕著に阻害された。これにより、赤痢菌は Clathrin に依存したエンドサイトーシスによって隣接する細胞に取り込まれることが示唆された。そこで、赤痢菌の細胞間拡散と Clathrin に依存したエンドサイトーシスとの関係を明らかにするために、Clathrin を shRNAi によりノックダウンした細胞に赤痢菌を感染させ赤痢菌の細胞間拡散能をプラークアッセイにより検討した。その結果、Clathrin ノックダウン細胞ではプラークの形成が顕著に抑制された。このことから、赤痢菌の細胞間拡散には Clathrin に依存したエンドサイトーシスが機能していることが明らかになった。そこで、偽足を取り込む際の Clathrin の動態を経時的に観察した結果、赤痢菌が偽足を隣接細胞に挿入させてから 30 分後に赤痢菌を含む偽足の周りに Clathrin が集積することが明らかになった。赤痢菌を含む偽足の取り込みは、Clathrin が細胞膜下に集積してから膜の陥入が開始されるカノニカルなエンドサイトーシスとは Clathrin の動態が異なることを示している。以上の結果から、赤痢菌の細胞間拡散には隣接細胞の Clathrin に依存したエンドサイトーシスによる赤痢菌を含む偽足の取り込みが重要であることが明らかとなった。

さらに隣接細胞による赤痢菌を含む偽足の Clathrin に依存したエンドサイトーシスについて Clathrin 被膜小胞の形成機構の機能的な関与を検討した。Clathrin 被膜小胞の形成に関与することが知られている AP-2、Epsin-1、Eps15、および Dab2 を shRNAi によりノックダウンした細胞に赤痢菌を感染させ赤痢菌の細胞間拡散能をプラークアッセイにより検討した。その結果、Epsin-1 ノックダウン細胞ではプラークの形成が顕著に抑制された。一方、AP-2、Eps15 および Dab2 ノックダウン細胞ではプラークの形成が抑制されなかった。AP-2、Epsin-1、Eps15、および Dab2 はカノニカルな Clathrin に依存したエンドサイトーシスに関与しており、この結果からも Clathrin に依存したエンドサイトーシスによる赤痢菌を含む偽足の取り込みの特異性が明らか

となった。次に、Epsin-1 の動態を経時的に観察した結果、Epsin-1 は Clathrin と同様に赤痢菌が偽足を隣接細胞に挿入してから 30 分後に偽足の周りに集積することが明らかとなった。さらに、赤痢菌が偽足を隣接細胞に挿入した際にみられる PI 3-kinase の活性化が Clathrin および Epsin-1 の集積に影響があるか検討するために、Clathrin-GFP および GFP-Epsin-1 を一過性に発現させた細胞に赤痢菌を感染させ、LY294002 処理したのち、Clathrin および Epsin-1 の赤痢菌を含む偽足への集積について観察した。その結果、Clathrin および Epsin-1 の菌体の周りへの集積は LY294002 の処理によって阻害された。このことから Epsin-1 と Clathrin の集積には PI3-kinase の活性化が必要であることが示唆された。

本研究により赤痢菌が隣接細胞に感染を拡大する際、赤痢菌は tTJs を経由して隣接細胞に偽足を挿入することを示した。また、赤痢菌の細胞間拡散は PI 3-kinase、Clathrin、および Epsin-1 に依存しており、赤痢菌を含む偽足はノンカノニカルなクラスリン依存性エンドサイトーシスを利用して隣接細胞に取り込まれることが明らかとなった。赤痢菌の細胞間拡散能は赤痢菌の感染病巣の拡大および、それに起因する下痢の惹起に重要であり、赤痢菌のもつ病原性に深く関わっている。したがって、赤痢菌の隣接細胞への拡散機構の一端を明らかにした本研究の研究成果は赤痢菌の感染戦略および感染現象を明らかにするとともに、赤痢菌に対する新規治療薬開発への応用が期待される。