

論文の内容の要旨

論文題目 赤痢菌の病原性タンパク質 OspD2 の機能に関する分子生物学的研究

氏名 福島篤仁

赤痢菌は細菌性赤痢の起原因菌で自然宿主はヒトとサルである。赤痢菌は経口感染すると潜伏期 1~4 日後に、発熱、下痢、腹痛を発症する。開発途上国では年間 1 億人以上が罹患し数 10 万人が死亡している。細菌性赤痢の発症は日本では年間 200 例程度に過ぎないが、赤痢菌は感染力が強く、衛生環境が劣悪な開発途上国では今も細菌性赤痢を制御することは困難であり、開発途上国での乳幼児死亡原因の一つとなっている。細菌性赤痢の治療は多剤耐性株との戦いの歴史でもある。1950 年代の段階で葉酸合成阻害薬耐性株が出現し、1960 年代にはストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンが耐性に加わり、4 剤耐性が一般的となり、その後導入されたアンピシリンやカナマイシンに対する耐性も獲得し、現在の流行株では 5 剤、6 剤に耐性である。近年ニューキノロン薬耐性株が急激に増加し、流行地では社会的問題となっている。このような状況下で赤痢菌の感染戦略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法を開発する上で非常に重要である。

赤痢菌感染において重要な役割を果たす病原因子は、主に赤痢菌の保有する 230 kb の巨大プラスミド (病原性プラスミド) 上にコードされている。そのなかでも特に 31 kb にわたる病原遺伝子塊 (pathogenicity island : PAI) と呼ばれる領域が病原性と密接に関わっている。PAI には III 型分泌装置およびこの装置を通じて宿主細胞へ分泌されるエフェクターと呼ばれる機能性タンパク質がコードされている。また PAI にこれらのエフェクターの安定性と分泌に関わる一群のシャペロンもコードされている。III 型分泌装置は病原因子に特化した分泌装置であり、多くの病原性グラム陰性桿菌が保持している。III 型分泌装置は、ニードル構造とべん毛基部に類似した基部構造からなり、菌体の内膜と外膜を貫くようにして多数存在し、ニードルの先端部が宿

主細胞へ接触すると細胞膜に小孔が形成され、その小孔を通じて一連のエフェクターが宿主細胞へ分泌される。

III 型分泌装置より分泌されるエフェクターの個々の機能を解析することは菌の宿主感染戦略を知る上で重要な手がかりとなると考えられる。本研究では機能が解明されていないエフェクターの一つである *OspD2* に着目した。その結果、*OspD2* は病原細菌の既知のエフェクターとは異なるユニークなメカニズムによって宿主の炎症応答を抑制していることを明らかにした。

OspD2 欠損赤痢菌を用いて上皮細胞への侵入効率、細胞内増殖性、隣接する細胞への拡散能の評価を行ったが、いずれも野生株と比較して差は認められなかった。上皮細胞での *OspD2* の作用を検索するため病原性プラスミドから PCR によりクローニングを行い *ospD2* の遺伝子断片を哺乳類細胞発現ベクターに挿入しヒト培養細胞に異所的に発現させたが、その発現を確認することができなかった。そこでヒトのコドンに最適化した *ospD2* の DNA 配列を人工的に合成し、哺乳類細胞発現ベクターに挿入し、ヒト培養細胞に異所的に発現させた結果、ヒト培養細胞で *OspD2* を発現させることが可能となり、以下に示す機能解析が可能となった。

宿主の炎症反応は病原細菌に対する自然免疫機構として機能しており、それに対して赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は感染を持続・拡大するために、宿主炎症応答を積極的に抑制している。上皮細胞に侵入した赤痢菌は、細胞内で分裂増殖する過程で多量のリポポリサッカライドとペプチドグリカンを経路内へ遊離する。特にペプチドグリカンは、細胞質の病原体認識受容体である *Nod1* を活性化する。これに *Rip2* と *IKK- $\alpha\beta\gamma$* 複合体が結合すると、その下流で *NF- κ B* が活性化され、炎症性サイトカインの産生を通じて、腸管粘膜に激しい炎症が引き起こされる。これまでに赤痢菌では *IpaH9.8*、*OspF*、*OspG*、*OspZ* などのエフェクターが炎症の活性化に必要な *NF- κ B* シグナルを抑制していることが報告されてきた。そこで *OspD2* の *Nod1-NF- κ B* 経路への影響を検討するため、*NF- κ B* ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果 *OspD2* 発現細胞では *Nod1* 過剰発現による *NF- κ B* の活性化が抑制されることが明らかになった。次に、*NF- κ B* シグナル経路における *OspD2* の作用点を解明するために、*Nod1-NF- κ B* 経路における上流と下流のシグナルに対する *OspD2* の抑制作用について *NF- κ B* ルシフェラーゼレポーターアッセイにより精査した。その結果 *TNF α* 刺激や、*TRAF2*、*IKK β* 過剰発現による *NF- κ B* の活性化は *OspD2* の発現によって抑制されたが、その下流に位置する *p65* 過剰発現による *NF- κ B* 活性については抑制作用が認められなかった。

NF- κ B は *RelA(p65)/p50* からなる二量体であり、無刺激状態の細胞内では活性化抑制因子 *I κ B α* と結合することによって細胞質に存在する。*TNF α* や *Nod1* などの上流からの刺激が入ると、*IKK* 複合体の *IKK β* がリン酸化されシグナル経路における一連の分子が活性化される。*IKK β* は *I κ B α* をリン酸化し、リン酸化された *I κ B α* はユビキチン・プロテアソーム系により分解され、その結果 *I κ B α* でマスクされていた *NF- κ B* の核移行シグナルが露出することにより *NF- κ B* は細胞質か

ら核に移行し、特定のプロモーター領域に結合して標的遺伝子の転写を促進する。そこで、OspD2 発現による NF- κ B シグナル経路の抑制をさらに詳細に確認するために、免疫染色法を用いて NF- κ B (p65) の核移行を評価した結果、TNF α 刺激による p65 の核移行を OspD2 が抑制することが明らかになった。次に TNF α 刺激により引き起こされる I κ B α の分解について OspD2 発現細胞を用いてウエスタンブロット法により評価した結果、OspD2 発現細胞では I κ B α のリン酸化が起きるにもかかわらず、I κ B α の分解が抑制されていた。以上の結果から、OspD2 は NF- κ B のシグナル経路に抑制的に作用し、さらに OspD2 はリン酸化された I κ B α の分解に直接的に作用している可能性が示唆された。

リン酸化された I κ B α はユビキチン・プロテアソーム系を介して分解されることが知られている。ユビキチン・プロテアソーム系は E1 (活性化酵素) /E2 (結合酵素) /E3 (ユビキチンリガーゼ) の 3 種類の酵素群の働きにより ATP 依存的に標的タンパク質にユビキチンを連続的に結合させてポリユビキチン鎖を形成し、そのポリユビキチン鎖が標識となって標的タンパク質がプロテアソームにより選択的に識別されて分解に至るシステムである。そこで、OspD2 のユビキチン・プロテアソーム系に与える影響を調べるため、OspD2 発現細胞を用いて、ポリユビキチン鎖を認識する抗体 (FK2) で免疫染色し観察した結果、OspD2 発現細胞では FK2 陽性の凝集塊を多数認めた。FK2 陽性凝集塊は、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した細胞においても観察されたことから、OspD2 発現細胞ではプロテアソームの機能が阻害され、ユビキチン化されたタンパク質が分解されずに凝集していることが推測された。

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解するための巨大なプロテアーゼ複合体であり、真核細胞において必須な役割を果たしている。プロテアーゼ活性を有する複合体である 20S プロテアソームの両端に制御因子である 19S が会合し、26S プロテアソームとなっはじめてその機能を発揮する。19S 制御因子は、6 個の ATPase 活性を有するサブユニットから成るリングと、10 種類近くの non-ATPase サブユニットが会合した複合体である。GST-OspD2 プルダウンアッセイを用いて 19S 制御因子構成成分に対する結合能を調べたところ、リングを形成する Rpt5 が OspD2 と直接結合することが明らかになった。OspD2 の各種トランケート体を用いた GST プルダウンアッセイの結果、569 アミノ酸からなる OspD2 配列のうち、N 末端領域である 1-65 アミノ酸までの配列が Rpt5 との結合に重要であることが示された。実際に、この領域を欠損する OspD2 を発現する細胞では、Nod1-NF- κ B、TNF α -NF- κ B シグナル経路に対する抑制作用は完全に消失した。これらの結果から OspD2 はプロテアソーム阻害作用を介して、NF- κ B シグナル経路を抑制することが明らかになった。

本研究の結果、OspD2 はプロテアソーム阻害作用により、I κ B α の分解を抑制することで NF- κ B の活性化を抑制することが明らかになった。赤痢菌が炎症抑制機能を担う遺伝子を複数保持している事実は、腸管感染において炎症抑制という戦略がいかに重要であることを示している。さ

らに、赤痢菌のみならず、サルモネラ、エルシニア、病原性大腸菌など多くの病原性細菌が炎症抑制という共通の戦略を持つことが知られているが、この事実は「病原菌が腸管粘膜に定着するためには、炎症反応の抑制が重要である」という事実の一般性を示している。本研究では、病原性細菌のエフェクターの1つである OspD2 がプロテアソーム複合体を標的とし I κ B α の分解を抑制することで NF- κ B の活性化を抑制することを世界で初めて見いだすことが出来た。OspD2 は全く新規なタイプの病原因子であり、本研究の知見は低炎症型赤痢菌ワクチン開発に貢献するのみならず、OspD2 を解析ツールとして用いることはプロテアソーム・ユビキチン系タンパク質分解システムの分子機構および生理機能の解明に貢献し、抗癌剤や抗炎症剤の開発において新たな角度から光を当てるものであると期待される。