

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 森 川 華 子

本研究はヒトに下痢を引き起こす腸管病原性大腸菌の感染において、腸管病原性大腸菌の菌体から III 型分泌装置より宿主標的細胞に分泌され、感染成立に重要な役割を果たす、エフェクター蛋白質の一つである **Cycle inhibiting factor (Cif)** が、ヒト細胞の細胞周期進行抑制を誘導する分子メカニズムの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト蛋白質アレイを用いた Cif の宿主標的蛋白質の探索の結果、**Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8 (NEDD8)** を同定した。大腸菌に His-Cif を GST または GST-NEDD8 または GST-Ubiquitin と共発現させ、GST Pull down assay を行ったところ、大腸菌内での Cif と NEDD8 の結合が示された。
2. EPEC 感染細胞において、NEDD8 化した蛋白質を比較したところ、Cif により蛋白質の NEDD8 化が亢進していた。とくに、NEDD8 の代表的な基質である Cullin ファミリー蛋白質の NEDD8 化を比較したところ、Cif を発現する株を感染させた細胞において、NEDD8 化した Cullin が安定化し蓄積していることが示された。
3. Cif による Cullin ファミリー蛋白質の NEDD8 化の蓄積が NEDD8 の促進の結果か、或いは脱 NEDD8 化の抑制の結果であるかを調べたところ、Cullin 2 の NEDD8 化は Cif により影響を受けなかったのに対し、Cullin2 の脱 NEDD8 化酵素 (CSN) による脱 NEDD8 化は、Cif により抑制されることが示された。
4. G1/S 期同調細胞に GST-p27 と His-Ubiquitin を発現させ、その後 EPEC を感染させた。さらにユビキチン化蛋白質を精製して、細胞内での p27 のユビキチン化を比較した結果、Cif 発現株を感染させた細胞において p27 のユビキチン化が減少していることが示された。また、Cif を発現する EPEC を感染させた細胞において、p27 のユビキチン化が減少した結果、p27 が異常に蓄積しているのが示された。
5. FLAG-Cif を細胞に発現させて免疫沈降を行った結果、Cif は Cullin1 が他の蛋白質と共に複合体を形成してユビキチンリガーゼとして働く Skp1-Cullin1-F-box protein (SCF) 複合体ユビキチンリガーゼの構成蛋白質に結合することが示された。
6. G1/S 期同調細胞をさらに 8 時間培養し、細胞が G2 期後期に入ったところ

で EPEC に感染させたところ、非感染細胞または *cif* 欠損株細胞において正常な細胞周期進行が見られたのに対し、Cif を発現する株を感染させた細胞において、G1 期から S 期への移行が阻害され、G1 期停止が観察された。また、この細胞で細胞周期進行に関わる代表的なユビキチンリガーゼである SCF 複合体ユビキチンリガーゼ特異的な基質の蓄積が見られ、EPEC 野生株感染細胞において、SCF 複合体ユビキチンリガーゼの基質の蓄積による G1 期停止が示された。

7. 細胞周期の進行をリアルタイムに観察できるプローブである **Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)** を安定的に発現する HeLa 細胞を用いて、Cif を保持する EPEC 感染細胞での細胞周期の進行を経時的に観察したところ、Cif による G1 期停止が確認された。

以上、本論文は腸管病原性大腸菌感染において、Cif が細胞に誘導する細胞周期抑制機構の分子メカニズムの解明から、EPEC と宿主細胞内の ユビキチン・プロテアソームを介した蛋白質分解経路との新たな関係性を明らかにした。本研究は腸管病原性大腸菌の感染成立に働く新たなメカニズムの解明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。