


学位論文審査結果報告書

報告番号	北里大 甲 第1016号	氏 名	吉田 雪絵
論文審査担当者	(主査) 北里大学 教授 今井 浩孝 (副査) 北里大学 教授 岡田 信彦 (副査) 北里大学 准教授 清野 正子 (副査) 北里大学 准教授 桑江 朝臣		
<p>〔論文題目〕 III型分泌機構を介した <i>Salmonella</i> 病原性発現機構に関する研究</p> <p>〔論文審査結果の要旨〕 <i>Salmonella enterica</i> (<i>S. enterica</i>) はヒトや家畜・家禽に対して、胃腸炎などの局所感染および腸チフスに代表される全身感染（敗血症）を引き起こすグラム陰性細菌である。<i>Salmonella</i> が全身感染を発症するための主要な病原形質は、マクロファージに対する殺菌抵抗性であり、これには <i>Salmonella</i> 特異的病原遺伝子領域である <i>Salmonella</i> pathogenicity island 2 (SPI-2) にコードされる III 型分泌機構が関与する。本研究では、<i>Salmonella</i> SPI-2 III 型分泌機構による <i>Salmonella</i> の病原性発現機構の解析を目的とし、第1章では、SPI-2 にコードされる機能未知タンパク質 SseE の機能について、また、第2章では、アミノ酸の相同性から <i>Salmonella</i> SPI-2 III 型分泌機構特異的 ATPase と予測される SsaN の ATPase 活性とその機能について解析を行った。</p> <p>第1章 シャペロンタンパク質 SseE の機能解析</p> <p><i>Salmonella</i> SPI-2 遺伝子領域にコードされるエフェクタータンパク質 SseE の機能解析を行った。まず、SseE の細胞内局在を調べるために、<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium SL1344 株（野生株）のゲノム上の <i>sseE</i> 遺伝子を、2HA タグを付加した <i>sseE</i>-2HA 遺伝子に置換した変異株を作製した。SPI-2 発現誘導条件下で培養後、遠心分離により菌体と上清、さらに菌体を可溶化画分と不溶化画分に分画した。SseE (SseE-2HA) は、細胞質画分のみ検出された。さらに、SseE の宿主細胞への分泌について、アデニル酸シクラーゼ活性を持つ CyaA との融合タンパク質を利用した cAMP 生成定量法により確認した。SseE-CyaA、SseG-CyaA（陽性コントロール）および CyaA（陰性コントロール）を発現するプラスミドを導入した <i>Salmonella</i> 野生株を HeLa 細胞に感染させ、感染 20 時間後の細胞内 cAMP を定量した結果、SPI-2 エフェクターである SseG のみが感染細胞における cAMP 量の増加が観察された。す</p>			

なわち、SseE は SPI-2 III 型分泌機構により分泌されるエフェクターでないことが確認された。

一方、SseE は、SPI-2 エフェクター SseG に対するシャペロンタンパク質であることが推定されたことから、野生株、*sseE* 欠失変異株およびその相補株に対して、SseG-2HA を発現するプラスミドを形質転換し、菌体内および培養上清への SseG の分泌を明らかにした。*sseE* 変異株においては菌体内での SseG 量は著しく減少し、また培養上清中では、検出できなかった。さらに、SseE と SseG との結合性を、FLAG pull-down 法により明らかにした。また、SseG が野生株に比べ、*sseE* 欠失変異株内で不安定であること、一方、SseF は *sseE* 欠失変異株内でも野生株同様に安定であることから、SseE は SseG の特異的シャペロンであることが示唆された。以上のことから、SseE は SPI-2 エフェクター SseG のシャペロンであり、宿主細胞内におけるエフェクター分泌およびその機能発現に関与していることが強く示唆された。

第2章 SPI-2 III 型分泌機構特異的 ATPase SsaN の機能解析

III 型分泌機構特異的 ATPase は、III 型分泌機構の機能発現には必要不可欠な酵素である。そこで、本研究では、SPI-2 III 型分泌機構特異的 ATPase と推定されている SsaN の ATPase 活性とその機能について検討した。まず、*S. Typhimurium* 野生株に *ssaN* 欠失変異を導入した結果、*ssaN* 欠失変異株では、エフェクター (SseB および SseJ) の分泌が阻害された。*ssaN* 欠失変異株では、マウスに対する病原性も著しい低下がみられた。

SsaN の ATPase 活性は、SsaN-Myc-His₆ 融合タンパク質を精製し、malachite green assay により測定した。SsaN の ATPase 活性は $0.36 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ で、他の III 型分泌機構特異的 ATPase とほぼ同様の活性を示した。

III 型分泌機構特異的 ATPase は、シャペロン-エフェクター複合体に結合後、シャペロン-エフェクター複合体からエフェクターを解離し、エフェクター分子を、III 型分泌機構を介して菌体外へ輸送するために必要であるといわれている。SsaN は、他の細菌に見られる III 型分泌装置の構造解析から、SsaK と複合体を形成し、さらに C リングを構成している SsaQ に結合していると予想されている。そこで、SsaN と SsaKQ および SPI-2 特異的なシャペロン分子 (SsaA、SsaB、SsaE および SsaA) との結合性を pull-down 法により確認した。その結果、SsaK および SsaQ とそれぞれ相互作用すること、および SPI-2 に存在する既知のすべてのシャペロンと結合することを明らかにした。また、SsaN によるシャペロン-エフェクター複合体からのエフェクターの解離作用を調べるために、SsaN 存在下で SsaE/SseB 複合体が解離することを確認した。SsaN と ATP の添加により、SsaE からの SseB の解離がみられたが、SsaN と ATP γ S あるいは SsaN_{R192G} と ATP の添加では、解離はみられなかった。したがって、シャペロン-エフェクター複合体において、SsaN は ATP 依存的にシャペロンとエフェクターの解離を促進することが明らかとなった。

以上のように、本研究は、サルモネラ病原性発現に対する III 型分泌機構の機能的役割を明らかにした基礎研究として高く評価でき、その内容は、独創性の高いものである。したがって、博士 (薬学) の学位に十分値するものであると判断し、学位審査を合格と判定した。