

学位論文要旨

氏名 VIESTA BEBY FADLITHA



論文題目

「The unique tropism of *Mycobacterium leprae* to the nasal epithelial cells can be explained by the mammalian cell entry protein 1A (*Mycobacterium leprae* は mammalian cell entry 1 A 蛋白を用いて鼻粘膜上皮細胞へ侵入する)」

指導教授承認印

天羽 康之



The unique tropism of *Mycobacterium leprae* to the nasal epithelial cells can be explained by the mammalian cell entry protein 1A

(*Mycobacterium leprae* は mammalian cell entry 1 A 蛋白を用いて鼻粘膜上皮細胞へ侵入する)

Viesta Beby Fadlitha

背景と目的

ハンセン病は *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) の感染により皮膚や末梢神経が侵される慢性の抗酸菌感染症である。現在ハンセン病の新規患者数は、先進国では激減したが、世界では年間 20 万人を超えており、Neglected Tropical Diseases, NTDs の一つとして、依然として公衆衛生上の大きな問題となっている。しかし、らい菌の人工培養法が確立されていないことが研究の妨げとなり、らい菌の感染様式は解明されないままに隔離政策を経て現在に至った。Mammalian cell entry 1A (mce1A) 蛋白は結核菌の mce1A 領域にコードされる蛋白で、結核菌の上皮系細胞への侵入やマクロファージ内における生存、増殖への関与が報告されている。結核菌 mce1A 領域と相同性の高い領域が、らい菌にも存在する事が明らかとなり、リコンビナント蛋白を用いた研究から本領域が、らい菌の上皮系細胞への侵入にも関わる重要な領域である事が報告された。今回、らい菌の上皮系細胞への侵入に関わる mce1A 領域の active sequence を明らかにする事を目的に検討を行った。

方法および結果

最初に、mce1A 蛋白が、native 蛋白としてらい菌に発現していることを免疫電子顕微鏡法にて確認した。

大腸菌を用いて作製したらい菌 mce1A 領域(1326bp、442aa)の N 末及び C 末をトランケートした各種組換え蛋白(r-lep37KDa、r-lep 27KDa)をラテックスビーズにコートし、HeLa 細胞への侵入活性を電子顕微鏡を用いて検討した結果、316bp ~ 921bp(202aa) までの r-lep 27KDa でも侵入活性が維持された。次に、316~921bp の領域を 316~531bp、532~753bp、754~921bp に 3 分割し、各領域を AIDA ベクターに組み込み大腸菌の菌体表面に表出させた。各組換え大腸菌を単層培養した

HeLa 細胞及び RPMI2650 細胞に加え、菌の細胞内への侵入をコロニーカウント法と電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、316~531bp の領域でのみ侵入が観察された。

次に、これまでの研究結果から想定された侵入活性領域（316~531bp の領域）を 316-387bp (106-129aa)、388-453bp (130-151aa)、454-486bp (152-162aa)、および 487-531bp (163-177aa) に 4 分割して、夫々の領域に対する高度免疫血清を作製し、316bp-531bp(72aa 領域)を外膜表示した組換え大腸菌を用いて侵入抑制効果を検討した結果、106-129 アミノ酸と 130—151 アミノ酸および 163-177 アミノ酸を免疫原に作製した高度免疫血清（抗 InvXa 抗体と抗 InvXb 抗体および抗 InvXd 抗体）に侵入抑制効果が認められた。

考察

今回の結果から、*M. leprae* の鼻粘膜上皮細胞への侵入に関与する active sequence は *mce1A* 領域の 316~531bp 間に存在することが明らかとなった。結核菌 Mce1A 蛋白のヒト上皮細胞への侵入に係わる最も重要な領域は、Inv3 領域と呼ばれ、130~152 アミノ酸に位置することが同定されている。結核菌の Inv3 領域は、らい菌では、388-453bp (InvXb) に相当するが、その配列は、N 末端部分から数えて 1~22 番目のアミノ酸はほぼ同一であるが、1~3、5、8、9、13 番目のアミノ酸がらい菌と結核菌では異なっており、抑制試験の結果からもらい菌 Mce1A 蛋白のヒト上皮細胞への侵入に係わる最も重要な領域は、結核菌のそれとは異なった領域である事が示唆された。

M. leprae は、蛋白をコードする遺伝子がわずか 1,604 (*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) では 3,959) である一方、偽遺伝子は 1,116 (*M. tuberculosis* では 6) 存在していることから *M. leprae* では多くの蛋白が結核菌と比して不活化されている。Mce1A 蛋白は、結核菌と同様に native 蛋白として菌体表面に発現していることから、本蛋白は *M. leprae* の鼻粘膜上皮細胞への侵入に関与する重要な蛋白の一つであり、ハンセン病の感染予防においてワクチンのターゲットとなりうる重要な領域であると考えられる。