





## 学位論文審査報告書

報告番号	北里大 甲 第1386号	氏名	後藤 雅貴
論文審査担当者	(主査) 北里大学教授	岡田 信彦	
	(副査) 北里大学教授	片山 和彦	
	(副査) 北里大学教授	高橋 孝	
	(副査) 北里大学教授	浅見 行弘	
<p>[論文題目]</p> <p>「<i>Bordetella</i> 属細菌の III 型分泌装置制御における還元剤の影響および Bcr4 タンパク質の機能解析」</p> <p>[論文審査結果の要旨]</p> <p><i>Bordetella</i> 属細菌は、グラム陰性菌の多くが保有する III 型分泌装置を菌体膜上に保持している。III 型分泌装置は、針状構造を持ち、病原性タンパク質を宿主内に直接注入し、宿主の生理機能を攪乱することにより感染の成立を促進する。この病原性タンパク質は、III 型分泌タンパク質あるいはエフェクターと呼ばれ、百日咳菌において、III 型分泌タンパク質は宿主への定着に関与することが示唆されている。しかし、百日咳菌は、試験管内で III 型分泌タンパク質を効率的に分泌させることができないため、その機能解析はほとんど進んでいない。一方、百日咳菌の類縁菌である気管支敗血症菌において、III 型分泌装置の機能に必須である Bcr4 が同定されているが、Bcr4 による III 型分泌装置の機能制御機構については未だ明らかとなっていない。本研究では、<i>Bordetella</i> 属細菌の III 型分泌装置を介した病原性発現機構を明らかにすることを目的として、百日咳菌における III 型分泌タンパク質の産生条件の検討および気管支敗血症菌における Bcr4 による III 型分泌装置制御機構の解析を行った。</p> <p>1. 百日咳菌における III 型分泌タンパク質の産生条件の検討</p> <p>百日咳菌感染における III 型分泌タンパク質の役割を明らかにするために、III 型分泌タンパク質が効率的に産生・分泌される培地成分の検討を行った。百日咳菌 Tohama I 株を SS 培地あるいはアスコルビン酸不含 SS 培地で培養し、III 型分泌タンパク質 BteA および BopB をウエスタンブロット法で検出した。その結果、全菌体画分および上清画分における BteA と BopB タンパク質は、SS 培地と比較し、アスコルビン酸不含 SS 培地において、より多く検出された。次に、BteA は標的細胞に対して細胞死を誘導することから、Tohama I 株を SS 培地あるいは低濃度アスコルビン酸含有 SS 培地を用いて、ラット肺上皮細胞株 L2 細胞に感染させ、培地中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 量を測定す</p>			

ることにより細胞死誘導の評価を行った。Tohama I 株を SS 培地中で感染させた場合、培地中から LDH は検出されなかったが、低濃度アスコルビン酸含有 SS 培地で感染させた場合、有意に LDH 量が増加した。また、アスコルビン酸不含 SS 培地に、アスコルビン酸、2-メルカプトエタノールおよびジチオエリスリトールをそれぞれ添加した培地で Tohama I 株を、BteA および BopB の発現をウエスタンブロットィング法により調べた。その結果、全菌体画分および上清画分における BteA および BopB タンパク質量は、アスコルビン酸不含 SS 培地と比較し、還元剤を添加した培地で、減弱した。さらに、臨床分離株においても、アスコルビン酸不含 SS 培地を用いることによりⅢ型分泌タンパク質の産生・分泌を誘導することができた。

百日咳菌は環境中の酸化還元状態を感知し、Ⅲ型分泌タンパク質の産生および分泌を制御することが示唆された。

## 2. 気管支敗血症菌が産生する Bcr4 によるⅢ型分泌装置制御機構の解析

Bcr4 のアミノ酸配列の特性から、Bcr4 がシャペロンであることが予想されている。そこで、Bcr4 によるⅢ型分泌装置の制御機構を調べるために、Bcr4 と相互作用するタンパク質の同定を試みた。Ⅲ型分泌機構におけるシャペロンは、下流にコードされるタンパク質を標的とすることから、Bcr4 (Bcr4-Strep) に対して、Ⅲ型分泌装置構成タンパク質 BscI (BscI-V5) および BscK (BscK-V5) による pull-down assay を行い、Bcr4-Strep が BscI-V5 と相互作用することを明らかにした。次いで、気管支敗血症菌 BscI 欠損株におけるⅢ型分泌タンパク質 BteA と BopD の分泌を調べたところ、いずれのタンパク質も菌体外への分泌量が著しく低下していることを見いだした。さらに、Ⅲ型分泌タンパク質遺伝子の転写抑制因子 BspR 欠損株および BspR Bcr4 二重欠損株の全菌体画分に対するウエスタンブロットィングを行ったところ、BspR 欠損株では BscI が検出されたが、BspR Bcr4 二重欠損株においては検出されなかった。

以上の結果から、Bcr4 は BscI のシャペロンとして機能し、BscI を菌体内で安定化させることで、Ⅲ型分泌装置の構築に関与していることが強く示唆された。これまでに、Ⅲ型分泌装置のインナーロッド (BscI) に対するシャペロンの報告なく、本研究がはじめてである。

本研究では、百日咳菌におけるⅢ型分泌機構の発現誘導するための試験管内での培養条件を検討し、培地中の還元剤が活性化を抑制していることを明らかにし、百日咳菌の有するⅢ型分泌タンパク質の機能解析が可能となった。さらに、類縁菌である気管支敗血症菌が産生する Bcr4 が、Ⅲ型分泌装置を構成するインナーロッド BscI のシャペロンであることを見いだした。これらの研究成果は、百日咳菌のⅢ型分泌機構を介した感染機構を解明するための分子基盤となるだけでなく、新規の予防・治療法の開発へとつながるものであり、独創的かつ有益な研究として高く評価できる。本研究内容の主要部分は、原著論文として国際英文誌に投稿受理されている。

以上のことから、本研究は博士 (感染制御科学) の学位授与に値すると判断し、学位審査を合格と判定した。