The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Adherence mechanism of EPEC
Author(s)	Vlademir, V. Cantarelli
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41960
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【26】

氏　　名	Vlademir V. Cantarelli（ウラデミル カンタレリ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	第　15381　号
学位授与年月日	平成12年 3 月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学 位 論 文 名	Adherence mechanism of EPEC （病原性大腸菌の定着機構）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　本田　武司 （副査） 教 授　那須　正夫　　教 授　宮本　和久　　教 授　山口　明人

論 文 内 容 の 要 旨

腸管病原性大腸菌（EPEC）は激しい下痢を引き起こすことで知られ、開発途上国では深刻な問題である。腸管出血性大腸菌（EHEC)、特に serotype O157：H 7、O26、O111 は、しばしば無症候性感染や出血性の下痢を引き起こし、hemolytic－uremic syndrome（HUS）を引き起こすことがあり、ヒトを死に至らしめることがある。

EPEC が上皮細胞に感染する時に、まず束形成線毛（bundle－forming pili：BFP）を介して小腸腸管上皮細胞の微絨毛に結合し局所性初期定着を起こす。さらにこの定着により上皮細胞でのシグナル伝達が誘導される。この時、菌の TypeⅢ secretion system により菌の病原因子が直接上皮細胞に注入される。そして intimin を介する後期定着が起こる。Intimin は菌の外膜にある蛋白であり、これが TypeⅢ secretion system により上皮細胞に注入された Tir（translocated intimin receptor）と結合する。この密着定着（intimate adherence）の stage では、上皮細胞内の myosin light chain、F－actin、α－actinin、ezrin、talin の再構築が起こり、菌定着部位にこれらの集積が起こる。この再構築機構のなかで、Tir と F－actin の間には他の蛋白が介在している可能性が示唆されているが、いまだ良く分かっていない。

まずEPEC感染により上皮細胞蛋白の再構築が起こるかどうかを確認した。

HeLa 細胞に EPEC を 3 時間感染させ F－actin、α－actinin、talin、vinculin を間接蛍光抗体法で染色し、confocal microscopy で観察した。F－actin と α－actinin と talin は菌定着部位に集積が認められたが、vinculin の集積は認めなかった。この結果はこれまでの報告と同じであった。

Cortactin は actin－binding 蛋白として知られており、HeLa 細胞に細胞侵入能を持った *Shigella flexneri* が感染すると、$pp60^{c\text{-}src}$ によりcortactinのチロシンリン酸化が起こりその感染部位に集積が起こることが報告されている。*S. flexneri* が HeLa 細胞に感染した時、30分以内に cortactin のチロシンリン酸化と集積が起こった。その後、徐々に cortactin は細胞質に分散し 1 時間後には cortactin のチロシンリン酸化と集積はみられなくなった。つまり *S. flexneri* 感染による cortactin の集積は一過性であることを確認した。EPEC 感染後 1 時間では cortactin の集積は認めなかったが、菌感染後 3 時間では cortactin が菌定着部位に集積することを認め、感染後 4 時間で最も強く集積した。EHEC感染でも同様の結果を得た。

次に cortactin の集積が $pp60^{c\text{-}src}$ により調節されているかどうかについて実験を行った。HeLa 細胞に Src－family kinase の阻害剤である PP1 を作用させると cortactin の集積が著明に減少した。このことより $pp60^{c\text{-}src}$ 依存性である

ことが確認された。さらに、HeLa細胞にPP1を作用させた上でEPECまたはEHECを感染させると、細胞に定着したEPECまたはEHECの周りにcortactinの集積を認めた。

以上よりEPECまたはEHEC感染時に起こるcortactin集積は$pp60^{c\text{-}src}$非依存性であることが示された。

*S.flexneri*を感染させたHeLa細胞で30分間後ではcortactinのチロシンリン酸化がWestern blot法によって観察できたが、1時間後には観察されなかった。*S. flexneri*を感染させて得られたこれらの結果は、これまでの報告と同じであった。

EHECまたはEPECをHeLa細胞に感染させて0.5、1、2、4時間でも感染させていないHeLa細胞と同様で違いはなかった。このことよりEPECまたはEHECが細胞に接着した時に起こるcortactinの集積には、cortactinのチロシンリン酸化は関係していないことが示唆された。

次にEPECまたはEHEC感染によるcortactin集積に、F−actin集積が関与するかどうかを、その阻害剤であるCytochalasin D（Cyt−D）を用いて調べた。Cyt−Dを感染前30分よりHeLa細胞に作用させ、その後4時間EPECまたはEHECを感染させた。Cyt−Dを作用させても、EPECまたはEHECの定着部位にcortactinの集積を認めた。しかし、Cyt−Dを作用させたHeLa細胞では、EPECまたはEHECの定着部位にF−actinの集積を認めなかった。

以上よりEPECまたはEHEC感染時に起こるcortactin集積には、F−actinの集積は関与していないことが示された。

さらにtyrosine protein kinase（TPK）の関与についてその阻害剤であるstaurosporineを用いて調べた。staurosporineはEPECをHeLa細胞に感染させた時のチロシンリン酸化を著明に減少させることが報告されている。staurosporineを感染前30分よりHeLa細胞に作用させ、その後4時間EPECまたはEHECを感染させた。staurosporineを作用させても、EPECまたはEHECの定着部位にcortactinの集積を認めた。以上よりEPECまたはEHEC感染時に起こるcortactin集積には、チロシンリン酸化は関与していないことが示された。

次に、Tirに対する抗体とcortactinに対する抗体、phalloidin−FITCを用いてEPEC感染時のTir、cortactin、actinの細胞内局在を観察した。EPEC定着部に下部にTir、cortactin、actinの順番に蛋白が局在していることが分かった。

cortactin、talinとTirとの結合を調べるために、2種類のHis−T 7 tagを結合させたTir 合成蛋白を作成した。TirのN末端側196 アミノ酸にHis−T 7 tagを結合させたもの（Tir−N）とC末端側の133アミノ酸にHis−T 7 tagを結合させたもの（Tir−C）を作成し、Ni^{2+}columnを用いて精製した。

Tir−N蛋白またはTir−C蛋白をNi^{2+}columnに結合させHeLa細胞のextractをそのcolumnにロードした。その後Western blotにてcolumnに結合した蛋白を解析した。抗cortactin抗体を用いて染色すると、Tir−N、Tir−C fraction共に、非常に強いcortactinのバンドを認めたが、コントロールでは認めなかった。つまりTir polypeptideとcortactinは*in vitro*で特異的に結合することが分かった。EPEC感染部位にtalinも集積することより、talinについて同様の実験を行った。TalinもTir polypeptideと*in vitro*で特異的に結合することが分かった。しかしvinculinはTir polypeptideとの結合を認めなかった。

cortactinとtalinはEPEC感染部位に集積するが、vinculinは集積しなかった。したがって、cortactinとtalinはTir polypeptideと特異的に結合するが、vinculinはTir polypeptideとは特異的に結合しないことが考えられる。

さらにEPECをHeLa細胞に感染させたとき、cortactin、talin、vinculinがTirと結合しているかどうか、免疫沈降法によって実験を行った。EPECを感染させたHeLa細胞と感染させていないHeLa細胞のextractを用いた。抗cortactin抗体または抗talin抗体で免疫沈降したsampleでは、90kDaのTirが認識できた。また抗Tir抗体で免疫沈降したsampleでは、cortactin、talinが認識できた。しかしEPECを感染させていないHeLa細胞のextractでは、これらのバンドは確認できなかった。つまりEPECが感染したHeLa細胞内では、Tir、cortactin、talinが複合体を形成していることが考えられる。一方vinculinのバンドはいずれの実験でも確認できなかった。

EPECやEHECが細胞に感染する時、菌由来の蛋白であるTirとtalin、actinが関与し、菌の定着部位にpedestal様構造を形成することが知られている。本研究では、EPECまたはEHECが上皮細胞に感染することにより、菌定着部位にcortactinが集積することを見出した。このcortactinの再構築にはチロシンリン酸化は関与しておらず、菌感染後3時間でその集積は最大になり、以後その集積は持続した。このことより、EPECまたはEHEC感染によっ

て引き起こされる cortactin の再構築機構は *S. flexneri* 感染によるものとは異ると考えられる。

さらに cortactin の再構築機構を EPEC を用いて詳しく解析した。EPEC 感染により細胞内で Tir、cortactin、talin は複合体を形成していることがわかった。しかし vinculin は関与していなかった。またこれらの蛋白の細胞内局在の観察より、EPEC 感染時菌感染部位に Tir、cortactin、actin の順に結合していることが考えられた。つまり cortactin は Tir と actin の間をつなぐ蛋白であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

食中毒原因菌として重要な腸管病原性大腸菌（EPEC）や腸管出血性大腸菌（EHEC）は、腸管上皮細胞に対して独特の定着様式を示し、これが腸管病原性に関わっていることが知られている。これらの病原性大腸菌は Type Ⅲ secretion system と呼ばれるタンパク質分泌機構を用いて宿主細胞内に Translocated intimin receptor（Tir）を注入する。これが宿主細胞膜上に移行し、大腸菌表面に存在する intimin と結合することで intimate adherence が行われる。この際に宿主細胞は細胞骨格の再編成を引き起こし、F－actin、actinin、ezrin、talin などの集積を伴う actin pedestal を形成することが知られている。しかしながら actin pedestal の形成メカニズムについては今だ不明な点が多い。本研究はこの actin pedestal の形成メカニズムについて検討したものである。その結果 EPEC、EHEC の HeLa 細胞への感染部位に actin 結合タンパク質である cortactin の集積を認めた。さらにこの集積は、阻害剤を用いた感染実験の結果、F－actin、tyrosine protein kinase 及び $pp60^{c\text{-}src}$ 非依存性であることを見出した。また pedestal 形成における cortactin の細胞内局在を confocal microscope を用いて検討したところ、大腸菌の付着下部から Tir、cortactin、F－actin の順番に局在することが判明した。また、His－T 7 tag を fusion させた Tir のN末端（Tir－N）あるいはC末端（Tir－C）を精製し、これらを用いて Tir と cortactin の結合性を検討したところ、Tir と cortactin さらに talin が結合することを見い出した。これらのことから pedestal 形成において Tir、cortactin、talin の複合体が形成されることを明らかにした。

以上の知見は病原性大腸菌（EPEC、EHEC）の病原性を理解する上で興味深い知見であり、発症機序解明に大いに貢献するもので、博士（薬学）の学位に十分値するものである。