

Title	The EspB protein of enterohemorrhagic Escherichia coli interacts directly with α -catenin and is involved in F-actin accumulation
Author(s)	児玉, 年央
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43750
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	児 玉 年 央
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 8 6 4 号
学位授与年月日	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	The EspB protein of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> interacts directly with α -catenin and is involved in F-actin accumulation (腸管出血性大腸菌が産生する EspB は α -catenin に結合する)
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 堀井 俊宏 教授 品川日出夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

細菌による病原性発揮の第一歩は宿主細胞への定着であり、定着機構を解明することは腸管感染症を制圧する上で重要である。腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli* ; EHEC) の細胞定着部位には宿主細胞側の細胞骨格を形成するタンパク質 (F-actin、talin、 α -actinin、cortactin など) が集積し、菌と細胞との密着 (attaching) と密着部位での微絨毛の縮退 (effacing) が引き起こされ (attaching and effacing (A/E) lesion)、さらに細胞を変形させ台座構造 (pedestal) を形成する。この A/E lesion は細菌側のエフェクター分子が宿主細胞側に注入され、宿主細胞の正常機能を巧妙に利用し、改変することで引き起こされると考えられている。しかしながら、これらのエフェクター分子が細胞側のどのような因子と相互作用した結果 A/E lesion が形成されるのかについては全く解明されていない。そこで、EHEC の A/E lesion 形成に必須のエフェクター分子の一つである EspB と相互作用する細胞側の因子の検索を行い、得られた因子の A/E lesion 形成への関与を検討した。

【方法ならびに成績】

全長の EspB を bait として約 1×10^7 の human testis cDNA を yeast two-hybrid system を用いてスクリーニングした結果、EspB と特異的に相互作用するクローンを得た。このクローンはアクチン結合タンパク質の一つである α -catenin の C 末端 (612-906 a. a.) をコードしていた。次に α -catenin と EspB 間の相互作用を確認するために GST 融合リコンビナント α -catenin と EspB を精製し GST pull-down assay を行ったところ、GST α -catenin により EspB が共沈した。さらに EspB の α -catenin 結合領域を決定するために EspB deletion mutant を精製し、GST pulldown assay および ligand overlay assay を行った。その結果、 α -catenin は EspB の N 末端 1-108 a. a. (EspB Δ 1) に結合することが明らかとなった。また EHEC 感染細胞における α -catenin の局在を検討するために EHEC の *espB* 遺伝子欠損株を作成し、これを HeLa 細胞に感染させ α -catenin を蛍光染色したところ、野生株において α -catenin の菌定着部位への集積が認められたが、*espB* 遺伝子欠損株では認められなかった。EHEC 野生株感染による α -catenin の集積はアクチン重合阻害剤である cytochalasin D によって阻害されなかった。さらに A/E lesion 形成における α -catenin の役割を明らかにするために α -catenin 結合領域である EspB Δ 1 (1-108 a. a.) を発現させた細胞に EHEC 野生株を感染させ、感染細胞の α -catenin およびアクチンを蛍光染色した。その結果、EspB Δ 1 発現

細胞では EHEC 感染による α -catenin の菌定着部位への集積および A/E lesion 形成が阻害された。一方、 α -catenin 結合領域を欠く EspB (EspB Δ 4 (109-312 a. a.)) 発現細胞では A/E lesion 形成が阻害されなかった。

【総括】

EHEC のエフェクター分子の一つである EspB は感染細胞内でアクチン結合タンパク質の一つである α -catenin と結合し、菌定着部位に集積させることが明らかになった。 α -catenin は EspB の N 末端部分 (EspB Δ 1) に結合し、この領域を発現させた細胞では EHEC 野生株感染による菌定着部位への α -catenin および F-actin の集積が阻害されたことにより、EspB による α -catenin の菌定着部位への集積は EHEC による A/E lesion 形成過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

腸管出血性大腸菌の細胞定着 (A/E lesion) は本菌による病態形成において非常に重要である。EspB は A/E lesion 形成過程において中心的な役割を果たす病原因子であると考えられているが、その詳細な機能についてはほとんど明らかにされていない。

本研究は腸管出血性大腸菌の A/E lesion 形成過程において必須の遺伝子である EspB と相互作用する宿主細胞側因子を同定し、その因子の A/E lesion 形成への関与を検討したものである。Yeast two-hybrid assay、GST pulldown assay および ligand-overlay assay により、アクチン結合タンパク質の一つである α -catenin が EspB の N 末端領域と直接相互作用することを明らかにした。また、 α -catenin が感染細胞の A/E lesion 部位に EspB 依存的に集積することを明らかにした。さらに EspB の α -catenin 結合領域発現細胞に対する感染実験では α -catenin および F-actin の A/E lesion への集積が阻害され、EspB による α -catenin の A/E lesion への集積が A/E lesion 形成過程において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以上の知見は腸管出血性大腸菌の A/E lesion 形成過程を理解する上で非常に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、学位の授与に値するものと考えられる。