



|              |                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Enteropathogenic Escherichia coli, Shigella flexneri, and Listeria monocytogenes recruit a junctional protein, zonula occludens-1, to actin tails and pedestals                                                    |
| Author(s)    | 花嶋, 美幸                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 2007, 博士論文                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/47394">https://hdl.handle.net/11094/47394</a>                                                                                                                                |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | はなじま おざわ み ゆき<br>花嶋 (小澤) 美 幸                                                                                                                                                                                                                                  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号     | 第 20949 号                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 19 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br><br>医学系研究科分子病態医学専攻                                                                                                                                                                                                                        |
| 学 位 論 文 名     | Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , and <i>Listeria monocytogenes</i> recruit a junctional protein, zonula occludens-1, to actin tails and pedestals<br>(腸管病原性大腸菌、赤痢菌、およびリステリアが誘導するアクチン凝集束への zonula occludens-1 (ZO-1) の集積) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 堀 口 安彦<br><br>(副査)<br>教 授 堀 井 俊宏 教 授 杉 本 央                                                                                                                                                                                                        |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

腸管病原性大腸菌 (EPEC) は、宿主に感染、定着後、菌体直下の宿主細胞質内でアクチン凝集束の形成を誘導する。このアクチン凝集束は、本菌と宿主とを強固に結びつける構造体で、菌の病原性に重要であると考えられている。この凝集束誘導機構はよく調べられているが、形成された凝集束の維持機構や消失機構についてはほとんどわかっていない。本研究は、分化した上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) に特異的に局在することが知られている細胞間接着構造タンパク質の ZO-1 が、病原細菌の誘導したアクチン凝集束に集積することを初めて見いだしたので、その局在機構を解析することを目的とした。

### 〔 方法ならびに成績 〕

EPEC を培養分化させたヒト腸管上皮細胞 Caco/B7 に感染させ、経時的に ZO-1 染色を施した。ZO-1 は非感染時には細胞間に濃縮して蜂の巣状に観察されたが、感染時間の経過に伴いその染色性が薄れ、感染後 (9 時間) では、断片化し、不規則、不明瞭な染色像を示した。この変化に加えて、特に感染初期 (3 時間) において、EPEC 菌体付着部位に ZO-1 が集積している像が観察された。

この ZO-1 集積に関わる EPEC 側の因子を明らかにするため、EPEC の既知の病原性遺伝子欠損変異体を細胞へ感染させた。この結果、3 型分泌装置 (TTSS) と呼ばれる病原因子分泌装置の欠損株では、ZO-1 の集積が観察されず、TTSS より分泌される蛋白質 (effector) が重要であると考えられた。さらに、既知の effector である Tir の欠損株や、細胞壁蛋白質 intimin の欠損変異株でも集積は見られなかった。Tir は TTSS によって分泌された後、宿主細胞膜に貫通して、膜貫通型の intimin 受容体となり、両者の結合複合体が菌と宿主細胞膜の境界で集積することが知られている。そこで両者の結合のみで ZO-1 集積が誘導されるかどうか検討するため、細胞表面に Tir を発現した細胞を用意し、これに intimin 吸着ラテックスビーズを添加したところ、ビーズの下部にアクチン凝集束と ZO-1 の集積が観察された。経時的な観察結果から、最初にアクチン凝集束が形成され、次いで ZO-1 が集積することがわかった。す

なわち ZO-1 は、Tir と intimin の結合が引き金となって形成されたアクチン凝集束の構成成分に結合している可能性が示唆された。

さらに EPEC と同様に、赤痢菌やリステリアの誘導するアクチン凝集束にも ZO-1 が集積していることがわかった。EPEC、赤痢菌、リステリアの三菌は、共に宿主細胞質の WASP ファミリー蛋白質と呼ばれる細胞骨格系制御因子そのものを活性化するか、それと同等の活性化シグナルを惹起することによってアクチン凝集束形成を誘導している。そこで、WASP ファミリー蛋白質を介するシグナルが ZO-1 集積に重要である可能性を疑い、WASP ファミリー蛋白質を直接活性化する宿主アダプター分子 Nck を膜結合型として細胞に発現させ、この Nck をクラスター化させることで人為的に WASP シグナルを発生させた。その結果、Nck のクラスター部位に、特徴的なアクチン凝集束と、それに集積した ZO-1 が確認できた。

ZO-1 集積に必要とされるドメイン解析を行った結果、ZO-1 は C 末端側の proline-rich region (PRR) を介してアクチン凝集束に集積することがわかった。この PRR 依存性 ZO-1 集積は、EPEC、赤痢菌、リステリアの三菌に共通して認められた。さらに、ZO-1 の集積は、アクチン凝集束内の菌から遠位にある尾部に強く認められ、アクチン凝集束の形成や分解のバランスを制御しているように思われた。

#### 〔 総 括 〕

本研究において、通常分化した上皮細胞では TJ にのみ局在する ZO-1 が病原細菌の感染により異所性に集積することを見いだした。ZO-1 集積には、WASP ファミリー蛋白質の活性化が関与していること、ZO-1 の C 末端側の PRR が関与していること、アクチン凝集束の特に尾部に観察されることが明らかとなった。アクチン凝集束は、EPEC では菌の定着、赤痢菌・リステリアでは細胞内拡散に重要とされている。これらの結果より、ZO-1 は病原細菌により形成されたアクチン凝集体に特異的に集積することにより、細菌感染時の病態形成や維持に関与している可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

腸管病原性大腸菌 (EPEC) は、感染過程において、菌体直下の宿主細胞質内でアクチン凝集束の形成を誘導する。このアクチン凝集束は本菌の定着に重要であると考えられており、その誘導機構はよく調べられているが、形成された凝集束の維持機構や消失機構についてはほとんどわかっていない。本研究において申請者は、宿主細胞タンパク質の ZO-1 がこのアクチン凝集束に特異的に集積することを初めて見だし、その局在機構を解析した。その結果、ZO-1 局在現象には EPEC の病原因子 Tir が必須であること、ZO-1 は C 末端側の proline-rich region を介してアクチン凝集束に局在すること、人為的に宿主細胞成分の Nck、N-WASP、Arp2/3 の一連のカスケードを活性化させることによって凝集束の形成と ZO-1 の集積が再現できることを示した。さらに、EPEC と同様にアクチン凝集束形成を誘導する赤痢菌やリステリアでも ZO-1 の集積が起こることを明らかにした。本研究は、分化上皮細胞でタイトジャンクションにのみ局在する ZO-1 が、EPEC、赤痢菌、リステリアなどの細菌感染時に何らかの特異的な役割を果たしていることを初めて示している。以上のことから、本研究は学位授与に値するものと判断できる。