

Title	Enterohemorrhagic Escherichia coli effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation
Author(s)	宮原, 顕
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49988
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

目的

腸管出血性大腸菌O157(以下O157)は食中毒の原因菌であり、ときに激しい下痢を惹起し、さらに溶血性尿毒症候群を引き起こす。この菌の病原性はベロ毒素とともに、染色体上のLEE(locus for enterocyte effacement) にコードされる3型分泌装置(以下TTSS)及び分泌蛋白質エフェクターに依存している。O157はTTSSによりエフェクターを宿主細胞内へ直接注入し、細胞の機能を様々に障害あるいは修飾する。例えば、Tir及びTccpは付着部位直下の細胞内にF-actinに富む台座構造の形成を誘導して上皮細胞に強く接着し、上皮細胞上に微小集落を形成する。私は、O157Sakai株のプロファージSpLE3にコードされた新規エフェクター蛋白質EspL2について解析を行った。

方法並びに成績

EspL2の感染細胞における局在及び機能を検討するために、FLAGタグを連結したEspL2-FLAG3融合蛋白質を発現するプラスミドを構築し、これを形質転換したO157株を用いて培養細胞に感染実験を行った。EspL2はTTSSに依存して宿主細胞内に移行し、微小集落直下の細胞膜付近のF-actinの凝集塊近傍に局在した。微小集落直下のF-actinの凝集塊を、野生型株と*espL2*欠損株と比較すると欠損株では凝集が弱まり、*espL2*遺伝子を戻すと凝集が回復した。さらに*espL2*欠損株は野生型株と比較すると平面的な散在した微小集落を形成したが、*espL2*遺伝子を戻すと立体的で密集した微小集落を形成した。これらの結果より、EspL2はF-actinの凝集を促進し、密度の高い微小集落の形成を促進することが示唆された。

次に標的となる宿主因子を検索するために、MBP-EspL2融合蛋白質を精製し、細胞抽出液より親和性を持つ蛋白質を分離した。その結果、EspL2に相互作用する細胞内因子annexin2を同定した。さらに、精製したannexin2蛋白質を用いたMBP-EspL2との結合実験により、EspL2がannexin2に直接結合することを明らかにした。annexin2は、細胞膜と細胞骨格の連結やF-actin凝集作用があることが報告されている。感染細胞内でのannexin2の関与を確かめるためにannexin2の発現をsiRNAにより抑制したCOS-7細胞を用いて感染実験を行った。annexin2発現を抑制した細胞では、EspL2発現株でも散在した微小集落を形成し、微小集落直下のF-actin凝集の程度が減少し、*espL2*欠損株の微小集落及びF-actin凝集に類似した形態を示した。これらの結果は、EspL2がannexin2を介してF-actin凝集及び細胞膜形態変化を誘導していることを示した。

annexin2のF-actin凝集活性へのEspL2の関与を検討するために、light scattering法を用いてF-actin、EspL2、annexin2蛋白質混合液中のF-actinの凝集塊形成を経時的に測定した。annexin2にさらにEspL2を混合すると高い凝集活性が見られた。反応液より遠心によりF-actin塊を分離し、組成を調べたところ、annexin2とEspL2も凝集塊に含まれた。すなわち、EspL2はannexin2と複合体を形成してF-actin凝集活性を促進していることが示唆された。

感染細胞におけるEspL2の作用にTirによるF-actin重合が必要であるか検討した。すなわち、Caco-2細胞に感染

【23】

氏名	宮原 顕
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 22732 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation (腸管出血性大腸菌のエフェクター蛋白質 EspL2 は、annexin2 活性化を通して、アクチン微細繊維の凝集を誘導する)
論文審査委員	(主査) 教授 杉本 央 (副査) 教授 目加田英輔 教授 本田 武司

させ微小集落及びF-actin凝集を観察した。*tir*欠損株では*espL2*を保有していてもF-actinの凝集は見られなかった。しかし、二重欠損株に*espL2*遺伝子を戻した株では付着した菌の間に仮足状突起が伸長し、二重欠損株よりも付着した菌数が増加していた。この結果は、EspL2は、TirIにより重合したF-actinを凝集させるが、一方でTir-Intimin結合による細菌密着とは別に細胞付着に寄与していることを示している。

総括

EspL2はannexin2の機能を介してTirIにより重合したF-actinをさらに凝集させること、及びTirIに非依存的に細胞膜の形態変化を誘導することを明らかにした。これらの機能により、EspL2は密度の高い微小集落の形成を促進するとともに付着にも直接関与していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、腸管出血性大腸菌O157(以下O157と表す)のエフェクター蛋白質EspL2の機能解析を行った。O157のエフェクターEspL2は、三型分泌装置を介して宿主細胞内に移行し、細胞内因子annexin2のF-actin凝集活性を亢進し、微小集落直下のF-actin凝集活性を促進させる。さらにO157の付着を増加させ、菌の付着に直接関わっていることを明らかにした。これらの機能により、EspL2は密度の高い微小集落の形成を促進するとともに、付着にも直接関与していると考えられる。

この結果は、O157の大腸上皮細胞への感染メカニズムを解析する上で重要な意味を持ち、これからのO157の病原性の解明に寄与することが期待される。よって、博士(医学)の学位授与に値すると考える。