

氏名(本籍)	わ じま たけ あき 輪 島 丈 明 (東京都)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 6214 号			
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	腸管毒素原性大腸菌の付着因子 CS6 に関する研究			
主 査	筑波大学教授	獣医学博士	八 神 健 一	
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	齋 藤 慎 二	
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	福 田 邦 明	
副 査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(医学)	倉 根 一 郎	

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) は発展途上国における乳幼児下痢症や先進国で散発する渡航者下痢症の主要な原因菌であり、発展途上国では年間の死者数が約 38 万人にのぼり、その大部分 5 歳以下の乳幼児が占める深刻な疾患である。ETEC は 3 つの主要な病原因子 (易熱性毒素、耐熱性毒素、付着因子) を産生し、そのなかで付着因子は ETEC の小腸粘膜への定着に必須であり、付着因子の欠損では感染が成立しないことから、治療および予防の標的として注目されている。付着因子のひとつである CS6 は特に途上国を中心にその保有株の割合が急激に増加しているが、CS6 による付着機構や CS6 自身の分子的性質や発現機構はほとんど明らかにされていない。本研究では、ETEC 臨床分離株を用い CS6 の成熟機構、腸管上皮細胞への付着機構および CS6 のもつ ETEC 感染における機能を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

ETEC 臨床分離株として、インド西ベンガル州立感染症病院で水様性下痢症患者から分離された 4266 株と、同病院で健康人より分離された 3020 株を用いた。これらの株は CS6 のみを付着因子として産生し、4266 株は C_{ss}AIC_{ss}BI 型、3020 株は C_{ss}AII C_{ss}BII 型の CS6 サブタイプを示す。まず、4266 株の各 CS6 遺伝子の欠損株を作製し、それらの株のヒト腸管上皮細胞株への付着性を評価した。また、CS6 の構造タンパクである C_{ss}A、C_{ss}B を精製し、細胞分画法や免疫沈降法により、C_{ss}A と C_{ss}B の局在および相互作用の解析を行った。

次に 4266 株および 3020 株の CS6 遺伝子をクローニングし、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解読を行うとともに、部位特異的変異導入や CS6 欠損株を作製し付着性の違いを確かめた。さらに、非細胞侵入性株である実験室系統大腸菌の TOP10 に CS6 を発現させた株 (TOP10 pCS6) および 4266 株の CS6 欠損株を作製し、細胞侵入における CS6 の寄与を検討した。

(結果)

CS6 を構成する 4 つのサブユニットの欠損株を構築し、細胞への付着性および CS6 の分子成熟を解析したところ、C_{ss}A は C_{ss}B 非存在下で mRNA レベルでは存在するが、タンパクレベルでは安定に存在できなかった。また、細胞分画のウェスタン解析、菌体外膜の蛍光染色の結果、CS6 のいずれのサブユニットが欠けて

も CS6 は外膜上に発現せず、ETEC の付着性も消失した。

CS6 を介した付着は C_{ss}B 抗体で阻害され、C_{ss}A 抗体では阻害されなかった。また、CS6 変異体の細胞への付着は C_{ss}BII 型を持つものが非発現株と同程度まで減少した。部位特異的変異導入により C_{ss}BI の 118 番目のリジンにアミノ酸置換を導入すると、付着性が消失した。CS6 のプラスミド塩基配列解析の結果、同一プラスミド上に *tra* オペロンおよびトキシン・アンチトキシン系が存在していた。

4266 株は Caco-2 細胞内に侵入し、後期エンドソームの内部で増殖することが観察された。CS6 欠損株の細胞侵入は強く抑制され、一方で非侵入性株である TOP10 に CS6 を発現させると細胞内に侵入した。TOP10 pCS6 による細胞侵入は、アクチン重合の阻害剤および PI3K 阻害剤により有意に減少し、感染細胞の付着菌体周辺にアクチンの集積が認められた。

(考察)

以上の結果より、CS6 はいずれか 1 つのサブユニットの欠損で、正常に成熟しないことが示された。また、CS6 の細胞への接着を担う責任分子は C_{ss}B であり、その中でも特に 118 番目のリジンが重要であることが明らかとなった。CS6 のプラスミド上の遺伝子を解析したところ、接合伝達に関わる *tra* オペロン、プラスミドの脱落を防ぐトキシン・アンチトキシン系が存在していた。これらは CS6 の伝達や安定化に関与している可能性を示唆している。

また、CS6 は細胞侵入因子である可能性が示され、CS6 を介した細胞侵入は、PI3K を含むシグナル伝達の結果、アクチン重合が促進されることに起因すると考えられた。細胞侵入した ETEC は細胞内で増殖することから、ETEC は細胞侵入性菌である可能性が示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究で示された CS6 の分子成熟機構や付着責任分子の解明は、付着因子を標的とした治療・予防法への応用につながる知見である。今後は、CS6 受容体を同定し CS6 による付着・侵入機構の完全解明を目指すとともに、ETEC 感染の *in vivo* 実験系の構築を通じて細胞侵入や病態発現機構の解明へと研究の進展が期待される。

平成 23 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。