[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 黒田 英介

本研究は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*、ピロリ菌)の付着に重要な役割を果たしていると考えられる付着因子 BabA の持続感染における付着機能の変動および、ピロリ菌感染後に作動する付着機構として菌体Ⅳ型分泌装置 (T4SS)と宿主インテグリン β1 の相互作用の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ピロリ菌感染モデル生物であるスナネズミに *H. pylori* ATCC 43504 野生株を経口投与し、感染経時的（1、5、8、16 週間後）に胃からピロリ菌を単離した。単離したピロリ菌の Le^b 結合能を ELISA 法にて測定したところ、感染 5、8、16 週間後の株において減弱していることが示された。しかしながら、感染 5、8、16 週後の多くの菌株で BabA タンパク質の顕著な減少は認められないことが、ウエスタンブロット法により示された。これらのことから、感染 5、8、16 週間後のピロリ菌は BabA を発現しているにも関わらず、Le^b 結合能が減弱したことが示された。

2. ピロリ菌感染スナネズミの胃内から単離した菌株の菌体表面 Le^b の発現量をフローサイトメーターにて測定したところ、感染 5、8、16 週後の菌株は、ピロリ菌野生株に比べて Le^b の菌体表面発現強度が増大していた。過ヨウ素酸ナトリウム処理、フコース分解酵素処理、Le^b 合成に関与する糖転移酵素をコードする *jhp0563* 欠損の三種類の方法を用いて、菌体表面 Le^b を除去した菌株では Le^b 結合能が上昇しており、菌体表面に発現した Le^b が BabA の付着機能を阻害していることが示唆された。

3. ピロリ菌菌体因子のリガンドとして報告がある宿主因子の発現に関わる糖転移酵素群、プロテオグリカン群およびインテグリン群に着目して、ピロリ菌感染により発現が変動する胃上皮細胞 AGS の宿主因子をマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、各種インテグリン分子群の発現が増大することが判明した。ピロリ菌感染培養細胞の定量的 RT-PCR 解析により、インテグリン群の mRNA は、ピロリ菌の T4SS、BabA、および宿主細胞の Le^b 発現に依存して増大することが示された。

4. ITGB1 欠損および発現細胞株へのピロリ菌野生株および T4SS 欠損変異株の付着実

験の結果、ITGB1 発現細胞株で見られた T4SS に依存したピロリ菌の付着は、ITGB1 欠損細胞株では見られなかった。したがって、ピロリ菌 T4SS は ITGB1 をリガンドとする菌体の付着因子として機能することが示唆された。

5. ピロリ菌感染スナネズミの胃組織中の *ITGB1* の mRNA 発現量は、感染 8 週後に顕著に上昇することが定量的 RT-PCR により示された。ピロリ菌野生株 8 週感染スナネズミの胃組織においては、ITGB1 タンパク質の強い発現が免疫蛍光組織染色により見られた。野生株感染動物でみられた ITGB1 の高度な発現は、*babA* 欠損変異株感染動物の胃組織では見られなかった。

6. ピロリ菌感染スナネズミの胃内定着菌数を測定したところ、感染 1 週では、*babA* に依存した定着を示した。さらに感染 8 週後では、野生株は感染 1 週後よりも胃内定着菌数の増大がみられたが、*babA* 欠損変異株および T4SS 欠損変異株の胃内定着菌数は野生株よりも有意に低かった。したがって、感染初期の胃組織への菌体付着は BabA に依存する一方で、感染後期では T4SS が付着因子として作用する可能性が示唆された。

7. Le^b 発現株の α-1,2 Fuc T をコードする *futC* を欠損させた変異株では、菌体表面の Le^b 発現量が減少し、Le^b の前駆体である Le^a の発現量の増加が認められた。したがって、Le^b の α-1,2 Fuc を付加する酵素をコードする遺伝子は *futC* であることが示された。

8. スナネズミから感染経時的に単離したピロリ菌株の *futA* の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR により測定したところ、Le^b 発現株において有意な低下を認めた。Le^b 陰性である野生株の *futA* 欠損変異株は、菌体表面 Le^b の発現が認められた。Le^b 発現株に *futA* を導入した変異株では、Le^b 発現量が有意に低下した。以上の結果から、*futA* が欠損することで、菌体表面 Le^b が発現することが示された。

以上、本論文はピロリ菌の持続感染において、ピロリ菌の *futA* 変異導入に伴い菌体表面に発現する Le^b が菌体 BabA をマスクすることで、菌体の胃粘膜上皮付着機能を抑制することを明らかにした。さらに、ピロリ菌感染後に T4SS と BabA に依存して発現する宿主 ITGB1 が、感染後期の菌体 T4SS の付着リガンドとして機能することを明らかにした。本研究はピロリ菌の持続感染を可能にする菌体-宿主付着機構の全容解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。