

赤痢菌の上皮細胞侵入機構に関する
細胞生物学的研究

久 雅 会 度

①

赤痢菌の上皮細胞侵入機構に関する 細胞生物学的研究

度会雅久

目次	頁
緒言	1
第I章 赤痢菌のIpa蛋白質遊離とその細胞侵入における役割	4
要旨	5
序文	6
材料と方法	7
結果	
1)大プラスミド上の <i>spa32</i> 遺伝子の欠失株作成とIpa蛋白質分泌への影響	12
2)Spa32蛋白質の菌体表在性	13
3) <i>spa32</i> 欠失株の細胞侵入部位におけるF-アクチン凝集の消失	14
4)宿主細胞との接触によるIpa蛋白質の遊離	15
5)細胞外マトリックスとの接触によるIpa蛋白質の遊離	17
6)遊離型Ipa蛋白質による <i>spa32</i> 欠失株の細胞侵入の促進	17
考察	18
図表	24
第II章 Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの相互作用と赤痢菌の細胞侵入	34
要旨	35
序文	36
材料と方法	38
結果	
1)赤痢菌の細胞侵入能と $\alpha_5\beta_1$ インテグリン発現量	43
2)Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合性	44
3) $\alpha_5\beta_1$ インテグリン添加による赤痢菌細胞侵入の阻害	46
4)赤痢菌細胞侵入に伴うFAKとパキシリンのチロシンリン酸化	48
5)細胞侵入部位における $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの凝集	49

6) Rhoによる赤痢菌細胞侵入の制御	50
7) 遊離型Ipa蛋白質による接着斑の活性化とRho不活化によるその阻害	52
考察	53
図表	62
参考文献	69
謝辞	

緒言

赤痢菌は細胞侵入性病原細菌のひとつで、腸上皮細胞へ侵入後、増殖・拡散し、細胞間感染を行い、これを通じて腸管組織に炎症・潰瘍を誘起し最終的に血性下痢を惹起する。その自然感染宿主はヒトとサルである(52)。わが国での細菌性赤痢の患者数は、衛生環境の改善、抗生物質の開発および体力向上等の要因により激減したが、発展途上国においては現在でも乳幼児の死亡原因の一つとして大きな問題となっている。最近では多剤耐性を獲得した赤痢菌が出現し、また有効なワクチンも開発されていないことから、今もなお公衆衛生上重要な細菌性疾患の一つとなっている(87)。

赤痢菌はグラム陰性菌の一つで、A-D群の4亜群からなり、腸管組織侵入性大腸菌(EIEC)と共に、赤痢の起因菌として知られる。赤痢菌は分類学上大腸菌に最も近縁で、大腸菌DNAとは90%以上の相同性を示す。赤痢菌とEIECは共通に180-230kbの大プラスミドを有し、その上には主要なビルレンス因子がコードされているが、一方染色体上にも多数のビルレンス領域が存在する(85, 87)。

赤痢菌は腸上皮細胞と接触後、以下のような過程をたどり血性下痢を引き起こすと考えられている(15, 35, 56)。(I)菌の分泌性蛋白質が上皮細胞へエンドサイトーシスを誘発し、菌を取り込む。(II)菌はファゴソーム様の膜を破壊し細胞質へ脱離する。(III)菌が細胞質内で増殖・分裂・拡散を行う。(IV)細胞間を拡散する。(V)感染細胞へ障害・代謝異常をもたらす、細胞に変性・壊死を起こす。赤痢菌は(I)と(II)より細胞へ侵入し、(III)から(V)を繰り返し周囲の細胞へ次々と感染する。この間、菌は基底膜下へ及ぶことはない。

ビルレンスを保持する赤痢菌には、230kbのプラスミドが存在する。この大プラスミド上に様々なビルレンス因子がコードされている。これまでに8つのビルレンス領域が同定され、各々の遺伝子、転写構成、塩基配列、遺伝子産物とその機能が調べられ、少なくとも5つの機能に関与していることが明らかとなっている(82-8

7)。第一は細胞侵入にかかわる機能で、*ipaBCD*遺伝子から発現される侵入性蛋白質 (IpaB, IpaC, IpaD; invasion plasmid antigens)にコードされている(84, 98)。第二は Ipa蛋白質の細胞質内における安定性に必要なシャペロン機能で、*ipaB*のすぐ上流に存在する *ipgC*遺伝子がこれに関与している(57)。第三はIpa蛋白質の菌体外分泌機構で、20 kbに及ぶ2つのDNA領域、*mxi*(membrane expression of invasion plasmid antigens)(5, 7-9)と *spa*(surface presentation of invasion plasmid antigens) (86, 99)にコードされる20数個の遺伝子がこれに関与している。第四は菌の細胞内、細胞間拡散に必要な機能で、*virG*(*icsA*)遺伝子がこれに関与し(53)、またそのVirG発現には *virK*遺伝子機能が必要で(66)、さらに感染細胞の偽足から隣接上皮細胞へ赤痢菌が脱離するのに *icsB*遺伝子が関与している(6)。また最近44.7 KDaの蛋白質をコードする *virA*遺伝子が新たに同定され、その機能が細胞間拡散に必要であることが認められた(95)。第五は、ビルレンス遺伝子発現を転写レベルで正に調節する機能で、これには *virF*と *virB*の2つ遺伝子が知られている(3, 72)。このほか、大プラスミド上には *ipaH*と呼ばれる抗原蛋白質をコードする遺伝子が5コピー(34)存在するが、ビルレンスに果たす意義はまだ確定していない。プラスミド上にはさらにIS1、IS4、IS3411に特異的なDNAプローブと強くハイブリダイズするDNA断片が各々数個存在している(95)。大プラスミド上のビルレンス遺伝子は、いずれもAT含量が64%と染色体の51%と比べ高く、その結果頻回利用コドンも染色体のものとは異なり、系統発生上赤痢菌の大プラスミドは外来性であることが示唆される(85)。

このように赤痢菌の上皮細胞侵入における分子遺伝学的解析は数多くなされており、種々の病原因子が同定されている。しかしながら、これらの病原因子と上皮細胞の相互作用については不明な点が多い。

そこで本研究では赤痢菌の上皮細胞侵入機構についてIpaB, IpaC, IpaD蛋白質と上皮細胞の相互作用を分子細胞生物学的手法を用いて解析を行った。本論文は2章から構成されているが、第1章では上皮細胞と赤痢菌の接触により誘発されるIpa蛋白質

の遊離と細胞侵入との関係について、第II章ではIpa蛋白質と細胞接着因子の一つである $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとの相互作用による細胞侵入の促進作用についてそれぞれ検討した。これらの結果を総合して、赤痢菌の細胞侵入機構の新しいモデルを提唱し、その正当性を他の研究と比較し総合的に考察を試みる。

要旨

赤痢菌は腸管上皮細胞に接触し菌自らエンドサイトーシスを誘発し細胞内に侵入する。これは菌の分泌するIpaB, IpaC, IpaDの3つの蛋白質によって行われており、その分泌にはMxiおよびSpa蛋白質群が必要である。赤痢菌は極性化した腸上皮細胞に対して側底面側から侵入する。そこで本章ではIpa蛋白質の分泌が赤痢菌の細胞侵入に特異的に誘発されるか否かを検討し、以下の結果を得た。(i)赤痢菌が上皮細胞へ接触するとIpa蛋白質が菌体表層から外液中に遊離する。(ii)Ipa蛋白質の遊離は菌体表在性Spa32蛋白質をコードする*spa32*遺伝子を不活化すると阻止される。(iii)赤痢菌を極性化したCaco-2細胞の頂端側と側底面側に各々接触させると、遊離するIpa蛋白質の量は側底面側との接触の方が頂端側との接触に比べ著しく高い。(iv)Ipa蛋白質の遊離は赤痢菌と細胞外マトリックスであるフィブロネクチン、ラミニン、IV型コラーゲンとの接触によっても促進される。以上の結果から、細胞侵入に必須なIpaB, IpaC, IpaDは赤痢菌の細胞侵入部位で菌体から遊離し、またこの現象は本菌の細胞侵入にとって不可欠であることが示唆された。

序文

赤痢菌が保有する大プラスミドにコードされている3つの抗原性蛋白質である IpaB, IpaC, IpaDは赤痢菌の上皮細胞侵入に中心的な役割を果たしている(11, 15, 84, 98)。 *ipaB*, *ipaC*, *ipaD*の各変異株を用いた研究からIpa蛋白質は菌と細胞の接触部位にみられるF-アクチンの凝集に直接関与していることが示された(17, 35, 56)。また赤痢菌は37°Cで培養すると、Ipa蛋白質を菌体表層および培養上清中に分泌することが知られており、これが不能となった変異赤痢菌株は上皮細胞に侵入できない(5, 7-9, 35, 62, 86, 99)。このIpa蛋白質の分泌に必要な遺伝子は大プラスミド上の *ipa* オペロンに隣接する21 kbのDNA領域に *mxi* および *spa* オペロンとしてコードされている。 *mxi* オペロンは *mxiHIJMEDCA* 遺伝子をコードしており(5, 7-9)、一方 *spa* オペロンは *spa47*, *spa13*, *spa32*, *spa33*, *spa24*, *spa9*, *spa29*, *spa40* をコードしている(86, 99)。DNAの塩基配列から演繹されたMxiとSpa蛋白質のアミノ酸配列は、 *Salmonella* 菌のSpa蛋白質, *Yersinia* 菌のYsc蛋白質, *Bacillus* 菌のFli蛋白質, *Caulobacter* 菌のFli蛋白質, *Xanthomonas* 菌のHrp蛋白質, *Pseudomonas* 菌のHrp蛋白質, *Erwinia* 菌のMop蛋白質, などの細菌の蛋白質分泌装置を構成する一連の蛋白質のアミノ酸配列と高い類似性が報告されている。それらは既知の2つの蛋白質分泌系(タイプI; Sec蛋白質群に依存した分泌系、タイプII; ヘモリジン蛋白質の分泌系)とは、(i)分泌される蛋白質にシグナル配列が存在しない、(ii)分泌に20以上のアクセサリ蛋白質(赤痢菌のMxi, Spaに相当するもの)を必要とする、点で異なっている。従って、それらは現在タイプIII蛋白質分泌系と呼ばれている(23, 32, 96)。しかしながら、MxiとSpaを始めとするタイプIII蛋白質分泌系によるIpa蛋白質分泌機構はまだ不明な点が多い。

ところで *mxi* と *spa* 遺伝子の各変異では、Ipa蛋白質の菌体表層そして培養上清への分泌能が欠如し、上皮細胞侵入能も失われていた(5, 7-9, 86, 99)。しかし以前作製した *spa* オペロン中の *spa32::Tn5* 変異株では、IpaB, IpaC, IpaDは菌体表層に分泌

発現が行われているにもかかわらず、その*spa32*変異株は細胞侵入性を全く喪失していた。即ち、赤痢菌の細胞侵入性の発現には*lpa*蛋白質の菌体表層分泌は必要であるが十分ではないことが示唆された(86)。そこで、赤痢菌の野生株の1つであるYSH6000Tの大プラスミド上の*spa32*遺伝子にインフレーションの欠失変異株を作成し、*lpa*蛋白質の菌体表層および培養上清への分泌能を*in vitro*および*in vivo*の条件下で解析し、*lpa*蛋白質の分泌と培養上清中への遊離能が赤痢菌の細胞侵入にいかなる役割を果たしているかを明らかにすることを企図した。

材料と方法

菌株とプラスミド

B群赤痢菌(*Shigella flexneri*)野生株としてYSH6000T株(83)を用い、その非病原性対照株としてYSH6000Tの230 kbプラスミド脱落変異株であるYSH6200株(66, 82)を使用した。S325とN1411は各々YSH6000*mxIA::Tn5*と*lpaB::Tn5*変異株である(84)。CS2585は*spa32*遺伝子のインフレーション欠失株である。SY327λ*pirI*はsuicideベクターの1つpCVD442の宿主大腸菌株として使用した(21)。pMW119(Nippongene)は*spa32*遺伝子を含む1539 bpの*EcoRI*断片をクローニングするベクターとして使用した。

*spa32*欠失株の作成

図1-1に示すように、YSH6000Tの保有する230 kbプラスミドpMYSH6000(大プラスミドと略す)上の*spa32*遺伝子を含む*HindIII*-*BglII*3606 bpのDNA断片(86)をpMW119にクローニングし、得られたプラスミドをpMAW101とした。*spa32*遺伝子の5'末端から1581 bp上流と68 bp下流のDNA配列と相補的なDNA配列を各々有する2つのプライマー5'-GAAATTGTTGAAGAGCTA-3'と5'-TAACTGCAGATAGTTTC

TCACATTTTTCTAT-3'を作成し、2つのプライマーの間のDNAをPCRで増幅した。後者のプライマーには*Pst*I部位を付加した。増幅したDNA断片内に含まれる *Hind*III-*Pst*I 1656 bpのDNA断片をpMAW101の*Hind*IIIと*Pst*I部位に挿入し、そのプラスミドをpMAW102とした。pMAW102の*Sac*I-SacI 3106 bpDNA断片をsuicideベクターであるpCVD442にクローニングしてこのプラスミドをpMAW201とした。pCVD442は*pir*遺伝子産物である π 蛋白質依存性の複製を行うR6Kレプリコンを有しており、*pir*遺伝子の存在しない宿主菌株内では複製することはできない(50)。この特性を利用して、*pir*遺伝子の存在するSY327 λ *pir*を用いて*spa32*遺伝子のインフレーム欠失変異をpCVD442上に構築し、このプラスミドpMAW201を*pir*遺伝子の存在しない赤痢菌YSH6000Tに導入した。この結果pMAW201は、大プラスミド上の*spa32*遺伝子と相同組み換えを起こし*spa32*遺伝子部分に組み込まれる。大プラスミド上に組み込まれた菌株のみがpMAW201の有するアンピシリン耐性遺伝子を発現するため、アンピシリン耐性(50 μ g/ml)によって組み換え体を選択した。さらにpCVD442はグラム陽性菌である*Bacillus subtilis*の*sacB*遺伝子を有しており、この*sacB*遺伝子はレバンサッカラーゼ(levansucrase)をコードし、サッカロースを含む培地中において*B. subtilis*の菌体内から培養上清中へ分泌される。この酵素はサッカロースからレバンを合成する作用を触媒する。5%サッカロース存在下においてグラム陰性菌でのレバンサッカラーゼの産生は致死性に作用する(27)。この特性を利用して、pMAW201が相同組み換えによって組み込まれたYSH6000Tを5%サッカロース存在下において30 $^{\circ}$ Cで18時間培養し(21)、発育したコロニーすなわち、*sacB*遺伝子を含むベクター部分が脱落した菌株を分離した。これらの菌株の中でアンピシリン感受性の株を1つ選び、その大プラスミドの*spa32*遺伝子欠失領域をPCRによって増幅し、その塩基配列を決定した。正確に*spa32*遺伝子部分が5'末端より68番目の塩基から572番目の塩基が脱落していることを確認後、その株をCS2585株とした。

細胞侵入性試験

サル腎臓上皮細胞由来の細胞株であるMK2細胞をMinimum essential medium (MEM)(Nissui)で80%コンフレントに調整し、菌の感染数を1細胞あたり100にした。700 xg, 10分間遠心することによって感染させ、37°Cで20分間保温した。その後、ゲンタミシン(100 µg/ml)を含むMEMで60分間保温することによって感染していない菌を殺した。感染細胞を0.5% Triton X-100で溶解し、それを寒天培地上に塗布し、生じたコロニー数から細胞内へ侵入した菌数を測定した。

菌体表層のIpa蛋白質の検出

菌体表層のIpa蛋白質はELISA法によって定量した(8)。ブレインハートインフュージョン(Brain Heart Infusion; BHI)培地(Difco)で37°C振盪培養し、対数増殖期まで培養した菌を遠心(2700xg, 10分間)し、最終的にOD₆₀₀=5.0になるようにリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered-saline; PBS)に懸濁した。菌の懸濁液を96穴マイクロタイタープレート(Costar)に加え、2時間室温で保温した。菌の懸濁液を取り除いて5%ウシ胎児血清(Bovine serum albumin; BSA)でブロッキングし、PBS-0.05% Tween 20(PBST)で2回洗浄した後、抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を加え2時間、37°Cで保温した。PBSTで2回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase; HRP)標識プロテイン Aを加え、1時間、37°Cで保温した。PBSTで2回洗浄した後、基質である2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) diammonium saltを加え発色させ、ELISA reader model 450(Bio-Rad)の405 nmのフィルターを使用して菌体表層のIpa蛋白質を定量した。

全菌体および培養上清中のIpa蛋白質の検出

上述の対数増殖期まで培養した菌1mlを遠心し、得られた上清を0.45 µmのフィルター(Millipore)を使用し菌体をろ過し除いた。この上清分画に終濃度が6%になるよ

うにトリクロロ酢酸(trichloroacetic acid; TCA)を加えて全蛋白質を沈殿させ、その沈査を60 μ lのSDS-サンプル液に懸濁して、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)によって分離した。一方、遠心集菌後、得られた菌体ペレットは1ml生理食塩水で洗浄し、上清分画と同様に終濃度6%TCAを加えて全蛋白質を沈殿させ、SDS-PAGEによって蛋白質を分離した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜に移し抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いてイムノブロットを行った(3)。

抗体の調整

Spa32蛋白質の抗体はSpa32と6個のヒスチジンの融合蛋白質を作成し、QIAexpress(Qiagen)を用いて精製したヒスチジン融合Spa32蛋白質をウサギに免疫することによって得た。赤痢菌の細胞質蛋白質の1つIpgC(56)の抗体はその分子内の139-155番目のアミノ酸を合成し、その合成ペプチドをウサギに免疫することによって得た。外膜蛋白質であるOmpC(91)の抗体は名古屋大学、水野猛博士より分与された。

Spa32蛋白質の菌体内局在

BHI培地で37 $^{\circ}$ C、対数増殖期まで培養した菌100mlを遠心集菌し、10ml HEPES緩衝液に懸濁した後、フレンチプレスを用いて(12000 kg/cm²)菌体を破碎した。破碎液をショ糖密度勾配遠心法によって内膜分画と外膜分画に分離した(69)。ペリプラスム分画の蛋白質はコールドオスモティックショック法によって分離した(67)。一方細胞質分画はペリプラスム分画の蛋白質を分離した後、MaagdとLugtenbergの方法により分離した(54)。それぞれの菌体画分の純度は、各菌体画分に特異的に存在する蛋白質によって決定した。即ち、細胞質、内膜、外膜、ペリプラスム画分は各々マレイトデヒドロゲナーゼ(46)、NADH オキシダーゼ(69)、2-ケト-3-デオキシオクトネート(45)、アルカリフォスファターゼ(61)の活性を測定し

た。得られた菌体画分はSDS-PAGEによって分離し、Spa32蛋白質の抗体を用いてイムノプロットを行うことによって菌体内局在を決定した。

赤痢菌と上皮細胞接触後のIpa蛋白質の検出

培養液中に遊離するIpa蛋白質と菌体表層に存在するIpa蛋白質をELISA法によって定量した。MK2細胞を80%コンフルントに調整し、菌の感染数を1細胞あたり100にした。菌の細胞侵入を阻害するためにMK2細胞をサイトカラシンD (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma)で感染前45分間処理した後(57)、700 xg, 10分間遠心し、0, 5, 10, 20分間37°Cで保温した。培養液を0.22 μm のフィルターでろ過し、このろ液中に含まれるIpa蛋白質を抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いてELISA法によって定量し、遊離Ipa蛋白質とした。一方細胞に付着した菌は10 mlのMEMに懸濁し、700 xgで4分間遠心して細胞を取り除いた後、その上清液を6000 xgで10分間遠心することによって集菌した。菌を2 ml PBSに懸濁し、菌体表層のIpa蛋白質をELISA法によって定量した。細胞と接触後の菌体内に存在するIpa蛋白質を定量するために、菌と細胞を接触させた後、菌を細胞から分離するためにプロナーゼ培地 (トリプシン 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, プロナーゼ K 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むMEM)を加え、10分間37°Cで保温した(57)。1 mM PMSF, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンインヒビター, 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプスタチン, 1 mM EDTAを含むMEMを10 ml加え、700 xgで4分間遠心して細胞を取り除いた後、菌を300 μl の1%SDS溶液で懸濁し、5分間100°Cで加熱した。13000 xgで30分間遠心し、その上清を2 mlのPBSに懸濁して、菌体内Ipa蛋白質とした。

細胞外マトリックスとの接触による遊離Ipa蛋白質の検出

フィブロネクチン、ラミニン、IV型コラーゲンなどの細胞外マトリックスを含むPBS溶液(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を96穴マイクロタイタープレートに加え2時間室温で保温した。その後、BHI培地で37°C振盪培養し、対数増殖期まで培養した赤痢菌を遠心

(2700xg, 10分間)し、最終的に $OD_{600}=1.0$ になるようにPBSに懸濁した菌液100 μ lを各ウェルに加えて700 xgで10分間遠心することによって、赤痢菌と細胞外マトリックスを接触させた。得られた上清を0.22 μ mのフィルターを用いて菌体を除いた。この上清分画に含まれるIpa蛋白質の量を抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いてELISA法によって定量した。

極性化Caco-2細胞の培養

ヒト大腸由来の細胞株であるCaco-2細胞をバイオコートセルカルチャーインサートマトリゲル(Becton Dickinson)を用いて6日間培養しコンフレントの状態にした。極性化Caco-2細胞に100 mM EGTAを感染前1時間加え、Caco-2細胞間のタイトジャンクションを壊し菌が側底面側に到達できるようにした(65)。

感染細胞の免疫蛍光染色

感染細胞を4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、0.2%Triton X-100を用いて脱膜した後、F-アクチンをローダミン標識ファロイジン、菌を抗赤痢菌2a LPSウサギ抗体あるいは抗IpaCウサギ抗体と抗ウサギFITC標識ヤギ抗体を用いて免疫蛍光染色した。

共焦点レーザー顕微鏡

免疫蛍光染色した標本は共焦点レーザー顕微鏡(Bio-Rad; MRC-1000, MRC-1024)を用いて解析した。解析した画像をFujichrome 100を使用して写真撮影を行った。

結果

1)大プラスミド上の $spa32$ 遺伝子の欠失株のIpa蛋白質分泌への影響

赤痢菌のIpaB, IpaC, IpaDの菌体表層と培養液中への分泌能および細胞侵入性の関係を調べる目的で、赤痢菌の*spa32*遺伝子の欠失株(CS2585)を作製し(図1-1)、以下の実験を行った。CS2585とYSH6000T(野生株)をBHI培地で37℃にて対数増殖期まで増殖し、その各々の菌体表層に発現しているIpa蛋白質の量をELISA法で定量した。YSH6000TとCS2585はほぼ同じ程度のIpaB, IpaC, IpaD蛋白質が検出された(図1-2)。一方、同一条件下で増殖させたS325(*mxiA*変異株; *mxiA*オペロン中の*mxiA*遺伝子)のIpaB, IpaC, IpaDの菌体表層発現量を調べたが、その量はいずれも検出限界以下であった。次に、培養上清中に分泌されたIpa蛋白質を抗IpaB, 抗IpaC, 抗IpaD抗体を用いたイムノプロット法で調べた(材料と方法の項参照)。図1-3に示したようにIpaB, IpaC, IpaD蛋白質はYSH6000Tの培養上清からは検出されたが、CS2585の培養上清には全く検出されなかった。次にYSH6000TとCS2585の細胞侵入性試験を行った。MK2細胞にYSH6000TとCS2585を感染させ、60分経過した後細胞内に侵入した菌数を測定した(材料と方法の項参照)。CS2585の細胞侵入性は、YSH6000Tに比べ10%以下へ低下した。CS2585におけるIpa蛋白質の培養上清への分泌能の欠如と細胞侵入性低下の原因が*spa32*遺伝子変異にあることを確認するために、*spa32*遺伝子をpMW119へクローン化したプラスミド(pMAW101)をCS2585へ形質転換で導入し、その形質転換株の一つをCS2586と命名した。CS2586, YSH6000T, CS2585のIpa蛋白質の培養上清分泌と細胞侵入性を測定した結果、CS2586ではいずれのIpa蛋白質の培養上清分泌能はYSH6000Tの示すレベルまで回復していた(図1-3)。以上の結果は、*spa32*遺伝子がIpa蛋白質の菌体から培養上清への遊離に関与し、本現象が赤痢菌の細胞侵入に必須であることを示唆している。

2) Spa32蛋白質の菌体表在性

Ipa蛋白質の菌体から培養上清への遊離におけるSpa32蛋白質の役割を明らかにする目的で、Spa32蛋白質の菌体局在性を調べた。1)と同一条件下に培養した

YSH6000Tの外膜、内膜、細胞質、ペリプラスムを材料と方法の項に従って分画し、各菌体画分の蛋白質をSDS-PAGEで分離した後、Spa32特異的抗体を用いてイムノブロット法でSpa32の分布を解析した。図1-4Aに示したように、抗Spa32抗体で染色されるバンドが32 kDaに検出され、その蛋白質の含量は外膜分画に最も多く、細胞質とペリプラスム分画にも各々約5分の1量のSpa32が検出された。次に、菌体をSpa32特異的抗体を用いて免疫蛍光染色法で染色して蛍光顕微鏡で観察すると、YSH6000Tの菌体表層は陽性に染色されたが、CS2585では全く染色されなかった(図1-4B)。これらの結果から、Spa32蛋白質は菌体表在性の外膜蛋白質である可能性が示唆された。

3) *spa32*欠失株の細胞侵入部位におけるF-アクチン凝集の消失

赤痢菌と上皮細胞の接着部位に認められる細胞骨格線維であるF-アクチンの凝集は細胞侵入に必須な現象であり、この細胞骨格の再構成によって赤痢菌が上皮細胞内に侵入するものと考えられている(17, 35, 56)。*ipaB*, *ipaC*, *ipaD*遺伝子の変異株あるいはIpa蛋白質を菌体表層および培養上清中に分泌できない*mxg*遺伝子の変異株を用いた実験ではF-アクチンの凝集は認められず、この報告によってIpa蛋白質がF-アクチンの凝集に直接関与することが示された(17, 35, 56)。そこで菌体表層に存在するIpa蛋白質がF-アクチンの凝集に直接関与するか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。YSH6000T(野生株)とCS2585(*spa32*遺伝子変異株)を各々MK2細胞に37°Cで15分間感染させ、この感染細胞のF-アクチンをローダミン標識ファロイジン、赤痢菌をFITC標識抗赤痢菌LPS 2a抗体を用いて免疫蛍光染色し、F-アクチンの凝集を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。YSH6000Tでは接着した細胞の20-30%にF-アクチンの凝集が観察されたが、CS2585では全く観察されなかった(図1-5)。さらに、菌体表層をFITC標識抗IpaC抗体を用いて免疫蛍光染色し、F-アクチンをローダミン標識ファロイジンで染色したところ、上皮細胞に接触

しF-アクチンの凝集を誘起しているYSH6000Tの菌体表層はFITC標識抗IpaC抗体で染色されなかった。しかし、上皮細胞と接触しているYSH6000Tの中でF-アクチンの凝集を誘起していない菌の場合、その菌体表層はFITC標識抗IpaC抗体で染色された(図1-6)。これは上皮細胞と接触しF-アクチンを凝集している赤痢菌ではIpa蛋白質が菌体表層から遊離したためではないかと考えられた。

4) 上皮細胞との接触によるIpa蛋白質の遊離

*spa32*変異株によりIpa蛋白質の菌体表層からの遊離が細胞侵入性に不可欠であるという事実と上述の図1-6で得られた結果を総合すると、Ipa蛋白質の遊離は赤痢菌と上皮細胞の接触によって誘起される可能性が示された。そこで赤痢菌が上皮細胞へ接触した時、上清中へ遊離するIpa蛋白質の定量を試みた。YSH6000T(野生株)、CS2585(*spa32*遺伝子欠失株)、S325(*mxiA*遺伝子変異株)をBHI培地で37°Cにて対数増殖期まで増殖し、その各々をMK2細胞に700 xg, 10分間遠心により接着させ、細胞培養液(MEM)中に遊離するIpa蛋白質および菌体表層と菌体内に存在するIpa蛋白質をELISA法で定量した(材料と方法の項参照)。図1-7A, B, Cに示すように、YSH6000Tの菌体表層と菌体内に存在するIpaB, IpaC, IpaD蛋白質は菌と上皮細胞の接触前では1:2であった。接触直後の菌体表層Ipa蛋白質は著しく減少しそれは接触前の20%のレベルであった。一方、菌体内のIpa蛋白質の量は接触直後は変化はなく、10分後も接触前の80%のレベルを保った。これと一致するように、MEM中のIpa蛋白質は接触後すぐに増加し、その増加は菌体表層から減少したIpa蛋白質の量と良い一致を示した。図1-7D, E, Fに示すように、CS2585の菌体表層と菌体内に存在するIpa蛋白質は、IpaB, IpaC, IpaD蛋白質ともYSH6000TのIpa蛋白質とほぼ同量であった。しかし、CS2585ではMK2細胞との接触後も菌体表層および菌体内のIpa蛋白質の量的変化は認められず、また培養上清中へ遊離するIpa蛋白質も認められなかった。図1-7G, H, Iに示すように、S325の菌体表層にはIpaB, IpaC, IpaD蛋

白質とも検出されず、菌体内に存在するIpa蛋白質はYSH6000Tの菌体内に存在するIpa蛋白質とほぼ同量であった。また、S325ではMK2細胞との接触による菌体表層および菌体内に存在するIpa蛋白質の量的変化は認められず、遊離するIpa蛋白質は検出されなかった。一方、YSH6000Tを上皮細胞へ接触させ、Spa32蛋白質自身の動態を調べた結果、Spa32蛋白質は菌体表層と菌体内に検出され、接触前と後でその各々に存在するSpa32蛋白質の量に変化は認められなかった(図1-7J)。また、菌体表層および菌体内に存在する蛋白質のマーカーとしてそれぞれOmpC蛋白質(91)、IpgC蛋白質(57)の動態を同時に調べたが、いずれも接触前と後でその量に変化は認められなかった(図1-7K, L)。これらの結果から、Ipa蛋白質は菌体表層に存在し、赤痢菌と上皮細胞の接触によって特異的に培養液中に遊離することが示唆された。

極性化したCaco-2細胞に赤痢菌を感染させると、菌は頂端側よりも側底面側の方からの感染率が著しく高いことが最近報告された(65, 72)。これに注目して、極性化したCaco-2細胞の頂端側あるいは側底面側にYSH6000Tを接触させこれによって遊離するIpa蛋白質の量と感染率を検討した。赤痢菌を側底面側に到達できるようにする目的でCaco-2細胞をEGTAで処理し細胞間隙を開き、感染を行った(65)。図1-8Aに示すように、YSH6000Tを側底面側(EGTA処理細胞)から感染させると、Caco-2細胞内へ侵入した菌数は頂端側(EGTA未処理細胞)よりも 3.7×10^3 高くなった。これに一致するように、Ipa蛋白質の遊離はYSH6000Tを頂端側(EGTA未処理細胞)と接触した場合と比べ側底面側(EGTA処理細胞)と接触させると高い値を示した(図1-8B)。一方CS2585では、極性化したCaco-2細胞の頂端側あるいは側底面側いずれの側と接触させても、Ipa蛋白質は遊離しなかった(図1-8B)。これらの結果により、Ipa蛋白質の遊離は菌と上皮細胞の相互作用によって引き起こされ、それは赤痢菌の細胞侵入部位で特異的に起こる現象であることが示唆された。

5)細胞外マトリックスとの接触によるIpa蛋白質の遊離

極性化したCaco-2細胞の側底面側においてIpa蛋白質の遊離を促進する因子が何であるかを探索するために、上皮細胞の側底面側に豊富に存在する細胞外マトリックスに注目した。この目的のためにYSH6000TをPBSに懸濁し、マイクロタイタープレートにコーティングしたIV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンと遠心することによって接触させたところ、PBS中にIpa蛋白質の遊離が検出された(表1-1)。同様の方法でCS2585を接触させたところ、PBS中にIpa蛋白質の遊離は検出されなかった。また、YSH6000TをBSAあるいはゼラチン(gelatin)と接触させてもIpa蛋白質の遊離は検出されなかった。これらの結果から、Ipa蛋白質の遊離を促進する因子の一つは細胞外マトリックスである可能性が示唆された。

6)Ipa蛋白質によるspa32欠失株の細胞侵入の促進

赤痢菌の細胞侵入において、菌体から遊離したIpa蛋白質(遊離型Ipa蛋白質)の役割を明らかにする目的で、遊離型Ipa蛋白質を含むMEMを用いて細胞侵入不能赤痢菌、CS2585(*spa32*遺伝子欠失株)、S325(*mxiA*遺伝子変異株)、N1411(*ipaB*遺伝子変異株)の各々の感染率を調べた。赤痢菌と上皮細胞の接触により遊離したIpa蛋白質を含むMEMを調製し(材料と方法の項参照)、これに各々の菌を懸濁しMK2細胞に感染させた。表1-2に示すように、CS2585を遊離型Ipa蛋白質を含むMEMでMK2細胞に感染させた場合Ipa蛋白質を含まないMEMの場合よりも22倍多く細胞内へ侵入した。一方、菌体表層にIpa蛋白質が存在しないS325、N1411は同じ条件下で細胞内への侵入は認められなかった。さらに、遊離型Ipa蛋白質を含むMEMに抗IpaB、IpaC、IpaD蛋白質抗体を加え免疫沈降法によってIpa蛋白質を取り除き、これにCS2585を懸濁しMK2細胞に感染させたところ、CS2585の細胞侵入性の増加は認められなかった(表1-2)。これらの結果から、赤痢菌の細胞侵入には菌体表層のIpa蛋白質と遊離したIpa蛋白質の両方が必要である可能性が示唆された。

考察

赤痢菌は腸管上皮細胞にエンドサイトーシスを誘導し細胞内に侵入する。これには菌の分泌するIpaB, IpaC, IpaDの3つの蛋白質が必要である(17, 35, 56)。赤痢菌は腸管に到達後、孤立リンパ小節のM細胞に取り込まれ、マクロファージに貪食されるが、マクロファージにアポトーシスを誘導し(102)、最終的に腸上皮細胞の側底面側から細胞内へ侵入する(73)。一方、赤痢菌を37℃で培養するとIpa蛋白質は菌体表層に分泌され、また培養液中にも分泌される。このIpa蛋白質の分泌は*mxl*と*spa*オペロンにコードされるMxiおよびSpa蛋白質群(タイプIII蛋白質分泌系)によって行われる(96)。即ち、*mxl*あるいは*spa*の変異株ではIpa蛋白質の菌体表層への分泌が不能となり、細胞侵入性も喪失する。しかし、以前作製した*spa*オペロン中の*spa32::Tn5*変異株では、IpaB, IpaC, IpaDは菌体表層に分泌発現が行われているにもかかわらず、その*spa32*変異株は細胞侵入性を喪失していた(86)。即ち、赤痢菌の細胞侵入を発揮するためには、Ipa蛋白質の菌体表層への分泌のみでは不十分であり、さらにIpa蛋白質が培養上清中へ分泌される必要があることが暗示された。そこで、本章ではIpa蛋白質の分泌が赤痢菌の細胞侵入に果たす役割を明らかにする目的で、i)赤痢菌の大プラスミド上の*spa32*遺伝子のインフレーション欠失変異株(CS2585)におけるIpa蛋白質分泌と細胞侵入性、ii)Ipa蛋白質の遊離は赤痢菌と上皮細胞との接触でされるか否か、iii)赤痢菌と細胞外マトリックスであるフィブロネクチン、ラミニン、VI型コラーゲンとの接触によるIpa蛋白質の遊離の有無、iv)遊離型Ipa蛋白質の細胞侵入性、を検討した。その結果、赤痢菌の細胞侵入に必須なIpaB, IpaC, IpaDは、赤痢菌の細胞侵入部位で菌体から遊離すること、さらにこの現象は本菌の細胞侵入に不可欠であることが示唆された。

最初に*spa32*遺伝子のインフレーション欠失株(CS2585)を作成し、Ipa蛋白質分泌と細

胞侵入性の関係を検討した。赤痢菌の *mxI* および *spa* 遺伝子変異株は *in vitro* の条件下では、Ipa 蛋白質を菌体表層および培養上清中に分泌できないことが報告されていた (5, 7-9, 86, 99)。しかし、最近になり *spa32::Tn5* 変異株は IpaC 蛋白質 (IpaB と IpaD は部分的) を菌体表層に分泌していたが、依然として細胞侵入性は失われていた (86)。一般的に、これまで Ipa 蛋白質の分泌は菌体内から外液中へ一段階分泌されるものであると考えられていたが (57)、*spa32::Tn5* 変異株の示す Ipa 蛋白質の分泌性状は、Ipa 蛋白質が一旦菌体表層に分泌発現し、そして外液中に遊離する、“二段階分泌” により行われることが強く示唆された。事実本研究で作製した *spa32* 欠失変異株 (CS2585) は Ipa 蛋白質を菌体表層に分泌しているにもかかわらず、依然として細胞侵入能を欠いており、また Ipa 蛋白質の菌体表層からの遊離能が失われていた。即ち、Ipa 蛋白質の菌体表層から培養液中への遊離が細胞侵入に不可欠であることが示唆された。

Spa32 蛋白質の菌体局在性を調べた結果、*Spa32* 蛋白質は外膜蛋白質として菌体表層に露出して存在することが示された。したがって、*Spa32* 蛋白質は Ipa 蛋白質の菌体表層からの遊離に直接関係していることが推察される。しかし、*Spa32* 蛋白質自身菌体表層から培養液中へ遊離することはなく、実際どのような機序で Ipa 蛋白質の遊離に関与しているかは明らかにすることはできなかった。

さらに、赤痢菌の細胞侵入と Ipa 蛋白質の菌体表層からの遊離との関係を明らかにする目的で、CS2585 の上皮細胞侵入における F-アクチンの凝集能と菌体表層の Ipa 蛋白質の有無を調べた。この結果、CS2585 は F-アクチン凝集能がなく、したがって Ipa 蛋白質の菌体表層への分泌発現のみでは細胞侵入に不十分であることが示唆された。同時に、抗 IpaC 抗体を用いた免疫蛍光染色法によって F-アクチン凝集時における IpaC の挙動を解析したところ、赤痢菌と上皮細胞が接触した F-アクチン凝集部位では菌体表層から Ipa 蛋白質が消失し、一方上皮細胞に付着しているにもかかわらず F-アクチン凝集がない赤痢菌体表層には Ipa 蛋白質が存在することが認められた。

したがって、F-アクチンの凝集にIpa蛋白質は菌体表層から遊離することが必要であり、このIpa蛋白質の遊離はF-アクチン凝集部位、すなわち赤痢菌と上皮細胞の接触部位で起きる現象である可能性が示唆された。

以上の結果から、Ipa蛋白質は赤痢菌と上皮細胞との接触により外液中に遊離し、この遊離型Ipa蛋白質が細胞侵入に用いられると考えられた。そこで、赤痢菌と上皮細胞の接触後遊離するIpa蛋白質をELISA法を用いて定量したところ、菌体表層のIpa蛋白質が速やかに(5分以内)外液中に遊離することが認められた。一方、同様にしてCS2585を用いて遊離Ipa蛋白質を定量したところ、接触20分後においても検出限界以下であった。これらの結果から、赤痢菌と上皮細胞の接触によるIpa蛋白質の遊離は細胞侵入部位において迅速に行われる現象である可能性が示唆された。また、同時にSpa32蛋白質、外膜蛋白質であるOmpC(91)、菌体内蛋白質であるIpgC(58)を定量したところ、赤痢菌と上皮細胞の接触後外液中に遊離は行われず、上皮細胞との接触による蛋白質の菌体からの遊離はIpa蛋白質に特異的な現象であることが推察される。最近Manardらにより赤痢菌と上皮細胞の接触後遊離するIpa蛋白質を抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いた免疫沈降法によって検出する実験が報告された(58)。この報告によると、赤痢菌と上皮細胞の接触後Ipa蛋白質は菌体表層ではなく、菌体内から直接外液中に放出され、さらに赤痢菌全体に存在するIpa蛋白質の約90%が菌体内に存在すること報告し、以本研究の結果と異なっていた。本研究では赤痢菌全体に存在するIpa蛋白質の約3分の1が菌体表層に存在し、赤痢菌と上皮細胞の接触後直ちに菌体表層に存在するIpa蛋白質が遊離することを示した。この2つの研究結果に相違が生じた理由の一つとして、赤痢菌の増殖条件の違いと用いた菌株自身にIpa蛋白質分泌能に差異がある可能性が挙げられる。Manardらは菌体内の全蛋白質を $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン標識し、そこから分泌されるIpa蛋白質を免疫沈降法で検出する方法を採用したため、赤痢菌を栄養価の最も低いM9最少培地(メチオニン不含)で培養した。しかし、本研究では遊離Ipa蛋白質をELISA法で検出する方法を採用した

ため、赤痢菌を栄養価の最も高いBHI培地で培養することができた。Ipa蛋白質の発現はM9最少培地に比べBHI培地の方が高く、実際に菌体表層のIpa蛋白質量をELISA法で定量するとM9最少培地に比べBHI培地の方が約4倍多く発現していた。このように2つの研究において用いた培地の違いから異なった結果が示された可能性が考えられた。

上述のように、赤痢菌を極性化したCaco-2細胞に感染させると、菌は頂端側よりも側底面側の方から侵入する(65, 72)。ウサギの腸管結紮実験などの動物実験においても、赤痢菌が腸管上皮細胞のM細胞を通過して側底面側から侵入することが示されている(73)。Sansonettiを中心とした研究グループによると、結腸には孤立リンパ小節が散在し、このリンパ小節を覆う上皮細胞は通常の微絨毛を有する上皮細胞とは異なり、細胞表面が異物を取り込みやすいように特殊に分化した構造をしている。この上皮細胞はmicrofold(M)細胞と呼ばれ、M細胞から取り込まれた異物は直下に存在するマクロファージに貪食され抗原提示されると考えられている(65, 72, 73)。しかし赤痢菌はマクロファージに貪食されるが、赤痢菌はマクロファージにアポトーシスを誘発して腸上皮細胞の側底面に離脱する(102)。側底面側に到達した赤痢菌は効率良く上皮細胞内に侵入するというモデルである。本研究においても赤痢菌の感染率は極性化したCaco-2細胞の頂端側よりも側底面側の方が高いことが認められた。さらに赤痢菌の感染率に正比例して遊離IpaB, IpaC, IpaD量も側底面側の方が多いたことが示された。上皮細胞の側底面側からのIpa蛋白質遊離は赤痢菌が側底面側から効率良く侵入する理由の一つであると考えられ、同時に細胞侵入する部位に特異的な現象である可能性が示唆された。さらに本研究ではIpa蛋白質遊離を促進する上皮細胞側因子の一つとして上皮細胞が産生する細胞外マトリックスを同定した。上皮細胞が産生する細胞外マトリックスの代表的なものとしてフィブロネクチン、ラミニン、IV型コラーゲンがあげられる。これらの細胞外マトリックスは基底膜の構成要素で細胞接着において中心的な役割を果たしており、細胞の側底面に

存在レインテグリンの基質となっている(38, 41)。側底面におけるIpa蛋白質の遊離は細胞外マトリックスとの接触によるものであると思われた。Menardらは、Ipa蛋白質遊離因子は細胞培養に使用する培地に含まれるFCSであると報告した(58)。FCS中にもフィブロネクチンは含まれており、本研究の結果とMenardらの結果は一致していると考えられた。

本研究で示された遊離型Ipa蛋白質と菌体表在型Ipa蛋白質は赤痢菌の上皮細胞侵入においていかなる役割を果たしているか不明な点は多く残されている。しかしながら、いくつかの実験によって遊離型Ipa蛋白質の機能を示唆する結果が得られた。実際に、CS2585に遊離型Ipa蛋白質を加えると細胞侵入効率が増加することが認められた。一方、菌体表層にIpa蛋白質が存在しないS325(*mxiA*変異株)、N1411(*ipaB*変異株)では遊離型Ipa蛋白質を加えても細胞侵入効率の増加は認められなかった。これらの結果から、赤痢菌の細胞侵入には菌体表在型Ipa蛋白質と遊離型Ipa蛋白質の両方が必要であり、2つの型のIpa蛋白質の相互作用によって成立するものと思われた。最近になって、遊離型Ipa蛋白質は培養上清中で複合体を形成すること(57)、さらに複合体を形成したIpa蛋白質は線維状構造物となることが報告された(55, 71)。これらの結果から推察すると、赤痢菌と細胞外マトリックスとの接触によって遊離したIpa蛋白質は複合体および線維状構造物を形成し、このIpa蛋白質複合体がインテグリンをレセプターとして結合し(本研究の第二章)、そのシグナルによってF-アクチンの凝集を引き起こしてエンドサイトーシスを誘発するものと考えられる。さらにIpa蛋白質は赤痢菌が細胞内に侵入した後包まれる細胞膜を破る機能もあると報告されており(35)、上皮細胞内に侵入した赤痢菌は菌体表在型Ipa蛋白質によって包まれている細胞膜を破り、上皮細胞質内に脱出するものと考えられた。

本章で示された菌と上皮細胞との接触による病原因子の遊離という現象は最近になってサルモネラ菌およびエルシニア菌でも類似した現象が報告されている(23)。サルモネラ菌では、赤痢菌のIpaB, IpaC, IpaD蛋白質とアミノ酸配列の相同性が高い

分泌性蛋白質であるSipB, SipC, SipD蛋白質が報告され(42, 43)、このSip蛋白質はInvおよびSpa蛋白質群(タイプIII蛋白質分泌系)依存性に分泌される(42, 43)。Sip蛋白質はサルモネラ菌の細胞侵入に必須であるが、その果たす役割は明確にされていない。サルモネラ菌のSip蛋白質分泌に必要なInvB, InvC, InvI, InvJ, SpaO, SpaP, SpaQ, SpaR, SpaSは赤痢菌のIpa蛋白質分泌に関与するSpa47, Spa13, Spa32, Spa33, Spa24, Spa9, Spa29, Spa40とアミノ酸配列に相同性がある(32)。そのなかのInvJ蛋白質はそれ自身に分泌能があり、さらにInvJ蛋白質はサルモネラ菌と上皮細胞との接触により外液中に分泌される(19)。サルモネラ菌のInvJ蛋白質と赤痢菌のSpa32蛋白質はアミノ酸配列に相同性があると報告されているが(19)、赤痢菌のSpa32蛋白質にはそれ自身に分泌能はなく、本研究で得られた結果とサルモネラ菌において報告された結果は異なっていた。実際にSpa32蛋白とInvJ蛋白質のアミノ酸配列の相同性は18%と低く、このため機能が異なっている可能性が考えられた。また、エルシニア菌の分泌性蛋白質であるYopE蛋白質についてもエルシニア菌と上皮細胞との接触によって外液中に分泌が促進されると報告されており(80)、これらの接触性蛋白質分泌機構は細胞侵入性細菌にみられる共通した現象である可能性が考えられた。実際に、Ipa蛋白質の分泌に関与するSpa47, Spa13, Spa32, Spa33, Spa24, Spa9, Spa29, Spa40はエルシニア菌のYop蛋白質を分泌するのに関与するYscN, YscO, YscP, YscQ, YscR, YscS, YscT, YscUとそれぞれアミノ酸配列に相同性があることが知られている(5, 12)。しかしながら、本章において解析したSpa32蛋白質とYopP蛋白質との相同性はわずかに16%であり、Spa, Yop蛋白質間における相同性のなかで最も低い数値である。以上の結果から、赤痢菌の細胞侵入機構はまだ不明な点が多く残されており、分子遺伝学的手法を用いた実験結果を基礎にして、遊離型Ipa蛋白質の上皮細胞側レセプターの同定等の分子細胞生物学的研究を進めていく必要性が示唆された。

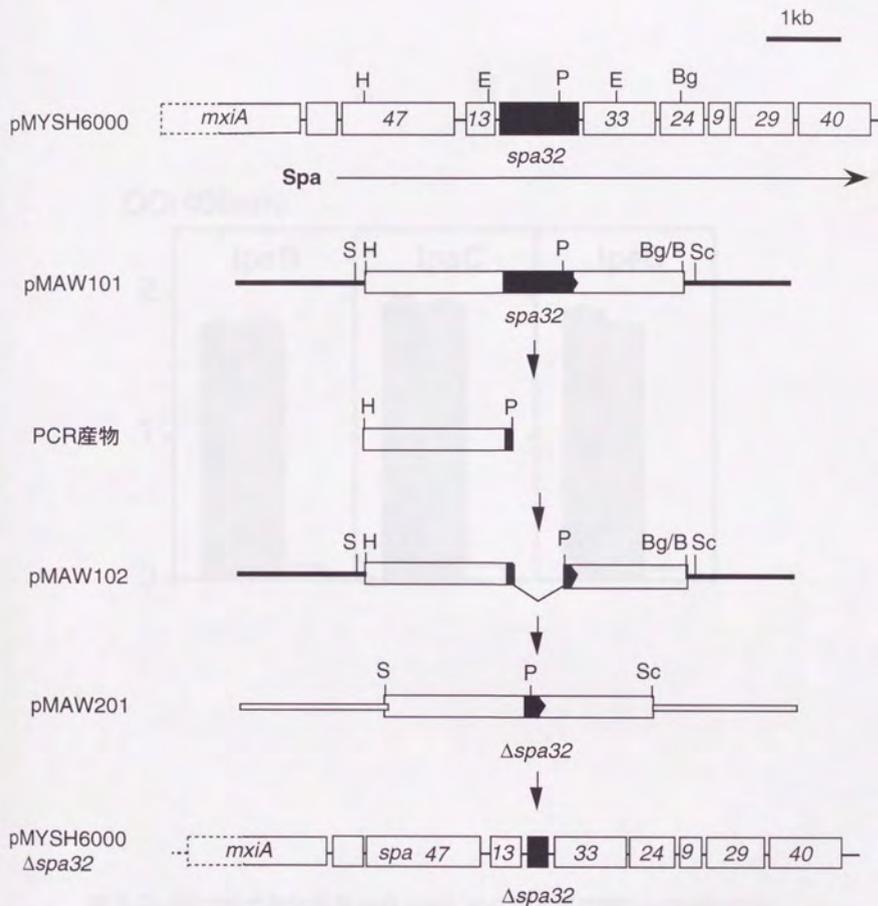


図1-1. 大プラスミドpMYSH6000上のspaオペロンとspa32遺伝子の欠失法。
 spaオペロンの遺伝子配列と主な制限酵素部位を示した(86, 99)。spa32遺伝子の
 欠失法は材料と方法の項参照。B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I;
 Sc, *Sac*Iをそれぞれ示す。

OD(405nm)

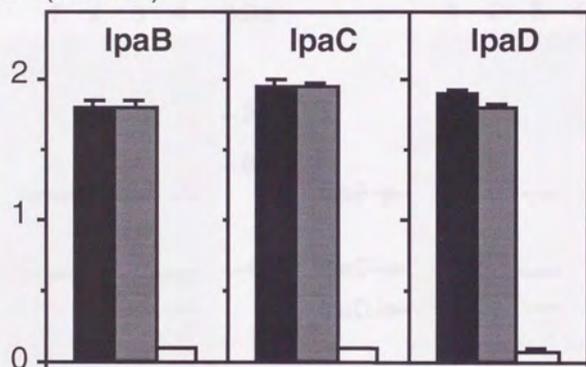


図 1-2. CS2585の菌体表層IpaB, IpaC, IpaD蛋白質の検出とYSH6000T, S325との比較。YSH6000T(野生株; 黒), CS2585(*spa32*欠失株; 網がけ), S325(*mxIA*変異株; 白)のIpa蛋白質のレベルをELISA法を用いて検出した。また、トッパーは3回行った実験のSDを示した。



図 1-3. *spa32* 遺伝子の欠失による lpaB, lpaC, lpaD 蛋白質分泌への影響。全菌体(A)と培養上清(B)のイムノプロット法による解析。レーン1, YSH6000T(野生株); 2, CS2585(*spa32*-); 3, CS2586(*spa32*+); 4, S325(*mxiA*-)をそれぞれ示した。

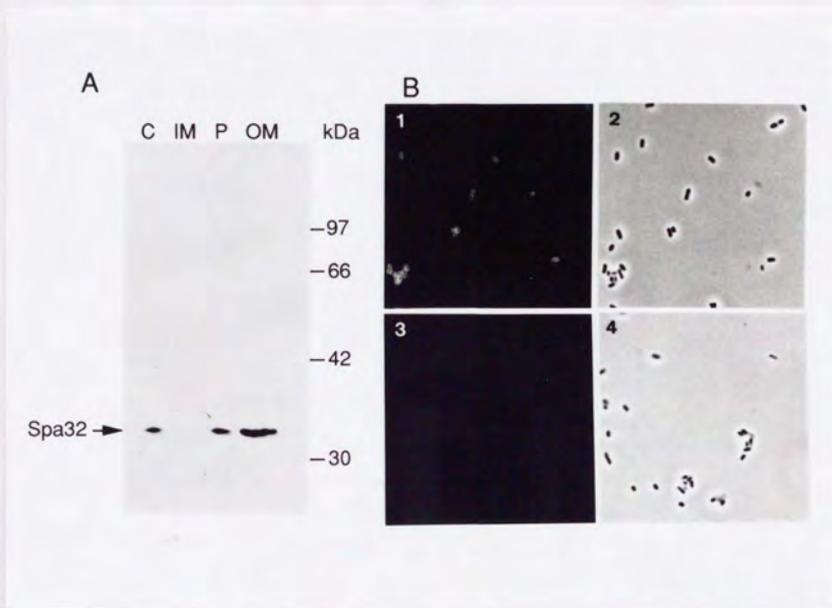


図1-4. Spa32蛋白質の菌体局在性。

(A)YSH6000Tの各分画を抗Spa32蛋白質抗体を用いてイムノブロット法で解析した。レーンC, 細胞質分画; IM, 内膜分画; P, ペリプラスム分画; OM, 外膜分画をそれぞれ示した。(B)抗Spa32蛋白質抗体を用いた菌体表面の蛍光標識。パネル1と3, 蛍光顕微鏡像、2と4, 位相差顕微鏡像をそれぞれ示した。パネル1と2, YSH6000T; 2と4はCS2585を示し、それぞれ同一視野を観察した。

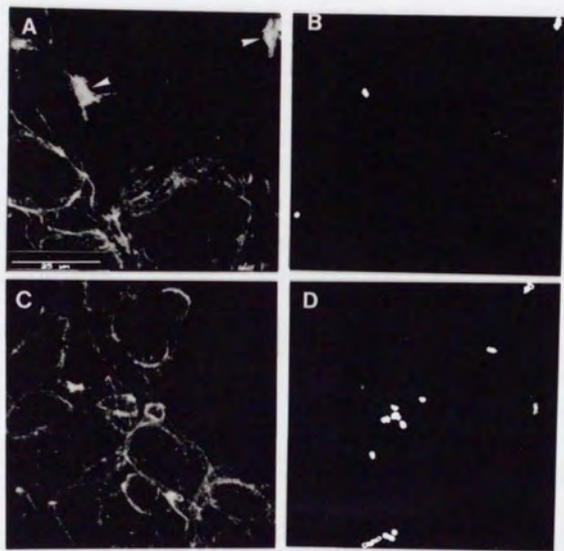


図 1-5. 赤痢菌と上皮細胞の接触部位に見られるF-アクチンの凝集。
 F-アクチンをローダミン標識ファロイジン(パネルAとC)、赤痢菌をFITC
 標識抗B群赤痢菌LPS抗体(パネルBとD)で蛍光染色し、共焦点レーザー顕
 微鏡を用いて解析した。パネルAとB, YSH6000T; CとD, CS2585をそれぞ
 れ示した。パネルAの矢印はF-アクチンの凝集部位を示した。

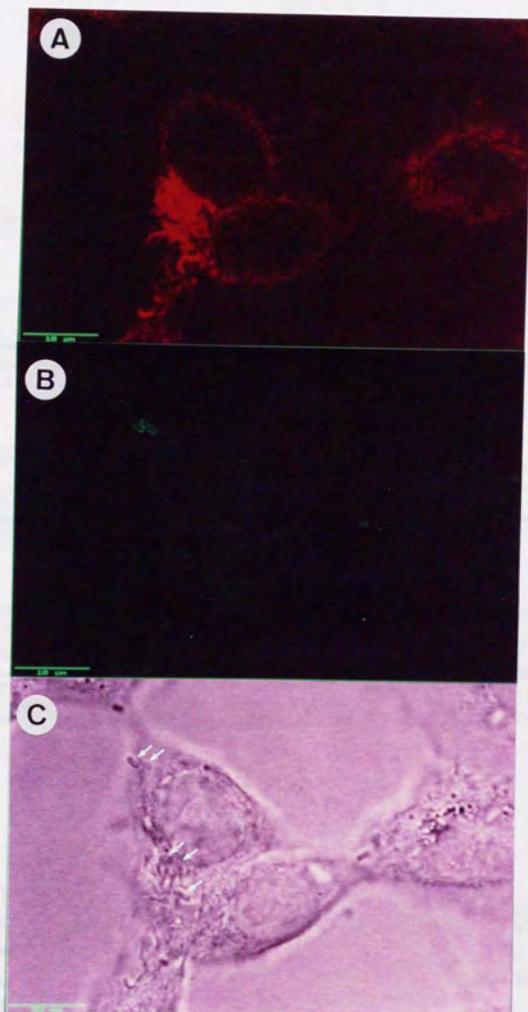


図 1-6. F-アクチンの凝集部位における菌体表層IpaC蛋白質の消失。
 ローダミン標識ファロイジン(A)、FITC標識抗IpaC蛋白質抗体(B)、同一
 視野の位相差顕微鏡像(C)。矢印はYSH6000Tの位置を示した。

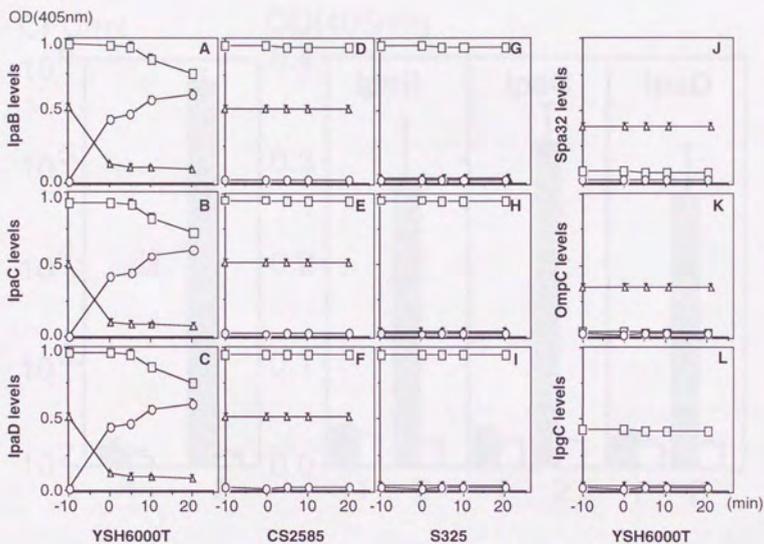


図1-7. 上皮細胞との接触によるIpa蛋白質の遊離。

縦軸はELISA reader model 450 (Bio-Rad)による測定値(OD405nm)、横軸は遠心後の時間(min)をそれぞれ示した。パネルA, B, C, J, K, LはYSH6000T、D, E, FはCS2585、G, H, IはS325を示し、シンボルは△, 菌体表層; □, 細胞質; ○, 上清をそれぞれ示した。

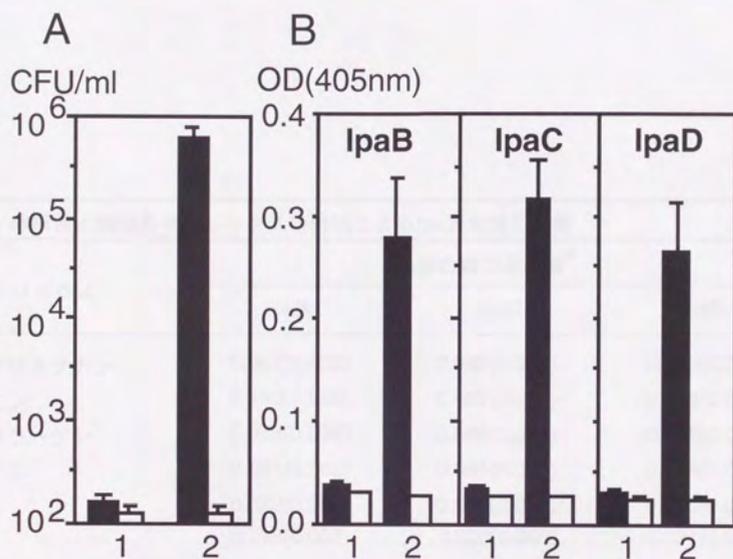


図1-8. 赤痢菌の極性化Caco-2細胞への細胞侵入とIpa蛋白質の遊離。
 (A)YSH6000T(黒)とCS2585(白)の細胞侵入。(B)YSH6000T(黒)とCS2585
 (白)のIpa蛋白質の遊離。レーン1はCaco-2細胞の頂端側、2は側底面側から
 それぞれ感染させたものを示した。データは3回行った実験の平均値で
 あり、トッパーはSDを示す。

表1-1. 赤痢菌と細胞外マトリックスの接触によるlpa蛋白質の遊離

マトリックス	lpa蛋白質の遊離量 ^a		
	lpaB	lpaC	lpaD
フィブリネクチン	0.357(0.032)	0.368(0.029)	0.329(0.031)
ラミニン	0.450(0.026)	0.467(0.025)	0.418(0.022)
IV型コラーゲン	0.582(0.036)	0.588(0.029)	0.521(0.024)
ゼラチン	0.021(0.006)	0.024(0.005)	0.019(0.002)
BSA	0.022(0.004)	0.021(0.005)	0.020(0.003)
PBS	0.018(0.007)	0.020(0.006)	0.021(0.005)

^a遊離したlpaB, lpaC, lpaD蛋白質をそれぞれの抗体を用いてELISA法によって定量した。括弧内の数値は3回行った実験のSDを示した。

表 1-2. 遊離型Ipa蛋白質による非感染性赤痢菌変異株の細胞侵入の促進

菌株	抗Ipa蛋白質抗体未処理 (%) ^a			抗Ipa蛋白質抗体処理 (%) ^a		
	MEM 有MEM ^b	Ipa蛋白質含 有MEM ^b	増加率 ^c	MEM	Ipa蛋白質非 含有MEM ^d	増加率 ^c
YSH6000T (野生株)	24.3	24.0	0.99	24.3	24.4	1.00
CS2585 (spa32変異株)	0.6	14.3	21.83	0.5	0.6	1.20
S325 (mxIA::Tn5)	0.6	0.8	1.13	0.6	0.6	1.00
N1411 (ipaB::Tn5)	0.6	0.6	1.00	0.6	0.6	1.00
YSH6200 (大テラスミト欠失)	0.5	0.6	1.20	0.5	0.6	1.20

^a 感染2時間後の感染細胞数。赤痢菌が5以上感染した細胞を感染細胞とし、非感染細胞との相対値を示した。

^b 赤痢菌と上皮細胞の接触後遊離したIpa蛋白質を含むMEMを使用した。

^c 増加率(Ipa蛋白質含有MEMとMEMの比率)を示した。

^d 遊離型Ipa蛋白質含有MEMに抗Ipa蛋白質抗体を加え免疫沈降法によってIpa蛋白質を除去したMEMを使用した。

要旨

赤痢菌の細胞侵入はレセプターを介した現象であると考えられているが、Ipa蛋白質に対する上皮細胞側レセプターはまだ同定されていない。現在までに、赤痢菌は培養細胞の接着斑から侵入することが報告されている。そこで本章ではIpa蛋白質に対する上皮細胞側レセプターを検索する目的で、Chinese hamster ovary(CHO)細胞を用いて赤痢菌の細胞侵入時におけるIpa蛋白質と接着斑で機能する $\alpha_5\beta_1$ インテグリン(フィブロネクチンレセプター)の相互作用について検討し、以下の結果を得た。(i)赤痢菌の細胞侵入率はインテグリンの発現量に比例して上昇する。(ii)*in vitro*および*in vivo*において遊離したIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが結合する。(iii)Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとフィブロネクチンとの結合ではなく $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとマトリックスフィブリル様フィブロネクチン(スーパーフィブロネクチン)との結合に似ている。(iv)赤痢菌の細胞侵入に伴いfocal adhesion kinase(FAK)とパキシリンのチロシンリン酸化が促進される。(v)赤痢菌と上皮細胞の接触部位に見られるF-アクチンの重合と同時にインテグリンの凝集が起きる。(vi)赤痢菌の細胞侵入に伴って引き起こされる細胞内シグナルは低分子量GTP結合蛋白質Rhoによって制御される。これらの結果から、Ipa蛋白質とインテグリンの結合により、インテグリンを介したシグナル伝達および細胞骨格の再構成を引き起こし、これによって赤痢菌が上皮細胞に侵入するものと考えられた。

序文

赤痢菌は細胞侵入性細菌の一つで、腸管上皮細胞に接触し菌自らエンドサイトーシスを誘発し細胞内に侵入する(87)。赤痢菌はヒトおよびサルの結腸において孤立リンパ小節のM細胞に取り込まれ(73)、マクロファージに貪食されるが、ここでマクロファージにアポトーシスを誘導し(102)、腸管上皮細胞の基底膜側に離脱する。次いで腸管上皮細胞の側底面側から細胞内に侵入する。また、赤痢菌を極性化したCaco-2細胞に感染させると、Caco-2細胞の頂端側よりも側底面側の方が感染効率が高い(65, 72)。一方、赤痢菌の上皮細胞侵入に必須な3つの分泌性蛋白質IpaB, IpaC, IpaDは、赤痢菌の上皮細胞侵入部位(側底面側)において菌体表層から遊離する(第一章)。この赤痢菌と上皮細胞の接触によるIpa蛋白質の遊離は、赤痢菌の上皮細胞侵入に不可欠な現象である(第一章)。遊離したIpaB, IpaC, IpaDは複合体(57)および線維状構造物を形成し(55, 71)、このIpa蛋白質複合体がまだ同定されていない上皮細胞側レセプターに結合し、エンドサイトーシスを誘発すると考えられる。そこで、遊離したIpa蛋白質に対する上皮細胞側レセプターの検索を試みた。

赤痢菌をニワトリ胚線維芽細胞に感染させると、細胞と基質(細胞外マトリックス)の接着部位である接着斑から細胞内に侵入する(97)。接着斑は極性化した上皮細胞の頂端側ではなく側底面側に存在し、赤痢菌の感染率も側底面側の方が高い(65, 72)。さらに、赤痢菌と細胞外マトリックスが接触することによって菌体表層のIpa蛋白質が遊離する(第一章)。これらのことから、赤痢菌が細胞外マトリックスと接触することによって遊離したIpa蛋白質はその最も近傍に位置する上皮細胞側レセプター、すなわち接着斑で機能する細胞接着因子であるインテグリンに結合する可能性が考えられた。

インテグリンは α 鎖と β 鎖の2量体で構成され、細胞と細胞外マトリックスの接着因子として発見された分子群である。これまでに $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ (コラーゲン、ラミニンレセプター)、 $\alpha_3\beta_1$ (フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンレセプター)、リンパ球

系の細胞に分布する $\alpha_4\beta_1$ (フィブロネクチンレセプター)、上皮系の細胞に分布する $\alpha_5\beta_1$ (フィブロネクチンレセプター)、 $\alpha_6\beta_1$ (ラミニンレセプター)などその他多くの分子が同定されており、一つのファミリーを形成している(16, 38, 40, 63, 74, 81)。特に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが最も解析が進んでいる。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの α_5 鎖の分子量は非還元条件下で約150kDであり、還元条件下では重鎖130kDと軽鎖約30kDに解離する。 β_1 鎖はその分子内にジスルフィド結合を有し、非還元条件下で110kD、還元条件下では130kDである(28)。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはフィブロネクチンのレセプターであり、フィブロネクチンの中間に位置する細胞結合領域に存在するArg-Gly-Asp(RGD)配列を認識して結合することが知られている(74, 81)。また、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを介した蛋白質のチロシンリン酸化(16)、プロテインキナーゼCの活性化(100, 101)などシグナル伝達に関する役割も注目されている(38, 40)。

インテグリンを介したシグナル伝達は細胞接着、ストレス線維形成、細胞運動、細胞増殖など多彩な細胞現象に関与する(16, 38, 40)。最近、これらの細胞現象が*ras*類似低分子量GTP結合蛋白質であるRho蛋白質によって制御される可能性が示されている(33, 36)。さて、ストレス線維は接着斑から伸展するアクチンを主要な構成成分とする線維で、これによって細胞形態は維持される。細胞が細胞外マトリックスに接着するとき、接着斑ではインテグリンの細胞質側にピンキュリン、テーリン、パキシリンなどの蛋白質が複合体を構成し、ストレス線維はこの複合体に結合する(16)。Rho蛋白質は分子内の14番目のグリシン残基をバリン残基に変換することによって活性化し(75)、41番目のアスパラギン残基がポツリヌス菌の産生するC3酵素によってADPリボシル化されると不活性型になる特性をもっている(4)。活性型Rho蛋白質はストレス線維形成を促進し、不活性型Rho蛋白質はストレス線維の消退を引き起こすことが明らかとなり、Rho蛋白質がGTP/GDPの変換によって活性発現のオン/オフを行いながら、ストレス線維形成を調節する分子スイッチである可能性が示唆された(75-77)。一方、赤痢菌と上皮細胞の接触部位にはアクチンの

凝集が認められ、このアクチンの凝集によってエンドサイトーシスが誘導され赤痢菌は上皮細胞内に侵入するものと考えられている(17, 35, 56)。そこで、赤痢菌の細胞侵入がRho蛋白質によって制御されているか否かを明らかにする目的で、活性型あるいは不活性型Rho蛋白質が赤痢菌の細胞侵入に与える影響を検討した。

本章では赤痢菌と上皮細胞の接触により遊離したIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合、およびそれによって引き起こされるシグナル伝達と細胞骨格の再構成について解析し、遊離Ipa蛋白質が赤痢菌の細胞侵入にいかなる役割を果たしているかを明らかにすることを企図した。

材料と方法

菌株と細胞培養

B群赤痢菌野生株としてYSH6000T株(83)を用い、その非病原性対照株として *spa32*遺伝子のインフレーム欠失株であるCS2585株(第一章)を使用した。大腸菌 (*Escherichia coli*) K-12 HB101にpINV[仮性結核菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)の *inv*遺伝子のクローン]を導入した株はT. F. Meyer博士(マックス・プランク研究所)から、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*) SB300はJ. E. Galan博士(ニューヨーク州立大学)からそれぞれ分与された。チャイニーズハムスター卵巣上皮細胞由来 Chinese hamster ovary(CHO)細胞、サル腎臓上皮細胞由来MK2細胞、ヒト大腸上皮細胞由来Caco-2細胞、ヒト子宮上皮細胞由来HeLa細胞はそれぞれ10%FCSを含むMEM、マウス線維芽細胞Swiss3T3細胞は10%FCSを含むダルベッコの改良型MEM(DMEM)を用いて培養した。

$\alpha_5\beta_1$ インテグリンcDNAのCHO細胞への導入

XbaI-SaII3.8-kbヒト α_5 インテグリンサブユニットcDNA(28)とXbaI-SaII3.6-kbヒト

β_1 インテグリンサブユニットcDNA(ラ・ホヤ癌研究所、E. Ruoslahti博士より分与された)(28)をpcDNA1neo(Invitrogen)のXbaI-SalI部位にクローニングした。2つのプラスミドを同時にCHO細胞にGene Pulser(Bio-Rad)を用いてエレクトロポレーション法で導入し、ゲネティシン(G418)耐性の細胞を選択した。2つの導入細胞株CHO-HFR4とCHO-HFR5の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量は抗 α_5 インテグリンサブユニットモノクローナル抗体KH/33および抗 β_1 インテグリンサブユニットモノクローナル抗体SG/19を用いてELISA法で定量した(89)。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとフィブロネクチン(Fn)の結合能はFITC標識抗フィブロネクチン抗体を用いて免疫蛍光染色し、Fnのフィブリル形成能で確認した(28)。

$\alpha_5\beta_1$ インテグリンの精製

$\alpha_5\beta_1$ インテグリンの精製は以下の方法で行った(39)。ヒト $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを導入したCHO細胞株CHO-HFR5を100ml MEMで80%コンフルントに調整し、1mM EDTAを含むPBS20mlで20分間室温で保温した。インテグリンと細胞外マトリックスの結合は2価陽イオンに依存しており、EDTAのキレート作用で2価陽イオンはキレートされインテグリンと細胞外マトリックスの結合は阻害される(81)。このEDTAの作用によって剥離したCHO-HFR5細胞の懸濁液に50mM $MgCl_2$ 溶液2mlを加え、EDTAのキレート作用を飽和し停止させた。その後、細胞を遠心(500xg, 10分間)し、PBSに懸濁した。この操作を2回繰り返して細胞を洗浄した。細胞の沈渣を25mM トリス塩酸(pH6.9)、150mM NaCl、1mM $MnCl_2$ を含む緩衝液(Tris-buffered saline-Mn; TBS-Mn)1mlに懸濁した。この細胞懸濁液をドライアイスを含むメタノール溶液で急速冷凍し-120℃で保存した。冷凍保存細胞液を氷中で融解し、500xgで10分間遠心した。この細胞沈渣に200mM n-オクチールグルコシドを含むTBS-Mn1mlを加え、氷中で20分間保温した。その後、超遠心(175000xg, 4℃, 10分間)することによってn-オクチールグルコシド可溶性画分(上清)と不可溶性画

分(沈渣)に分離した。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは可溶性画分(上清)に存在するため、超遠心後の上清をフィブロネクチンをリガンドとして固定化したセファロースカラムに添加した。50mM n-オクチールグルコシドを含むTBS-Mnでカラムを洗浄し、フィブロネクチンと結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを10mM EDTAを含むTBSで溶出し、SDS-PAGEにより $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの純度を確認した。

遊離型Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合

ELISA法

BHI培地で37°C振盪培養し、対数増殖期まで増殖した菌を遠心(2700xg, 10分間)し、最終的に 10^8 個/100 μ lになるようにMEMに懸濁した。一方、遊離Ipa蛋白質は、MEMで37°C振盪培養し、対数増殖期まで増殖した菌5mlを遠心し、得られた上清を0.45 μ mのフィルターを使用し菌体をろ過し除いて調製した。菌を懸濁したMEMあるいは遊離Ipa蛋白質を含むMEM50 μ lをそれぞれ96穴マイクロタイタープレートに2時間室温でコーティングした。PBS-Tween20で2回洗浄した後、精製した $\alpha_5\beta_1$ インテグリン(10 μ g/ml)を加え1時間37°Cで保温した。結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの量は抗 α_5 (mAb KH/33) β_1 (mAb SG/19)インテグリンモノクローナル抗体を用いてELISA法で定量した(第一章材料と方法の項参照)。

免疫沈降法

上記の方法と同様に調製した遊離Ipa蛋白質を含む1ml MEMに $\alpha_5\beta_1$ インテグリン(20 μ g/ml)を加え20分間37°Cで保温した。それぞれ抗IpaB, IpaC, IpaD, $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体を加えて18時間4°Cで保温した後、プロテインA-セファロースビーズを加えさらに1時間室温で保温した。免疫沈降したビーズをPBSで3回洗浄し、SDSサンプル溶液を入れて5分間100°Cで加熱した。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはSDSサンプル溶液に2-メルカプトエタノールを含まない非還元状態7%SDS-PAGE、Ipa蛋白質はSDS

サンプル溶液に2-メルカプトエタノールを含む還元状態10%SDS-PAGEで分離した。

免疫蛍光染色法

上記の方法と同様に調製した遊離Ipa蛋白質を含む2ml MEMにCHO-HFR5細胞($\sim 2 \times 10^6$ 細胞/ml)を懸濁して24時間37°Cで培養した。一次抗体として抗IpaCウサギ血清あるいは抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンマウスモノクローナル抗体、二次抗体としてローダミン標識抗ウサギIgGあるいはFITC標識抗マウスIgGを用いて免疫蛍光染色した。

スーパーフィブロネクチン(S-Fn)の作成

S-Fnの作成は以下の方法で行った(64)。FnとIII₁-C(Fn分子のIII型繰り返しドメインの1番目)(64)あるいは陰性対照として用いたIII₁₁(III型繰り返しドメインの11番目)(64)のN末端に6個のヒスチジンを融合させ(ラ・ホヤ癌研究所、E. Ruoslahti博士より分与された)、その融合蛋白質をQIA express system(Qiagen)を用いて精製した。それぞれの濃度のFnとIII₁-Cを混合し24時間37°Cで保温した。

インテグリン-マトリックス複合体による赤痢菌細胞侵入の阻害

3mM MnCl₂を含むTris-saline(pH7.5)緩衝液中(28)に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと等量のArg-Gly-Asp-Ser(RGDS)ペプチド、Fn、S-Fn、FnとIII₁₁(陰性対照)を加え3時間4°Cで保温した。このインテグリン-マトリックス複合体を含むMEMを用いて、第一章材料と方法の項で述べた方法と同様にして感染試験を行った。

蛋白質のチロシンリン酸化の解析

CHO細胞を6穴プレートに80%コンフルントになるように培養しYSH6000TあるいはCS2585を感染させた。感染は700xg、10分間室温で遠心することによって行

い、遠心後10-30分間37°Cで保温した。細胞をハンス液(Hanks balanced saline solution; HBSS)で洗浄し0.5ml 融解溶液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 100 μ M Na_2VO_4 , 1 mM PMSF)を加えた。この細胞融解溶液に抗focal adhesion kinase(FAK)モノクローナル抗体(2A7)、抗パキシリンモノクローナル抗体(349)を加え免疫沈降法を行い、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体(PT-66)を用いてイムノブロット法により解析した。

CHO細胞のボツリヌスC3酵素処理

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)が産生するC3酵素(大阪府立大学、小崎俊二博士より分与された)を含むMEMを用いて、それぞれCHO細胞(C3酵素濃度; 2 μ g/ml), MK2細胞(4 μ g/ml), Caco-2細胞(4 μ g/ml), HeLa細胞(5 μ g/ml), Swiss 3T3細胞(2 μ g/ml)を37°Cで24時間培養した(44)。その後、これらの細胞に赤痢菌を感染させた(第一章材料と方法の項参照)。

マイクロインジェクション

グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合活性型(Val14)RhoA蛋白質(ロンドン大学、A. Hall博士より分与された)(75)100 μ g/mlとマウスIgG(500 μ g/ml)を血清飢餓状態にした500個のCHO細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、37°Cで30分間保温した。これらの細胞に1細胞あたり100に調製したYSH6000Tを700xg, 10分間遠心することにより接着させ、その後37°Cで15分間保温することによって感染させた。感染細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、YSH6000Tを抗赤痢菌LPSウサギ抗体およびFITC標識抗ウサギIgG、マイクロインジェクションした細胞をローダミン標識抗マウスIgGを用いてそれぞれ免疫蛍光染色し、感染細胞数および感染菌数を蛍光顕微鏡を用いて数えることによって1細胞あたりの感染菌数を算

出した。

結果

1) $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量の細胞侵入への影響

赤痢菌の細胞侵入と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの関係を検討する目的で、発現量の異なる2つのヒト $\alpha_5\beta_1$ インテグリンcDNA導入CHO細胞、CHO-HFR4とCHO-HFR5を作成した(材料と方法の項参照)。ヒト $\alpha_5\beta_1$ インテグリンcDNA(28)を導入しゲネティシン耐性となったCHO細胞をそれぞれ96穴マイクロタイタープレートに培養し、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量を $\alpha_5\beta_1$ インテグリンモノクローナル抗体を用いてELISA法で定量した。このうち $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量が親細胞株であるCHO細胞に比べて3.1および7.4倍高かった細胞をCHO-HFR4およびCHO-HFR5とそれぞれ命名した。次に、CHO-HFR4とCHO-HFR5細胞をフィブロネクチン(Fn)をコーティングしたカバーガラス上に培養し、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとFnの結合能をFITC標識抗Fn抗体を用いて免疫蛍光染色法で調べた。各CHO細胞から発現しているFnの量は、ELISA法で定量した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量とほぼ一致した蛍光染色量を示し、このことから発現している $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはFnとの結合においても正常に機能していることが確認された。

図II-1に示すように、CHO、CHO-HFR4およびCHO-HFR5細胞に、BHI培地で37°C振盪培養し、対数増殖期まで培養した赤痢菌野生株YSH6000Tを感染させたところ、CHO細胞に比べてCHO-HFR4およびCHO-HFR5細胞に対して各々7.6倍および15.4倍高い感染率(細胞内へ侵入した菌の割合)を示した。一方、同様にして赤痢菌*spa32*欠失株CS2585を感染させたところ、細胞間による感染率の差は認められず、常に低い感染率であった(YSH6000Tの1%以下)。すでに $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合することが報告されている仮性結核菌のインベーシン(*invasin*)(41)をコードした

プラスミドpINVを導入した大腸菌K-12 (HB101株/pINV)を陽性対照として同様の方法でCHO、CHO-HFR4およびCHO-HFR5細胞に感染させたところ、CHO細胞に比べてCHO-HFR4およびCHO-HFR5細胞ではそれぞれ7.0倍および15.5倍高い感染率を示した(図II-1)。これらの結果から、赤痢菌の細胞侵入と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量との間には相関性があることが示唆された。

2) Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合性

IpaB, IpaC, IpaD蛋白質は赤痢菌と上皮細胞との接触によって菌体表層から培養液(MEM)中に遊離する(第一章)。さらに遊離したIpa蛋白質は複合体を形成する(57)。このIpa蛋白質の遊離は赤痢菌の細胞侵入に必須な現象であり、遊離したIpa蛋白質が上皮細胞側のレセプターに結合するものと考えられる(第一章)。一方1)の結果から、赤痢菌の細胞侵入に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが関与していることが示唆された。そこで、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが結合するか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。最初に、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合を検討する目的で、MEM中に遊離したIpaB, IpaC, IpaD蛋白質をマイクロタイタープレートにコーティングし、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え37°Cで1時間保温した。その後、抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体を用いて $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合量をELISA法で定量した。図II-2Aに示すように、遊離Ipa蛋白質を含むMEMをコーティングしたウェルには有意な量の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合が検出された(レーン1)。一方、抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いた免疫沈降法によって遊離Ipa蛋白質を除去したMEM(レーン2)あるいはIpa蛋白質を遊離することができない変異株(CS2585)の培養上清液(MEM)をコーティングしたウェル(レーン3)には、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合量は著しく低く、遊離Ipa蛋白質を含むMEMをコーティングしたウェルに比べ約10分の1に低下した。次に、菌体表層のIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合を検討する目的で、BHI培地で37°C振盪培養し、対数増殖期まで培養したYSH6000T、HB101株/pINV(陽性対照)およびBSA(陰

性対照)をマイクロタイタープレートにコーティングした。以上の条件下で YSH6000TあるいはHB101/pINVを培養したとき、Ipa蛋白質は菌体表層に分泌発現し(86)、インペシンは外膜に発現する(39)。その後、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え37℃で1時間保温した。図II-2Aに示すように、YSH6000T(レーン4)およびBSA(レーン6)をコーティングしたウェルには、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は著しく低く、陽性対照であるHB101/pINV(レーン5)に比べ約10分の1以下であった。これらの結果から、外液中に遊離したIpa蛋白質は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合できるが、菌体表層に存在するIpa蛋白質は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合できない可能性が示唆された。

さらに遊離したIpaB, IpaC, IpaD蛋白質の何れが $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合するか検討する目的で、遊離したIpa蛋白質を含むMEMに $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え、37℃で20分間保温した後、抗IpaB, IpaC, IpaD, $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体をそれぞれ加え免疫沈降を行った。図II-2Bに示すように、それぞれ抗 α_5 および β_1 インテグリンサブユニット, IpaB, IpaC, IpaD抗体で免疫沈降を行い、抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いてイムノプロットを行ったところ、どの抗体で免疫沈降を行ってもほぼ同量のIpaB, IpaC, IpaD蛋白質が検出された。同様にして、抗 α_5 および β_1 インテグリンサブユニット抗体を用いてイムノプロットを行ったところ、どの抗体で免疫沈降を行ってもほぼ同量の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが検出された(図II-2C)。これらの結果から、Ipa蛋白質は複合体を形成して $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合することが示唆された。

遊離したIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合を*in vivo*条件下で検討する目的で、遊離したIpa蛋白質を含むMEMを用いてCHO-HFR5細胞を37℃で24時間培養し、FITC標識抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンモノクローナル抗体あるいはローダミン標識抗IpaC抗体で免疫蛍光染色を行った。図II-2Dに示すように、免疫蛍光染色したCHO-HFR5細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析したところ、CHO-HFR5細胞の接着斑部分に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが染色され(パネル2)、ほぼ同じと思われる部位にIpaC蛋白質

が染色された(パネル1)。これら2つの像を重ねさせたところ、位置が同一の部分は赤と緑が重なり黄色となり、IpaCと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの染色位置はほぼ同一であることが示された(パネル3)。さらに同様の結果がIpaBおよびIpaD蛋白質についても認められた。以上の結果から、遊離したIpa蛋白質は*in vivo*条件下においても $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合することが示唆された。

3) $\alpha_5\beta_1$ インテグリン添加による赤痢菌細胞侵入の阻害

遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合が実際に赤痢菌の細胞侵入に関与しているか否かを明らかにする目的で、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを含んだMEMを用いて感染実験を行い、YSH6000TのCHO-HFR5細胞への侵入に与える影響を検討した。図II-3Aに示すように、MEM中に加えた $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの量が増加するにしたがって、YSH6000Tの細胞侵入率は減少し、インテグリンの濃度が20 $\mu\text{g/ml}$ のときYSH6000Tの細胞侵入率は64%阻害された。この結果から、赤痢菌と上皮細胞の接触によって遊離したIpa蛋白質は添加された $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合し、これによって遊離Ipa蛋白質とCHO-HFR5細胞上に発現する $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとの結合が阻害され赤痢菌の細胞侵入が阻害されたと考えられた。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはフィブロネクチン(Fn)レセプターであり、Fn分子内のArg-Gly-Asp-Ser(RGDS)配列を認識して結合することが知られている(74)。そこで、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合部位がFnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合部位と同一であるか否かを検討する目的で、FnもしくはRGDSペプチドと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを混合しMEM中に加えたときのYSH6000Tの細胞侵入に対する影響を調べた。FnもしくはRGDSペプチドと結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを添加したMEMを用いて感染実験を行ったところ、YSH6000TのCHO-HFR5細胞への侵入は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを添加した場合と同様に阻害された(図II-3A)。この結果から、遊離Ipa蛋白質はFnもしくはRGDSペプチドと結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリン

にも結合することが予想され、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式はFnもしくはRGDSペプチドと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式とは異なる可能性が示唆された。最近になって、組織中に存在するFnはFn同士がジスルフィド結合し高分子量となり、フィブリル様構造を形成することが報告され、それがスーパーフィブロネクチン(S-Fn)と命名された(64)。この報告の中でS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式はFnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式とは異なることが示された。S-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合力はFnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合力に比べ強く、またS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は2価陽イオン非依存性の結合であった(64)。そこで、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合部位がS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合部位と同一であるか否かを検討する目的で、S-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを混合しMEM中に加えたときのYSH6000Tの細胞侵入に対する影響を調べた。S-Fnと結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを添加したMEMを用いて感染実験を行ったところ、YSH6000TのCHO-HFR5細胞への侵入率は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを添加しない場合と同程度であり(図II-3A)、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン添加による赤痢菌細胞侵入阻害効果が失われた。この結果から、遊離Ipa蛋白質はS-Fnと結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンには結合しないことが予想され、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式はS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式と類似している可能性が示唆された。

実際にS-Fnが遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合を阻害するか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。遊離Ipa蛋白質を含むMEM中にS-FnあるいはFnを結合させた $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え37°Cで20分間保温した後、抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体で免疫沈降し、抗IpaB、IpaC、IpaD抗体を用いてイムノプロットした。図II-3Bに示すように、遊離IpaB、IpaC、IpaDと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合はFnが結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンでは阻害されなかったが(レーン2)、S-Fnが結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンでは阻害された(レーン3)。一方、Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は2価陽イオン

に依存しているためEDTA(10 mM)によって阻害されるが、S-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は阻害されない(64)。そこで、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合が2価陽イオンに依存しているか否かを明らかにする目的で、遊離Ipa蛋白質を含むMEM中に10mM EDTAと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え37°Cで20分間保温した後、抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体で免疫沈降し、抗IpaB, IpaC, IpaD抗体を用いてイムノブロットした。図II-3Bレーン5に示すように、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合に10 mM EDTAの影響は全く認められなかった。この結果により、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合はS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合と機能的に類似していることが示唆された。

4)赤痢菌細胞侵入に伴うFAKとパキシリンのチロシンリン酸化

インテグリンと細胞外マトリックスの結合によって起きる細胞質内蛋白質のチロシンリン酸化はインテグリンを介したシグナル伝達の初期に起きる現象の一つで、細胞骨格系蛋白質であるパキシリン、テンシンあるいは接着斑に局在するfocal adhesion kinase(FAK)のチロシンリン酸化が知られている(16)。そこで、赤痢菌の感染に伴って上皮細胞蛋白質のチロシンリン酸化が促進されるか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。YSH6000TおよびCS2585をBHI培地で37°Cにて対数増殖期まで増殖し、その各々の菌をCHO細胞に感染させ、感染後10、20、30分間37°Cにて保温した。その後CHO細胞のチロシンリン酸化される蛋白質を抗ホスホチロシン抗体を用いてイムノブロット法で解析した。図II-4Aに示すように、YSH6000T感染CHO細胞の全蛋白質をSDS-PAGEで分離し、抗ホスホチロシン抗体を用いてイムノブロットしたところ、感染後20、30分で少なくとも分子量125000(125kD)と70000(70kD)の2つの蛋白質のチロシンリン酸化の促進が検出された。一方、同様にしてCS2585感染CHO細胞の全蛋白質をイムノブロットしたところ、これら2つの蛋白質のチロシンリン酸化は認められず、非感染CHO細胞のチロ

シンリン酸化とほぼ同じであった。この結果から、YSH6000T感染CHO細胞において認められた125kDと70kDの2つの蛋白質のチロシンリン酸化はYSH6000Tの感染によって起きた現象である可能性が示唆された。次に、この2つの蛋白質がインテグリンを介したシグナル伝達に重要な役割を果たしているFAK(125kD)とパキシリン(70kD)であるか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。YSH6000TあるいはCS2585を上述と同様にして培養し、その各々の菌をCHO細胞に感染させ、感染後10、20、30分間保温した。感染CHO細胞の全蛋白質融解溶液に抗FAK抗体あるいは抗パキシリン抗体を加え免疫沈降法を行い、抗ホスホチロシン抗体でイムノブロットした。YSH6000Tを感染させたCHO細胞では感染後20、30分後においてFAK(パネルB)とパキシリン(パネルC)のチロシンリン酸化の促進が認められた。一方、CS2585を感染させたCHO細胞ではFAK(パネルB)とパキシリン(パネルC)のチロシンリン酸化は全く認められなかった。この結果と一致するように、CHO細胞をチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステイン(125 μ M)で処理したところ、FAKとパキシリンのチロシンリン酸化は阻害された。実際にゲニステイン(125 μ M)で処理したCHO細胞にYSH6000Tを感染させたところ、感染率がゲニステイン未処理細胞に比べ7.9%まで低下した。これらの結果から、赤痢菌の細胞侵入にFAKとパキシリンのチロシンリン酸化が関与することが示唆された。

5)細胞侵入部位における $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの凝集

インテグリンと細胞外マトリックスの結合によって起きるFAKとパキシリンのチロシンリン酸化は接着斑の形成およびインテグリンの凝集を促進する(36, 38)。そこで、赤痢菌のCHO細胞への感染によってインテグリンの凝集が引き起こされるか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。YSH6000TをBHI培地で37℃にて対数増殖期まで増殖し、その菌をCHO-HFR5細胞に感染させた後、37℃で20分間保温した。感染細胞をFITC標識抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンモノクローナル抗体(図II-5

A)、ローダミン標識ファロイジン(図II-5B)、Cy5標識抗赤痢菌2a LPS抗体(図II-5C)を用いて蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で解析を行った。赤痢菌の付着している部位に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンおよびF-アクチンの凝集が認められた。さらに $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの凝集と同時に細胞骨格系蛋白質であるピンキュリン、テーリンの凝集も認められた。一方、同様にしてCS2585を感染させたCHO-HFR5細胞では $\alpha_5\beta_1$ インテグリンおよびF-アクチンの凝集は認められなかった。以上の結果から、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって誘発されたシグナルによって細胞骨格の再構成が起きると考えられた。

6) Rhoによる赤痢菌細胞侵入の制御

インテグリンを介したシグナル伝達によって接着斑の活性化および細胞骨格系の再構成が引き起こされるが、これらは低分子量GTP結合蛋白質Rhoによって制御されている(16, 36)。そこで、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって誘発されたシグナルによって引き起こされる赤痢菌の細胞侵入がRho蛋白質によって制御されているか否かを明らかにする目的で、Rho蛋白質を不活化あるいは活性化することによって赤痢菌細胞侵入に与える影響を検討した。Rho蛋白質はボツリヌス菌が産生するC3酵素によって分子内の41番目のアスパラギン残基がADPリボシル化され、それによって不活化される(4, 33)。そこで、Rho蛋白質を不活化することによる赤痢菌細胞侵入への影響を調べる目的で、CHO細胞をC3酵素で処理し、赤痢菌の感染効率を検討した。CHO細胞をC3酵素で24時間、37℃で処理し、このCHO細胞にBHI培地で対数増殖期まで増殖させた赤痢菌YSH6000Tとネズミチフス菌SB300(陽性対照株)を1細胞あたり100になるように感染させた。最近になって、ネズミチフス菌はRho蛋白質の活性と関係なく細胞侵入することが報告された(40)。図II-6Aに示すように、CHO細胞に処理したC3酵素の濃度が上昇するにしたがって赤痢菌の細胞侵入は阻害され、2 $\mu\text{g/ml}$ で8%まで減少した。一方、ネズミチフス菌

SB300はCHO細胞に処理したC3酵素の濃度と関係なく一定の感染率を示した(図 II-6A)(40)。この結果から、赤痢菌の細胞侵入がCHO細胞をC3酵素で処理することによって阻害されることが示唆されたが、この現象が他の培養細胞においても同じであるか否かを調べる目的で、CHO細胞の他にMK2, Caco-2, HeLa, Swiss3T3細胞をそれぞれ用いてC3酵素で処理し、赤痢菌の感染効率を検討した。それぞれの細胞をC3酵素で24時間、37°Cで処理し、この細胞にBHI培地で対数増殖期まで増殖させた赤痢菌YSH6000Tとネズミチフス菌SB300を1細胞あたり100になるように感染させた。図 II-6Bに示すように、それぞれの細胞に処理したC3酵素の濃度が上昇するにしたがって赤痢菌の細胞侵入は阻害され、CHO細胞(C3酵素濃度; 2 µg/ml), MK2細胞(4 µg/ml), Caco-2細胞(4 µg/ml), HeLa細胞(5 µg/ml), Swiss 3T3細胞(2 µg/ml)でそれぞれ10%以下まで減少した。一方、ネズミチフス菌SB300はCHO細胞と同様に他の細胞でもC3酵素の濃度と関係なく一定の感染率を示した(図 II-6B)(40)。

以上の結果から、Rho蛋白質を不活化することによって赤痢菌の細胞侵入が阻害されることが示唆された。さらに赤痢菌細胞侵入に対するRho蛋白質の関係を確認する目的で、以下の実験を行った。Rho蛋白質の分子内の14番目のアミノ酸であるグリシン残基をバリン残基に変換したRho蛋白質は常に活性を持つ活性型(Val14)Rho蛋白質になり、これを細胞質内にマイクロインジェクションするとアクチンのストレス線維形成と蛋白質のチロシンリン酸化が促進される(75)。そこで血清飢餓状態CHO細胞の細胞質内に活性型(Val14)Rho蛋白質(100µg/ml)とマウスIgG(500µg/ml)をマイクロインジェクションし、37°Cで30分間保温した後YSH6000Tを感染させた。感染細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、YSH6000Tを抗赤痢菌LPSウサギ抗体およびFITC標識抗ウサギIgG、マイクロインジェクションした細胞をローダミン標識抗マウスIgGを用いてそれぞれ免疫蛍光染色し、感染細胞数および感染菌数を蛍光顕微鏡を用いて数えることによって1細胞あたりの感染菌数を算出した。その結果、赤痢菌はCHO細胞に32.1%の効率で感染する

が、活性型(Val14)Rho蛋白質をマイクロインジェクションしたCHO細胞には61.2%感染し、感染率が1.9倍上昇した。さらに感染細胞あたりの感染細菌数を数えたところ、CHO細胞は平均7.8であったが、活性型(Val14)Rho蛋白質をマイクロインジェクションしたCHO細胞では平均40.2であり、CHO細胞と比べ5倍増加した。これらの結果から、赤痢菌の細胞侵入はRho蛋白質によって制御されている可能性が示唆された。

赤痢菌と上皮細胞の接触部位に認められるF-アクチンの凝集がRho蛋白質を活性化させることによって影響を受けるか否かを明らかにする目的で、血清飢餓状態CHO細胞あるいは活性型(Val14)Rho蛋白質をマイクロインジェクションしたCHO細胞にYSH6000Tを15分間感染させ、赤痢菌をCy5標識抗赤痢菌LPS抗体、チロシンリン酸化された蛋白質をFITC標識抗ホスホチロシン抗体、F-アクチンをローダミン標識ファロイジンをそれぞれ用いて免疫蛍光染色した。図II-7A, C, Eに示すように、血清飢餓状態CHO細胞では赤痢菌と細胞の接触部位にわずかなF-アクチンおよびチロシンリン酸化された蛋白質の凝集が認められた。一方、活性型(Val14)Rho蛋白質をマイクロインジェクションしたCHO細胞では著しいF-アクチンおよびチロシンリン酸化された蛋白質の凝集が起こり、多数の赤痢菌の感染が認められた(図II-7B, D, F)。この結果から、Rho蛋白質を活性化することにより著しいF-アクチンの凝集が引き起こされ、これによって赤痢菌の感染率が増加した可能性が考えられた。

7)遊離型Ipa蛋白質による接着斑の活性化とRho不活化によるその阻害

これまでの結果から、赤痢菌の細胞侵入に伴うシグナル伝達および細胞骨格系の再構成は赤痢菌の菌体表層から遊離したIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって引き起こされる可能性が示唆された。そこで、遊離型Ipa蛋白質のみでシグナル伝達および細胞骨格系の再構成を引き起こすことができるか否かを明らかにする目的

で、以下の実験を行った。血清飢餓状態CHO細胞を遊離Ipa蛋白質を含むMEMを用いて37°Cで30あるいは60分間処理し、固定後チロシンリン酸化された蛋白質をFITC標識抗ホスホチロシン抗体、F-アクチンをローダミン標識ファロイジンを用いて免疫蛍光染色した。図II-8Aに示すように、CHO細胞のF-アクチン(パネルa-d)とチロシンリン酸化蛋白質(パネルe-h)は遊離Ipa蛋白質の処理時間の経過と共に増加した。同時に遊離Ipa蛋白質処理CHO細胞(図II-8Bパネルa, b)と同様の方法で処理したSwiss3T3細胞(図II-8Bパネルc, d)を高倍率で観察したところ、アクチンのストレス線維が多数形成され、その基部にチロシンリン酸化蛋白質の凝集が認められた。さらにこれらの現象の定量的解析を行う目的で、血清飢餓状態CHO細胞を遊離Ipa蛋白質で30あるいは60分間処理することによって凝集するF-アクチン、ピンキュリン、テーリン、パキシリン、FAK、チロシンリン酸化蛋白質をそれぞれの蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡によって得られた画像のピクセルをLaserSharp version2.0(Bio-Rad)を用いて計測した。図II-8Cに示すように、遊離Ipa蛋白質処理CHO細胞はF-アクチン、ピンキュリン、テーリン、パキシリン、FAK、チロシンリン酸化蛋白質の凝集度が血清飢餓状態CHO細胞に比べ著しく高く、また遊離Ipa蛋白質処理30分後と60分後の凝集度をそれぞれ比較すると2~2.5倍高い値を示すことが認められた(レーン1-3)。一方、この血清飢餓状態CHO細胞を遊離Ipa蛋白質で処理することによって引き起こされる細胞骨格系の再構成はCHO細胞をボツリヌス菌のC3酵素で事前に処理することによって全て阻害された(レーン4)。これらの結果から、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが結合することによって接着斑の活性化が促進され、それはRho蛋白質によって制御されることが示唆された。

考察

赤痢菌と上皮細胞の接触によりIpa蛋白質は菌体表層から遊離される(第一章)。このIpa蛋白質の遊離は赤痢菌の上皮細胞侵入に必須であり(第一章)、遊離したIpa蛋白質は複合体(57)および線維状構造物を形成する(71)。この遊離Ipa蛋白質複合体が上皮細胞に何らかの作用をし、それによって細胞骨格の再構成が引き起こされ、エンドサイトーシスが誘導されると考えられた。しかし、これらの赤痢菌の細胞内への取り込みはレセプターを介したエンドサイトーシスであると考えられているが、未だ上皮細胞側レセプターは同定されていない。そこで、本章では遊離Ipa蛋白質が赤痢菌の上皮細胞侵入にいかなる役割を果たしているかを明らかにする目的で、遊離Ipa蛋白質に対する上皮細胞側レセプターの検索を試みた。

赤痢菌は結腸において孤立リンパ小節を覆うM細胞に取り込まれ(73)、マクロファージに貪食されるが、マクロファージにアポトーシスを誘導し(102)、腸管上皮細胞の基底膜側に離脱する。次いで腸管上皮細胞の側底面側から細胞内に侵入する。赤痢菌を極性化したCaco-2細胞に感染させると、Caco-2細胞の頂端側よりも側底面側の方が感染効率が高い(65, 72)。一方、赤痢菌をニワトリ胚線維芽細胞に感染させると、細胞と細胞外マトリックスの接着部位である接着斑から細胞内に侵入する(97)。接着斑は極性化した上皮細胞の側底面側に存在し、赤痢菌の感染効率も側底面側の方が高い(65, 72)。さらに、赤痢菌と細胞外マトリックスが接触することによってIpa蛋白質は菌体表層から遊離する(第一章)。これらのことから、遊離Ipa蛋白質の上皮細胞側レセプターは接着斑で機能する細胞接着因子であるインテグリンである可能性が考えられた。そこで、遊離Ipa蛋白質に対する上皮細胞側レセプターを検索する目的で、CHO細胞を用いて赤痢菌の細胞侵入時における遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの相互作用について以下の実験を検討した。i) $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量が異なるCHO細胞における赤痢菌の細胞侵入、ii) $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに対するIpaB, IpaC, IpaD蛋白質の結合能、iii) $\alpha_5\beta_1$ インテグリン添加による赤痢菌の細

胞侵入の阻害、iv)赤痢菌の細胞侵入に伴うFAKとパキシリンのチロシンリン酸化の促進、v)赤痢菌とCHO細胞の接触部位にみられる $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの凝集、vi)赤痢菌細胞侵入のRho蛋白質による制御をそれぞれ検討した結果、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合により、インテグリンを介したシグナル伝達および細胞骨格の再構成を引き起こし、これによって赤痢菌が上皮細胞に侵入するものと考えられた。

最初に赤痢菌の細胞侵入と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの関連性を調べるために、発現量の異なる2つのヒト $\alpha_5\beta_1$ インテグリンcDNA導入CHO細胞、CHO-HFR4とCHO-HFR5を作成し、赤痢菌の細胞侵入効率と $\alpha_5\beta_1$ インテグリン発現量の相関性を検討した。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量の増加に伴い赤痢菌の細胞侵入効率の増加も認められた。一方、細胞侵入不能株CS2585(*spa32*変異株)の感染効率は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量に関係なく常に低値を示した。また、インテグリンの β_1 サブユニットに結合することがすでに報告されている仮性結核菌のインベーシン(*invasin*)をコードしている*inv*遺伝子のクローンを導入した大腸菌HB101/pINVを陽性対照として用い、その感染効率を赤痢菌の感染効率と同時に検討したところ、報告されているように $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの発現量の増加に伴い大腸菌HB101/pINVの感染効率も増加した(39)。これらの結果から、赤痢菌は仮性結核菌と同様にインテグリンをレセプターとして上皮細胞へ侵入する可能性が考えられた。

赤痢菌の細胞侵入に中心的な役割を果たすと考えられているIpaB、IpaC、IpaDは分泌性蛋白質であり、赤痢菌の細胞侵入部位において特異的に菌体表層から遊離することが示された(第一章)。この遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合の有無を明らかにする目的で、本研究では3つの異なる手法を用いて検討した。第一に遊離Ipa蛋白質あるいは菌体表在性Ipa蛋白質をマイクロタイタープレートにコーティングした後、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加えその結合量をELISA法で定量した。この方法を採用したことによって、赤痢菌の菌体表層から遊離したIpa蛋白質は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合

できるが、赤痢菌の菌体表層に存在するIpa蛋白質は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合できないことが認められた。この結果から、Ipa蛋白質の菌体表層からの遊離がIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかしながら、IpaB, IpaC, IpaD蛋白質の何れが $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合するか不明な点が残された。第二にこの疑問を解決する目的で、遊離Ipa蛋白質を含むMEM中に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え、それぞれ抗IpaB, IpaC, IpaD, $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体を用いて免疫沈降した後抗IpaB, IpaC, IpaDあるいは $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体でイムノブロットを行った。その結果、IpaB, IpaC, IpaDと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは複合体を形成して結合することが認められた。最近になってMenardらは、Ipa蛋白質は培養上清中で複合体を形成すると報告した(57)。本研究で得られた結果とMenardらの報告は一致するものであり、Ipa蛋白質が上皮細胞側レセプターと予想される $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合するためには、赤痢菌の菌体表層から遊離し複合体を形成することが必要である可能性が示唆された。しかしながら、赤痢菌の上皮細胞侵入には遊離型Ipa蛋白質と共に菌体表層のIpa蛋白質も必要であり(第一章)、赤痢菌は菌体表在型Ipa蛋白質と遊離型Ipa蛋白質の相互作用によって細胞侵入するものと考えられたが、その詳細な機序を明らかにすることはできなかった。第三に*in vivo*における遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合の有無を明らかにする目的で、遊離Ipa蛋白質を含むMEMを用いてCHO-HFR5細胞を培養し、抗IpaC抗体あるいは抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体で免疫蛍光染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。その結果、*in vivo*における遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合が認められ、赤痢菌の細胞侵入におけるIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合の重要性が示唆された。

赤痢菌の細胞侵入におけるIpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合の関与を明らかにする目的で、MEM中に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを加え、それを用いて赤痢菌の感染実験を行った。その結果、赤痢菌の細胞侵入率がMEM中に添加した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの量

が増加するにしたがって低下することが認められた。これは赤痢菌と上皮細胞が接触することによって菌体表層から遊離したIpa蛋白質が添加した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合し、CHO細胞上に発現する $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとの結合が阻害されたためであると考えられた。次に、Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式を探索する目的で、RGDSペプチド、フィブロネクチン(Fn)、スーパーフィブロネクチン(S-Fn)をそれぞれ結合させた $\alpha_5\beta_1$ インテグリンをMEM中に加え、それを用いて赤痢菌の感染実験を行った。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはFnのレセプターであり、Fn分子内に存在するRGD配列を認識して2価陽イオン依存性に結合する(74)。しかし最近になって、組織中に存在するFnはFn同士がジスルフィド結合し高分子量となり、線維状構造を形成することが報告され、それがスーパーフィブロネクチン(S-Fn)と命名された(64)。この報告の中でS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式はFnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合様式とは異なることが示された。S-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合力はFnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合力に比べ強く、またS-Fnと $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は2価陽イオン非依存性の結合であった(64)。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン添加による赤痢菌細胞侵入の阻害効果はRGDSペプチドあるいはFnによって影響を受けないが、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとS-Fnが結合することによって赤痢菌細胞侵入の阻害効果が低下することが認められた。これは赤痢菌の菌体表層から遊離したIpa蛋白質と添加した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合がS-Fnによって阻害されたためであると考えられた。実際にそれを免疫沈降法およびイムノブロット法により確認した結果、S-Fnの結合した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンには遊離Ipa蛋白質は結合できないことが認められた。さらに、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはキレート効果をもつEDTA存在下においても結合することが認められ、2価陽イオン非依存性に結合することが示唆された。また最近になって、Ipa蛋白質は培養上清中において複合体を形成し(57)、さらに線維状構造物を形成することが報告された(71)。これらのことから、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合は $\alpha_5\beta_1$ イン

テグリンとFnの結合様式ではなく、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとS-Fnの結合様式に類似している可能性が示唆された。一方、仮性結核菌のインベージンとインテグリンとの結合は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとFnの結合と同様に2価陽イオン依存性に結合し(39, 94)、また仮性結核菌のインベージンは外膜蛋白質であり、赤痢菌のIpa蛋白質の様に培養上清中に分泌することはない点において異なっていた。しかしながら、赤痢菌と仮性結核菌の間におけるこれらの相違点が各々の菌の上皮細胞侵入にどのような係わりをしているか明らかにすることはできなかった。

細胞骨格系蛋白質であるパキシリン、あるいは接着斑に局在するfocal adhesion kinase (FAK)のチロシンリン酸化はインテグリンと細胞外マトリックスの結合によって起きる細胞質内蛋白質のチロシンリン酸化の代表例として知られている(16)。このインテグリンを介したシグナル伝達が始まることによって接着斑の形成が促進されることから、インテグリンが細胞外マトリックスのレセプターであると考えられている(16, 38, 41)。本研究において、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合が認められ、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンがIpa蛋白質のレセプターである可能性が示唆された。そこで遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって細胞質内蛋白質のチロシンリン酸化が起きるか否かを明らかにする目的で、赤痢菌感染細胞の細胞質内蛋白質を抗ホスホチロシン抗体を用いてイムノプロット法で解析した。その結果、赤痢菌の感染に伴って少なくとも分子量125kDと70kDの2つの蛋白質がチロシンリン酸化されることが示された。さらにこの2つの蛋白質はインテグリンを介したシグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられているFAKとパキシリンであることがそれぞれのモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法によって示唆された。これによって、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはIpa蛋白質のレセプターの一つである可能性が考えられた。最近になってDehioらは、赤痢菌の感染に伴ってアクチン結合蛋白質であるコータクチン(cortactin)のチロシンリン酸化が促進されることを報告した(20)。コータクチンは分子量80kDであり、本研究で分子量80kDの蛋白質のチロシンリン酸化の

促進は検出できなかった。この2つの研究結果の相違は用いた菌株と細胞株の違いによるものであると考えられた。DehioらはHeLa細胞を赤痢菌の感染実験に使用しており、また赤痢菌の上皮細胞への付着性を高めるために病原性大腸菌の付着因子をコードする遺伝子を導入した赤痢菌株を用いた(20)。これによって赤痢菌の細胞侵入効率が高くなり、チロシンリン酸化蛋白質の検出が容易になったと考えられた。しかしながら、Dehioらを用いた赤痢菌株は他の細菌の付着因子を導入しているため、赤痢菌本来の細胞侵入とは異なる部位から侵入し、その結果本研究とは異なる上皮細胞内蛋白質のチロシンリン酸化が検出された可能性が考えられた。

インテグリンを介したシグナルによって起きるFAKとパキシリンのチロシンリン酸化は接着斑の形成およびインテグリンの凝集を促進する(36, 38)。そこで、赤痢菌のCHO細胞への感染によってインテグリンの凝集が引き起こされるか否かを明らかにする目的で、赤痢菌感染細胞を免疫蛍光染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、赤痢菌とCHO細胞の接触部位に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンおよびF-アクチンの凝集が認められた。この結果から、赤痢菌の菌体表層から遊離したIpa蛋白質が $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合することによってFAKとパキシリンのチロシンリン酸化が促進され、このインテグリンを介したシグナル伝達によって細胞骨格系の再構成が誘発されるものと考えられた。

インテグリンを介したシグナルによって引き起こされる接着斑の活性化および細胞骨格系の再構成は、低分子量GTP結合蛋白質Rhoによって制御されている(16, 36)。そこで、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって誘発されたシグナルによって引き起こされる赤痢菌の細胞侵入がRho蛋白質によって制御されているか否かを明らかにする目的で、Rho蛋白質を不活化あるいは活性化することによって赤痢菌細胞侵入に与える影響を検討した。その結果、赤痢菌の細胞侵入はCHO細胞をRho蛋白質の活性化を特異的に阻害するボツリヌス菌C3酵素で処理すると阻害された。逆に赤痢菌の細胞侵入効率は活性化型Rho蛋白質をマイクロインジェクション

ンしたCHO細胞では上昇した。このことから、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって引き起こされる誘導エンドサイトーシスはRho蛋白質によって制御されている可能性が示唆された。さらに、遊離Ipa蛋白質のみで細胞質内蛋白質のチロシンリン酸化および細胞骨格系の再構成を引き起こすことができるか否かを明らかにする目的で、遊離Ipa蛋白質処理CHO細胞免疫蛍光染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、アクチンのストレス線維が多数形成され、その基部にチロシンリン酸化蛋白質および細胞骨格系蛋白質であるビンキュリン、テーリン、パキシリンの凝集し、接着斑の活性化が認められた。これらの細胞現象はCHO細胞をC3酵素処理することによって全て阻害された。以上の結果から、遊離Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合によって起きるシグナルによって、FAKとパキシリンのチロシンリン酸化が促進し、細胞骨格系の再構成が引き起こされ、エンドサイトーシスが誘導されると考えられた。最近になってAdamらは、赤痢菌のHeLa細胞への侵入がRho蛋白質によって制御されていることを報告し、本研究の結果と一致していた(2)。以上の結果から、Rho蛋白質は細胞接着と同様に細胞運動の制御も行っており(90)、Rho蛋白質による細胞運動あるいは赤痢菌感染における誘導エンドサイトーシスの制御機構は同じである可能性が考えられた。また、細胞運動は細胞接着現象と表裏となる現象であるが、細胞が運動するためには細胞外マトリックスとの接着と解離という2つの相反する現象を繰り返す必要があり、Rho蛋白質は細胞接着の制御を通じて細胞運動、すなわち赤痢菌感染における誘導エンドサイトーシスの制御も行っていると考えられた。

病原性細菌の宿主細胞への付着あるいは侵入において、菌と宿主細胞との相互作用によって引き起こされる宿主細胞内へのシグナル伝達の初期に起きる現象が蛋白質のチロシンリン酸化であるが、そのシグナル伝達のメカニズムはそれぞれ菌によって異なと考えられている。仮性結核菌の細胞侵入はインベージンとインテグリンの結合によって行われるが(39)、仮性結核菌の細胞侵入はチロシンキナーゼの阻害

剤であるゲニスタインを細胞に処理することによって阻害される(78)。一方、ネズミチフス菌はMDCK細胞、Henle-407細胞などの極性化した細胞の頂端側から侵入し(29)、宿主細胞蛋白質のチロシンリン酸化を促進して、菌と細胞の接触部位に細胞膜のラッフリングを形成する(24)。しかしながら、ネズミチフス菌の細胞侵入はチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニスタインあるいはRho蛋白質の活性化を特異的に阻害するボツリヌスC3酵素を細胞に処理することによっても阻害されず(40, 78, 92)、赤痢菌の細胞侵入に伴うシグナル伝達とは異なっている。腸管病原性大腸菌(enteropathogenic *E. coli*; EPEC)と上皮細胞との接触によって未同定の宿主細胞蛋白質であるHp90のチロシンリン酸化が促進し、F-アクチンの凝集が引き起こされ、これによっておそらく腸管病原性大腸菌は細胞内に侵入するものと考えられている(79)。しかしながら、これらの病原細菌と宿主細胞との相互作用により引き起こされる細胞骨格系蛋白質の再構成と蛋白質のチロシンリン酸化の明確な機構および意義はまだ不明な点が多い。今後さらに赤痢菌およびその他の病原細菌における宿主細胞相互作用を比較検討する必要があると思われる。

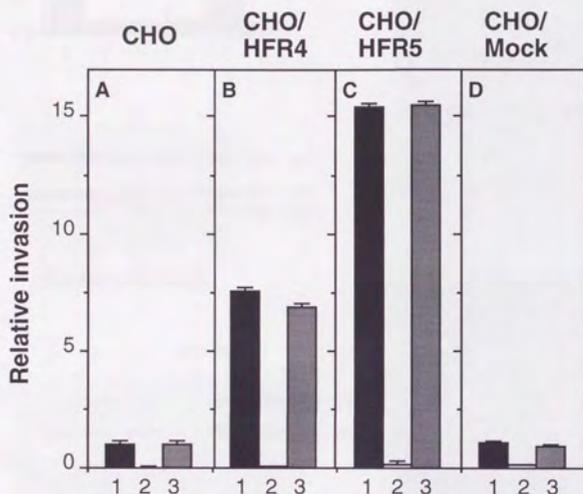


図 II-1. $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの遺伝子を導入したCHO細胞への赤痢菌の細胞侵入。
 感染菌数はCHO細胞を1とした相対値で示した。(A) CHO細胞、
 (B) CHO-HFR4細胞、(C) CHO-HFR5細胞、(D) CHO-Mock(vector)細胞。
 レーン1: YSH6000T(wild type *S. flexneri*); 2: CS2585 ($\Delta spa32$);
 3: *E. coli* K-12 HB101/pINV。データは3回行った実験の平均値を示す。

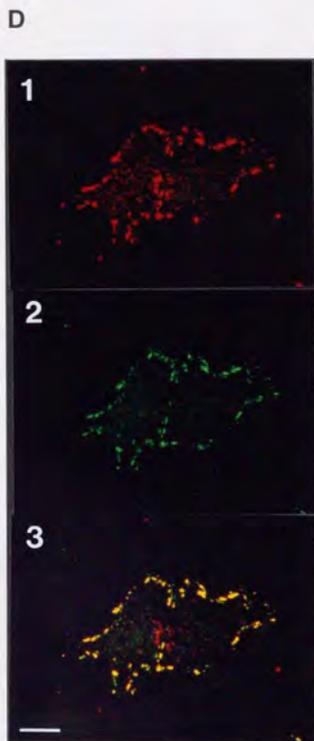
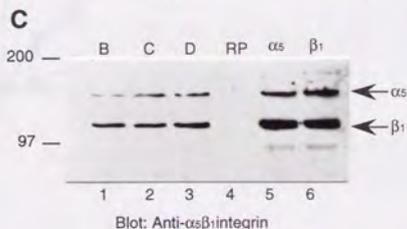
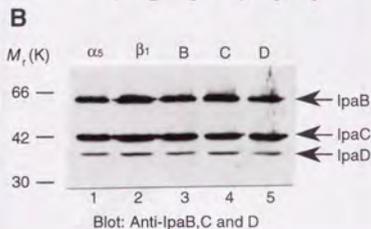
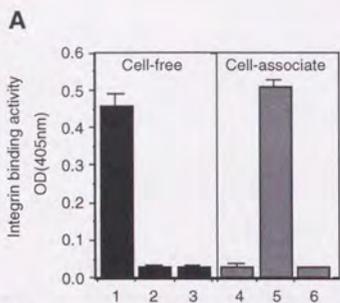


図 II-2. lpaB, lpaC, lpaD蛋白質の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンへの結合。

(A)インテグリンへの結合活性。左と右のパネルにはそれぞれ遊離したlpa蛋白質あるいは菌体と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンへの結合を示した。レーン1, 遊離したlpa蛋白質を含む上清; 2, レーン1から免疫沈降法によってlpa蛋白質を取り除いた上清; 3, 遊離したlpa蛋白質を含まない上清; 4, YSH6000T; 5, *E. coli* K-12 HB101/pINV; 6, BSA。(B)免疫沈降法によるlpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合。それぞれ抗 α_5 インテグリン(レーン1)、抗 β_1 インテグリン(レーン2)、抗lpaB(レーン3)、抗lpaC(レーン4)、抗lpaD(レーン4)抗体で免疫沈降し、抗lpa蛋白質抗体でプロットした。(C)それぞれ抗lpaB(レーン1)、抗lpaC(レーン2)、抗lpaD(レーン3)、正常ウサギ血清(レーン4)、抗 α_5 インテグリン(レーン5)、抗 β_1 インテグリン(レーン6)抗体で免疫沈降し、抗 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン抗体でプロットした。(D)共焦点レーザー顕微鏡によるlpa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合像。パネル1, lpaC; パネル2, $\alpha_5\beta_1$ インテグリン; パネル3, パネル1とパネル2を重ねた像。Barは10 μ mを示す。

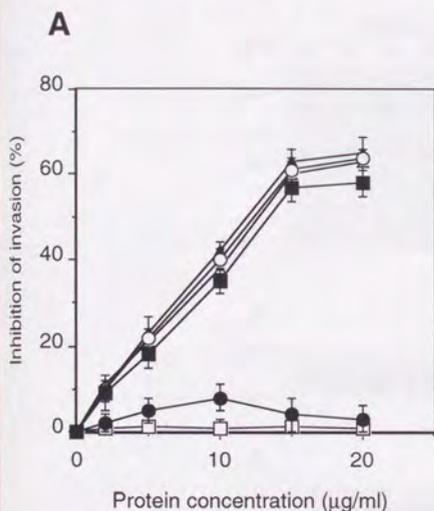
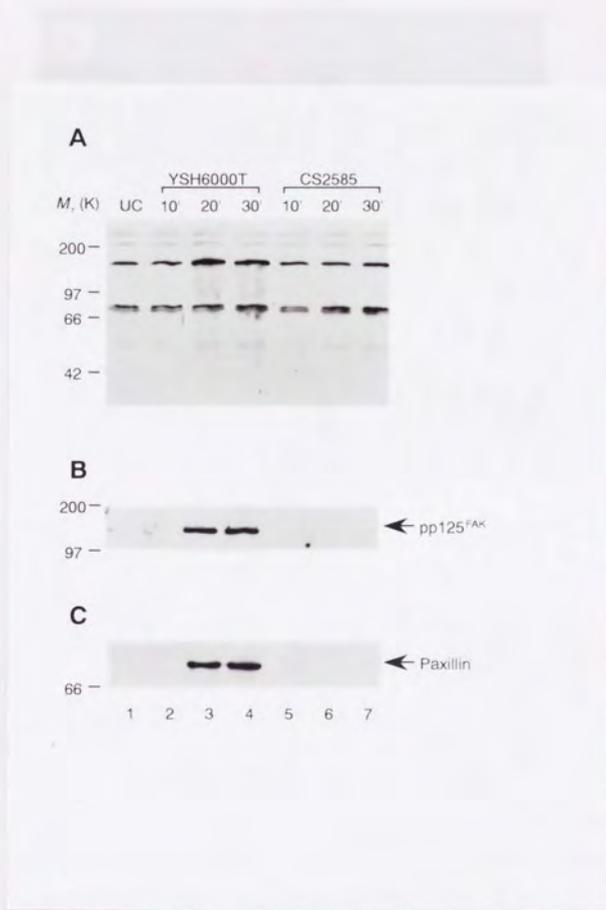


図 II-3. IpaB, IpaC, IpaD蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合におけるスーパーフィブロネクチン(S-Fn)の影響。

(A)赤痢菌の細胞侵入の阻害。MEM中にそれぞれBSA(□)、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン(○)、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとRGDSペプチド(Δ)、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとFn(■)、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとS-Fn(●)、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとFn/III₁(negative control, ▲)を加え赤痢菌をCHO-HFR5細胞に感染させた。実験結果は3回の平均値を示す。(B)Ipa蛋白質と $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの結合の阻害。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとマトリックス複合体(レーン1, 無添加; レーン2, Fn; レーン3, S-Fn; レーン4, III₁-C(negative control); レーン5, 10 mM EDTA)を遊離したIpa蛋白質を含むMEM中に加え、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの抗体で免疫沈降した後、Ipa蛋白質の抗体でプロットした。



図II-4. 赤痢菌の感染に伴うCHO細胞の蛋白質のチロシンリン酸化。
 感染していないCHO細胞(レーン1)、YSH6000Tを10(レーン2)、20(レーン3)、
 30(レーン3)分間感染させたCHO細胞、CS2582を10(レーン5)、20(レーン6)、
 30(レーン7)分間感染させたCHO細胞の溶解液(A)をそれぞれ抗FAK抗体(B)および
 抗パキシリン抗体(C)で免疫沈降した後、抗ホスホチロシン抗体でプロットした。

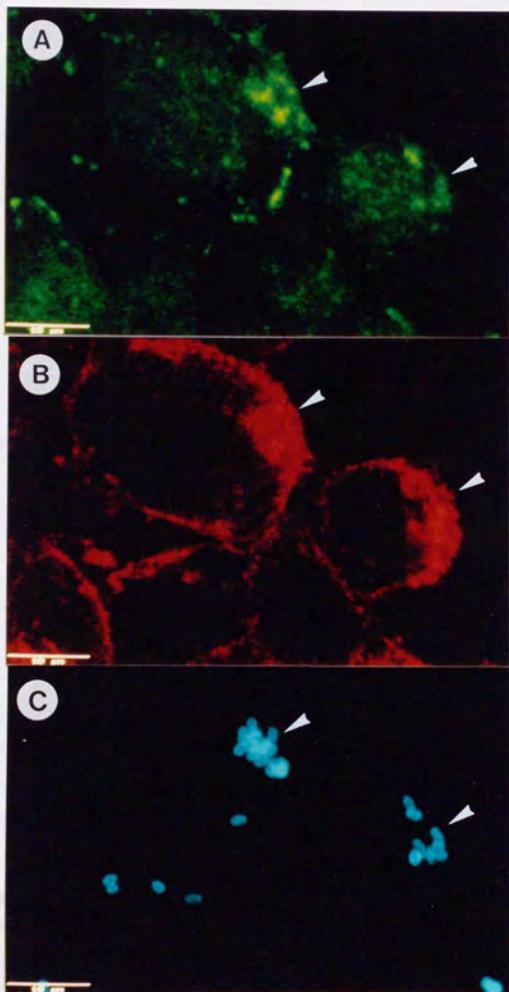
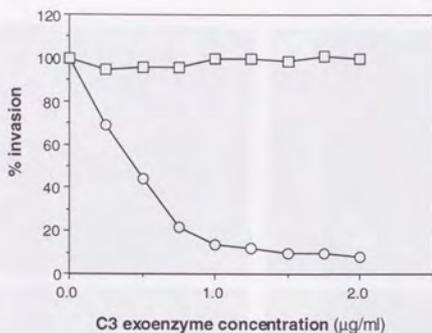


図 II-5. 赤痢菌とCHO-HFR5細胞の接触部位に観察される $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとF-アクチンの凝集。

(A)FITC標識 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン、(B)ローダミン標識F-アクチン、(C)Cy5標識赤痢菌2a LPS。矢印は赤痢菌と細胞の接触部位を示す。

A



B

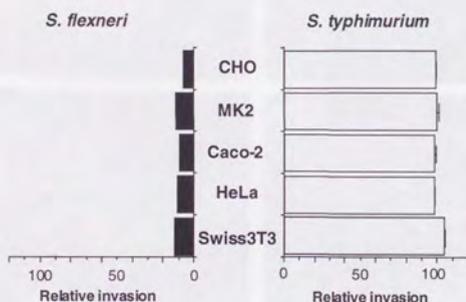


図 II -6. C3酵素処理による赤痢菌の細胞侵入の阻害。

(A)赤痢菌YSH6000T(○)とネズミチフス菌SB300(□)のC3酵素処理CHO細胞への細胞侵入。(B)赤痢菌YSH6000T(黒)とネズミチフス菌(白)のC3酵素処理CHO細胞(1.25µg/ml)、MK2細胞(4µg/ml)、Caco-2細胞(4µg/ml)、HeLa細胞(5µg/ml)、Swiss3T3細胞(1µg/ml)への細胞侵入。細胞侵入率はC3酵素未処理細胞への細胞侵入率との相対値を示した。データは3回行った実験の平均値を示した。

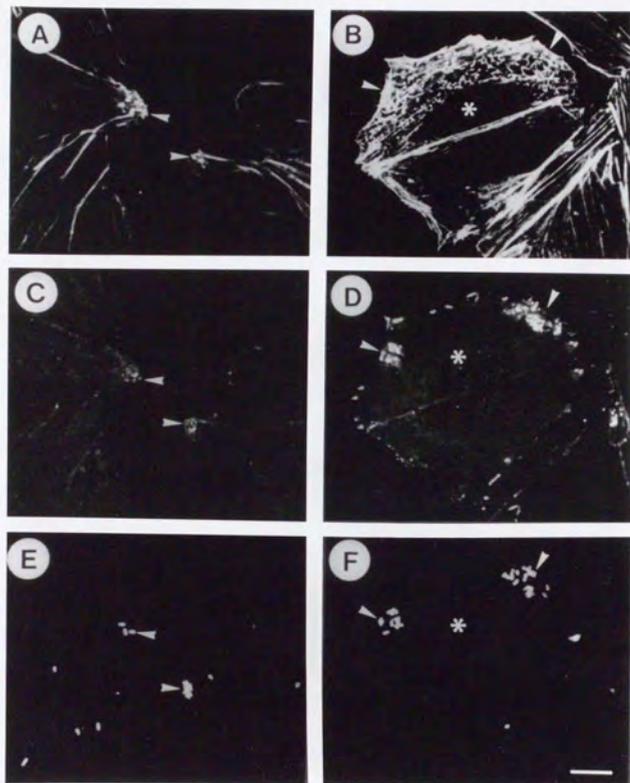
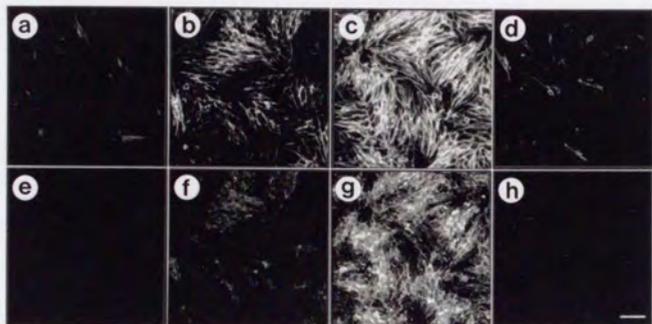


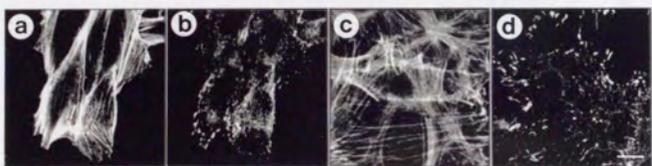
図 11-7. 活性化型Rho蛋白質のマイクロインジェクションによる赤痢菌細胞侵入の促進。

それぞれ血清飢餓状態CHO細胞(パネルA, C, E)と活性化型Rho蛋白質(300 μ g/ml)をマイクロインジェクションした血清飢餓状態CHO細胞(パネルB, D, F)へ赤痢菌YSH6000Tを感染させた。パネルAとBはローダミン標識ファロイジン、パネルCとDはFITC標識抗ホスホチロシン抗体、パネルEとFはCy5標識抗赤痢菌LPS抗体でそれぞれ免疫蛍光染色した。バーは10 μ mを示す。

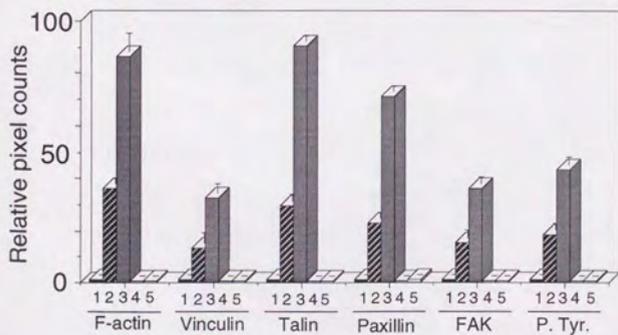
A



B



C



図II-8. 遊離型Ipa蛋白質処理によるアクチンストレス線維形成とチロシンリン酸化蛋白質の凝集。

(A)遊離型Ipa蛋白質を0分(パネルaとe)、30分(パネルbとf)、60分(パネルcとg)処理あるいは未処理CHO細胞(パネルdとh)をそれぞれローダミン標識ファロイジン(パネルc-d)、FITC標識抗ホスホチロシン抗体(パネルe-h)を用いて免疫蛍光染色した低倍率像。バーは100 μ mを示す。(B)パネルAの高倍率像。遊離型Ipa蛋白質を60分処理したCHO細胞(パネルaとb)とSwiss3T3細胞(パネルcとd)をそれぞれローダミン標識ファロイジン(パネルaとc)、FITC標識抗ホスホチロシン抗体(パネルbとd)を用いて免疫蛍光染色した。バーは10 μ mを示す。(C)アクチンストレス線維形成と接着斑活性化の定量。遊離型Ipa蛋白質を0分(レーン1)、30分(レーン2)、60分(レーン3)処理あるいは遊離型Ipa蛋白質除去液を60分処理(レーン4)、C3酵素(1.25 μ g/ml)を24時間処理(レーン5)したCHO細胞をそれぞれ図に示した蛋白質に対する抗体で免疫蛍光染色し、得られた画像のピクセルをLaserSharp version2.0を用いて計測した。データは3回行った実験の平均値を示す。

参考文献

1. Adam, T., M. Arpin, M-C. Prévost, P. Gounon, and P. J. Sansonetti. 1995. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129: 367-381.
2. Adam, T., M. Giry, P. Boquet, and P. J. Sansonetti. 1996. Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 15: 3315-3321.
3. Adler, B., C. Sasakawa, T. Tobe, S. Makino, K. Komatsu, and M. Yoshikawa. 1989. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 3: 627-635.
4. Aktories, K., and I. Just. 1995. Monoglucosylation of low-molecular-mass GTP-binding Rho proteins by clostridial cytotoxins. *Trends Cell Biol.* 5: 441-443.
5. Allaoui, A. P., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1992. MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella lpa* invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia Yop* proteins. *J. Bacteriol.* 174: 7661-7669.
6. Allaoui, A. P., J. Mounier, M.-C. Prévost, P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1992. *icsB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol. Microbiol.* 6: 1605-1616.
7. Allaoui, A. P., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. MixD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri lpa* invasins. *Mol. Microbiol.* 7: 59-68.
8. Andrews, G. P., A. R. Hromockyj, C. Coker, and A. T. Maurelli. 1991. Two novel virulence loci, *mxiA* and *mxiB*, in *Shigella flexneri* 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. *Infect. Immun.* 59: 1997-2005.
9. Andrews, G. P., and A. T. Maurelli. 1992. *mxiA* of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a

- homolog of the low-calcium response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 60:3287-3295.
10. Asano, T., and H. Hidaka. 1984. Vasodilatory action of HA1004 [*N*-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide], a novel calcium antagonist with no effect on cardiac function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231: 141-145.
 11. Baudry, B., M. Kaczorek, and P. J. Sansonetti. 1988. Nucleotide sequence of the invasion plasmid antigen B and C genes (*ipaB* and *ipaC*) of *Shigella flexneri*. *Microb. Pathog.* 4: 345-357.
 12. Bergman, T., K. Erickson, E. Galyov, C. Persson, H. Wolf-Watz. 1994. The *lcrB* (*yscN/U*) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the *spa* gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176: 2619-2626.
 13. Bliska, J. B., J. E. Galán, and S. Falkow. 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73: 903-920.
 14. BurrIDGE, K., C. E. Turner, and L. H. Romer. 1992. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119: 893-903.
 15. Buysse, J. M., C. K. Stover, E. V. Oaks, M. Venkatesan, and D. J. Kopecko. 1987. Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. *J. Bacteriol.* 169: 2561-2569.
 16. Clark, E. A., and J. S. Brugge. 1995. Integrin and signal transduction pathways: the road taken. *Science (Wash. DC)*. 268:233-239.
 17. Clerc, P., and P. J. Sansonetti. 1987. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect. Immun.* 55:2681-2688.

18. Clerc, P., and P. J. Sansonetti. 1989. Evidence for clathrin mobilization during directed phagocytosis of *Shigella flexneri* by HEp2 cells. *Microb. Pathog.* 7: 329-36.
19. Collazo, C. M., M. K. Zierler, and J. E. Galán. 1995. Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol. Microbiol.* 15: 25-38.
20. Dehio, C., M.-C. Prévost, and P. J. Sansonetti. 1995. Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60^{c-src}-mediated signaling pathway. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 14:2471-2482.
21. Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59: 4310-4317.
22. Fields, K. A., G. V. Plano, and S. C. Straley. 1994. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 176: 569-579.
23. Forsberg, A., R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 1994. Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol.* 2: 14-19.
24. Francis, C. L., T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith, And S. Falkow. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature (Lond.)* 364: 639-642.
25. Galán, J. E., C. Ginocchio, and P. Costeas. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174: 4338-4349.
26. Galán, J. E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* 20: 263-271.

27. Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, and C. I. Kado. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164: 918-921.
28. Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 1990. Elevated levels of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells. *Cell.* 60:849-859.
29. Ginocchio, C., J. Pace, and J. E. Galán. 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of *Salmonellae* into culture epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5976-5980.
30. Greenberg, S., K. Burrige, and S. C. Silverstein. 1990. Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 172: 1853-1856.
31. Greenberg, S., P. Chang, and S. C. Silverstein. 1993. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 177: 529-534.
32. Groisman, E., and H. Ochman. 1993. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cell by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 12: 3779-3787.
33. Hall, A. 1990. The cellular function of small GTP-binding proteins. *Science (Wash. DC)* 249: 635-640.
34. Hartman, A. B., M. M. Venkatesan, E. V. Oaks, J. M. Buysse. 1990. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 172: 1905-1915.
35. High, N., J. Mounier, M.-C. Prévost, and P. J. Sansonetti. 1992. *IpaB* of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 11:1991-1999.

36. Hotchin, N. A., and A. Hall. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intercellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol.* 131: 1857-1865.
37. Hromockyj, A.E., and A. T. Maurelli. 1989. Identification of *Shigella* invasion genes by isolation of temperature-regulated *inv::lacZ* operon fusions. *Infect. Immun.* 57: 2963-2970.
38. Hynes, R. O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
39. Isberg, R. R., and J. M. Leong. 1990. Multiple β_1 chain integrins are receptor for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 60:861-871.
40. Jones, B. D., H. F. Paterson, A. Hall, and S. Falkow. 1993. *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10390-10394.
41. Juliano, R. L., and S. Haskill. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120: 577-585.
42. Kaniga, K., S. C. Tucker, D. Trollinger, and J. E. Galán. 1995. Homologues of the *Shigella* invasins IpaB and IpaC are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured cells. *J. Bacteriol.* 177: 3965-3971.
43. Kaniga, K., D. Trollinger, and J. E. Galán. 1995. Identification of two targets of the type III secretion system encoded in the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that share homology to IpaD and IpaA proteins. *J. Bacteriol.* 177: 7078-7085.
44. Kamata, Y., T. Nishiki, K. Matsumura, T. Hiroi, and S. Kozaki. 1994. Morphological effects, rate of incorporation, and the enzymatic action of botulinum ADP-ribosyltransferase, known as C3 exoenzyme, on human neuroblastoma GOTO cells. *Microbiol. Immunol.* 38: 421-428.

45. Karkhanis, Y. D., J. Y. Zeltner, J. J. Jakson, and D. J. Carlo. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. 1978. *Anal. Biochem.* 85: 595-601.
46. Kitto, G. B. 1969. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol.* 13: 106-116.
47. Kawamoto, S., and H. Hidaka. 1984. 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 258-268.
48. Kikkawa, U., R. Minakuchi, Y. Takai, and Y. Nishizuka. 1983. Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) from rat brain. *Methods Enzymol.* 99: 288-298.
49. Kobayashi, E., H. Nakano, M. Morimoto, and T. Tamaoki. 1989. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 548-553.
50. Kolter, R., M. Inuzuka, and D. R. Helinski. 1978. Transcomplementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell* 15: 1199-1208.
51. Labigne-Roussel, A. F., L. Lark, G. Schoolnik, and S. Falkow. 1984. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA) responsible for P blood group-independent mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *E. coli* strain. *Infect. Immun.* 46: 251-259.
52. LaBrec, E. H., H. Schneider, J. J. Magnani, and S. B. Formal. 1964. Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J. Bacteriol.* 88: 1503-1518.
53. Lett, M.-C., C. Sasakawa, N. Okada, T. Sakai, S. Makino, M., Yamada, K. Komatsu, and M. Yoshikawa. 1989. *virG*, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the VirG protein and

- determination of the complete coding sequence. *J. Bacteriol.* 171: 353-359.
54. Maagd, R. A., and B. Lugtenberg. 1986. Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, and cytoplasmic components. *J. Bacteriol.* 167: 1083-1085.
55. Marquart, M. E., W. L. Picking, and W. D. Picking. 1995. Structural analysis of invasion plasmid antigen D (IpaD) from *Shigella flexneri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 963-970.
56. Ménard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175:5899-5906.
57. Ménard, R., P. Sansonetti, C. Parsot, and T. Vasselon. 1994. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell.* 79:515-525.
58. Ménard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1994. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaC. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 13:5293-5302.
59. Ménard, R., M.-C. Prévost, P. Gounon, P. Sansonetti, and C. Dehio. 1996. The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1254-1258.
60. Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R-M. Mège, and P. Cossart. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-932.
61. Michaelis, S., L. Guarente, and J. Beckwith. 1983. *In vitro* construction and characterization of *phoA-lacZ* gene fusions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154: 356-365.

62. Mills, J. A., J. M. Buysse, and E. V. Oaks. 1988. *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens B and C: epitope location and characterization with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56: 2933-2941.
63. Miyamoto, S., S. K. Akiyama, and K. M. Yamada. 1995. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science (Wash. DC)*. 267:883-885.
64. Morla, A., Z. Zhang, and E. Ruoslahti. 1994. Superfibronectin is a functionally distinct from of fibronectin. *Nature (Lond.)*. 367:193-196.
65. Mounier, J., T. Vasselon, R. Hellio, M. Lesourd, and P. J. Sansonetti. 1992. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect. Immun.* 60:237-248.
66. Nakata, N., C. Sasakawa, N. Okada, T. Tobe, I. Fukuda, T. Suzuki, K. Komatsu, and M. Yoshikawa. 1992. Identification and characterization of *virK*, a virulence-associated large plasmid gene essential for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 2:2387-2395.
67. Neu, H. C., and J. Chou. 1967. Release of surface enzymes in Enterobacteriaceae by osmotic shock. *J. Bacteriol.* 94: 1934-1945.
68. Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature (Lond.)* 308: 693-698.
69. Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi, and J. Carson. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* 247: 3962-3972.
70. Pace, J., M. J. Hayman, and J. E. Galán. 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* 72: 505-514.
71. Parsot, C., R. Ménard, P. Gounon, and P. J. Sansonetti. 1995. Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol. Microbiol.* 16:291-300.

72. Perdomo, J., P. Gounon, and P. J. Sansonetti. 1994. Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.* 93: 633-643.
73. Perdomo, O. J. J., J. M. Cavaillon, M. Huerre, H. Ohayon, P. Gounon, and P. J. Sansonetti. 1994. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J. Exp. Med.* 180: 1307-1319.
74. Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature (Lond.)* 309:30-33.
75. Ridley, A. J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.
76. Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410.
77. Ridley, A. J., and A. Hall. 1994. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 13: 2600-2610.
78. Rosenshine, I., V. Duronio, and B. B. Finlay. 1992. Tyrosine protein kinase inhibitors block invasion-promoted bacterial uptake by epithelial cells. *Infect. Immun.* 60: 2211-2217.
79. Rosenshine, I., M. S. Sonnenberg, J. B. Kaper, and B. B. Finlay. 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 11: 3551-3560.
80. Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE

- cytotoxin into mammalian cells. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 13: 964-972.
81. Ruoslahti, E., and M. D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (Wash. DC)*. 238:491-497.
82. Sakai, T., C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. 1988. Expression of four virulence antigens of *Shigella flexneri* is positively regulated at the transcriptional level by the 30 kiloDalton virF protein. *Mol. Microbiol.* 2: 589-587.
83. Sasakawa, C., K. Kamata, T. Sakai, S. Y. Murayama, S. Makino, and M. Yoshikawa. 1986. Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 51: 470-475.
84. Sasakawa, C., B. Adler, T. Tobe, N. Okada, S. Nagai, K. Komatsu, and M. Yoshikawa. 1989. Functional organization and nucleotide sequence of virulence Region-2 on the large virulence plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *Mol. Microbiol.* 3:1191-1201
85. Sasakawa, C., J. M. Buysse, and H. Watanabe. 1992. The large virulence plasmid of *Shigella*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 180: 21-44.
86. Sasakawa, C., K. Komatsu, T. Tobe, T. Suzuki, and M. Yoshikawa. 1993. Eight genes in region 5 that from an operon are essential for invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* 2a. *J. Bacteriol.* 175:2334-2346.
87. Sasakawa, C. 1995. Molecular basis of pathogenicity of *Shigella*. *Rev. Med. Microbiol.* 6: 257-266.
88. Schaller, M. D., C. A. Borgman, B. S. Cobb, R. R. Vines, A. B. Reynolds, and J. T. Parsons. 1992. pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5192-5196.
89. Schreiner, C. L., J. S. Bauer, Y. N. Danilov, S. Hussein, M. M. Sczekan, and R. L. Juliano. 1989. Isolation and characterization of chinese

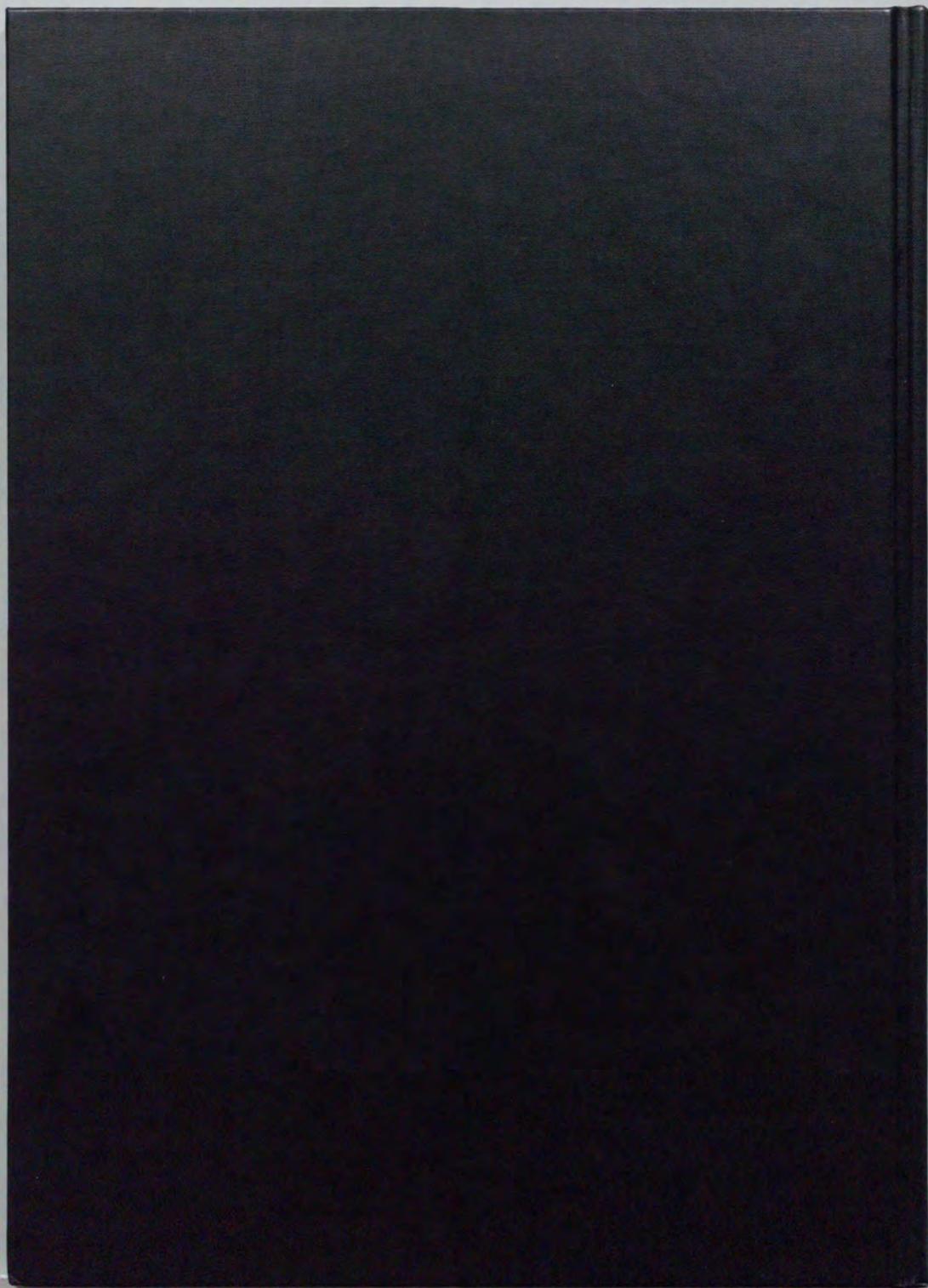
- hamster ovary cell variants deficient in the expression of fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* 109:3157-3167.
90. Takaishi, K., A. Kikuchi, S. Kuroda, K. Kotani, T. Sasaki, and Y. Takai. 1993. Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) in cell motility. *Mol. Cell. Biol.* 13, 72-79.
91. Takayanagi, K., and T. Mizuno. 1992. Activation of the osmoregulated *ompF* and *ompC* genes by the OmpR protein in *Escherichia coli*: a study involving chimeric promoters. *J. Biochem.* 112: 1-6.
92. Tang, P., I. Rosenshine, and B. B. Finlay. 1994. *Listeria monocytogenes*, an invasive bacterium, stimulates MAP kinase upon attachment to epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 5: 455-464.
93. Thomas, T. P., R. Gopalakrishna, and W. B. Anderson. 1987. Hormone- and tumor promoter-induced activation or membrane association of protein kinase C in intact cells. *Methods Enzymol.* 141: 399-411.
94. Tran Van Nhieu, G., and R. R. Isberg. 1991. The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the $\alpha_5\beta_1$ integrin receptor. *J. Biol. Chem.* 266:24367-24375.
95. Uchiya, K., T. Tobe, K. Komatsu, T. Suzuki, M. Watarai, I. Fukuda, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa. 1995. Identification of a novel virulence gene, *virA*, on the large plasmid of *Shigella*, involved in invasion and intercellular spreading. *Mol. Microbiol.* 17: 241-250.
96. Van Gijsegem, F., S. Genin, and C. Boucher. 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* 1: 175-180.
97. Vasselon, T., J. Mounier, M.-C. Prévost, R. Hellio, and P. J. Sansonetti. 1991. Stress fiber-based movement of *Shigella flexneri* within cells. *Infect. Immun.* 59:1723-1732.

98. Venkatesan, M. M., J. M. Buysse, and D. J. Kopecko. 1988. Characterization of invasion plasmid antigen genes (*ipaBCD*) from *Shigella flexneri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:9317-9321.
99. Venkatesan, M. M., J. M. Buysse, and E. V. Oaks. 1992. Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the *spa* locus. *J. Bacteriol.* 174:1990-2001.
100. Vuori, K., and E. Ruoslahti. 1993. Activation of protein kinase C precedes $\alpha_5\beta_1$ integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem.* 268: 21459-21462.
101. Woods, A., and J. R. Couchman. 1992. Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* 101: 277-290.
102. Zychlinsky, A., M.-C. Prévost, and P. J. Sansonetti. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature(Lond.)* 358: 167-169.

謝辞

本研究を行うにあたり、始終御指導と御助言を賜りました東京大学医科学研究所細菌研究部笹川千尋教授ならびに吉川昌之介名誉教授に心より感謝の意を表します。

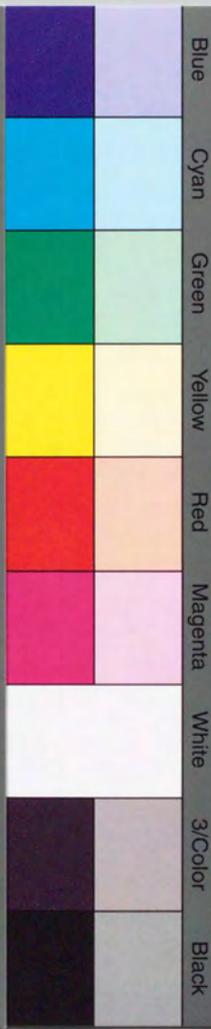
また本研究の遂行に際し、多大なる御協力を戴きました東京大学医科学研究所細菌研究部の方々に深く感謝致します。また、共焦点レーザー顕微鏡の操作に際し多大なる御協力を戴きました日本バイオ・ラッド、マイクロサイエンス事業部船戸澄子さんに深く感謝致します。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

