

論文審査の結果の要旨

氏名 小林 泰良

本研究では、腸管感染性病原細菌である赤痢菌の感染機構を解明するために、宿主細胞感染時に、菌体のⅢ型分泌装置依存的に分泌されるエフェクターOspC3の機能を解析し、下記の結果を得ている。

1. 赤痢菌のエフェクター遺伝子が欠損した株を細胞に感染させ、その表現型を解析した。エフェクターOspC3 欠損株 ($\Delta ospC3$) が感染した細胞では、感染後 2-4 時間の死細胞の割合が上昇した。さらに $\Delta ospC3$ 感染は細胞では細胞膜の消失および核の収縮を、動物では腸管上皮組織の破壊と出血を惹起した。感染細胞・組織中の赤痢菌数は OspC3 の欠損で減少したことから、OspC3 は細胞死抑制によって増殖の足場を確保し感染を有利に進めることを示した。
2. OspC3 の作用機序を解析するため、OspC3 が抑制する細胞死の種類を特定した。 $\Delta ospC3$ の感染細胞では、核の断片化および膜の破綻を伴う細胞死が生じ、炎症性サイトカイン (IL-18) の成熟化・分泌がみられた。またこの細胞死は、カスパーゼ 1/4/5 阻害剤で抑制された。以上の結果から、パイロプトーシスと呼ばれる細胞死であることが示唆された。
3. パイロプトーシスは主に血球系細胞で研究され、インフラマソーム経由のシグナルでカスパーゼ 1 依存的に生じることが報告されているが、上皮細胞では解析が進んでいない。OspC3 の標的因子を同定するために、カスパーゼ 1 活性化に関与する宿主タンパク質群と OspC3 との結合実験を行ったが標的は発見できなかった。一方、カスパーゼ 1/4/5 阻害剤の処理で細胞死が阻害された結果から、カスパーゼファミリーとの結合を確認した結果、カスパーゼ 4 との結合が確認された。

カスパーゼは大 (p19)、小 (p10) のサブユニットに切断され、p19-p10 の多量体形成により成熟化する。赤痢菌感染細胞のカスパーゼ 4 全長を確認した結果、限定分解は野生株感染細胞においても $\Delta ospC3$ 感染同様に観察され、OspC3 は多量体形成もしくは成熟体カスパーゼ 4 の活性を直接阻害することが考えられた。

パイロプトーシスは一般的にカスパーゼ 1 依存的な細胞死と考えられていることから、本細胞死におけるカスパーゼ 1 の影響を確認した。カスパーゼ

1/4 双方の siRNA を用いたノックダウン細胞で生じる細胞死を確認した結果、 $\Delta ospC3$ 感染が誘導する細胞死はカスパーゼ 4 のノックダウンによってのみ抑制された。従って、OspC3 が抑制する細胞死は、カスパーゼ 4 依存的であることが明らかになった。

4. 精製タンパク質およびカスパーゼ 4 の蛍光基質を用い、OspC3 のカスパーゼ 4 に対する阻害を検討した結果、OspC3 は成熟化カスパーゼ 4 を直接阻害することが確認された。プルダウンアッセイの結果、OspC3 はカスパーゼ 4 の p19 と結合し、さらに p10 の p19 への結合は OspC3 の濃度依存的に阻害されたことから、OspC3 は成熟化カスパーゼ 4 の形成を阻害することを示唆した。
5. OspC3 のカスパーゼ 4 に対する機能ドメインを同定するため、OspC3 の部分欠失変異体とカスパーゼ 4 の結合をプルダウンアッセイによって確認した結果、OspC3 の C 末端約 30 アミノ酸領域が結合に必須であることが示唆された。また、立体構造予測から OspC3 の配列中にはカスパーゼ 1 の基質とされるモチーフ (LSTDN) がカスパーゼ 4 の活性ポケットに作用することが予測された。C 末端約 30 アミノ酸領域内の LAL モチーフ配列の AGA 変異タンパク質 (OspC3- Δ Ank)、およびカスパーゼ 1 基質モチーフ LSTDN の AAAAA 変異タンパク質 (OspC3-AAA) を用いてカスパーゼ 4 依存的な細胞死を測定した結果、細胞死の阻害効果が減弱した。従って、OspC3 は 2 つのドメインの機能によりカスパーゼ 4 の活性を阻害していることが明らかになった。
6. サルモネラおよび腸管病原性大腸菌の感染細胞において生じる細胞死を観察した結果、カスパーゼ 4 依存的細胞死が観察された。このことから、カスパーゼ 4 依存的なパイロプトーシスは宿主細胞による病原体排除のための自然免疫的機構であることが示唆された。

以上、本論文は赤痢菌のエフェクター OspC3 が、感染依存的に上皮細胞で生じるパイロプトーシスを抑制することを示した。また、OspC3 は 2 つのドメインによってカスパーゼ 4 を阻害することを、タンパク質科学的解析により明らかにし、さらに、上皮細胞にカスパーゼ 4 依存的に生じる新しい機序のパイロプトーシス細胞死を同定した。本研究は新規エフェクターの作用機序を解明しただけでなく、新たにカスパーゼ 4 依存的細胞死の分子メカニズムを明らかにして、感染症研究に重要な貢献をなしたことから、博士 (生命科学) の学位の授与に値するものと考えられる。