

氏名	高山 昇一
(ふりがな)	(たかやま しょういち)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第45号
学位審査年月日	令和5年1月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	The role of MreB in intrabacterial nanotransportation system for cholera toxin in <i>Vibrio cholerae</i> ( <i>V. cholerae</i> コレラトキシンの菌体内ナノ輸送システムにおける MreB の役割について)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 小野 富三人 教授 近藤 洋一

### 学位論文内容の要旨

目的：

細菌には菌体外からの刺激に反応して、菌体内物質を細胞膜に向かって輸送するナノ輸送システム (*ibNoTS*) がある。これまでの免疫電子顕微鏡法を用いた研究で、ピロリ菌の MreB 線維が CagA の *ibNoTS* 輸送ルートに関係し、*urease* の *ibNoTS* 輸送ルートは FtsZ 線維が関係することが明らかになっている。このように、菌体内のタンパク質輸送には特定のルートを介するメカニズムがあると考えられるが、*Vibrio cholerae* の病原因子であるコレラトキシシン (CT) の *ibNoTS* については、その輸送ルートはまだ解明されていない。本研究では、*V. cholerae* CT の *ibNoTS* 輸送ルートを解明するため、菌体内線維 MreB に着目し、菌体内線維構造を可視化する凍結融解法及び免疫電子顕微鏡法などを用いて、*V. cholerae* CT の *ibNoTS* における菌体内輸送ルートと MreB 線維との関連を明らかにすることを目的とした。

方法：

被験菌として *V. cholerae* GTC2647 株、試薬として MreB の重合阻害剤である A22 を用いた。CT と MreB が近接しているか否かを明らかにするため、まず *V. cholerae* MreB に対するポリクローナル抗体を作製した。抗 CT 抗体には市販のモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いた。これらの抗体を用い、二重染色の免疫電子顕微鏡法による観察を行い、両者の関係を解析した。また、A22 が *V. cholerae* の増殖に影響を及ぼさない最大濃度を決定し、その濃度における CT の *ibNoTS* 障害を免疫電子顕微鏡法により解析した。さらに、A22 作用時のアルカリ環境における *V. cholerae* の CT 分泌量及び産生量を経時的に酵素抗体法 (EIA) で測定し、CT の *ibNoTS* が A22 により障害されるかを抗 CT 抗体による免疫電子顕微鏡法で解析した。更に、凍結融解法で可視化した菌体内線維に CT と MreB が局在しているかを免疫電子顕微鏡法により解析し、また CT と MreB の相互作用を EIA により解析した。

結果：

作製した抗 *V. cholerae* MreB 抗体が菌体内 MreB に反応することを免疫電子顕微鏡法で確認し、二重免疫染色の免疫電子顕微鏡法により CT と MreB 分子が近接していることを確認した。*V. cholerae* CT の *ibNoTS* に対して A22 が与える影響を免疫電子顕微鏡法で解析した結果、CT の *ibNoTS* が障害されたことが明らかとなった。さらに、A22 により MreB 重合が阻害されると、CT の *ibNoTS* が障害された結果として、アルカリ環境における CT の分泌増加現象と合成誘導現象がなくなることを EIA で明らかにした。以上のことから、*ibNoTS* の輸送ルートに乗っている CT は MreB 線維と関係していると考えられ、凍結融解法で可視化した菌体内線維を免疫電子顕微鏡法で観察した結果、やはり線維上で MreB と CT が近接していることを確認した。一方、別の菌体内線維である FtsZ には近接していないことを同法で確認し、金粒子の密度を定量的に解析した結果でも CT と FtsZ 分子は近接していないことが明らかとなった。また、CT と MreB の結合を EIA より解析した結果、CT と MreB との相互作用は認められたが、FtsZ との相互作用は認められなかった。

考察：

二重染色免疫電顕法と EIA により、*V. cholerae* CT の *ibNoTS* 輸送ルートと MreB 線維の関連が示唆された。*V. cholerae* CT の *ibNoTS* 輸送ルートの解明は、種々の病原因子の *ibNoTS* メカニズム解明への重要な一歩となり、本研究は、病原細菌の細菌生理学上重要な知見を与えるものである。また、さらに知見を深め、宿主真核生物における細胞内物質輸送システムとの相違を明らかにすることによって、細菌感染症治療薬の新規ターゲットを提供する可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

細菌には菌体外からの刺激に反応して、菌体内物質を細胞膜に向かって輸送するナノ輸送システム (*ibNoTS*) がある。先行研究において、ピロリ菌の MreB 線維が CagA の *ibNoTS* 輸送ルートに関係し、urease の *ibNoTS* 輸送ルートは FtsZ 線維と関係することが明らかになっている。このように、菌体内タンパク質輸送には特定のルートを介したメカニズムが存在すると考えられる。そこで、申請者は *Vibrio cholerae* の病原因子であるコレラトキシン (CT) の *ibNoTS* について、その輸送ルートを解明するため菌体内 MreB 線維に着目し、免疫電子顕微鏡法や酵素抗体法 (EIA) を用いて、このルートと MreB 線維との関連を解析した。

*V. cholerae* CT の *ibNoTS* に対して MreB の重合阻害剤である A22 が与える影響を免疫電子顕微鏡法で解析した結果、CT の *ibNoTS* が障害されたことが明らかとなった。さらに、A22 により CT の *ibNoTS* が障害された結果として、アルカリ環境における CT の分泌増加現象と合成誘導現象がなくなったことを EIA で確認した。凍結融解法で可視化した菌体内線維を免疫電子顕微鏡法で観察した結果、線維上で MreB と CT が近接していることを確認した。さらに、CT と MreB の結合を EIA より解析した結果、CT と MreB との相互作用が認められ、CT の *ibNoTS* 輸送ルートと MreB 線維との関連を明らかにした。

現在、細菌感染症に対する治療は抗菌化学療法が中心となっているが、抗菌薬には耐性菌の出現が避けられない。申請者による本研究は、病原因子の一つである外毒素分泌の前段階である菌体内タンパク質輸送機構の一部を明らかにしている。このことは、抗菌薬という「細菌の増殖」をコントロールすることを企図した感染症治療ではなく、細菌の病原因子が発現するメカニズムを阻害することで「細菌の病原性」をコントロールするという、新しい概念の細菌感染症治療法を開発する端緒となりうるものといえ、医学の発展に寄与するところは大きい。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Bulletin of Osaka Medical and Pharmaceutical University

Vol.68 (1,2) : 17–28, 2022.