

医研 第355号


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Molecular characterization of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression
in T cells

(T細胞における *Legionella pneumophila* 誘導性インターロイキン-8 発現の分子特徴)

氏名 高松 玲佳 

論 文 要 旨

【 研 究 の 目 的 】

Legionella pneumophila はレジオネラ肺炎の原因となり、感染後に肺胞マクロファージや上皮細胞内で増殖する通性細胞内寄生菌である。当研究室では、*L. pneumophila* 感染における肺胞上皮細胞の役割について既に報告しているが、免疫担当細胞として重要な T 細胞との関係についての報告は少ない。そこで、レジオネラ肺炎における T 細胞の役割について検討する目的で、T 細胞内での *L. pneumophila* の増殖を確認し、炎症に関わる好中球遊走性ケモカイン IL-8 の発現誘導機構を *L. pneumophila* の病原因子と細胞内シグナル伝達経路の双方から解析した。

【 方 法 】

L. pneumophila は AA100jm 株と IV 型分泌機構を欠失した *dot0* 変異株並びに Corby 株とフラジェリンを欠失した *flaA* 変異株を用いた。T 細胞株として Jurkat を用い、末梢血

より分離した CD4⁺T 細胞も感染実験に供した。細胞内での菌の増殖は、BCYE- α 寒天培地でのコロニー数の計測と抗体を用いた蛍光染色による観察を行った。IL-8 mRNA の発現及び培養液中への分泌は RT-PCR と ELISA を用いた。IL-8 遺伝子の転写制御機構はレポーターアッセイと EMSA で、シグナル伝達経路はウェスタンブロットで解析した。

【結果】

L. pneumophila は Jurkat 及び CD4⁺T 細胞内で増殖した。フラジェリン欠失株も増殖したが、IV型分泌機構欠失株は増殖できなかった。一方、野生株とIV型分泌機構欠失株は IL-8 mRNA の発現や分泌を誘導したが、フラジェリン欠失株や 100℃ で熱処理した野生株では IL-8 mRNA の発現や分泌の誘導はみられなかった。レポーターアッセイにて、*L. pneumophila* 誘導性 IL-8 遺伝子の転写活性化には転写因子 NF- κ B と AP-1 の結合配列が重要なことがわかり、EMSA にて NF- κ




B 結合配列には p50/p65 が、また AP-1 結合配列には c-Jun/JunD/CREB/ATF1 複合体の結合が誘導されることがわかった。レポーターアッセイやウェスタンブロットの結果、フラジェリンによる TLR5 を介した MyD88 → TAK1 の活性化が明らかになった。さらに TAK1 は 1) IKK を活性化することで NF- κ B を活性化、2) MKK4 → JNK の活性化による c-Jun のリン酸化を介して AP-1 を活性化、3) p38 → MSK1/MAPKAPK-2 の活性化による CREB/ATF1 のリン酸化を介して AP-1 を活性化することを証明した。

【 結 論 】

L. pneumophila は CD4⁺T 細胞における増殖には IV 型分泌機構を利用し、IL-8 の発現には主にフラジェリンを利用する。フラジェリン依存性の IL-8 発現誘導には、MyD88 → TAK1 → 1) IKK → NF- κ B、2) MKK4 → JNK → c-Jun → AP-1、3) p38 → MSK1/MAPKAPK-2 → CREB/ATF1 → AP-1 の活性化が重要である。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 355 号 論文博	氏名	高松 玲佳
論文審査委員	審査日	平成 22年 2月 15日	
	主査教授	鈴木敏孝	
	副査教授	益崎裕章	
	副査教授	松崎吾朗	
(論文題目)			
Molecular characterization of <i>Legionella pneumophila</i> -induced interleukin-8 expression in T cells (T細胞における <i>Legionella pneumophila</i> 誘導性インターロイキン-8 発現の分子特徴)			
(論文審査結果の要旨)			
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究結果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
<p><i>Legionella pneumophila</i> はレジオネラ肺炎等の原因菌であり、通性細胞内寄生菌である。本菌が病原性を発揮するうえで重要な性質として肺胞マクロファージにおける増殖があげられる。また、本菌と最初に遭遇し、かつ接触の機会の多い肺胞上皮細胞への感染も注目されている。一方、免疫担当細胞である T 細胞のレジオネラ肺炎における役割は十分に解明されていない。そこで、T 細胞への <i>L. pneumophila</i> の感染とその後の細胞の反応（好中球遊走性ケモカイン IL-8 の産生）及び運命を明らかにするため、菌側の病原因子である鞭毛の構成タンパク質フラジェリンと殺菌に抵抗し、細胞内増殖を可能にする Dot/Icm トランスポーターと名付けられたIV型タンパク質分泌装置に着目し、宿主細胞に誘導されるシグナル伝達経路の解析を行った。</p>			
2. 研究内容			
T細胞として、ヒトT細胞性白血病細胞株 Jurkat と健常人末梢血より分離した CD4 陽性 T細胞を用いた。 <i>L. pneumophila</i> は、野生株 (Corby) とフラジェリン欠損株 (<i>flaA mutant</i>)、			

および野生株 (AA100jm) とIV型タンパク質分泌装置欠損株 (*dotO* mutant) を用いて、感染実験を行った。両野生株及び *flaA* mutant は T 細胞内で増殖したが、*dotO* mutant は増殖できず、*L. pneumophila* が T 細胞内で増殖するためにはIV型タンパク質分泌装置が不可欠であった。一方、上記菌株を用いた結果、IL-8 の発現誘導にはIV型タンパク質分泌装置よりもフラジェリンが重要であることがわかった。IL-8 遺伝子のプロモーター上に存在する NF- κ B 及び AP-1 結合配列の重要性を明らかにし、フラジェリン \rightarrow TLR5 \rightarrow MyD88 \rightarrow TAK1 のシグナル伝達経路が活性化されることを証明した。TAK1 の活性化は IKK \rightarrow NF- κ B の活性化を誘導する一方、p38 \rightarrow MSK1/MAPKAPK2 の活性化による CREB/ATF1 のリン酸化ならびに MKK4 \rightarrow JNK の活性化による c-Jun のリン酸化により AP-1 を活性化した。

また、*L. pneumophila* による T 細胞アポトーシス誘導機構についても解析した。*L. pneumophila* は Jurkat や活性化 T 細胞にアポトーシスを誘導した。アポトーシスの誘導にはフラジェリンとIV型タンパク質分泌装置の両者が必要であり、Akt の脱リン酸化に伴う GSK-3 β の活性化 \rightarrow β -catenin の分解と Bax の活性化ならびに XIAP の分解が caspase-9 \rightarrow caspase-3 の活性化を誘導することを明らかにした。

総括すると、*L. pneumophila* が T 細胞において、1) IV型タンパク質分泌装置を利用して細胞内で増殖すること、2) フラジェリン依存性に MyD88 \rightarrow TAK1 を活性化し、IKK、p38、JNK の活性化を誘導することで NF- κ B および AP-1 依存性に IL-8 を誘導すること、3) フラジェリンとIV型タンパク質分泌装置依存性に Akt の脱リン酸化を誘導する結果、ミトコンドリア経由のアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究はレジオネラ肺炎における T 細胞の役割と運命を示したもので、菌側の病原因子と宿主細胞におけるシグナル伝達経路との関連を詳細に解析し、細胞反応としての IL-8 発現誘導機構と細胞運命としてのアポトーシス誘導機構を明らかにした。レジオネラ研究における T 細胞の解析は新しい視点と位置づけられ、今後は Akt の脱リン酸化機構の解明に期待したい。行ったシグナル伝達経路の解析は緻密であり、*L. pneumophila* のIV型タンパク質分泌装置やフラジェリンが T 細胞に及ぼす影響を解析した貴重な報告である。国際的にも高水準のものであると評価される。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。