

平成 30 年 7 月 2 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08483

研究課題名(和文) 緑膿菌感染における5型分泌蛋白質EprSの役割の解明とワクチン抗原としての可能性

研究課題名(英文) EprS, an autotransporter serine protease, exerts pleiotropic effects on various pathogenic phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

木田 豊 (KIDA, YUTAKA)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30309752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：以前に、我々は、緑膿菌のオートトランスポーター分泌蛋白質の一つであるEprSが、プロテアーゼ活性化受容体を介して宿主の炎症応答を活性化するセリンプロテアーゼであることを報告した。しかし、緑膿菌の病原性におけるEprSの役割の解明は不十分であった。本研究では、EprSが緑膿菌の病原性に関与するかを検討するために、緑膿菌PA01野生型株とそのeprS破壊株の病原性に関連する様々な表現型について特性を解析した。その結果、EprSは、緑膿菌の生体内での毒力に重要な役割を担い、緑膿菌の病原性に関連する表現型に多面的な効果を発揮することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that EprS, an autotransporter serine protease of *Pseudomonas aeruginosa*, induces host inflammatory responses through protease-activated receptors. However, little is known about the role of EprS as a virulence factor of *P. aeruginosa*. In this study, to investigate whether EprS participates in the pathogenicity of *P. aeruginosa*, we characterized various pathogenic phenotypes of the wild-type PA01 strain and its eprS-disrupted mutant. Our results indicated that eprS plays a role in the growth of *P. aeruginosa* in the presence of limited nutrients such as a medium containing proteinaceous materials as the sole carbon and nitrogen source. Furthermore, the isogenic eprS mutant showed an attenuation of virulence in leucopenic mice as compared with the wild-type strain. Collectively, these results suggest that EprS exerts pleiotropic effects on various pathogenic phenotypes of *P. aeruginosa*.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 オートトランスポーター プロテアーゼ 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は、健常者には病原性の弱い日和見病原体であり、易感染宿主における術後感染症や院内感染症の起原菌として頻りに分離される。また、本菌は、各種抗菌薬による化学療法に対して耐性の傾向を示し、近年では多剤耐性緑膿菌による院内感染が問題となっている。従って、緑膿菌感染症対策の一つとして、ワクチンによる感染予防は重要であると考えられる。しかし、有効な緑膿菌ワクチンは現在のところ存在しない。

これまでに研究された緑膿菌ワクチンは、緑膿菌が産生する様々な病原性因子（エキソトキシン A, ペン毛, 線毛, リポ多糖体など）を免疫原としていたが、①全ての緑膿菌株に適用可能ではないこと、②感染防御効果が十分ではないこと、③発熱や免疫複合体の形成をはじめとする副作用が認められることなどの問題を抱えている。これらを解決する一つの方策として新たな免疫原の確立が挙げられることから、その候補として緑膿菌の 5 型分泌蛋白質が有用であるのかを検討することを考え、本研究の開始に至った。

## 2. 研究の目的

グラム陰性菌の 5 型分泌装置は、オートトランスポーター分泌系と two-partner 分泌系の二種類の経路から構成される。5 型分泌される蛋白質の多くは、病原性因子であるが、緑膿菌の病原性と 5 型分泌蛋白質との関係は、十分に理解されていない。我々は以前に緑膿菌オートトランスポータープロテアーゼ EprS が、塩基性アミノ酸残基の C 末端側を切断する基質特異性のセリンプロテアーゼであり、プロテアーゼ活性化受容体を介して炎症応答を誘導することを報告した。しかし、緑膿菌の病原性における EprS の役割は十分に理解されていない。そこで、本研究では、EprS が緑膿菌の病原性に果たす役割を解明することを目的として、緑膿菌 PAO1 野生型株 (PAO1 WT) とその *eprS* 破壊株 (PAO1  $\Delta eprS$ ) の病原性に関連する様々な表現型について比較を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種の培地における緑膿菌の増殖

緑膿菌 PAO1 野生型株 (PAO1 WT) とその *eprS* 破壊株 (PAO1  $\Delta eprS$ ) について各種の培地にて 37°C で振盪培養し、600nm における培養液の濁度を分光光度計によって経時的に測定することで各株の増殖を評価した。

### (2) 緑膿菌による各種の病原性因子の産生

緑膿菌の病原性に関するエラスターゼ、ピオシアニン、ピオベルジンの培養上清中への産生について調べた。エラスターゼの産生については培養上清と基質であるエラスチンコンゴレッドを 37°C で 6 時間反応させた後、生じた可溶性コンゴレッドを 490 nm での吸光度の測定によって定量する方法で評価した。また、ピオシアニンとピオベルジンの産生については、それぞれ 695 nm と 403 nm における培養上清の吸光度を測定することで評価した。

### (3) 緑膿菌によるオートインデューサーの産生

緑膿菌の各株を培養し、その培養上清をオートインデューサー誘導性ルシフェラーゼレポーター株である *Vibrio harveyi* BB886 に 30°C で 5 時間作用させた後、オートインデューサーの存在依存的に生じる発光をルミノメーターにより測定することで評価した。

### (4) 緑膿菌の運動性

緑膿菌の swimming, swarming, twitching 能評価するために、各株を 0.3, 0.5, 1.0% の寒天濃度の培地にそれぞれ接種した。25-37°C で 24 時間培養した後、各培地における菌株の増殖状態を観察した。

### (5) 緑膿菌による界面活性物質の産生

緑膿菌の各株を培養し、その培養上清をポリスチレン板の表面に滴下し、形成される液滴の状態を観察する drop collapse assay によって評価した。

### (6) マウスに対する緑膿菌の毒力

マウスに白血球減少症を誘導するために、シクロフォスファミドを投与して 4 日間飼育した。その後、そのマウスへ緑膿菌の各株を腹腔内感染させて、マウスの生存を経目的に 7 日間観察し、マウスの生存率を比較した。また、マウスに対する各株の半数致死量 (LD<sub>50</sub>) を算出した。

## 4. 研究成果

まず、EprS が緑膿菌の増殖に関するかを検討するために、単一の炭素及び窒素源としてアルブミンのみを含む最少培地や完全培地である LB 培地、また、タンパク質性の栄養源を含まない最少培地である VB 培地における緑膿菌の増殖を調べた。その結果、アルブミン培地では、PAO1  $\Delta eprS$  の増殖が PAO1

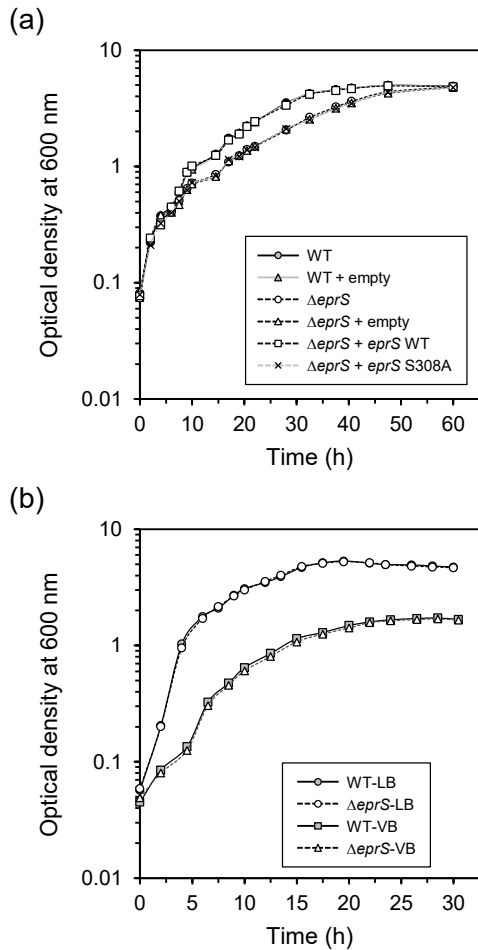


図1. 各種の培地における緑膿菌の増殖

WT よりも低下していたが (図 1 (a)), LB や VB 培地では、増殖の差は認められなかった (図 1 (b)). 従って、これらの結果から、*EprS* は、単一の炭素及び窒素源としてタンパク質性の物質が存在する条件下での緑膿菌の増殖に、一定の役割を担うことが示唆された。

次に、緑膿菌の病原性に関与するエラスターゼ、ピオシアニン、ピオベルジンの産生に、*eprS* の破壊が影響するかを調べた。その結果、PAO1  $\Delta eprS$  では、エラスターゼ、ピオシアニ

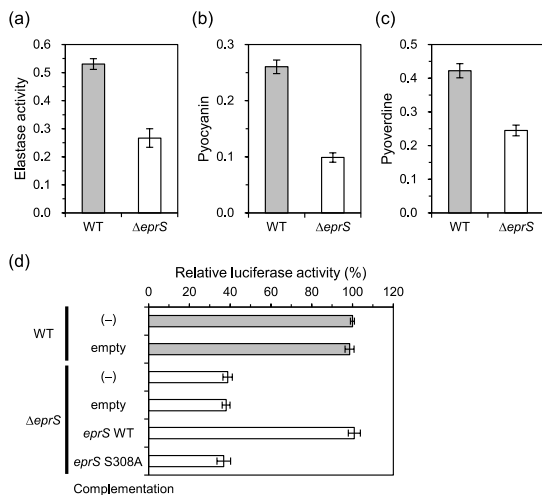


図2. 緑膿菌による分泌性因子の産生

ン、ピオベルジンの産生の減少が認められた (図 2 (a-c)). また、これらの分子の発現は、クオラムセンシングにより調節されることが知られているので、クオラムセンシングに関与するオートインデューサーの産生を、*V. harveyi* をレポーターとするバイオアッセイにより検討した。その結果、PAO1  $\Delta eprS$  ではオートインデューサー産生の低下が認められた (図 2 (d)).

緑膿菌の病原性には、本菌の運動性の関与が報告されている。そこで、*eprS* の破壊がべん毛による運動である swimming、べん毛と線毛による運動である swarming、線毛による運動である twitching に影響するかを調べた。その結果 (図 3)、PAO1  $\Delta eprS$  では、swimming と swarming 能が低下していたが、twitching 能は変化しなかった。また、緑膿菌の swarming 能は、本菌の界面活性物質の産生と関連することが報告されているので、PAO1 WT と PAO1  $\Delta eprS$  の界面活性物質の産生を drop collapse assay により半定量的に比較した。その結果 (図 4)、PAO1  $\Delta eprS$  では PAO1 WT よりも界面活性物質の産生を低下していることが認められた。

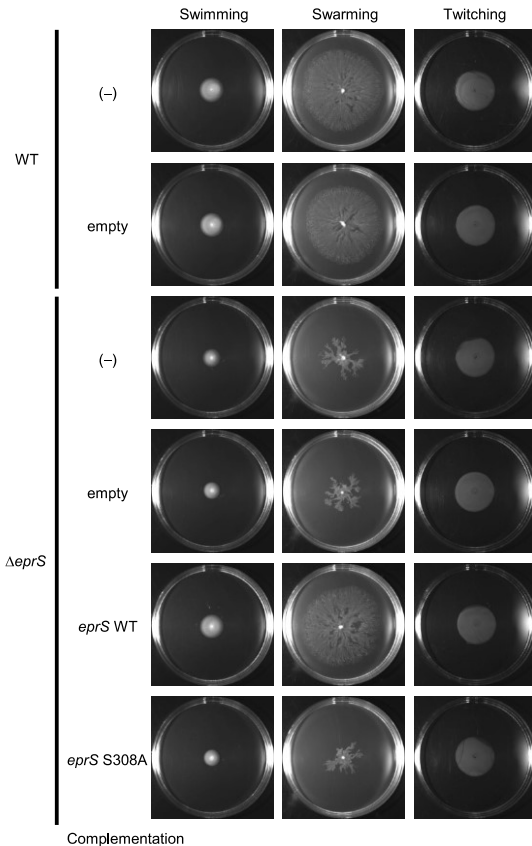


図3. 緑膿菌の運動性

マウスに対する緑膿菌の毒力に *eprS* の寄与があるかを検討した。この実験では、マウスにシクロfosファミドを投与して白血球減少症を誘導した後、マウスへそれぞれの

菌株を腹腔内感染させて、マウスの生存を観察した。その結果、 $5 \times 10^3$  から  $5 \times 10^5$  CFU の PAO1  $\Delta eprS$  の感染 (図 5 (b)) では、同菌数の PAO1 WT の感染 (図 5 (a)) よりも生存率が高く、PAO1  $\Delta eprS$  の LD<sub>50</sub> は PAO1 WT のそれよりも 17 倍程度高いことが示された。従って、これらの結果から、EprS は、緑膿菌の生体内での毒力に重要な役割を担うことが示唆された。

以上の結果から EprS は、緑膿菌の病原性に関連する表現型に多面的な効果を発揮することが示唆された。しかし、EprS によって直接的に影響を受ける標的分子は不明であることから、どのような標的分子が EprS によって影響を受けて各種の表現型に変化を生じるのかを解析する必要があると考えられた。

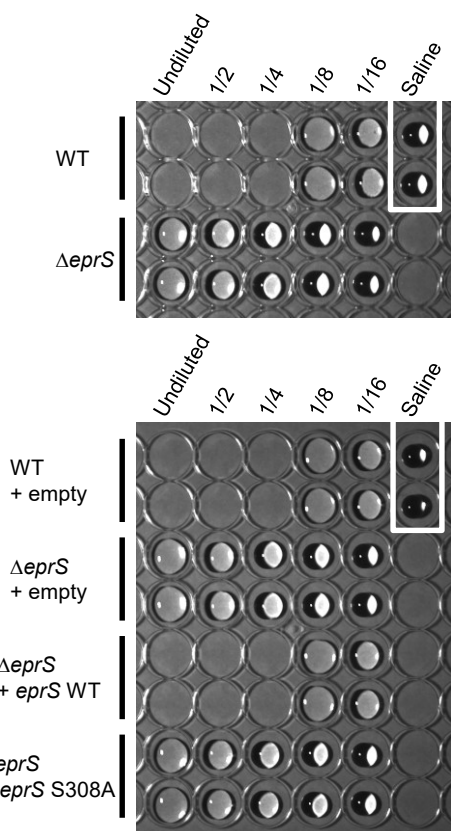


図4. 緑膿菌による界面活性物質の産生

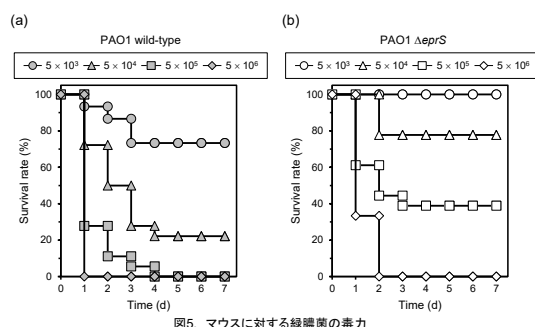


図5. マウスに対する緑膿菌の毒力

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Taira, J., Kida, Y., Inatomi, K., Komatsu, H., Higashimoto, Y., Sakamoto, H. Phosphorylation of clustered serine residues in the N-terminus of BPS domain negatively regulates formation of the complex between human Grb14 and insulin receptor. *J. Biochem.*, **162**(2), 113-122, (2017). doi: 10.1093/jb/mvx007. 査読：有
2. Yamamoto, T., Kida, Y., Sakamoto, Y., Kuwano, K. Mpn491, a secreted nuclease of *Mycoplasma pneumoniae*, plays a critical role in evading killing by neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.*, **19**(3), e12666, (2017). doi: 10.1111/cmi.12666. 査読：有
3. Yasuda, M., Nagata, S., Yamane, S., Kunikata, C., Kida, Y., Kuwano, K., Suezawa, C., Okuda, J. *Pseudomonas aeruginosa serA* gene is required for bacterial translocation through Caco-2 cell monolayers. *PLoS One*, **12**(1), e0169367, (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0169367. 査読：有
4. Kida, Y. Quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Kurume Med. Assoc.*, **79**(10-12), 274-282, (2016). Japanese. (<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=dm4kurum>) 査読：無
5. Sakai, Y., Qin, L., Miura, M., Masunaga, K., Tanamachi, C., Iwahashi, J., Kida, Y., Takasu, O., Sakamoto, T., Watanabe, H. Successful infection control for a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* outbreak in an advanced emergency medical service centre. *J. Hosp. Infect.*, **92**(4), 385-391, (2016). doi: 10.1016/j.jhin.2015.12.016. 査読：有
6. Kida, Y., Taira, J., Kuwano, K. EprS, an autotransporter serine protease,

plays an important role in various pathogenic phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **162**(2), 318-329, (2016). doi: 10.1099/mic.0.000228. 査読：有

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 木田 豊、山本 武司、坂本 勇一、桑野 剛一

病原性因子としての緑膿菌オートトランスポータープロテアーゼ EprS の役割  
第 68 回日本細菌学会九州支部総会、一般演題、2015 年 9 月 5 日、大分県別府市、ビーコンプラザ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木田 豊 (KIDA YUTAKA)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：30309752