

研究種目：若手（スタートアップ）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19890254  
 研究課題名（和文） アエロモナスのセリンプロテアーゼの成熟化過程におけるカルボキシ末端領域の役割  
 研究課題名（英文） Role of the Carboxy-terminal Region in Maturation of *Aeromonas sobria* Serine Protease  
 研究代表者 小林 秀丈 (KOBAYASHI HIDETOMO)  
 広島国際大学・薬学部・助教  
 研究者番号：70441574

## 研究成果の概要：

病原細菌である *Aeromonas sobria* が産生するセリンプロテアーゼ（ASP）の成熟化機構について研究を行った。ASP の成熟化にはシャペロン蛋白質（ORF2）との相互作用が必要である。本研究では ORF2 との相互作用に必要な ASP の領域を種々の変異遺伝子を作製して解析した。その結果、ASP のカルボキシ末端 519～591 番目の領域が ORF2 との相互作用に重要である事を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,240,000	0	1,240,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	330,000	2,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：アエロモナス、セリンプロテアーゼ、成熟化、細菌、毒素、酵素

## 1. 研究開始当初の背景

*Aeromonas* は、河川水などの自然環境中に広く生息している通性嫌気性グラム陰性桿菌である。*Aeromonas* は現在 18 菌種が知られている。これらの菌種のうち、活発な運動性を有し、中温域でよく増殖する菌種である *A. hydrophila* や *A. sobria* はヒトに下痢症を誘発する原因菌としてしばしば分離されてお

り、食中毒の起原因菌にも指定されている。

*Aeromonas* の主要な病原因子として数種の菌体外プロテアーゼが報告されており、特にセリンプロテアーゼは内因性のプロテアーゼカスケードを活性化するなど多様な病原効果を発揮する事が明らかにされている。

我々は、*A. sobria* の培養上清中に高いプロテアーゼ活性を見出し、その遺伝子を同定し

た。その結果、遺伝子には分子量約 64,000 のサブチリシン様セリンプロテアーゼ (*A. sobria* serine protease : ASP) がコードされている事を明らかにした。さらに、ASPの性状解析により、ASPは血管透過性亢進作用を示し、ASPによる血漿プレカリクレインの限定的な断片化が、その作用の引き金となる事を報告している。以上の事から、本菌感染症成立にASPは主要な病原因子であると考え、ASPに着目し研究を進めた。

## 2. 研究の目的

遺伝子解析により、ASPの遺伝子下流には open reading frame 2 (ORF2) がコードされている事を見出した。また、ORF2の機能は遺伝子欠損実験などにより、ASPの成熟化に関与している蛋白質である事が判明した。ASP及びORF2は菌体内で未成熟な形で生合成され、ペリプラスムへ移行する。そして、未成熟なASPはORF2との相互作用を介して活性化成熟体へと変換される。このようなASPの成熟化を助ける役割から、報告者はORF2をシャペロン蛋白質の一種であると考えた。しかし、両蛋白質がどのような分子機構で相互作用するのかが不明であったため、本研究ではORF2との相互作用に必要なASPの構造部位を解明する事を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ペプチドディスプレイ

ASPのどの領域がORF2蛋白質との相互作用に重要かを限定する目的で、ランダムペプチドディスプレイ法で解析した。標的蛋白質としてHis-tagが付加されたHis-tag ORF2をコーティングしたシャーレに、鞭毛の先端にランダムな12アミノ酸からなるペプチドを発現した大腸菌を添加した。数回の洗浄操作により非結合菌を取り除き、His-tag ORF2と

相互作用する結合菌を得た。結合菌のコロニーからプラスミドを精製し、鞭毛遺伝子中にコードされた12アミノ酸のDNA配列を決定した。この様にして得られた12アミノ酸の配列とASPのアミノ酸配列とを比較しORF2と相互作用するASPの領域を限定した。

### (2) Pull-down assay

ASP及びORF2の相互作用を、Ni sepharoseを用いたpull-down assayで解析した。*In vitro*蛋白質合成キットで、RIラベルしたHis-tag ORF2及びASPを合成した。合成後の反応溶液にbinding buffer (0.1 M PBS、0.1% Triton X-100 及び 0.5% Nonidet P-40)、100 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、及びNi sepharoseを加え、4°Cで2時間緩やかに振盪混和した。その後、binding bufferで2回、0.5 M NaCl-PBS溶液で1回、PBSで2回それぞれ洗浄後、100 mM imidazole-PBS溶液でNi sepharoseに結合した蛋白質を溶出した。溶出液にSDS-sample bufferを加え、SDS-PAGEで分離しオートラジオグラフィーで蛋白質のバンドを検出した。

### (3) プロテアーゼ活性の測定

ASPのプロテアーゼ活性の測定には、ASPが高い分解性を有する蛍光基質である(Boc)-Glu-Lys-Lys-MCA (Boc, *t*-butyloxy-carbonyl; MCA, 4-methylcoumarin-7-amides)を用いた。*In vitro*蛋白質合成後、反応溶液に2µlの10 mM Boc-Glu-Lys-Lys-MCA溶液、及び15 µlのリン酸緩衝液(pH 7.4)をそれぞれ加えた。水を加え150 µlとした後、37°Cで30分間インキュベーションした。その後、150 µlの1 M 酢酸溶液で反応を止めた。反応溶液中に遊離した7-amino-4-methyl coumarin (AMC)量を蛍光強度(測定波長 460 nm、励起波長 355 nm)として測定した。

#### 4. 研究成果

ランダムペプチドディスプレイで ORF2 と相互作用するペプチド配列を決定し、ASP のアミノ酸配列と比較した結果、得られたペプチド配列は ASP の 519~591 番目の領域との類似していた。この領域は ASP のカルボキシ末端領域に位置している。この結果から、ASP のカルボキシ末端領域は ORF2 との相互作用部位である事が予想された。

次に ASP のカルボキシ末端領域が ORF2 との相互作用に重要かどうかを解析する目的で、Ni sepharose を用いた pull-down assay を行った。もし、ASP が ORF2 と相互作用するならば、Ni sepharose と結合した His-tag ORF2 と共に ASP も共沈し、SDS-PAGE で両者のバンドが観察される。野生型 ASP と His-tag ORF2 を合成し pull-down assay を行った結果、His-tag ORF2 のバンドと共に ASP のバンドが検出された (図 1B)。同様に、ASP のカルボキシ末端から 1, 5, 6, 7, 8, 10, 82 個のアミノ酸が欠損した変異 ASP をコードする遺伝子を作製し、同様に解析した。その結果、ASP のカルボキシ末端から 1 及び 5 個欠損した変異 ASP では野生型 ASP と同様に His-tag ORF2 と共沈した ASP のバンドが検出された (図 1B)。一方、ASP のカルボキシ末端から 6, 7, 8, 10 及び 82 個欠損した変異 ASP の蛋白合成量は野生型 ASP と同じ量であるにも関わらず (図 1A)、pull-down assay を行うと ASP のバンドが検出されず、ORF2 と相互作用していない事がわかった (図 1B)。また、これらのサンプルにおけるプロテアーゼ活性を測定した結果、ORF2 と相互作用が検出されなかった変異 ASP では野生型 ASP の場合と比較して顕著に低い活性しか有していない事がわかった (図 1C)。以上の結果より、ASP のカルボキシ末端から 6 個以上の欠損は ORF2 との相互作用が妨げられる事により、

ASP の成熟化が進行しないと考察され、特にカルボキシ末端から 6 番目の構成アミノ酸である His595 はそのプロセスの進行に重要な残基であると考えられる。

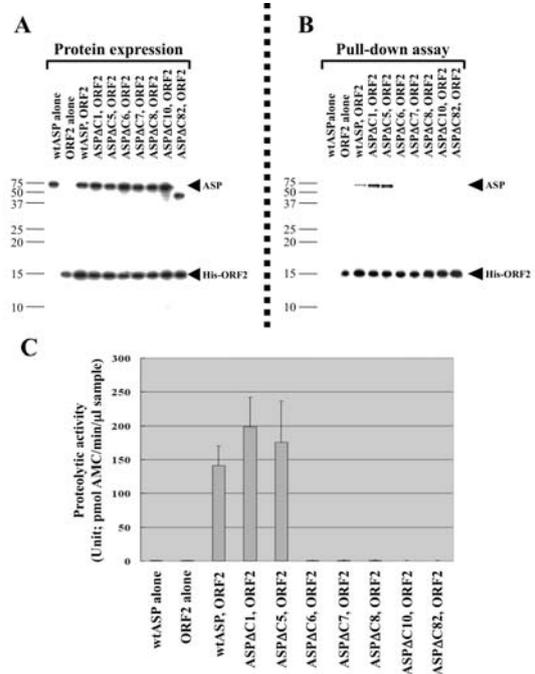


図 1. ASP の C 末端領域欠損による影響

A: 蛋白質合成後の SDS-PAGE による分離結果  
B: pull-down assay の結果 C: 蛋白質合成後の溶液のプロテアーゼ活性

さらに、ASP の 519~591 番目の領域の他のアミノ酸残基についてそれぞれ Ala に置換した変異 ASP を作製して pull-down assay を行った。その結果、Arg524, Gly527, Arg529, Arg532, Phe538, Glu541, Trp547, Arg559 の変異体で ORF2 との相互作用が阻害された (図 2)。よって、His595 に加えこれらのアミノ酸残基が ORF2 との相互作用に重要である事が示唆された。従って、ASP は上記の複数のアミノ酸残基を介して ORF2 と相互作用し、活性を有する成熟体へ変換されるのではないかと推察している (図 3)。

今後、ORF2 の構造解析を進めることによって上記の残基が ASP の成熟化に重要であることを検証できるのではないかと考えている。

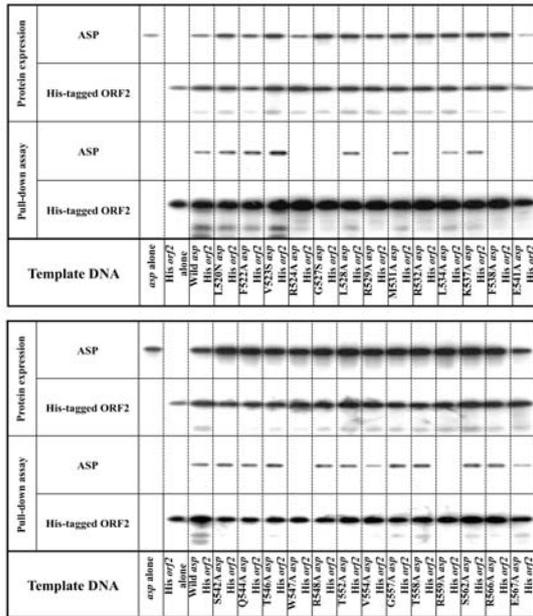


図2. ASPのC末端領域のアミノ酸残基をAlaに変異した影響  
in vitro 蛋白合成後、及び pull-down assay 後に SDS-PAGE を行い蛋白質のバンドを確認した。

ASPはカリクレイン／キニン系の活性化による血管透過性亢進作用を引き起こす。また、ASPはプロトロンビンを活性体トロンビンに変換する作用も有しており、血液凝固カスケードの亢進を引き起こす事が示されている。Aeromonas 感染症において、ASPのこれらの作用が感染宿主の生理機能に障害を与える大きな要因と考えられる。その為、ASPの成熟化機構の解明は、本菌感染症の予防や治療戦略を立てる上でも有用な情報を将来提供するものと考えている。

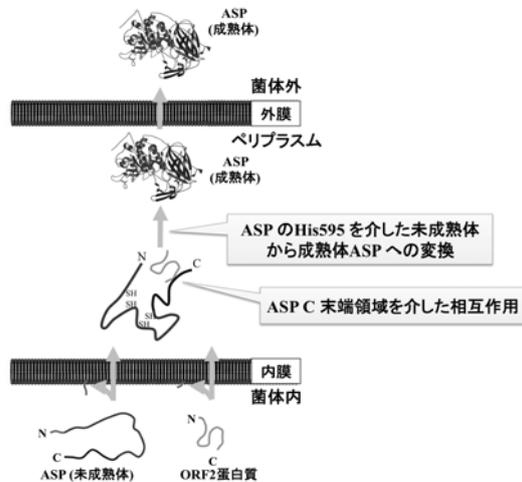


図3. ASPの成熟化様式の概要

## 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4件)

- ① Hiroyasu Yamanaka, Hidetomo Kobayashi, Eizo Takahashi, and Keinosuke Okamoto  
MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II.  
Journal of Bacteriology  
査読：有  
2008, **190**; 7693-7698
- ② Hidetoshi Nitta, Takahisa Imamura, Yoshihiro Wada, Atsushi Irie, Hidetomo Kobayashi, Keinosuke Okamoto, and Hideo Baba  
Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*.  
The Journal of Immunology  
査読：有  
2008, **181**; 3602-3608
- ③ Takahisa Imamura, Hidetoshi Nitta, Yoshihiro Wada, Hidetomo Kobayashi and Keinosuke Okamoto  
Impaired plasma clottability induction through fibrinogen degradation by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*.  
FEMS Microbiology Letters  
査読：有  
2008, **284**; 35-42
- ④ Hidetoshi Nitta, Hidetomo Kobayashi, Atsushi Irie, Hideo Baba, Keinosuke Okamoto, Takahisa Imamura  
Activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*.  
FEBS Letters  
査読：有  
2007, **581**; 5935-5939

[学会発表] (計9件)

- ① 小林 秀丈  
Aeromonas sobria セリンプロテアーゼの成熟化機構の解析  
日本薬学会第129年会  
平成21年3月27日  
国立京都国際会館
- ② 小林 秀丈  
Aeromonas sobria セリンプロテアーゼの成熟化機構の解析  
第8回日本細菌学会総会  
平成21年3月13日

- 名古屋国際会議場
- ③ 小林 秀丈  
*Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼの成熟化メカニズム  
第31回日本部分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会  
平成20年12月10日  
神戸国際展示場
- ④ 立石 亜里紗  
アエロモナスセリンプロテアーゼの成熟化機構の解析  
第48回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会  
平成20年11月8日  
岡山コンベンションセンター
- ⑤ 小林 秀丈  
*Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼの成熟化メカニズム  
第61回日本細菌学会中国・四国支部総会  
平成20年10月18日  
愛媛大学
- ⑥ 小林 秀丈  
*Aeromonas sobria* の産生するセリンプロテアーゼの成熟化機構の解析  
第55回毒素シンポジウム  
平成20年7月2日  
ラフォーレ山中湖
- ⑦ 小林 秀丈  
アエロモナスセリンプロテアーゼの成熟化におけるC末端領域の役割  
第81回日本細菌学会総会  
平成20年3月24日  
国立京都国際会館
- ⑧ 小林 秀丈  
アエロモナスセリンプロテアーゼの構造とC末端領域の機能に関する研究  
第46回日本薬学会中国四国支部学術大会  
平成19年11月11日  
高知市文化プラザ「カルポート」
- ⑨ 小林 秀丈  
*Aeromonas sobria* の産生するセリンプロテアーゼに関する研究  
第54回毒素シンポジウム  
平成19年9月6日  
犬鳴グランドホテル 紀泉閣

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 秀丈 (KOBAYASHI HIDETOMO)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：70441574

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし