

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790426

研究課題名(和文) 緑膿菌 5 型分泌装置由来の新規な分泌蛋白質の細胞接着性と感染防御抗原性の解析

研究課題名(英文) Roles of type 5 secretion system-derived proteins in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

木田 豊 (KIDA, YUTAKA)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30309752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円

研究成果の概要(和文)：日和見病原体である緑膿菌は、易感染性宿主に対して難治性を呈する様々な感染症を惹起し、近年では多剤耐性緑膿菌による院内感染が問題である。緑膿菌は、様々な細胞付随形ならびに分泌形の病原性因子を産生する。なかでも5型分泌蛋白質が緑膿菌の病原性に関与するのは十分に解明されていない。そこで、本研究では、緑膿菌5型分泌蛋白質の一種であるEprSが、病原性因子として機能するのかについて解析を行った。その結果、EprSは、塩基性アミノ酸残基のC末端側を切断する基質特異性を示す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が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic pathogen, is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised hosts. P. aeruginosa possesses an arsenal of both cell-associated (flagella, pili, alginate/biofilm, etc.) and secreted (exotoxin A, proteases, type 3 secretion system effectors, etc.) virulence factors. However, little has been known about the type 5 secretion system (T5SS)-derived proteins involving in the pathogenicity of this organism. In this study, we tried to elucidate whether EprS, an autotransporter protein, secreted via T5SS functions as a virulence factor of P. aeruginosa. Although EprS is predicted to encode a serine protease, there is no published experimental evidence to confirm this. Then, we performed functional analyses of recombinant EprS secreted by Escherichia coli. Our results indicated that EprS, a serine protease, exhibits the substrate specificity, cleaving at the carboxyl side of basic residues and induces host inflammatory responses through PARs.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 プロテアーゼ 感染 5型分泌

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は、健常者には本来病原性の弱い細菌であるが、易感性宿主に対して、難治性を呈する様々な感染症（呼吸器感染症、尿路感染症、熱傷部感染症、創傷感染症、敗血症など）を引き起こす。また、緑膿菌は、院内感染症の起因菌としても頻繁に分離され、各種の抗菌薬による化学療法に対して耐性の傾向を示す。さらに、近年では多剤耐性緑膿菌による院内感染が、社会問題となっている。従って、緑膿菌感染症対策の一つとして、ワクチンの開発は重要であると考えられる。しかし、今日までに開発された緑膿菌ワクチンは、その効果と副作用について種々の問題を抱えており、新規なワクチンの開発が望まれている。

グラム陰性菌は、1型から6型までの分泌装置を有する。緑膿菌には、4型分泌装置を除いた他の全ての分泌装置が備わる。中でも5型分泌装置 (T5SS) は、autotransporter (AT) 分泌とtwo-partner分泌 (TPS) の二種類の経路から成る。このT5SSによる蛋白質の分泌は、輸送される蛋白質が、自身のシグナルペプチド依存的にSec移送装置を介して内膜を通過、内膜を通過した蛋白質が、外膜に形成されたβ-バレル型のチャネルを通じて菌体外に輸送、という二段階の過程から成る。最終的に、菌体外に輸送された蛋白質は、自己消化や何らかのプロテアーゼにより切断後、菌体外に放出されるか、外膜の表面に結合した状態で存在する。あるいは、これら両方の場合も知られている。他の分泌装置と異なる特徴は、外膜輸送に利用されるβ-バレル型のチャネルである。これらが、輸送される蛋白質自身で形成される場合をAT分泌系、別個の蛋白質によって形成される場合をTPS系と呼ぶ。AT蛋白質は、分泌される機能領域のC末端側に、それ自身の外膜輸送領域が連結される。一方、TPS系では、分泌される機能蛋白質であるTpsAと、その特異的な輸送蛋白質であるTpsBの二種類の蛋白質から構成される。T5SSの外膜輸送領域は、異属間でも高い相同性を示すが、分泌される機能領域は、非常に多様性に富む。実際に、培養細胞やマウス等を用いた実験によって、性状が明らかにされた機能領域の多くは、酵素活性（プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、エステラーゼ）宿主侵入能、接着性、細胞毒性などの機能を有し、グラム陰性菌の病原性に関与すると考えられている。

緑膿菌 PAO1 株の全ゲノム配列の解析は、緑膿菌において3種類のAT分泌蛋白質

(PA0328, PA3535, PA5112) と6種類のTPS (TpsA-TpsB) 蛋白質 (PA0041-PA0040, PA0690-PA0692, PA2462-PA2463, PA2542-PA2543, PA4541-PA4540, PA4625-PA4624) が存在することを示唆している。それらの中でもAT分泌蛋白質であるPA0328とPA5112は、それぞれアミノペプチダーゼ、エステラーゼであることが示され、緑膿菌の病原性に関与する。また、TPS蛋白質では、PA0690とPA4625が、病原性因子として機能することが示された。以前に、私達は、TPS蛋白質の一つであるPA4541 (LepA) が、プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptors; PARs) を介して炎症応答を誘導することを報告した。また、シクロフォスファミド投与マウスを用いた緑膿菌急性全身感染モデルにより、LepAが生体内での緑膿菌の増殖と毒力に寄与することを明らかにした。一方、PA3535 (EprS) は、そのアミノ酸配列からセリンプロテアーゼであると予測されるが、実際の機能は明らかではなかった。そこで、本研究では、LepAのようにEprSが、緑膿菌の病原性に関与するのかを解明することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、緑膿菌のAT分泌蛋白質の一つであるEprSの機能解析を行うことで、EprSが緑膿菌の病原性因子であるのかを明らかにすることを目的とする。研究目的の達成のために、以下の研究項目を実施した。

- (1) 大腸菌における組換え体 EprS 発現系の構築と組換え体 EprS の精製
- (2) 組換え体 EprS の蛋白質分解活性と基質特異性の解析
- (3) 組換え体 EprS による PARs 活性化能の解析
- (4) ヒト細気管支上皮細胞株における組換え体 EprS の炎症応答誘導能の解析
- (5) 緑膿菌培養上清中の EprS の検出

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌における組換え体 EprS 発現系の構築と組換え体 EprS の精製

EprS のシグナルペプチドの下流に、ヒスチジンタグを挿入したアラビノース誘導性の発現ベクターを構築した。また、推定の活性中心であるセリン308をアラニンに置換した変異体の発現ベクターを構築した。発現ベクターを導入した大腸菌の培養上清から陰イオン交換カラムとニッケルキレートカラムを用いて、組換え体 EprS をほぼ単一まで

に精製した。

(2) 組換え体 EprS の蛋白質分解活性と基質特異性の解析

カゼインを基質として、組換え体 EprS の蛋白質分解活性を評価した。また、各種のプロテアーゼ阻害剤を添加した場合の蛋白質分解活性を調べた。さらに、蛍光標識ペプチドを基質として、組換え体 EprS の基質特異性を評価した。

(3) 組換え体 EprS による PARs 活性化能の解析

PARs 活性化能を評価するために、機能的な PARs を発現しない COS-7 細胞へヒト PARs 発現ベクターと NF- κ B レポーターベクターを導入した後、組換え体 EprS で刺激して、ルシフェラーゼアッセイにより NF- κ B 依存性プロモーターの活性化を調べた。

(4) ヒト細気管支上皮細胞株における組換え体 EprS の炎症応答誘導能の解析

ヒト細気管支上皮細胞株 EBC-1 を組換え体 EprS で刺激した場合に、IL-8 産生が誘導されるかを ELISA にて調べた。

(5) 緑膿菌培養上清中の EprS の検出

菌体外に分泌される EprS の 466-479 アミノ酸の合成ペプチドを抗原として、ウサギ抗 EprS ポリクローナル抗体を作製した。緑膿菌の培養上清に含まれる蛋白質を、ウェスタンブロッティングにより解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌における組換え体 EprS 発現系の構築と組換え体 EprS の精製

EprS 発現ベクターを導入した大腸菌の培養上清から陰イオン交換カラムとニッケルキレートカラムを用いて、組換え体 EprS をほぼ単一までに精製した。その分子量は、52-kDa を示し、EprS 菌体外領域の推定分子量の 51.2-kDa によく一致していた (図 1)。

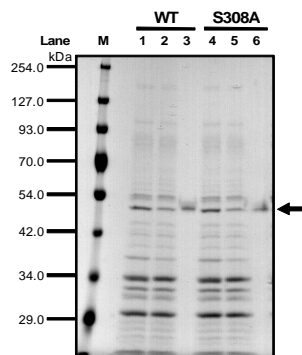
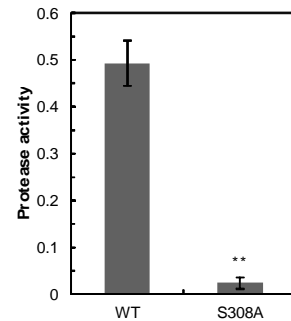


図1 組換え体EprSの精製
レーン1と4は、陰イオン交換カラム素通り画分。レーン2と5は、ニッケルキレートカラム素通り画分。レーン3と6は、精製組換え体EprS。

(2) 組換え体 EprS の蛋白質分解活性と基質特異性の解析

カゼインを基質として、精製組換え体 EprS の蛋白質

分解活性を測定した。図 2 に示すように、推定の活性中心であるセリン 308 をアラニンに置換した変異体では、野生型よりも活



性が顕著に低下していた。また、表 1 に示す

図2 組換え体EprSの蛋白質分解活性
**P<0.01 (WTと比較)

表1 プロテアーゼ阻害剤存在下における組換え体EprSの蛋白質分解活性

Inhibitor	Inhibitor class	Activity (%)
none		100
Benzamidine	Nonspecific	14.6 ± 0.8
PMSF	Serine	2.4 ± 0.5
Leupeptin	Serine/Cysteine	8.2 ± 0.8
Aprotinin	Serine	10.2 ± 0.8
Pepstatin	Aspartic	90.5 ± 1.9
EDTA	Metallo	94.6 ± 2.0
EGTA	Metallo	96.1 ± 1.3
1, 10-Phenanthroline	Metallo	98.3 ± 1.5
E-64	Cysteine	97.7 ± 1.6

ように、PMSF のようなセリンプロテアーゼ

の存在下では、活性の大幅な低下が認められた。このように、これらの結果は、EprS がセリンプロテアーゼであることを示唆している。また、表 2 に示すように、EprS は、アルギニンやリジンといった塩基性アミノ酸残基の C 末端側を好んで切断した。しかし、疎水性あるいは低分子量アミノ酸残基の C 末端側をほとんど切

表2 EprSの基質特異性

Substrate	Activity (%)
R-MCA	100
Z-FR-MCA	67.2 ± 0.9
Z-RR-MCA	58.6 ± 4.2
Z-LR-MCA	54.3 ± 2.1
Boc-FSR-MCA	45.6 ± 1.4
Boc-LGR-MCA	42.0 ± 1.0
K-MCA	38.4 ± 0.9
PFR-MCA	38.2 ± 2.1
Bz-R-MCA	29.9 ± 1.0
Boc-VLK-MCA	23.2 ± 1.0
Z-GPR-MCA	20.5 ± 1.5
Boc-VPR-MCA	10.4 ± 0.9
Boc-IEGR-MCA	7.0 ± 0.9
Z-Pyr-GR-MCA	2.1 ± 0.1
Suc(OMe)-AAPV-MCA	1.3 ± 0.2
Suc-GPLGP-MCA	0.8 ± 0.2
L-MCA	-
M-MCA	-
F-MCA	-
A-MCA	-
Suc-AAPF-MCA	-
Glt-AAF-MCA	-
Suc-LLVY-MCA	-
Suc-AAA-MCA	-
Suc-APA-MCA	-
Suc-GP-MCA	-
Pyr-MCA	-
GP-MCA	-

断しなかった。従って、これらの結果は、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を持つことを示している。

(3) 組換え体 EprS による PARs 活性化能の解析

トロンピンやトリプシンの様な塩基性アミノ酸残基の C 末端側を切断する活性を示すプロテアーゼは、PAR-1, -2, -4 を介して炎症応答を誘導することが報告されている。そこで、EprS が PAR-1, -2, -4 を介して炎症応答に重要な転写因子の NF- κ B を活性化するかを調べた。ヒト PAR-1, -2, -4 を、それぞれ

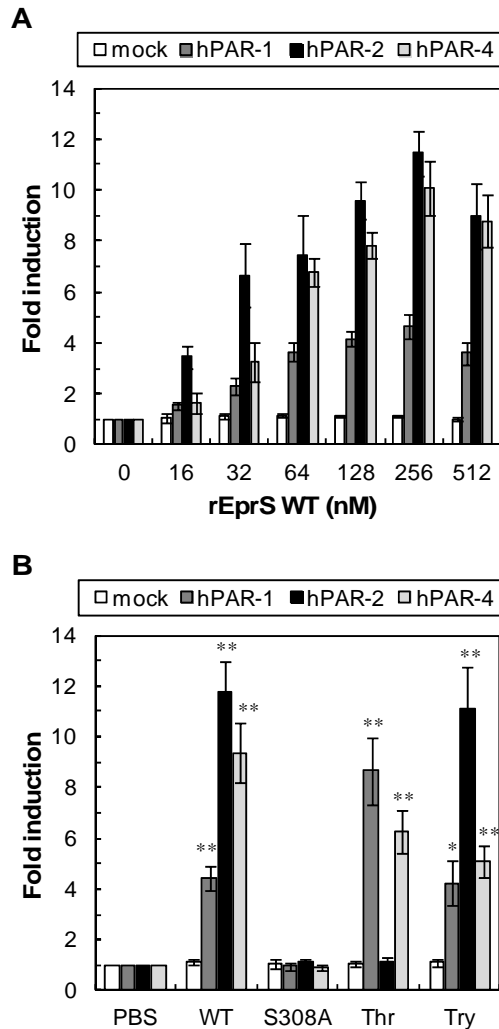


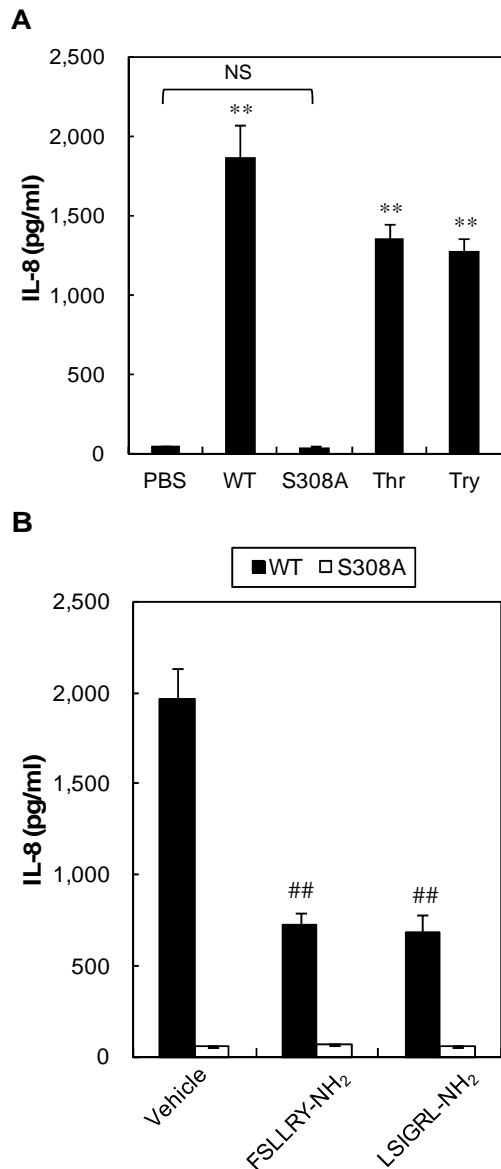
図3 EprSによるPARsを介したNF- κ Bの活性化
*P<0.05; **P<0.01 (刺激なしのコントロールと比較)

れトランスフェクションした COS-7 では、EprS の用量依存的に NF- κ B レポーターの活性化が認められた (図 3A)。一方、コントロールベクターのトランスフェクションでは、活性化を認めなかった (図 3A)。また、EprS による NF- κ B の活性化は、PAR-1, -4 を活性化するトロンピンと PAR-1, -2, -4 を活性化するトリプシンと同様に認められ (図 3B) プロテアーゼ活性を持たない変異体は、

NF- κ B を活性化しなかった (図 3B)。従って、これらの結果は、EprS が PAR-1, -2, -4 を介して炎症応答を誘導することを示唆している。

(4) ヒト細気管支上皮細胞株における組換え体 EprS の炎症応答誘導能の解析

ヒト細気管支上皮細胞株 EBC-1 に対する EprS の炎症応答誘導能について、IL-8 の産生を指標として調べた。EprS はトロンピンやトリプシンと同様に IL-8 産生を誘導し、プロテアーゼ活性を持たない変異体では、IL-8 産生の誘導を認めなかった (図 4A)。また、EprS による IL-8 産生の誘導に、PAR の関与があるかを調べるために、PAR-2 アンタゴニストペプチドや抗 PAR-2 モノクローナル抗体で EBC-1 を前処理した後、EprS で刺激を加えて IL-8 の産生量を測定した。その結果、アンタゴニストペプチド (図 4B) やモノクローナル抗体 (図 4C) での処理は、



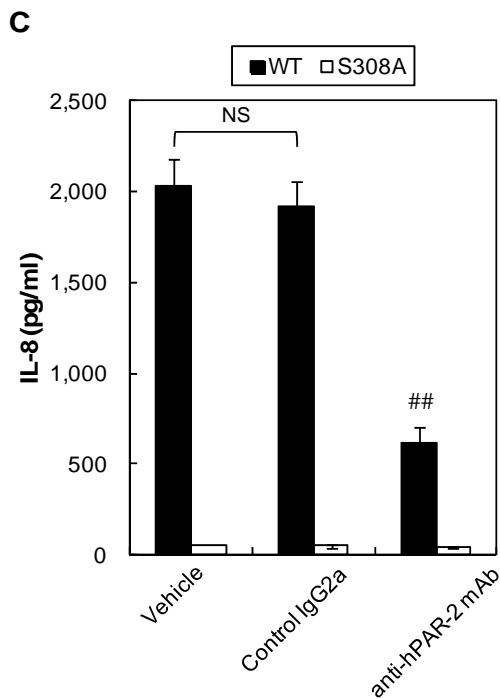


図4 EprSのIL-8産生誘導能
*P<0.05; **P<0.01 (刺激なしのコントロールと比較)
*P<0.05; **P<0.01 (PAR-2活性化阻害物非存在下でのEprS刺激ありと比較)

EprS による IL-8 産生の誘導を抑制した。このように、これらの結果は、EprS の蛋白質分解活性が IL-8 産生の誘導に必要であることを示している。加えて、EprS は、PAR-2 を介した IL-8 産生の誘導能を持つことが示唆された。

(5) 緑膿菌培養上清中の EprS の検出

緑膿菌が培養上清中に EprS 菌体外分泌領域を分泌するかを、菌体外に分泌される EprS の 466-479 アミノ酸の合成ペプチドを抗原として作製した抗 EprS 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した(図5)。まず、レーン1と2に示されるように、作製した抗体が、大腸菌から精製された EprS を認識できることを確認した。そして、レーン3のように、緑膿菌の野生型株の培養上清中に EprS を検出したが、*eprS* 破壊株ではそのバンドは検出されなかった。さらに、レーン6に示されるように、*eprS* 破壊株を *eprS* 発現プラスミドで相補すると、EprS が検出された。これらの結果から、緑膿菌が培養上清中に EprS 菌体外分泌領域を分泌していることを確認できた。

以上の結果をまとめると、緑膿菌 AT 蛋白質の一つである EprS は、塩基性アミノ酸残基の C 末端側を切断する基質特異性を示すセリンプロテアーゼであり、PARs を介して

炎症応答を誘導することが明らかになった。

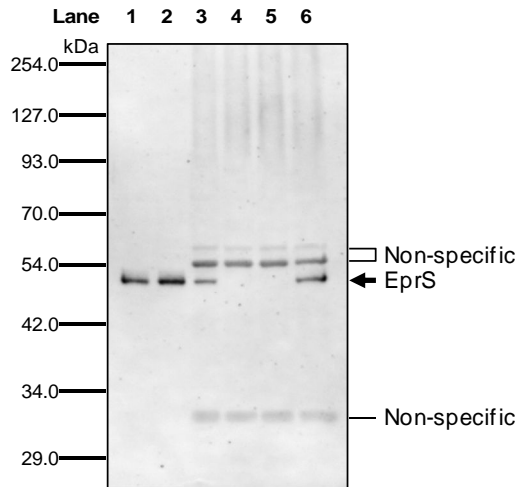


図5 緑膿菌培養上清中のEprSの検出
レーン1は野生型組換え体EprS。レーン2は変異型組換え体EprS。
レーン3は緑膿菌野生型株の培養上清蛋白質。レーン4は緑膿菌*eprS*
破壊株の培養上清蛋白質。レーン5は緑膿菌*eprS*破壊株を空ベクター
で相補。レーン6は緑膿菌*eprS*破壊株を*eprS*発現ベクターで相補。

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. Shimizu, T., Kimura, Y., Kida, Y., Kuwano, K., Tachibana, M., Hashino, M., Watarai, M.
Cytadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4. *Infect. Immun.*, 82(7), 3076-3086, (2014). 査読：有
2. Qin, L., Kida, Y., Ishiwada, N., Ohkusu, K., Kaji, C., Sakai, Y., Watanabe, K., Furumoto, A., Ichinose, A., Watanabe, H.
The relationship between biofilm formations and capsule in *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Chemother.*, 20(3), 151-156, (2014). 査読：有
3. Kida, Y.
Roles of *Pseudomonas aeruginosa*-derived proteases as a virulence factor. *Nihon Saikingaku Zasshi*, 68(4), 313-323, (2013). Japanese. 査読：無
4. Taira, J., Kida, Y., Kuwano, K., Higashimoto, Y.

Protein phosphatase 2a dephosphorylates phosphoserines in nucleocytoplasmic shuttling and secretion of high mobility group box 1. *J. Biochem.*, 154(3), 299-308, (2013).
査読：有

5. Kida, Y., Taira, J., Yamamoto, T., Higashimoto, Y., Kuwano, K. EprS, an autotransporter protein of *Pseudomonas aeruginosa*, possessing serine protease activity induces inflammatory responses through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.*, 15(7), 1168-1181, (2013).
査読：有
6. Qin, L., Kida, Y., Imamura, Y., Kuwano, K., Watanabe, H. Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Chemother.*, 19(2), 261-271, (2013).
査読：有

〔学会発表〕(計6件)

1. 木田 豊
病原性因子としての緑膿菌プロテアーゼの役割
日本薬学会第135年会、一般シンポジウム、2015年3月28日、兵庫県神戸市、神戸学院大学
2. 木田 豊、山本 武司、桑野 剛一
緑膿菌の病原性因子としてのEprSオートトランスポータープロテアーゼの役割
第88回日本細菌学会総会、一般演題、2015年3月26日、岐阜県岐阜市、長良川国際会議場
3. Yutaka Kida
Role of bacterial proteases in pathogenesis
第12回日韓国際微生物学シンポジウム、国際シンポジウム、2014年3月25日、東京都江戸川区、タワーホール船堀
4. 木田 豊、山本 武司、桑野 剛一
緑膿菌オートトランスポータープロテアーゼ EprS の機能解析

第66回日本細菌学会九州支部総会、一般演題、2013年9月6日、長崎県長崎市、長崎大学医学部良順会館

5. 木田 豊、山本 武司、桑野 剛一
緑膿菌オートトランスポータープロテアーゼ EprS の機能解析
第86回日本細菌学会総会、一般演題、2013年3月18~20日、千葉県千葉市、幕張メッセ国際会議場
6. 木田 豊、山本 武司、桑野 剛一
緑膿菌オートトランスポータープロテアーゼ EprS の機能解析
第65回日本細菌学会九州支部総会、一般演題、2012年8月25日、沖縄県那覇市、ぶんかテンプス館

6. 研究組織

(1)研究代表者

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