

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18926

研究課題名(和文)腸管感染細菌が惹起する劇症型感染症の発症機構と分子疫学解析

研究課題名(英文)The role of *Aeromonas sobria* serine protease in the *Aeromonas* infection and its molecular epidemiological analysis

研究代表者

小林 秀丈 (KOBAYASHI, Hidetomo)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：70441574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：*Aeromonas sobria*が菌体外に産生するセリンプロテアーゼ(ASP)に注目し、ASPの腸管組織への作用や基質特異性を調べると共に、種々の株のASP産生性やジェノタイプを調べる実験系の確立を目指した。その結果、以下の知見を得た。1) ASPは腸管組織における細胞間接着因子として知られるNectin-2やafadinに作用し、腸管組織のバリア機能を破壊することを明らかにした。2) 基質の分子認識において、ASPの566位のアルギニン残基は重要な役割を担っていることを明らかにした。3) 種々の*Aeromonas*株を用い、ASPの産生性やジェノタイプを調べる実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：*Aeromonas sobria* is known as a causative agent evoking gastroenteritis. In severe cases, however, extra-intestinal diseases such as sepsis may occur especially in compromised host. To clarify the role of the extracellular serine protease produced by *A. sobria* (ASP) in the development of extra-intestinal infection, we investigated the effect of ASP on intestinal tissue using cultured cells. We further studied the substrate specificity of ASP and also examined the productivity of ASP among several strains. As a result, the following findings were obtained. 1) ASP acts on intestinal cell-cell adhesion factors such as nectin-2 and afadin, and destroys the epithelial barrier function of intestinal tissue., 2) We found that the Arg-566 residue of ASP plays an important role in molecular recognition of substrate., 3) We established an experimental system to investigate the ASP production and genotype of various *Aeromonas* strains.

研究分野：腸管感染細菌由来病原因子の機能解析

キーワード：*Aeromonas* プロテアーゼ 上皮バリア 基質特異性 分子疫学

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における食中毒による罹患者数は毎年2万人を超え、その半数以上が細菌やウイルスによるものである。さらに一部の細菌性食中毒では腸管感染にとどまらず、菌が全身に移行するなど重症化するケースも報告されている。その中でも *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* による感染ではしばしば四肢の壊死を伴った劇症型感染症へと進展している。そのことから、これらの菌は『ヒト食いバクテリア』としても警戒されている。Tangらは、劇症型 *Aeromonas* 感染を発症した患者91名を調べた結果、基礎疾患に癌を持つ患者が40名(38.5%)、肝炎・肝硬変を持つ患者36名(34.1%)いたことを明らかにし、劇症化と癌や肝臓障害との関連性を指摘している(Tang HJ *et al.*, PLoS ONE, 2014)。我が国においてもがんや肝硬変の罹患者率は増加傾向にあることから、これらの細菌による感染症が重症化するリスクが高まっている。

細菌による組織浸潤は、感染病巣である上皮から細胞間隙を通り組織側へと菌が移行することにより引き起こされる。*Aeromonas* 属の細菌でも同様の侵入経路が考えられる。しかし、細胞間隙には細胞間結合による強固なバリアが存在しており、通常では細菌などの異物は侵入できない構造になっている。近年、いくつかの細菌の産生する菌体外毒素が細胞間結合を弱めることが報告されている。*Aeromonas* 属の細菌でも菌体外毒素が細胞間結合の破壊に寄与していると推察されるが、これまで *A. hydrophila* で溶血毒素が関与しているとの報告があるのみで、他の毒素による解析は進んでいない。そこで、これまでに報告者は *Aeromonas* の組織侵入に関わる因子について解析を行ってきた。その結果、*A. sobria* の菌体外セリンプロテアーゼ(ASP)が上皮バリア破壊を引き起こす因子であることを明らかにした。そこで、今回ASPによる上皮バリア破壊機構について解明し、菌の組織侵入におけるASPの役割について明らかにすることを旨とする。さらに、ASPの基質認識機構や種々の *Aeromonas* 菌株におけるASP産生性と菌の遺伝子型について解析し、将来高病原性菌の検出技術への応用を目指す。

## 2. 研究の目的

これまでに報告者は *A. sobria* における上皮細胞バリアの破壊に菌体外セリンプロテアーゼ(ASP)が関わることを明らかにした。上皮バリアは細胞間結合が重要で細胞表面の細胞間結合分子がその役割を担っている。そこで、本研究ではASPが作用する細胞間結合分子を同定し、菌の組織浸潤におけるASPの役割について解明を試みる。

これまでの研究でASPは基質特異性の高いプロテアーゼであることがわかっている。このようなASPの高い基質特性は病原発現に重要であると考えており、今回ASPの基質分

解に重要なASPの構造について解明を試みた。以前、報告者らはASPが *Vibrio* 属細菌など近縁の細菌で広く保存されていることを報告した(Kobayashi *et al.*, J. Biol. Chem., 2015)。今回、上述のテーマに加えて、ASP産生菌の分布やパルスフィールド電気泳動法を用いた菌の遺伝子型の決定を行う。将来、本研究による知見が高病原細菌株の検出技術の確立に応用されることを期待している。

## 3. 研究の方法

### (1) 上皮バリア破壊におけるASPの標的分子の特定

腸管上皮細胞T84細胞に500 nM ASPを3時間作用させた後、細胞抽出溶液を調製した。SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離後、ニトロセルロース膜へ転写した。タンパク質の検出は種々の細胞間接着分子の抗体を作用させた、化学発光によりバンドを検出した。

T84細胞をトランスウェルに培養し、種々の濃度のASPで3時間処理後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷やしたメタノールで細胞を固定した。1% BSA溶液でブロッキング後、細胞間接着分子の抗体を作用させた。さらに、蛍光標識二次抗体を作用後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。

### (2) ASPの基質認識に重要なアミノ酸残基の特定

ASPの基質認識に重要なアミノ酸残基を特定する目的でASPの活性中心のエントランスに位置する566位のアルギニン残基をアラニンに置換した変異体ASPを作製した。精製した変異体ASPと野生型ASPを用いて合成基質や生体基質(高分子キニノーゲン、プレカリクレイン)に対する分解活性を測定した。

### (3) *Aeromonas* 分離株におけるASP産生性の解析

*Aeromonas* 分離株109菌株におけるASP産生性を確認した。ASPで特異的に分解される基質を用いて菌の培養上清中へのASPの産生性を調べた。さらに、ASP抗体を用いたウェスタンブロット解析によりASPのバンドを検出した。

### (4) パルスフィールドゲル電気泳動による *Aeromonas* 分離株の遺伝子型の決定

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により *Aeromonas* 分離株109菌株における遺伝子型を決定した。*Xba*Iで切断した染色体遺伝子断片をPFGEで分離した。得られたバンドパターンから解析ソフト(GelComper2)で系統樹を作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 上皮バリア破壊におけるASPの標的分子の特定

ASP処理細胞より細胞抽出溶液を調整し、種々の細胞間結合分子の抗体を用いたウェ

スタンプロット解析を行った。その結果、ASP 処理細胞では nectin 2 や afadin の抗体で検出されるバンドが未処理細胞のものと比較して、強度が低下していた。その結果、ASP はこれらの分子に作用していると考えられる。そこで、次に ASP 処理細胞を同様の抗体で細胞免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、ASP 処理細胞で nectin 2 や afadin の蛍光像の減弱が観察された。このことから、ASP は nectin 2 や afadin に作用し上皮バリア破壊を引き起こすことが推察される。

#### (2) ASP の基質認識に重要なアミノ酸残基の特定

以前、報告者は ASP の構造解析を行い ASP は Kexin ファミリーのプロテアーゼであること明らかにした (Kobayashi *et al.*, J. Biol. Chem., 2009)。Kexin ファミリーのプロテアーゼは基質特異性が高く生体でプロセッシング酵素として機能することが知られている。ASP もまた基質特異性の高い酵素であることが明らかになっていたが、酵素の基質認識機構については十分な知見が得られていない。そこで、今回 ASP の基質認識に重要なアミノ酸残基を特定して酵素の基質認識機構の解明を試みた。ASP の構造解析より ASP の 566 番目のアルギニン残基が基質認識に重要であることが推察された。そこで、この残基をアラニンに変異させた ASP を用いてペプチド基質並びに生体基質に対する分解活性を野生型 ASP と比較した。その結果、ペプチド基質の分解性については変異体 ASP は野生型 ASP と比較して P3 のアミノ酸残基の選択性が変化することが明らかになった。さらに、生体基質として高分子キニノーゲンやプレカリクレインの分解活性について解析した結果、変異体 ASP では野生型 ASP と比較して分解活性が低下することが明らかになった。これらの結果から ASP の 566 位のアミノ酸残基は基質認識に重要であることが明らかになった (Kobayashi *et al.*, PLoS ONE 2017)。

#### (3) *Aeromonas* 分離株における ASP 産生性の解析

研究室に保存された *Aeromonas* 分離株 109 菌株について ASP の産生性を解析した。ASP の産生性は ASP の特異的基質 (Boc-Glu-Lys-Lys-MCA) の分解性と ASP 抗体を用いたウェスタンブロット解析により決定した。その結果、30 株/109 株 (27.5%) で ASP の産生性が陽性と判定された。今後、ASP 産生性が陽性の菌株について病原性の評価を行う予定である。

#### (4) パルスフィールドゲル電気泳動による *Aeromonas* 分離株の遺伝子型の決定

*Aeromonas* 分離株 109 菌株の染色体遺伝子を *Xba*I で切断した断片を PFGE により分離した。得られたバンドパターンから解析ソフト

(GelComper2) で系統樹を作成した。その結果、研究室で保存される菌株間での遺伝子の保存性は低く、関連性を見出すことができなかった。今回、採取地域や時期が様々な菌株を用いて実験しているため、*Aeromonas* では採取地域や時期ごとに様々なクローンが存在することが示唆された。今後、同一の採取地域や時期から分離された *Aeromonas* について解析して、地域ごとに分離される遺伝子型を決定する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kobayashi H, Otsubo T, Teraoka F, Ikeda K, Seike S, Takahashi E, Okamoto K, Yoshida T, Tsuge H, Yamanaka H, Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity, PLOS ONE, 査読有, 12, 2017, e0186392. (doi:10.1371/journal.pone.0186392)

〔学会発表〕(計 10 件)

小林秀文, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas* セリンプロテアーゼによる腸管上皮バリア破壊機構の解析, 第 28 回微生物シンポジウム, 2016 年 9 月 2-3 日, 愛知

小林秀文, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼの腸管上皮バリア破壊機構の解析, 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2016 年 10 月 15-16 日, 香川

小林秀文, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas sobria* の上皮バリア破壊における菌体外プロテアーゼの役割, 第 50 回腸炎ビブリオシンポジウム 2016 年 10 月 20-21 日, 大阪

小林秀文, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas* の組織浸潤におけるセリンプロテアーゼの役割, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 19-21 日, 宮城

小林秀文, 清家総史, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas* の菌体外プロテアーゼによる腸上皮バリア破壊機構の解析とその産生機構に関する研究, 第 64 回トキシンシンポジウム, 2017 年 7 月 10-12 日, 兵庫  
清家総史, 小林秀文, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas* 属菌の組織侵入機構の解析, 第 70 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2017 年 10 月 14-15 日, 広島

甲斐雄貴, 小林秀文, 清家総史, 吉田徹, 宮川拓也, 田代充, 高橋栄造, 岡本敬の介, 津下英明, 田之倉優, 山中浩泰, *Aeromonas* の産生する菌体外プロテアーゼの産生機構に関する研究, 第 56 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, 2017 年 10 月 21-22 日, 徳島

古田典滉, 小林秀文, 清家総史, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰, *Aeromonas* の組織侵入に関わる菌体外プロテアーゼの役割, 第 56 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，2017 年 10 月 21-22 日，徳島

清家総史，小林秀文，高橋栄造，岡本敬の介，山中浩泰，T84 細胞の培養上清に存在する *Aeromonas* による Biofilm の形成を阻害する因子について，第 91 回日本細菌学会総会，2018 年 3 月 27-29 日，福岡

小林秀文，大坪忠宗，寺岡文照，池田潔，清家総史，高橋栄造，岡本敬の介，吉田徹，津下英明，山中浩泰，Involvement of the Arg-566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity，第 91 回日本細菌学会総会，2018 年 3 月 27-29 日，福岡

〔その他〕

ホームページ等

PLOS ONE に掲載された ASP の基質特異性に関する報告

[http://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/m\\_microbiological\\_cat/announce/](http://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/m_microbiological_cat/announce/)

ASP の基質特異性に関する論文が Biomedical Advances に紹介

<http://biomedical-advances.org/ep-20182-8/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

小林 秀文 (KOBAYASHI, Hidetomo)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：70441574