

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790422

研究課題名（和文） 食塩によるアエロモナスの菌体外毒素産生抑制機構の解析

研究課題名（英文） Inhibitory effect of NaCl on the production of extracellular proteins by *Aeromonas* spp.

研究代表者

高橋 栄造（TAKAHASHI EIZO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70379733

研究成果の概要（和文）：

本研究では下痢原因菌であるアエロモナスが食塩存在下ではメタロプロテアーゼ、リパーゼを正常に産生できない原因の解明を試みた。食塩によるメタロプロテアーゼ遺伝子の転写阻害には LysR タイプ転写調節因子が関与するのではないかと推測し、欠損株を作製したが転写阻害は見られなかった。一方、リパーゼは食塩存在下でも遺伝子は転写されているがリパーゼ産生が低下する事、また、わずかに産生されたリパーゼは活性を示さない事が分かった。

研究成果の概要（英文）：

Aeromonas, which is a causative agent of diarrhea of adults and children, could not produce active metalloprotease and lipase in the medium containing 3% NaCl, though it could produce them under physiological condition. In this study, we constructed the mutant strain in which the gene encoding LysR type transcriptional factor is deleted and examined whether the deletion of LysR affects the production of metalloprotease. The results show that LysR type transcriptional factor is not involved in production of metalloprotease. Additionally, we found the lipase gene is transcribed in the medium containing 3%NaCl as well as in the medium 0.5% NaCl, though production of lipase is reduced under salty condition. And we showed that the lipase produced slightly in the medium containing 3%NaCl is denatured.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：病原性、病原毒素、アエロモナス(エロモナス)、プロテアーゼ、リパーゼ、NaCl、

1. 研究開始当初の背景

細菌は様々な菌体外蛋白質を産生する。これら菌体外蛋白質のうち、菌体外毒素は宿主

感染時には宿主体内で作用し、病気を引き起こす原因となる。しかし、遊離栄養素の乏しい自然環境中では、このような菌体外毒素は菌の増殖に必要な栄養を外界から獲得したり、生息に適した環境を整えるのに機能すると考えられ、毒素の産生能力は細菌の生存と密接に関連する。

アエロモナス(エロモナス)は河川や湖沼などの淡水中に広く生息する通性嫌気性グラム陰性桿菌であり、しばしば下痢の原因菌として分離される。アエロモナスは淡水中では多数存在するのに対し、海水中ではその菌数が減少する。しかし、試験管内では海水と同じ 3%食塩を含む培地中でアエロモナスは増殖できることから、海水中で本菌が減少する原因は毒素産生が抑制され、栄養の獲得が効率的に行えない、もしくは海水中に生息する他の微生物(原生動物など)による捕食に抵抗できなくなっているのではないかと考えた。そこで、これまでに *Aeromonas sobria* の 3%食塩存在下での毒素産生を調べた結果、以下の現象を見いだした。

- (1) 食塩存在下でも溶血毒は産生するが、プロテアーゼは正常に産生できない。
- (2) セリンプロテアーゼは生合成されるが、食塩により成熟化過程が阻害され、活性化成熟体を構築できない。
- (3) メタロプロテアーゼは食塩により遺伝子の転写が阻害されるため、蛋白質が生合成されていない。
- (4) 食塩存在下での培養上清はプロテアーゼ活性同様に、リパーゼ活性も検出されない。

本研究では(3)(4)についてより詳細な解析を行う事にした。

2. 研究の目的

細菌の産生するプロテアーゼは環境中の蛋白質を菌が利用可能なアミノ酸やペプチドにまで分解する。同様に、リパーゼは脂質を分解する事で利用可能な栄養の獲得に寄与すると考えられる。本研究では、アエロモナスが食塩存在下ではプロテアーゼ、リパーゼを正常に産生できない原因を明らかにする事を目的とした。すなわち、(1) 食塩によるメタロプロテアーゼ遺伝子転写阻害の原因を明らかにする。(2) 食塩存在下で産生抑制される菌体外リパーゼを同定した後、食塩存在下で、リパーゼの産生抑制の原因について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 食塩によるメタロプロテアーゼ遺伝子の転写阻害について

① メタロプロテアーゼ遺伝子上流領域のうち、遺伝子発現に関連するに領域の決定

A. sobria 288 株 DNA をテンプレートにメ

タロプロテアーゼ遺伝子を含む DNA 断片を PCR 増幅し、プラスミドに挿入した。DNA 断片に含まれる遺伝子上流領域がそれぞれ異なる長さになるようにプライマーを設計し、それら DNA 断片をプラスミドに挿入した。作製したプラスミドをメタロプロテアーゼ非産生性の *A. sobria* に形質転換し、得られた形質転換株の 0.5%および 3%食塩存在下でのメタロプロテアーゼ産生を調べた。メタロプロテアーゼの産生は特異的抗血清を用いたイムノブロットング法を用いて行った。

② メタロプロテアーゼ遺伝子下流にコードされる LysR タイプ転写調節因子の欠損株の作製

A. sobria 288 メタロプロテアーゼ遺伝子の周辺の塩基配列を解析した結果、メタロプロテアーゼ遺伝子の下流には LysR タイプ転写調節因子(LTR)をコードする遺伝子が存在することが分かった。また、メタロプロテアーゼ遺伝子の開始コドンから-30~-16bp の領域には LTR が認識する LTR box(ATC-N9-GAT)が存在する事が明らかとなった。LTR は様々な菌種で報告されている転写調節因子であり、その転写調節機能には co-factor を必要とする。LTR の中には Na イオンを co-factor とするものも報告されていることから、メタロプロテアーゼ遺伝子の転写調節、特に食塩による転写阻害にこの LTR が関与するのではないかと考えた。そこで、この LysR 欠損株を作製し、メタロプロテアーゼの産生が野生株に比べ、変化するかどうかを調べた。LysR 欠損株は相同組換え法を利用して作製した。

(2) 菌体外リパーゼの食塩による産生抑制について

① 食塩により産生抑制される菌体外リパーゼの精製, および遺伝子塩基配列の決定

食塩存在下で菌体外産生量が減少する蛋白質を精製し、N 末端アミノ酸配列、分子量を決定した。それらの情報から、Blast 検索した結果、その蛋白質はリパーゼである事が推測された。そのデータベース上の類縁遺伝子の塩基配列情報からプライマーを設計し、*A. sobria* の菌体外リパーゼ遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

また、精製したリパーゼを用いて、各種基質に対する反応性、温度に対する安定性等を評価した。

② 食塩存在下での菌体外リパーゼの産生抑制

得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定し、推定アミノ酸配列の N 末端 15 アミノ酸の合成ペプチドで免疫した抗血清を作製した。得られた抗血清を用いて、リパーゼ蛋

白質をイムノブロット法で検出した。リパーゼ活性はパラニトロフェニル脂肪酸エステルを基質に用いて測定した。

③ 食塩存在下での菌体外リパーゼ遺伝子の転写について

食塩濃度 0.5%、3%を含む培地で培養した培養液から菌体を回収し、total RNA を抽出した。得られた total RNA を RNA ドットプロット法、およびリアルタイム RT-PCR 法を用いてリパーゼ遺伝子の mRNA を検出した。コントロールとして、16S rRNA の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 食塩によるメタロプロテアーゼ遺伝子の転写阻害について

① メタロプロテアーゼ遺伝子上流領域のうち、遺伝子発現に関連する領域の決定

A. sobria 288 株のメタロプロテアーゼ遺伝子を 349bp の上流領域とともにプラスミドに挿入した。このプラスミドをメタロプロテアーゼ非産生性の *A. sobria* 104 株に形質転換し、その株のメタロプロテアーゼ産生をイムノブロット法で検出すると、形質転換株は普通液体培地 37°C 培養でメタロプロテアーゼを培養上清中に産生した。しかし、この形質転換株を 3% 食塩を含む培地で培養すると、野生株と同様にメタロプロテアーゼは産生されなかった。このことから、このプラスミドにクローニングした遺伝子上流領域には遺伝子発現および食塩による阻害に関連する因子が機能する領域がある事が示された。そこで、この上流領域をそれぞれ、300、200、250、200、100bp とそれぞれ異なる長さで調製し、それぞれプラスミドに挿入して、各プラスミドからのメタロプロテアーゼ産生性を同様に調べた。その結果、上流領域の長さが 250bp 以上含んだプラスミドからはメタロプロテアーゼが発現されたのに対し、200bp 以下では発現しなかった。この結果から、メタロプロテアーゼの発現に必須な配列が上流領域-200bp から-250bp の領域に存在することが示唆された。また、これらプラスミドの形質転換株を 3% 食塩を含む培地で培養すると、いずれの株もメタロプロテアーゼを産生しなかった事から、3% 食塩での転写阻害は発現に必須な上流領域 250bp の領域中で生じている事が示唆された。

遺伝子上流領域の作用を明らかにすると同時に、このメタロプロテアーゼ遺伝子の周辺の遺伝子について解析を進めた。その結果、本遺伝子の下流のごく近傍には他の遺伝子が存在する事が分かり、その遺伝子産物の推定アミノ酸配列を Blast 検索すると LysR タイプ転写調節因子 (LTTR) である事が分かった。LysR タイプ転写調節因子は様々な菌種で

報告されている転写調節因子であり、LTTR が認識する LTTR box (ATC-N9-GAT) が報告されている事から、この配列をメタロプロテアーゼ遺伝子近傍で検索すると、開始コドンから -30~-16bp の領域に同配列が存在する事が分かった。

本菌のメタロプロテアーゼの産生はオートインデューサーを介した菌密度依存的な発現制御システムであるクォラムセンシングシステムの関与が報告されている。しかし、食塩による転写阻害は菌の生育には一切影響を与えない食塩濃度 1.5% という低濃度から生じる。このことから、クォラムセンシング系が食塩存在下では機能阻害されている、もしくはこれ以外の系がメタロプロテアーゼの産生調節に関与していると推測した。LTTR の多くは転写調節機能に co-factor を必要とし、その中には Na イオンを co-factor とするものも報告されている事から、メタロプロテアーゼ遺伝子の転写調節、特に食塩による転写阻害にこの LTTR が関与するのではないかと推測した。

② メタロプロテアーゼ遺伝子下流にコードされる LysR タイプ転写調節因子の欠損株の作製

食塩存在下でメタロプロテアーゼ遺伝子の転写が阻害される原因として、食塩による転写促進因子の作用抑制もしくは転写阻害因子の作用亢進が考えられる。本研究では、開始コドンから -30~-16bp の領域に存在する LTTR box に LTTR が結合する事で転写の伸長が阻害されるのではないかと推測し、メタロプロテアーゼの産生に LysR タイプ調節因子遺伝子が関与するかどうかを調べた。

プラスミドにクローニングされた *lysR* 遺伝子を遺伝子中の制限酵素 *EcoRV* および *NaeI* の切断部位で切断した後、両端を連結する事で中間部分が欠失した破壊型遺伝子を作製した。それを用いて相同組換え法を利用し、遺伝子欠損株を作製した。

作製した LysR 欠損株を普通培地で 15°C、25°C、37°C で培養し、その培養上清のメタロプロテアーゼ産生を調べた。また、3% 食塩を含む普通培地で 37°C 培養し、同様にメタロプロテアーゼの産生を調べた。調べた結果、15、25、37°C いずれの温度で培養しても野生株と LysR 欠損株でメタロプロテアーゼ産生に変化は見られなかった。また、3% 食塩存在下では野生株はメタロプロテアーゼを産生しなくなるが、LysR 欠損株でも同様にメタロプロテアーゼは産生されなかった。作製した LysR 欠損株の培養上清、および菌体破砕液を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色で蛋白質を検出したが、いずれの条件においても野生株と比べて顕著に異なる蛋白質は見られなかった。以上の結果から、メタロプロテアー

ゼ遺伝子下流に存在する LysR タイプ転写調節因子はメタロプロテアーゼ産生には関与していない事が分かった。

メタロプロテアーゼの食塩による転写阻害のメカニズムを明らかにする事はこれまでに報告されているクォーラムセンシング系とは異なる産生調節メカニズムの解明につながると期待される。

(2) 菌体外リパーゼの食塩による産生抑制について

① 食塩により産生抑制される菌体外リパーゼの精製, および遺伝子塩基配列の決定

3%食塩存在下で産生抑制される菌体外蛋白質を調べるには、菌が産生するプロテアーゼによる分解が影響しないように、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ欠損株を利用した。この株を 0.5%、3%食塩を含む培地で培養し菌体外蛋白質を調べると、3%食塩では 0.5%食塩に比べ産生量の増加した蛋白質が多数存在した。しかし、いくつかの蛋白質は 3%食塩で産生量が低下していた事から、このうち、0.5%食塩中で多く産生され、3%食塩で産生抑制されている蛋白質を精製し、N 末端アミノ酸配列、分子量を決定した。その結果、N 末端アミノ酸配列は GGDDN で、分子量 81044.8 であることが分かった。これらの条件から Blast 検索した結果、本蛋白質は菌体外リパーゼである事が示唆され、本菌は 3%食塩存在下ではプロテアーゼだけでなく、リパーゼも正常に産生できない事が分かった。

Blast 検索で得られた類縁遺伝子の塩基配列情報からプライマーを設計し、*A. sobria* の菌体外リパーゼ遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列は GenBank に登録した (Accession No. JN019936)。本遺伝子は 2433bp からなり、推定アミノ酸配列 811 残基の 19-23 番目に GGDDN の配列が存在した。19 番目の残基から C 末端までの推定分子量は 81,135.7 であり、決定した分子量と近似した。

パラニトロフェニル脂肪酸エステルを基質に用いて精製リパーゼのリパーゼ活性を調べると、本リパーゼは脂肪酸側鎖が長鎖よりも短鎖の脂肪酸に対して切断活性が高いことが分かった。また、本リパーゼは 60℃で 10 分加温すると失活する易熱性であることが分かった。しかし、本リパーゼを 3%食塩溶液中で 37℃で 24 時間保温しても失活しなかった事から、本菌が 3%食塩存在下でリパーゼ活性を発揮できない原因は産生されたリパーゼが失活したのではなく、リパーゼの産生が抑制されたためであると推測された。

② 食塩存在下での菌体外リパーゼの産生抑制

3%食塩存在下ではリパーゼの産生が抑制

される事が示唆された事から、本蛋白質を特異的に検出するためにイムノブロッティングを行った。推定アミノ酸配列の N 末端 15 アミノ酸の合成ペプチドで免疫した抗血清を作製し使用した。0.5%、3%食塩を含む培地で培養し、培養上清および、ペリプラズム画分、外膜画分のリパーゼを検出した。その結果、0.5%食塩存在下では培養時間依存的に培養上清中のリパーゼ量が増加した。ペリプラズムにはごくわずかに検出されたが、外膜画分には検出されなかった。この事からも本リパーゼは菌体外リパーゼであると言える。一方、3%食塩存在下では、培養上清中のリパーゼ量は 0.5%に比べ少ないものの、わずかには産生されている事が分かった。また、ペリプラズム画分や外膜画分には検出されなかった事から、3%食塩存在下で菌体外リパーゼ産生量が低下したのは菌体外への排出が阻害されたのではなく、生合成される量が低下したためである事が示された。また、3%食塩存在下でわずかにリパーゼが産生されていたにもかかわらず、活性を一切示さない事から、3%食塩存在下で産生されたリパーゼは 0.5%食塩存在下で産生されたものとは異なる立体構造を取り、活性を十分に発揮できないのではないかと推測される。

③ 食塩存在下での菌体外リパーゼ遺伝子の転写について

3%食塩存在下ではメタロプロテアーゼと同様に菌体外リパーゼの産生量も低下する事が分かった。その原因も同様に遺伝子の転写阻害ではないかと推測し、0.5%、3%食塩存在下での菌体外リパーゼ遺伝子の転写について検出した。食塩濃度 0.5%、3%を含む培地で培養した培養液から菌体を回収し、total RNA を抽出した。得られた total RNA を RNA ドットプロット法、およびリアルタイム RT-PCR 法を用いてリパーゼ遺伝子の mRNA を検出した。RNA ドットプロットの結果、0.5%食塩存在下では培養 6 時間で検出が最大になる事が分かった。3%食塩存在下でも同様に培養 6 時間で検出は最大となる事がわかったが、いずれの培養時間においても 3%食塩のサンプルでは 0.5%食塩のサンプルに比べ、濃いスポットが検出された。リアルタイム RT-PCR 法を用いて培養 6 時間のサンプルでの mRNA 量を $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて比較したところ、0.5%食塩のサンプルに比べ、3%食塩のサンプルでは 7.8 倍高い mRNA 量である事が示された。

以上の結果から、3%食塩存在下では菌体外リパーゼの産生が低下しているが、遺伝子の転写量はむしろ 3%食塩中の方が高い事が分かった。この事から、3%食塩存在下では遺伝子転写以降のステップが抑制されたために蛋白質の産生量が低下したと考えられる。こ

のような抑制機構はメタロプロテアーゼで検出された転写阻害とは異なるメカニズムで食塩が蛋白質発現に影響を与えている事を示唆している。

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 8 件)

① Eizo Takahashi et al., Production and properties of lipase of *Aeromonas sobria*, Microbiology and Immunology, 査読有, in press

② Eizo Takahashi et al., Inhibition of biosynthesis of metalloprotease of *Aeromonas sobria* by sodium chloride in the medium, Microbiology and Immunology, 査読有, Vol.55 No.1, 2011, 60-65

③ Eizo Takahashi et al., Maturation pathway of metalloprotease produced by *Aeromonas sobria*, Microbiology and Immunology, 査読有, Vol.54 No.10, 2010, 596-605

[学会発表] (計 30 件)

① 高橋栄造、アエロモナスの菌体外毒素産生に及ぼす食塩の影響と生息環境との関係、第二回 愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2011年11月26日、松山

② Eizo Takahashi, Inhibitory effect of

Salt on the Production of metalloprotease by *Aeromonas sobria*, IUMS2011, 2011年9月6-10日、札幌

③ Eizo Takahashi, Production and characterization of lipase produced by *Aeromonas sobria*, The 45th Annual joint meeting on cholera and other bacterial enteric infections, 2011年12月6-8日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 栄造 (TAKAHASHI EIZO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 70379733