

平成 22 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790343

研究課題名 (和文) プロテアーゼ活性化受容体と V 型分泌装置由来の新規プロテアーゼとの相互作用解析

研究課題名 (英文) A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors

研究代表者

木田 豊 (KIDA YUTAKA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30309752

研究成果の概要 (和文)：緑膿菌が産生するエラスターゼなどのプロテアーゼは病原因子として重要視されている。緑膿菌のゲノム解析は他にもプロテアーゼの存在を予測しているが、実際の機能は解明されていない。一方、細菌由来プロテアーゼはプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptors; PARs) を介して炎症や免疫応答を誘導することが報告されている。本研究では、緑膿菌がエラスターゼなどの既知のプロテアーゼとは異なるプロテアーゼ (LepA) を産生することを見出した。また、LepA は PARs を介して NF-kappaB を活性化し、炎症応答を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The *Pseudomonas aeruginosa*-derived alkaline protease (AprA), elastase A (LasA), elastase B (LasB), and protease IV are considered to play an important role in pathogenesis of this organism. Although the sequence analysis of *P. aeruginosa* genome predicts the presence of several genes encoding other potential proteases in the genome, little has been known about the proteases involving in pathogenesis. Recently, *Porphyromonas gingivalis* gingipains and *Serratia marcescens* serralyisin have been shown to activate protease-activated receptor 2 (PAR-2), thereby modulating host inflammatory and immune responses. Accordingly, we hypothesized that unknown protease(s) from *P. aeruginosa* would also modulate such responses through PARs. In this study, we found that *P. aeruginosa* produces a novel large exoprotease (LepA) distinct from known proteases such as AprA, LasA, LasB, and protease IV. Sequence analysis of LepA showed a molecular feature of the proteins transported by the two-partner secretion pathway. Our results indicated that LepA activates NF-kappaB-driven promoter through human PAR-1, -2, or -4 and cleaves the peptides corresponding to the tethered ligand region of human PAR-1, -2, and -4 at a specific site with exposure of their tethered ligands. Considered together, these results suggest that LepA would require PARs to modulate various host responses against bacterial infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌学、分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：プロテアーゼ、プロテアーゼ活性化受容体、緑膿菌、V型分泌装置

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は自然界に広く分布し、健常者には本来病原性の弱い細菌である。しかし、生体の防御機構が低下した易感染性の宿主に対する呼吸器感染症、尿路感染症、重傷熱傷感染、創傷感染、敗血症など難治性感染症の起原因菌であり、院内感染を惹起する細菌としても注視されている。緑膿菌が産生する様々な菌体外酵素は病原因子として知られ、なかでもプロテアーゼは組織を傷害する因子として機能する。そのようなプロテアーゼとしてはアルカリプロテアーゼ (AprA)、エラスターゼ A (LasA)、エラスターゼ B (LasB)、プロテアーゼIVがよく研究されている。

プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptors; PARs) は G 蛋白質共役 7 回膜貫通型受容体の一種である。PARs の活性化は通常のリガンド-受容体相互作用というよりは、むしろ受容体の N 末端側細胞外領域のプロテアーゼ切断により生じた分子内テザリガンドが、受容体の細胞外ループ 2 と相互作用することにより開始される。現在までに 4 つの PARs (PAR-1, -2, -3, -4) が同定され、これらの内 PAR-1, -3, -4 はいずれもトロンビンの受容体であるが (PAR-1, -4 はトリプシンの受容体でもある)、PAR-2 はトロンビンでは活性化されず、トリプシン、肥満細胞トリプターゼ、血液凝固第 VIIa、Xa 因子等により活性化される受容体である。PARs は循環器系、消化器系、呼吸器系、中枢神経系を含む様々な組織や細胞に分布し、発生、炎症、免疫などにおいて多様な生理学的・病態生理学的な役割を担っている。

上述のように AprA、LasA、LasB、プロテアーゼIVは緑膿菌感染における病原因子として重要な役割を担う。緑膿菌のゲノム解析はそれら以外にもプロテアーゼの存在を示唆しているが、病原性に関与するかについては解明されていない。近年、LasB は PAR-2 を不活性化することが報告されている。対照的に我々は、AprA と同様な性質を示すセラチア菌由来のプロテアーゼであるセラリシンが、

PAR-2 を介して炎症応答を誘導することを報告した。

そこで、LasB やセラリシンのように、緑膿菌由来の未知のプロテアーゼも PARs を介してサイトカイン産生などの炎症、免疫応答を修飾する可能性が高いと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症や免疫応答の制御に重要な役割を担う PARs が、緑膿菌の蛋白質分泌機構の一つである V 型分泌装置を介して分泌される新規プロテアーゼにより活性化されるのかを解明することである。

具体的な研究項目は以下であった。

- (1) V 型分泌装置を介して分泌される緑膿菌の新規プロテアーゼの同定
- (2) 新規プロテアーゼによる PARs 活性化能の解析

3. 研究の方法

- (1) 緑膿菌臨床分離株が未知のプロテアーゼを産生するかを検討するために、それらの培養上清をカゼインゼイモグラフィーにて解析した。
- (2) 緑膿菌の新規な分泌プロテアーゼである LepA は、緑膿菌臨床分離株 KU2 の培養上清から硫酸塩析、陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。
- (3) LepA をコードすると考えられる遺伝子が目的蛋白質をコードしていることを確認するために、その遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を相同組換えで挿入して遺伝子破壊を行い、得られた株におけるプロテアーゼの産生をゼイモグラフィーにより解析した。また、各種のデータベースを使用して LepA のアミノ酸配列を解析した。
- (4) 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 発現ベクターをトランスフェクションし、LepA で刺激した時の NF-kappaB 依存性プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイで調べた。

- (5) LepA で刺激したヒト細気管支上皮細胞株 EBC-1 において IL-8 産生が誘導されるかを ELISA にて調べた。

4. 研究成果

- (1) 緑膿菌臨床分離株が未知のプロテアーゼを産生するかを検討するために、それらの培養上清をカゼインゼイモグラフィーにて解析した。緑膿菌の既知のプロテアーゼである AprA、LasA、LasB、プロテアーゼIVはカゼインあるいはゼラチンゼイモグラフィーにおいて、それぞれ 50、160、160、200 kDa のバンドを示すことが知られている。図 1 のレーン 1 に示すように、AprA と LasB を産生する緑膿菌標準株の PA01 では 50、160 kDa のバンドが認められたが、緑膿菌臨床分離株 KU2、alpha05-6、alpha05-43 では AprA、LasA、LasB、プロテアーゼIVとは異なる 100 kDa のバンドが認められた(図 1 のレーン 2-4)。従って、これらの結果は緑膿菌が AprA、LasA、LasB、プロテアーゼIVとは異なる未知のプロテアーゼを産生していることを示唆している。

- (2) ゼイモグラフィーで 100 kDa を示したプロテアーゼを陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。目的蛋白質は、SDS-PAGE にて 100kDa を示し(図 2)、LepA と名付けた。精製蛋白質の N 末端アミノ酸配列を解析し、データベース検索を行った結果、緑膿菌 PA01 の PA4541 (1, 417 aa) と相同であった。

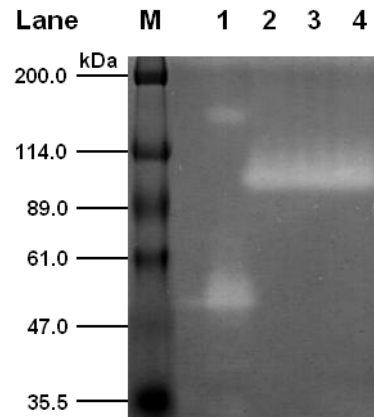


図 1 緑膿菌臨床分離株培養上清のカゼインゼイモグラフィー
レーン 1; PA01、レーン 2; KU2、レーン 3; alpha05-6、レーン 4; alpha05-43

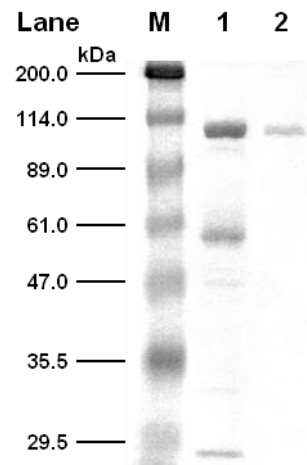


図 2 精製蛋白質の SDS-PAGE
レーン 1; イオン交換クロマトグラフィー精製画分、レーン 2; 最終精製物

- (3) 緑膿菌野生型 KU2 とその *lepA* 破壊株 (KU2*lepA*) におけるプロテアーゼ産生能をカゼインゼイモグラフィーにより比較した。図 3 に示すように、野生型 KU2 (レーン 1) では 100 kDa のバンドが認められたが、KU2*lepA* ではそれは確認されなかった(レーン 2)。従って、これらの結果は *lepA* が緑膿菌の新規な分泌プロテアーゼをコードしていることを示している。

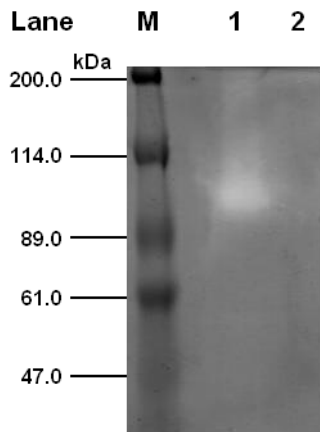


図3 KU2株とKU2*lepA*株のカゼインザイモグラフィー
 レーン1; KU2、レーン2; KU2*lepA*

LepA はトリプシン様セリンプロテアーゼ活性中心モチーフと RGD 細胞接着モチーフ、さらには、V型分泌装置の two-partner secretion (TPS) system による分泌蛋白質に特徴的な TPS モチーフを有していた。TPS システムは細胞外に分泌される蛋白質とその分泌に関与する蛋白質から構成され、それらをコードする遺伝子は一つのオペロンを構成するか、近隣の遺伝子座に存在することが知られている。実際に、LepA をコードする遺伝子 (*lepA*) は、LepA の分泌に関わると推測される蛋白質 (LepB) をコードする遺伝子 (*lepB*) とオペロンを構成していた。

- (4) LepA による PAR-1, -2, -4 を介した NF- κ B の活性化を調べるために、機能的な PAR を発現しない COS-7 細胞へヒト PAR 発現ベクターと NF- κ B レポーターベクターをトランスフェクションして実験に使用した。図 4 の A に示すように、LepA 刺激に対する NF- κ B レポーターの活性化は、ヒト PAR-1, -2, -4 のトランスフェクション量依存的に認められたが、コントロールでは認められなかった。また、図 4 の B に示すように、LepA 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 (図 4 の C) と PAR-1, -2, -4 を活性化するトリプシン (図 4 の D)

と同様に用量依存的に認められた。

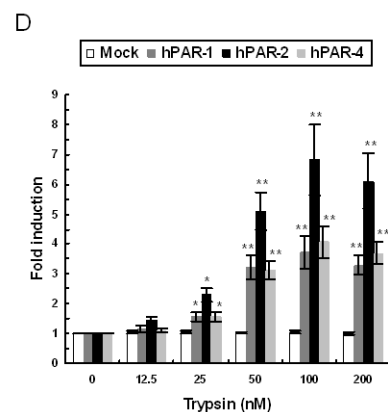
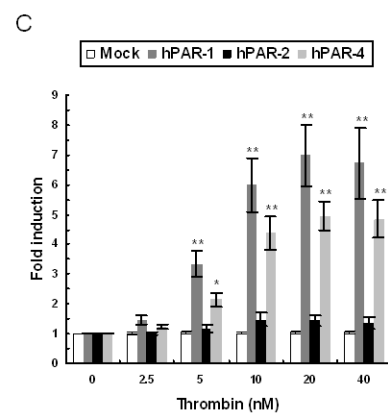
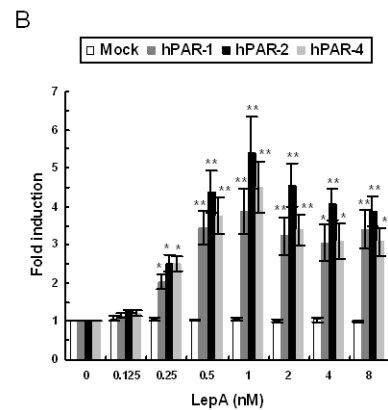
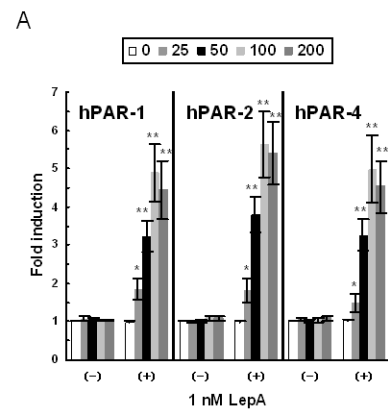


図4 NF-kappaB ルシフェラーゼレポーターアッセイ
*P<0.05; **P<0.01 (刺激なしのコントロールと比較)

- (5) ヒト細気管支上皮細胞株 EBC-1 に対する LepA の炎症応答誘導能を調べた。図5に示すように、LepA はトロンビンやトリプシンと同様に IL-8 産生を誘導し (図5のA)、ヒト PAR-2 のアンタゴニストペプチド (FLLRY-NH₂、LSIGRL-NH₂) はその誘導を抑制した (図5のB)。

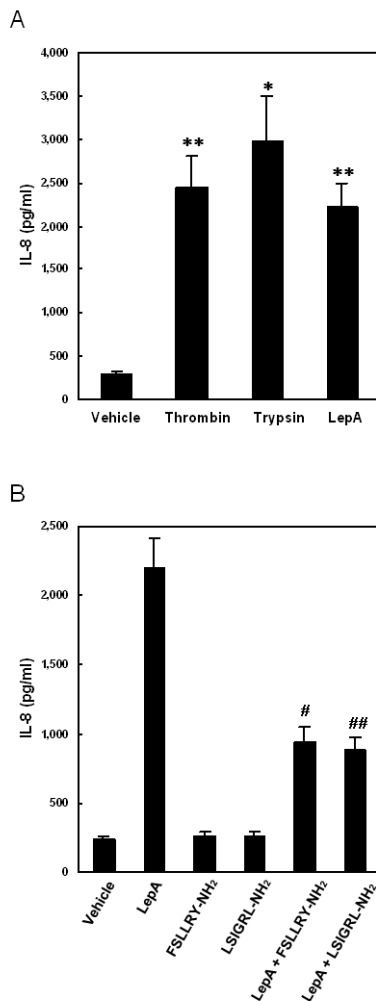


図5 LepA の IL-8 産生誘導能
*P<0.05; **P<0.01 (刺激なしのコントロールと比較)
#P<0.05; ##P<0.01 (アンタゴニストペプチドなしの LepA 刺激ありと比較)

以上の結果をまとめると、緑膿菌 LepA は V 型分泌装置の TPS system から分泌され、

ヒト PAR-1, -2, -4 を介して NF-kappaB を活性化し、IL-8 産生などの炎症応答を誘導すると考えられる。

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4件)

1. Shimizu, T., Kida, Y., Kuwano, K.
A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-kappaB through TLR1 and TLR2. *Infect. Immun.*, 76, 3672-3678, (2008). 査読：有
2. Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K.
A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.*, 10, 1491-1504, (2008). 査読：有
3. Shimizu, T., Kida, Y., Kuwano, K.
Ureaplasma parvum lipoproteins, including MB antigen, activate NF-kappaB through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology*, 154, 1318-1325, (2008). 査読：有
4. Shimizu, T., Kida, Y., Kuwano, K.
Mycoplasma pneumoniae-derived lipopeptides induce acute inflammatory responses in the lungs of mice. *Infect. Immun.*, 76, 270-277, (2008). 査読：有

[学会発表] (計1件)

1. 木田 豊、清水 隆、桑野剛一
緑膿菌の新規プロテアーゼによるプロテアーゼ活性化受容体の活性化
第61回日本細菌学会九州支部総会、2008年10月4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木田 豊 (KIDA YUTAKA)
久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30309752