

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790417

研究課題名(和文) 病原性アエロモナスの産生するプロテアーゼの分子学的性状解析

研究課題名(英文) Characterization of proteases produced by virulent strain of *Aeromonas*

研究代表者

高橋 栄造 (Takahashi, Eizo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70379733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：アエロモナスが産生する菌体外メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼの性状解析を行った。メタロプロテアーゼは中間体として菌体外に放出されたのち、成熟体へと移行する。その中間体の性状解析のため、大腸菌でメタロプロテアーゼを発現させたが、中間体は検出されなかった。また、セリンプロテアーゼは37℃より25℃の方が産生量が多く、またその産生は培地中に添加したスキムミルクで増強されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The properties of metalloprotease produced by *A. hydrophila* and of serine protease produced by *A. trota* were examined. *A. hydrophila* produces the metalloprotease as the intermediate form, which is composed of mature domain and carboxy-terminal domain, into milieu. The intermediate form released into milieu is immediately cleaved to remove the carboxy-terminal domain and turns into mature form.

To clear the property of the intermediate form, we constructed the plasmid harboring metalloprotease gene and introduced it into *Escherichia coli*. The examination of the metalloprotease produced by the transformed cell showed that the intermediate form is not detected, though the mature form is detected.

Subsequently, I showed that *A. trota* produced much amount of serine protease at 25 degree than at 37 degree and that the addition of skim milk in the medium promoted the production of serine protease by *A. trota*.

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：アエロモナス(エロモナス) メタロプロテアーゼ セリンプロテアーゼ エラスチン スキムミルク

1. 研究開始当初の背景

アエロモナスは水性環境に広く存在するグラム陰性菌であり、旅行者下痢症や国内での散発例の下痢症の原因菌として頻繁に分離されている。また、創傷感染も引き起こす事が知られている。さらに、腸管や傷口などの感染部位から菌が血中に移行すると、敗血症、髄膜炎、肺炎や軟部組織の壊死性疾患(筋壊死や蜂巣炎)を併発する事から、種々の重症症状の起病菌として注目を集めている。

アエロモナス属菌のうち、下痢原因菌となる菌種は7種報告されている。そのうち、*A. hydrophila*、*A. sobria*は食中毒原因菌にも指定され、特に病原性の強い菌種である。これらの菌種による感染では軟部組織の壊死性疾患、敗血症などの重症症例も報告されているが、その原因因子は明らかになっていない。創傷感染や軟部組織の傷害ではしばしば菌の産生するプロテアーゼが関与すると考えられている。また、細菌の産生するプロテアーゼは環境中の蛋白質をアミノ酸やペプチドにまで分解し、菌はそれらを利用して生育する事から、菌の生存には重要な因子であると考えられる。

そこで、*A. hydrophila*の産生するプロテアーゼについて研究を開始したところ、一部の*A. hydrophila*は血管壁や肺胞、靭帯などに含まれる結合組織タンパク質であるエラスチンを分解する事を見出した。アエロモナスの産生する主要な菌体外プロテアーゼとしてはメタロプロテアーゼとセリンプロテアーゼが知られているが、欠損株を用いた解析から、このエラスチン分解活性にはメタロプロテアーゼが関与している事を明らかにした。アエロモナスの産生するメタロプロテアーゼはサーモリシンファミリーに属するプロテアーゼであり、588個のアミノ酸からなる前駆体蛋白質として生合成された後、N末端ドメインがプロセッシングされた中間体が菌体外に産生される。その後、中間体はカルボキシ末端(C末端)ドメインがプロセッシングされて、305残基からなる活性体(33 kDa)へと変換される。しかし、活性体を精製し調べた結果、メタロプロテアーゼ活性体は可溶性蛋白質であるカゼインは分解するが、エラスチンは分解しなかった。この事からエラスチン分解にはメタロプロテアーゼ活性体ではなく、中間体が重要である、つまり、活性体では失われるC末端ドメインがエラスチン分解に重要な役割を果たしている事が示唆された。また、エラスチンを分解しない*A. hydrophila*もメタロプロテアーゼを産生するが、そのC末端ドメインには、エラスチン分解性株のメタロプロテアーゼに比べ、多くのアミノ酸置換が生じていた事から、エラスチン分解にはC末端ドメインの構造が重要であると考えられた。このように本菌の産生するメ

タロプロテアーゼはプロテアーゼ活性本体とは異なる領域に機能性ドメインを有するのではないかと考えられる興味深いプロテアーゼである。

また、*A. trota*は下痢の原因となる菌種の一つであるが、本菌の病原性状についてはこれまであまり解析が進んでいなかった。そこで、本菌が産生するプロテアーゼに関する研究を開始し、*A. trota*はメタロプロテアーゼ遺伝子を保有していないが、セリンプロテアーゼ遺伝子は保有している事を明らかにした。遺伝子の一部の塩基配列を同定した結果、*A. trota*のセリンプロテアーゼはこれまでに解析した*A. sobria*のセリンプロテアーゼとは塩基配列がわずかに異なっていた。これまでの研究から、*A. sobria*のセリンプロテアーゼは哺乳類のプロテアーゼであるフーリンと極めて類似しており、基質特異性も類似している事を報告している。フーリンは体内でプロエンザイムを活性化する重要なプロテアーゼであり、哺乳類の生存には欠く事のできない酵素である。このフーリンと*A. sobria*のセリンプロテアーゼが類似していることは非常に興味深い。*A. trota*のセリンプロテアーゼの性状解析は一連のホモログプロテアーゼの理解に有益な知見を与えると考えられる。

2. 研究の目的

前述したように、アエロモナスの産生するメタロプロテアーゼは菌株によって異なるだけでなく、活性体と中間体では異なる性状を有していると推察される。しかし、それら性状を明らかにするためにはそれぞれの蛋白質を精製し、精製蛋白質で比較する事が不可欠である。しかし、これまでに安定的なメタロプロテアーゼ活性体は野生株培養上清から精製することができたが、中間体は精製過程で容易にプロセッシングされる事から精製に至っていない。そこで、メタロプロテアーゼ中間体の精製方法の確立とその性状解析を本研究の目的とした。

また同様に、*A. trota*セリンプロテアーゼを精製し、*A. sobria*セリンプロテアーゼや真核生物プロテアーゼとの性状比較を行い、相関性を明らかにすることを目的とする。

そこで、本研究では以下の解析を実施した。

(1) *A. hydrophila*メタロプロテアーゼに関する解析

大量発現系の構築、メタロプロテアーゼ中間体の精製方法の検討

メタロプロテアーゼとエラスチンとの親和性の評価

(2) *A. trota*セリンプロテアーゼに関する解析

セリンプロテアーゼ遺伝子および遺伝子周辺の塩基配列の決定

大量発現系の構築、セリンプロテアーゼの精製、性状解析

3. 研究の方法

(1) *A. hydrophila* メタロプロテアーゼに関する解析

大量発現系の構築、メタロプロテアーゼ中間体の精製方法の検討

これまで、アエロモナス野生株の培養上清を出発材料に中間体の精製方法を検討したが、いずれも精製過程に分解を受け、精製できなかった。そこで、より簡便な精製方法が必要である事から、本研究では大腸菌形質転換株を用いた大量発現系の構築、およびC末端タグを利用した融合蛋白質の簡便な精製方法の樹立を試みた。本遺伝子をPCR法にて増幅し、DNA断片をプラスミドに挿入し、大腸菌宿主へ形質転換した。また、部位特異的変異導入法を用いて変異型遺伝子を構築し、同様に変異メタロプロテアーゼ発現形質転換株の樹立を試みた。得られた形質転換株を培養し、培養上清および菌体破砕液のプロテアーゼ活性をアゾカゼイン、エラスチンコンゴレッドを基質に用いて測定した。また、メタロプロテアーゼ蛋白質は特異的抗血清を用いたイムノブロットング法で検出した。

メタロプロテアーゼとエラスチンとの親和性の評価

クロストリジウム属菌のコラゲナーゼで報告されているコラーゲン結合ドメインのコラーゲンに対する親和性を評価した系を参考に、エラスチンに対する親和性を評価した。メタロプロテアーゼ活性体、および中間体を含むサンプルをエラスチン粒子と混合した後、遠心、もしくは限外ろ過フィルターを用いてエラスチン粒子を分離した。エラスチン粒子をSDSバッファーに溶解し、SDS-PAGE、イムノブロットング法を用いてエラスチンと共沈するメタロプロテアーゼ分子種を検出した。

(2) *A. trota* セリンプロテアーゼに関する解析 セリンプロテアーゼ遺伝子および遺伝子周辺の塩基配列の決定

これまでに類縁プロテアーゼを比較解析し、特に相同性の高い領域にプライマーを設計し、PCRを行った。その結果、*A. trota* セリンプロテアーゼの遺伝子の一部を検出した。しかし、決定した領域以外はPCRでは増幅できなかった事から、本研究では本遺伝子をショットガンクローニング法を用いて単離した。これまでに決定している*A. sobria* セリンプロテアーゼ遺伝子ではその遺伝子下流には活性体構築に必要なシャペロン蛋白質

(ORF2)の遺伝子がコードされているが、本法で*A. trota*の両遺伝子全長の塩基配列を決定した。

大量発現系の構築、セリンプロテアーゼの精製、性状解析

A. trota セリンプロテアーゼの産生条件を検討した。プロテアーゼ活性はアゾカゼインを基質に用いて測定した。また、セリンプロテアーゼ蛋白質の特異的ペプチド配列を認識する特異的抗血清を作製し、それを用いたイムノブロットング法でセリンプロテアーゼ蛋白質を検出した。

その後、その至適条件下で培養して産生されたセリンプロテアーゼを培養上清から硫酸分画、カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製プロテアーゼを用いてプロテアーゼ活性を測定し、*A. sobria* セリンプロテアーゼと比較した。

4. 研究成果

(1) *A. hydrophila* メタロプロテアーゼに関する解析

大量発現系の構築、メタロプロテアーゼ中間体の精製方法の検討

本研究ではこれまで精製が困難であったメタロプロテアーゼ中間体の精製を目的に、簡便な精製方法を可能にする形質転換株を用いた大量発現系の構築を試みた。そこでまず、アエロモナスのメタロプロテアーゼ遺伝子をプラスミドに挿入し、大腸菌に形質転換したところ、作製した形質転換株はメタロプロテアーゼ活性体を培養上清に産生するが、アエロモナス野生株とは異なり、中間体は培養上清に産生しなかった。また、野生株では菌体内にメタロプロテアーゼは検出されないが、大腸菌形質転換株では菌体内にメタロプロテアーゼ活性体が滞留している事が分かった。しかし、大腸菌内で検出されるメタロプロテアーゼも活性体が多く、中間体はほとんど検出しなかった。これはアエロモナス野生株では生合成され、成熟したメタロプロテアーゼは速やかに菌体外に排出されるが、大腸菌では排出できていないと考えられる。そのため、菌体内の制限された空間でメタロプロテアーゼが貯留した結果、高頻度に自己分解が生じ、活性体が多く存在したのではないかと考えられる。また、培養上清で検出されたメタロプロテアーゼ活性体は溶菌した菌体から漏出したものではないかと考えられる。

そこで、この大腸菌形質転換株でも安定的にメタロプロテアーゼ中間体を産生するため、部位特異的変異導入法を用いて、変異型

蛋白質の作製を試みた。自己分解によるプロセシングを阻害するために、活性中心モチーフにアミノ酸置換を導入した変異型遺伝子、また活性体とC末端ドメインが切断される部位にアミノ酸置換を導入した変異型遺伝子を作製した。しかし、これら変異型遺伝子を有するプラスミドを形質転換した株では培養上清、菌体内ともにメタロプロテアーゼ蛋白質は検出されなかった。一方、終止コドンを導入し、C末端ドメインを欠失した変異型遺伝子では、野生型遺伝子と同様に、メタロプロテアーゼ活性体が産生され、アゾカゼインに対するプロテアーゼ活性を發揮した。以上の結果から、C末端ドメインは活性なメタロプロテアーゼの構築には必須ではないが、活性中心やC末端ドメインのプロセシング部位は安定なメタロプロテアーゼを構築する過程に必須の役割を示しているのではないかと考えられる。

大腸菌形質転換株では中間体を産生する事が困難であった事から、次に、*in vitro* 発現系を用いて、メタロプロテアーゼの作製を試みた。大腸菌形質転換株で用いた作製プラスミドのうち、pET30 プラスミドに挿入したメタロプロテアーゼ遺伝子は T7 プロモーター下で発現される事から、本プラスミドを用いて *in vitro* での発現を試みた。その結果、わずかでは有るが、遺伝子全長が翻訳された蛋白質が生合成され、プロセシングされた分解産物は生じなかった。この結果は、*in vitro* 発現系を用いる事でメタロプロテアーゼ中間体の産生が可能であり、また、本蛋白質はC末端 His-tag 融合蛋白質である事から、簡便な精製方法を利用する事でメタロプロテアーゼ中間体の精製が期待される。

メタロプロテアーゼとエラスチンとの親和性の評価

メタロプロテアーゼ活性体、中間体ではC末端ドメインの有無がエラスチンへの結合に關与し、その結果、分解活性の有無に關連するのではないかと考え、活性体、中間体のエラスチンへの親和性を評価した。

エラスチン分解性 *A. hydrophila* 453 株およびエラスチン非分解性 *A. hydrophila* 436 株を普通ブイヨン培地で培養し、メタロプロテアーゼ活性体、中間体を含む培養上清を得た。この培養上清にエラスチン粒子を混和した後、エラスチン粒子を分離し、イムノブロットング法でメタロプロテアーゼを検出した。しかし、いずれの株もメタロプロテアーゼ活性体、中間体のバンドがともに検出され、違いは見られなかった。

(2) *A. trota* セリンプロテアーゼに関する解析
セリンプロテアーゼ遺伝子および遺伝

子周辺の塩基配列の決定

A. trota セリンプロテアーゼ遺伝子をショットガンクローニング法を用いてプラスミドに単離し、遺伝子の塩基配列を決定した。決定した *A. trota* セリンプロテアーゼ遺伝子は全長 1,825bp で、その遺伝子下流には *A. sobria* のシャペロン遺伝子に類似した遺伝子が存在した。*A. trota* のセリンプロテアーゼおよびシャペロンは推定アミノ酸配列で *A. sobria* とそれぞれ 83.4%、76.5%の相同性を示した (GenBank accession number AF253471)。この *A. trota* セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をもとに、アエロモナスセリンプロテアーゼに特異的なペプチド配列を認識する抗血清を作製した。

大量発現系の構築、セリンプロテアーゼの精製、性状解析

A. sobria は普通ブイヨン培地で 37 で培養すると菌体外にセリンプロテアーゼを産生する。しかし、*A. trota* は 37 で培養するとセリンプロテアーゼを産生しなかった。培養温度を変えて培養すると、30 以上ではセリンプロテアーゼを産生しないが、15 や 25 での培養では *A. sobria* よりも多くのセリンプロテアーゼを産生した。

A. trota セリンプロテアーゼの産生は培養温度による厳密な調節を受ける。そこで、25、37 で培養した菌体から RNA を抽出し、本遺伝子の転写量を RNA ドットプロットハイブリダイゼーション法で検出した。すると、セリンプロテアーゼの産生が見られる 25、9 時間培養で転写量が著しく上昇したが、37 培養ではほとんど検出されなかった。以上の結果から、*A. trota* セリンプロテアーゼ遺伝子では培養温度依存的な転写調節が生じていることが分かった。

一方、のショットガンクローニング法で作製した本遺伝子を含むプラスミドを形質転換した大腸菌形質転換株では、いずれの培養温度でもセリンプロテアーゼの産生は見られず、*A. trota* 野生株で観察される培養温度依存的な発現は見られなかった。

そこで、*A. trota* を普通ブイヨン培地、15 で 48 時間培養し、その培養上清からセリンプロテアーゼを精製した。培養上清を硫酸分画すると、セリンプロテアーゼは 40-60% 飽和硫酸分画分に局在し、それを疎水性カラム (HiPrep16/10 phenyl FF) を用いて分画して、精製セリンプロテアーゼを得た。本蛋白質の N 末端アミノ酸配列をエドマン分解法で、分子量を MALDI-TOFMS で調べた結果、N 末端アミノ酸配列は NENXA(X; シグナル無し)、分子量は 64262.84 であった。求めた推定アミノ酸配列のうち、25-29 残基は NENCA で

あり、そこから C 末端までの推定分子量は 64248.12 であり、決定した分子量と類似した。

得られた精製プロテアーゼを用いて、アゾカゼインに対する分解活性を測定した結果、*A. trota* セリンプロテアーゼは *A. sobria* セリンプロテアーゼに比べ、およそ 2 倍高い比活性を示した。

前述したように、*A. trota* を普通ブイオン培地で 37 で培養すると、培養上清にセリンプロテアーゼは産生されない。しかし、本菌をスキムミルクを含む普通寒天培地で培養すると、37 で培養してもコロニー周辺に分解環を形成し、プロテアーゼ活性を發揮する。これはスキムミルクがセリンプロテアーゼの産生を亢進しているのではないかと考え、スキムミルク(終濃度 1%)を添加した普通ブイオン培地でのセリンプロテアーゼ産生を調べた。その結果、*A. trota* はわずかではあるが、37 での培養であってもスキムミルク存在下ではセリンプロテアーゼを産生した。同様に 25 培養であっても、スキムミルク存在下でセリンプロテアーゼの産生量は増加した。RNA ドットプロット法を用いて、本遺伝子の転写量を調べると、25、9 時間で検出されるスポットが、スキムミルク存在下ではより濃く検出される事が分かった。このスキムミルクによるセリンプロテアーゼの産生亢進作用は *A. trota* だけでなく、*A. sobria* でも同様に生じた。しかし、スキムミルクの主要な構成成分であるカゼインやラクトースではセリンプロテアーゼ産生亢進作用は見られなかった。

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 7 件)

Eizo Takahashi, Haruka Ozaki et al. (全8人中1番目) Properties of hemolysin and protease produced by *Aeromonas trota*, PLOS ONE, 査読有, 2014, 9(3), e91149 (doi: 10.1371/journal.pone.0091149. eCollection 2014.)

Eizo Takahashi, Seiji Oono et al. (全6人中1番目) Spermidine-analogous triamines suppressed the growth of *Candida albicans*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 2013, 36(9), 1440-1447 (https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/9/36_b13-00148/_pdf)

Eizo Takahashi, Hidetomo Kobayashi et al. (全9人中1番目) Analysis of carboxy terminal domain of metalloprotease of elastolytic *Aeromonas hydrophila*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 2013, 36(7), 1174-1182 (https://www.jstage.jst.go.

jp/article/bpb/36/7/36_b13-00161/_pdf)

高橋栄造, 工口モナス感染症, 化学療法の領域, 査読無, 2013, 29(7), 1478-1481

Eizo Takahashi, Hidenobu Ito et al. (全9人中1番目) Production and properties of lipase of *Aeromonas sobria*, Microbiology and Immunology, 査読有, 2012, 56(5), 295-307 (doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00445.x.)

〔学会発表〕(計 16 件)

Eizo Takahashi, Skim milk promotes the production of extracellular serine protease by *Aeromonas* spp., 第 86 回 日本細菌学会, 2014 年 3 月 26-28 日、東京

Eizo Takahashi, Production and characterization of serine protease produced by *Aeromonas trota*, The 48th Annual joint meeting on cholera and other bacterial enteric infections, 2014 2/10-14, Dhaka, Bangladesh

Eizo Takahashi, Inductive effect of skim milk on the production of extracellular serine protease by *Aeromonas* spp. Asian-African Research Forum 2014, 2014 1/20-22. 仙台

〔図書〕(計 3 件)

Eizo Takahashi, Keinosuke Okamoto, Elsevier, Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Ed), Chapter 118 PA peptidase (*Aeromonas*), 2013, 577-579

Shin-ichi Miyoshi, Keinosuke Okamoto, Eizo Takahashi, Elsevier, Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Ed), Chapter 119 Vibriosin, 2013, 579-582

Eizo Takahashi, Keinosuke Okamoto, Elsevier, Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Ed), Chapter 706 ASP peptidase, 2013, 3209-3213

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: インドロキノリン誘導体を含む溶血毒阻害用組成物

発明者: 高橋栄造、岡本敬の介、竹内靖雄、黒田照夫

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-163052

出願年月日: 2013 年 8 月 6 日

国内外の別: 国内

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