

Aeromonas sobria の溶血毒素の成熟化過程と作用機構

野村 知彦

徳島文理大学薬学部, 〒770-8514 徳島市山城町西浜傍示 180

Maturation Pathway of Hemolysin of *Aeromonas sobria* and the Mechanism of Action of the Hemolysin

Tomohiko NOMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Yamashiro, Tokushima 770-8514, Japan

(Received March 12, 2001)

Aeromonas sobria has been recognized as pathogens associated with acute gastroenteritis in both adults and children. The major virulence factor has been proposed to be hemolysin which possesses both hemolytic and enterotoxic activities. Mature (bio-active) hemolysin secreted out of cells binds to the target cells of the host and injure the cells. However, hemolysin remained in bacteria can not express such toxicity. It means that the maturation and secretion pathway of hemolysin is closely related to the pathogenicity of bacteria. Therefore, I examined the pathway and clarified the following events. Hemolysin synthesized in cytoplasm translocates across the inner membrane and appears in a periplasmic space. Hemolysins appeared in the space associates to form dimer in the space. The C-terminal region of hemolysin functions as a trigger in the association. Dimerized hemolysin crosses the outer membrane and emerges in milieu, but monomer can not cross it. Therefore, the C-terminal region of hemolysin attributes not only to the formation of the dimer but also to its secretion into milieu. Hemolysin emerged in milieu is inactive. Inactive hemolysin is converted to bio-Active hemolysin by deleting its carboxyl-terminal 42-amino-acid peptide. Active hemolysin generated binds to the receptor of the target cell and stimulates the production of cyclic AMP by the cell. I assume that this stimulation closely relates to the induction of diarrhea by hemolysin.

Key words—*Aeromonas sobria*; hemolysin; dimer; diarrhea

1. はじめに

Aeromonas 菌は *Vibrio* 科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌である。本菌は主に水中（河川水、海水など）に棲息しており、その多くは非病原性であるが、一部はヒトに下痢を引き起こす下痢原因菌となることが知られている。¹⁾ 近年では、タイやインド、ペルーのような発展途上国での下痢患者、特に子供から高い確率で分離されており、下痢原因菌として重要視されている。²⁾

本菌による下痢症は軽症の下痢が多いが、ときには激しい水溶性の下痢、あるいは血便、腹痛、及び発熱を伴う重度の下痢を引き起こす。本菌による疾患としては下痢の他にも創傷感染、肺炎、髄膜炎、敗血症が知られている。^{3,4)} そのような症状を引き起こす菌としては、*A. sobria* と *A. hydrophila* がよく分離される。しかし、これらの菌による発症機構

は十分には分かっていない。

Aeromonas 菌の病原因子の研究は *A. hydrophila* の産生する毒素を中心に展開されてきた。その結果、細胞溶解因子〔アエロリジン (aerolysin)、あるいは溶血毒素 (hemolysin) と呼ばれている〕、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、コレラ毒素に類似する毒素、リパーゼなどが病原因子として報告された。^{5,6)} これらの毒素の中では細胞溶解因子が最も詳しく研究され、アエロリジンが生合成された後、シグナルペプチド (signal peptide) 依存的に内膜を通過し、ペリプラスム内へ移行する。⁷⁾ その後、アエロリジンは菌体外に分泌される。⁸⁾ 分泌されたアエロリジンは不活性であり、二量体を形成し

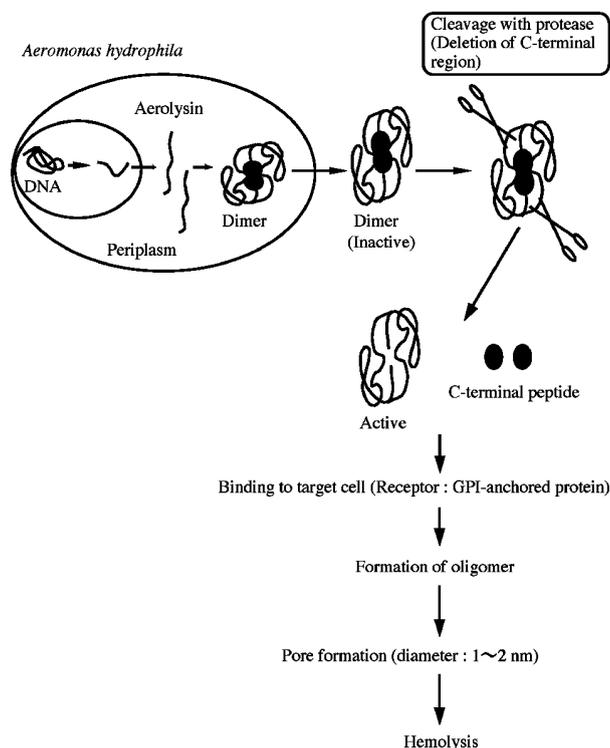


Fig. 1. Secretion Pathway and Action of *A. hydrophila* Aerolysin

ている。⁹⁾ やがてプロテアーゼによって切断を受けてC末端領域の約40アミノ酸からなるペプチドが切り離されると活性体となる。¹⁰⁾ 活性体は赤血球膜に結合すると膜中で7量体からなるオリゴマーとなり、孔(pore)が形成される。¹¹⁾ 膜に孔が形成されると、やがて赤血球の内圧が変動し赤血球が破壊される。¹²⁾

それに対して、*A. sobria*の毒素の研究は遅れており、毒素に関する報告は少ない。しかし、*A. sobria*にも細胞溶解因子、溶血毒素の存在が報告されているので、筆者はまず*A. sobria*の溶血毒素の性状を明らかにするために研究を開始した。以下に*A. sobria*の溶血毒素に関する筆者の研究成果を*A. hydrophila*のアエロリジンと比較しながら概説する。

2. *A. sobria*の溶血毒素の精製と性状

2-1. 溶血毒素の精製と性状 述べたように、*A. sobria*の溶血毒素に関する報告は少なく、また報告によって結果も異なっている。Kozakiらは*A. hydrophila*の溶血毒素のモノクローナル抗体が*A. sobria*の培養上清が示す下痢活性を阻害することを報告し、¹³⁾ Millershipらは*A. sobria*の培養上清中の溶血毒素は本菌の下痢因子として重要であると報告

している。¹⁴⁾ しかし、溶血毒素は下痢発症に重要ではないと主張する論文もあり、¹⁵⁾ さらに、Goslingらは溶血毒素は腸管毒性活性を有しないと報告している。¹⁶⁾ そこで筆者は溶血毒素の精製を行い、まず溶血毒素の性状を調べた。*A. sobria*の培養上清をSPセファデックスC25カラムクロマトグラフィー、フェニルセファロースカラムクロマトグラフィーで分離し溶血毒素を精製した。精製毒素の下痢活性をマウス腸管ループ法で調べた結果、その下痢活性は毒素原性大腸菌のSTIIの下痢活性に匹敵する強さであった。STIIは毒素原性大腸菌の主な下痢因子である。¹⁷⁾ また抗溶血毒素抗血清は*A. sobria*の生菌による下痢も抑制する事が分かった。以上の研究成果より、*A. sobria*溶血毒素はこの菌によって引き起こされる下痢の主要な病原因子と結論した。

2-2. 溶血毒素遺伝子の解析 溶血毒素遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、溶血毒素の構造遺伝子は1464塩基からなり、¹⁸⁾ 溶血毒素は488アミノ酸からなるタンパク毒素(理論分子量54,047)であることが分かった。さらにそのアミノ酸配列は*A. hydrophila*のアエロリジンとN末端領域や中央領域では高い相同性を示したが、¹⁹⁾ アミノ酸440番目以降のC末端領域の相同性は低いことが分かった。

3. 溶血毒素の成熟化の過程

*A. sobria*の溶血毒素とアエロリジンは互いに類似する毒素であったが、C末端領域のアミノ酸配列は異なっていた。そのため両毒素が同様な成熟化の過程を経るかどうかは不明である。そこで、溶血毒素の成熟化過程の検討を行った結果、溶血毒素もアエロリジンと同様に不活性体として菌体外に放出され、その不活性体はプロテアーゼによって毒素の一部が切断を受けて活性体へ変換されることが分かった。しかし、溶血毒素がアエロリジンと同様にC末側の領域が切断を受けて活性体へ移行しているのかは不明である。そこで溶血毒素の切断部位の解析を行ったところ、①溶血毒素のN末端の1~24番目までのペプチドはシグナルペプチドであること、②活性体移行時にはC末端側の446番目のセリンと447番目のアラニンの間で切断を受けてC末端の42アミノ酸から成るペプチドが切り離される事が分かった。アエロリジンが*Aeromonas*のプロテ

アーゼによって切断される部位はまだ明らかにはされていないが、トリプシンではアエロリジンの451番目のリジンと452番目のバリンの間、キモトリプシンでは453番目のアルギニンと454番目のアルギニンの間で切断を受けることがvan der Gootらによって報告されている。⁷⁾これらの切断部位は、筆者が明らかにした溶血毒素の切断部位と近接している。このように両毒素はC末側の約40個のアミノ酸からなるペプチドを切断し活性体へ移行する。また今回筆者が切断部位を明らかにしたことは、溶血毒素を活性化する *Aeromonas* のプロテアーゼの研究にも貢献するものと考えている。

4. 溶血毒素の二量体の形成とC末端領域の機能

上で述べたように、*A. sobria* の溶血毒素とアエロリジンは活性体移行時にC末端領域が切断を受ける。しかしその切断されるC末端領域のペプチドがいかなる機能を有しているのかは分かっていない。また、アエロリジンは二量体を形成している事が知られているが、溶血毒素も二量体を形成しているのかどうか、また形成されるとすればその二量体はどこで形成されるのか、などは不明であるので、これらの点を調べ、以下の結果を得た。

4-1. 溶血毒素のC末端領域の機能 C末端のアミノ酸を1個、2個、3個及び10個欠損した変異溶血毒素遺伝子を *A. sobria* で発現させて解析した。いずれの変異毒素遺伝子でも細胞質での生合成は正常に行われていたが、C末端のアミノ酸が3個以上欠損すると培養上清中への毒素の放出量は減少する事が分かった。さらに、溶血毒素 ($\Delta C10$) (C末端のアミノ酸を10個欠損) について詳細に調べた結果、溶血毒素 ($\Delta C10$) は上清に分泌されず菌体内に一時とどまっているが、この菌体内の溶血毒素 ($\Delta C10$) は速やかに分解される事が分かった。これらの結果は、①溶血毒素のC末端領域が溶血毒素の菌体外分泌にとって必要であること、②C末端領域の作用で溶血毒素のプロテアーゼに対する安定構造が構築される事を示している。

4-2. 溶血毒素の二量体の形成 架橋剤を用いた実験から培養上清中の溶血毒素は野生型溶血毒素、溶血毒素 ($\Delta C3$) はともに二量体を形成している事が分かった。この二量体が分泌のどの段階で形成されるのかをパルスラベル実験で調べた結果、

生合成1分後に菌体外に現れた毒素は二量体を形成している事、及び菌体内の毒素も二量体を形成している事を示唆する結果を得た (Fig. 2)。この事は、溶血毒素は菌体内で二量体となった後二量体の形で菌体外へ分泌される事を示している。すなわち、溶血毒素は二量体を形成することで分泌能を獲得し、一量体では分泌されない。また溶血毒素 ($\Delta C10$) は菌体外へ分泌されず菌体内で速やかに分解されたことから、C末端領域は二量体形成の引き金としての機能を有しており、この二量体はプロテアーゼに対する安定性も獲得していると考えられた。

アエロリジンはその二量体の結晶構造が明らかとされている。²⁰⁾ その結晶構造によると、C末端領域は立体構造的に対となる分子から離れた位置に存在している。そのためC末端領域は二量体の構造の維持には関与していないと考えられる。溶血毒素の構造はアエロリジンの構造と類似していると考えられるので、溶血毒素のC末端領域も二量体の構造の維持には関与していないと考えられる。

以上の結果をまとめ、*A. sobria* で生合成された溶血毒素が活性体となるまでの過程をモデルで表し

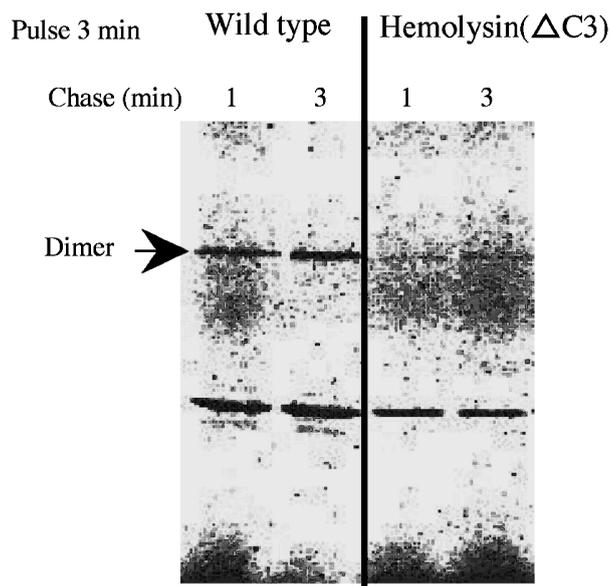


Fig. 2. Formation of Dimer of *A. sobria* Hemolysin

The non-hemolytic strain of *A. sobria* T94 was transformed with plasmids carrying wild type hemolysin or hemolysin ($\Delta C3$). The transformed cells were labeled with [³⁵S]cysteine by incubation at 30°C for 3 min and then chased for period indicated in the figure. The culture supernatant were treated with dimethyl suberimidate to form the cross-linkage between the associated molecules. The hemolysins were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The bands indicated by the arrow is dimer of hemolysin.

た (Fig. 3). 生合成された溶血毒素はシグナルペプチド依存的に菌のペリプラスム内へ移行後, C末端領域が引き金となり速やかに二量体を形成し, 二量体を形成した毒素は菌体外へ分泌される. 生合成から菌体外へと分泌される時間は非常に早く1分以内に完了する. 二量体の毒素は安定であり分解され

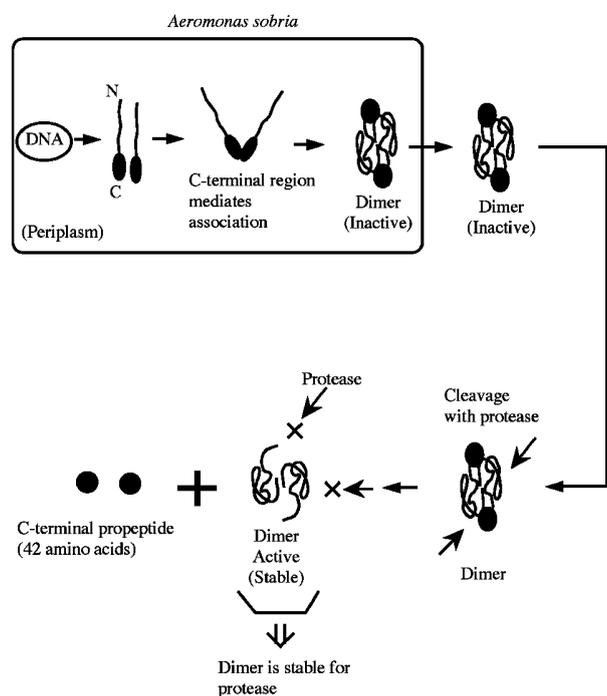


Fig. 3. Maturation Pathway of Hemolysin Produced by *Aeromonas sobria*

ない. 分泌された溶血毒素は不活性体であり, やがて菌から産生されたプロテアーゼにより C末端の42アミノ酸が切り取られ活性体となる.

溶血毒素と同じく, 成熟化の過程でペプチドが切断を受けるタンパクは他にも多く知られている. そのようなペプチドのことをプロペプチドと呼ぶ. プロペプチドの機能は主に Table 1 のように分類され, 分子シャペロン型, 膜アンカー型, 外膜輸送型, 内膜輸送型が知られている.²¹⁾ しかし, *A. sobria* の溶血毒素の C末端領域は, 二量体形成を促すように機能しており, 今までに知られているプロペプチドとは性質を異にすると思われる. このような観点から, 筆者は溶血毒素の C末端領域を分子会合の促進に機能する C末端プロペプチドと位置づけた. このように本溶血毒素の C末端領域は, タンパク化学的にも興味ある性質を保有する領域である.

5. 溶血毒素の下痢発症機構

下痢を発症する毒素として有名なコレラ菌のコレラ毒素 (CT) や大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (ST1) は標的細胞のアデニル酸シクラーゼやグアニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cAMP (サイクリック AMP) や cGMP (サイクリック GMP) の合成をそれぞれ促進し, その結果腸管の液体貯留を起こすと考えられている.²²⁾ これらの毒素はいず

Table 1. Functions of Pro-Peptides of Bacterial Proteins

Type	Protein	Bacteria	Function
I. Intramolecular chaperone	Subtilisin family	<i>Bacillus subtilis</i>	Folding, Inhibition
	El Tor Hemolysin	<i>Vibrio cholerae</i>	
	α -Toxin	<i>Clostridium septicum</i>	
II. Membrane anchor	Penicillinase	<i>Bacillus subtilis</i>	Anchoring
	Carlsberg subtilisin	<i>Bacillus licheniformis</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i>	
III. Outer membrane transport	Aqualysin I	<i>Thermus aqualiticus</i>	Autotransport (C-terminal pro-region)
	IgA protease	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
	Serine protease	<i>Serratia marcescens</i>	Accelerate outer membrane transport (N-terminal pro-region)
	Endoglucanase	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	
IV. Inner membrane transport	Neutral protease	<i>Bacillus cereus</i>	Accelerate inner membrane transport
	Heat-stable enterotoxin Ip	<i>Escherichia coli</i>	
	Nuclease	<i>Staphylococcus aureus</i>	
V. Molecular association	Hemolysin	<i>Aeromonas sobria</i>	Accelerate the dimer formation

れも細胞を破壊せず、細胞内シグナルの変動に基づいて下痢を発症させる。一方、溶血毒素は標的細胞膜上で直径約1—4 nmの小孔を形成し細胞を破壊する活性を有する毒素である。¹⁸⁾ そこでこの細胞破壊と下痢との関係を検討したところ、細胞の破壊が下痢発症の直接の原因ではない事が分かった。さらに検討を進めたところ、溶血毒素の作用によって細胞内、細胞外のcAMP量に変動する事が分かった。詳細な機構に関しては現在さらに検討中である。

6. おわりに

筆者らの研究が行われるまでは全く不明であった *A. sobria* の下痢毒素の性状を明らかにした。下痢毒素は溶血毒素でもある事を証明し、さらに溶血毒素が下痢活性を示す活性体となるまでの毒素の成熟化過程とC末端領域の機能を明らかにした。すなわち本毒素はC末端のプロペプチドの機能を利用し、二量体を形成し、その結果毒素は安定型となり、また分泌能も獲得する。また毒素には標的細胞のcAMP産生を高める作用のある事も分かった。今回明らかにしたこれらの性状は、今後二量体形成タンパクの形成過程の解析や下痢毒素の作用機構の解析に有用であると考えている。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部分子細胞薬品科学講座 岡本敬の介教授に深謝いたします。また多大な御指導と御助言を賜りました徳島文理大学薬学部生薬研究所 藤井儀夫助教授、生化学研究室 山中浩泰助教授に厚く御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Sanyal S. C., Singh S. J., Sen P. C., *J. Med. Microbiol.*, **8**, 195–198 (1975).
- 2) Albert M. J., Faruque A. S., Faruque S. M., Sack R. B., Mahalanabis D., *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3458–3464 (1999).
- 3) Ender P. T., Dolan M. J., Dolan D., Famer J. C., Melcher G. P., *J. Emerg. Med.*, **14**, 737–741 (1996).
- 4) Brink A. J., Giannakopoulos E., Viljoen H. G., *S. Afr. Med. J.*, **88**, 1011–1012 (1998).
- 5) Singh D. V., Sanyal S. C., *J. Med. Microbiol.*, **36**, 269–272 (1992).
- 6) Chopra A. K., Peterson J. W., Xu X. J., Copenhagen D. H., Houston C. W., *Microb. Pathog.*, **21**, 357–377 (1996).
- 7) van der Goot F. G., Lakey J., Pattus F., Kay C. M., Sorokine O., Dorselaer A. V., Buckley J. T., *Biochemistry*, **31**, 8566–8570 (1992).
- 8) Howard S. P., Buckley J. T., *J. Bacteriol.*, **161**, 1118–1124 (1985).
- 9) van der Goot F. G., Ausio J., Wong K. R., Pattus F., Buckley J. T., *J. Biol. Chem.*, **268**, 18272–18279 (1993).
- 10) Abrami L., Fivaz M., Decroly E., Seidah N. G., Jean F., Thomas G., Leppla S. H., Buckley J. T., van der Goot F. G., *J. Biol. Chem.*, **273**, 32656–32661 (1998).
- 11) van der Goot F. G., Pattus F., Wong K. R., Buckley J. T., *Biochemistry*, **32**, 2636–2642 (1993).
- 12) Garland W. J., Buckley J. T., *Infect. Immun.*, **56**, 1249–1253 (1988).
- 13) Kozaki S., Asao T., Kamata Y., Sakaguchi G., *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1782–1786 (1989).
- 14) Millership S. E., Barer M. R., Mulla R. J., Maneck S., *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 261–267 (1992).
- 15) Potomski J., Burke V., Watoson I., Gracey M., *J. Med. Microbiol.*, **23**, 171–177 (1987).
- 16) Gosling P. J., Turnbull P. C. B., Lightfoot N. F., Pether J. V. S., Lewis R. J., *J. Med. Microbiol.*, **38**, 227–234 (1993).
- 17) Hitotsubashi S., Fujii Y., Yamanaka H., Okamoto K., *Infect. Immun.*, **60**, 4468–4474 (1992).
- 18) Fujii Y., Nomura T., Kanzawa H., Kameyama M., Yamanaka H., Akita M., Setsu K., Okamoto K., *Microbiol. Immunol.*, **42**, 703–714 (1998).
- 19) Ferguson M. R., Xu X. J., Houston C. W., Peterson J. W., Copenhagen D. H., Popov V. L., Chopra A. K., *Infect. Immun.*, **65**, 4299–4308 (1997).
- 20) Parker M. W., Buckley J. T., Postma J. P. M., Tucker A. D., Leonard K., Pattus F., Tsernoglou D., *Nature (London)*, **367**, 292–295 (1994).
- 21) Eder J., Fersht A. R., *Mol. Microbiol.*, **16**, 609–614 (1995).
- 22) Braun P., Tommassen J., Filloux A., *Mol. Microbiol.*, **19**, 297–306 (1996).