

Aeromonas sobria セリンプロテアーゼの構造と機能に関する研究

小林秀丈

Structural and Functional Analysis of the Serine Protease from *Aeromonas sobria*

Hidetomo KOBAYASHI

Laboratory of Molecular Microbiological Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
5-1-1 Hiro-Koshingai, Kure, Hiroshima 737-0112, Japan

(Received May 30, 2011)

Aeromonas species are Gram-negative facultative anaerobic bacteria found ubiquitously in a variety of aquatic environments and most commonly implicated as causative agents of gastroenteritis. Sepsis is a fatal complication of *Aeromonas* infectious diseases, particularly in immune-compromised patients. Two species, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*, are associated with human disease. Feasible virulence factors of *Aeromonas* include fimbrial and afimbrial adhesion molecules, hemolysins, enterotoxins, lipases and proteases. Recently, we purified a 65-kDa *A. sobria* serine protease (ASP) from the culture supernatant of *A. sobria* and found that the enzyme induces vascular leakage and reduces blood pressure through activation of the kallikrein/kinin system. This ASP activity potentially contributes to the onset of septic shock, suggesting ASP as an important virulence factor. In this review, I describe both the substrate specificity and the structural property of ASP. Furthermore, I also discuss the maturation mechanism of ASP. Further studies will facilitate development of novel drugs for bacterial infection that have inhibitory effects on various serine proteases.

Key words—*Aeromonas sobria*; serine protease; substrate specificity; crystal structure; maturation

はじめに

Aeromonas は河川水、海水、泥や土などの自然環境中に広く生息している通性嫌気性グラム陰性桿菌である。現在、*Aeromonas* には Table 1 に示すように 18 菌種が知られている。^{1,2)} 本菌種による感染症は下痢症など消化器系の感染症に加え、重篤なケースでは敗血症などの全身感染症を示す。筆者はこれまで病原菌種に属する *A. sobria* が産生する病原因子の 1 つであるセリンプロテアーゼに注目し、研究を行ってきた。本総説では、セリンプロテアーゼの結晶構造の解析結果とともに、基質特異性や成熟化機構に関して論述する。

1. *Aeromonas* の病原因子

Aeromonas 属のうち、*A. hydrophila* と *A. sobria* は近年ヒトに下痢症を誘発する原因菌としてしばし

ば分離されており、保健衛生上の注意が喚起されている。これらの菌の病原因子に関する研究は *A. hydrophila* が産生する毒素を中心に展開されている。^{3,4)} その毒素には複数のものが含まれており、互いに協調的に機能してヒトにおける感染の成立、ひいては感染症の進展に寄与しているものと思われる。特に、*Aeromonas* は菌体外に高いプロテアーゼ活性を示す菌としても特徴づけられている。細菌性プロテアーゼは宿主への病原性を高める重要な因

Table 1. Species of Genus *Aeromonas*

Pathogenic species
<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. punctata</i> (<i>caviae</i>)
Non-pathogenic or uncertain species
<i>A. simiae</i> , <i>A. bestiarum</i> , <i>A. guangheii</i> , <i>A. media</i> , <i>A. eucrenophila</i> , <i>A. veronii</i> (biogroups <i>sobria</i> and <i>veronii</i>), <i>A. jandaei</i> , <i>A. schubertii</i> , <i>A. molluscorum</i> , <i>A. allosaccharophila</i> , <i>A. encheleia</i> , <i>A. popoffii</i> , <i>A. culicicola</i> , <i>A. enteropelogenes</i> , <i>A. ichthiosmia</i> , <i>A. tecta</i>

広島国際大学薬学部分子微生物科学教室 (〒737-0112 広島県呉市広古新開 5-1-1)

e-mail: h-koba@ps.hirokoku-u.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

子として注目を集めており、直接的に組織破壊を促すのみならず、宿主のプロテアーゼカスケード系や細胞を異常に活性化するなど多様な作用を持つ病原因子である。しかしながら、その分子機構の詳細については不明な点も多く、*A. hydrophila* 以外の菌に関する情報は決して多いとは言えない。このような背景から、筆者は *A. sobria* が産生するプロテアーゼに注目し、その研究を進展させようと考えた。

2. *A. sobria* の産生するセリンプロテアーゼの精製と基質特異性

A. sobria が産生するセリンプロテアーゼ (*A. sobria* serine protease: ASP) は分子量約 64000 のタンパク質であり、Fig. 1 に示すように培養上清から高度に精製することに成功している。⁵⁾ ASP の一次構造を解析した結果、ASP は Kexin ファミリーに属するセリンプロテアーゼに分類される。⁶⁾ Kexin ファミリーの代表的なプロテアーゼである Kex2 や furin は K/R-Xn-K/R 配列の C 末端側で切断する高い基質特異性が特徴で、哺乳動物の組織に広く分布し恒常性の維持に重要なタンパク質のプロセシングに係わることが知られている。^{7,8)} そこで ASP の基質特異性を種々の合成基質を用いて調べた結果、ASP は Xn-K-K/R 配列の C 末端側を特異的に切断することを明らかにした。⁹⁾ 一方、ASP を皮内注射するとカリクレイン-キニン系を活性化して血管透過亢進を起こす。この病原作用は血漿プレカリクレインの限定切断によるカリクレインへの変換が関わっていることから、ASP は -R 残基の C 末端側も切断することができることがわかった。^{9,10)} これはプロトロンビン活性化作用からも窺える。¹¹⁾ このように、ASP の高い基質特異性が病原性と深く関わることが考察されたが、その基質認識についてより詳細に解析する目的で ASP の結晶構造の解明を試みた。

3. ASP の結晶構造

ASP の全体像を Fig. 2 (A) に示した。ASP は Gly-3 から Pro-431 に至るサブチリシン様の触媒ドメイン及び Leu-432 から His-595 に至る P ドメインの構造を有していることが明らかになった。ASP の構造を同じ Kexin ファミリーのプロテアーゼである Kex2 と比較した結果、Fig. 2(B) に示すように、ASP の構造は Kex2 の構造と大部分では類似していたが、サブチリシン様触媒ドメインでは L1,

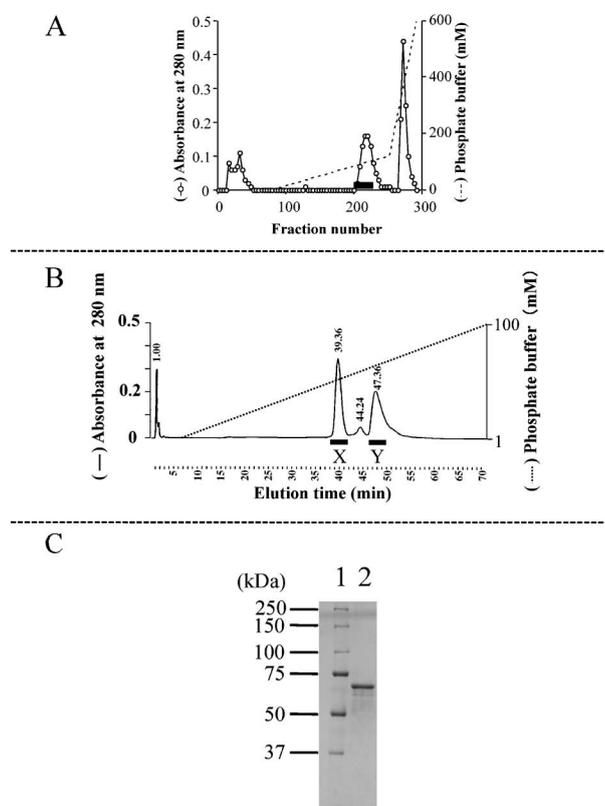


Fig. 1. Purification of ASP

(A) The crude sample was loaded onto a hydroxyapatite column equilibrated with 1 mM phosphate buffer (pH 7.2). After washing the column, the adsorbed material was eluted first with a linear gradient of 1 to 120 mM phosphate buffer, and then with a gradient of 120 to 600 mM phosphate buffer. Fractions presenting proteolytic activity are indicated by the horizontal bar. (B) The active fractions from panel A were collected and concentrated 20x, after which the sample was diluted threefold with water and loaded onto a hydroxyapatite column in a HPLC system. After washing, the adsorbed material was eluted with a linear gradient of 1 to 100 mM phosphate buffer. Two peaks, designated as fractions X and Y, expressed proteolytic activity. (C) SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) of the purified samples from fractions X (lane 2) in Fig. 1B. Numbers along the side indicate molecular masses in kDa. Lane 1, molecular mass standards.

L2, L3 及び L4 が、P ドメインでは pL1 及び pL2 の構造がそれぞれ ASP にのみ存在することが明らかになった。特に活性中心の立体構造に注目すると、ASP では基質の P1 結合部位の構成アミノ酸残基が Gly-179, Gly-217, Glu-242 及び Asp-247 の 4 個のアミノ酸残基で構成されているのに対して、Kex2 では Gly-274, Asp-277, Gly-313, Asp-320, Asp-325 及び Glu-350 の 6 個で構成されていた。また ASP と Kex2 は、いずれも 3 個の Ca^{2+} イオンの配位が確認され [Fig. 2(B)], Kex2 ではそのうちの 1 つの Ca^{2+} イオンが P1 結合部位に配位していることが報告されている。¹²⁾ この Ca^{2+} イオンは Kex2 の触媒活性には関わっていないものの、主に酸性アミノ

酸残基で構成される P1 結合部位周辺の環境を部分的に中和するなど、P1 の選択性に少なからず寄与していることが推察されている。¹²⁾ 一方、ASP では P1 結合部位の Ca²⁺ イオンが確認されず、このよ

うな特徴が ASP の P1 アミノ酸残基の選択性が Kex2 と比較して低くなる原因ではないかと考えている [Figs. 3(A) and (B)]. さらに、ASP では Gly-557~Asn-578 (extra occluding region) が触媒部位に隣接しており、特に Arg-566 は P3 のアミノ酸残基の近くに位置していた [Fig. 3(C)]. これらの知

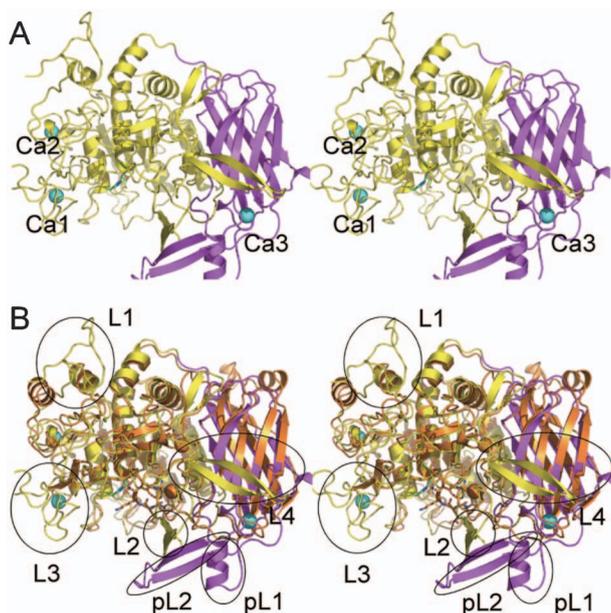


Fig. 2. Overall Structure of ASP

A, stereo ribbon representation of the overall structure of ASP. The domain architecture is shown in different colors: the N-terminal subtilisin domain (amino acids 3–431) is shown in yellow, and the C-terminal P-domain (amino acids 432–595) is shown in purple. Three bound Ca²⁺ ions are shown as greenish cyan spheres. B, superimposed stereo view of ASP (yellow and purple as in A) and Kex2 (orange). The four loops in the N-terminal domain of ASP are labeled L1, L2, L3, and L4, whereas the two parts of the unique extra occluding region in the C-terminal domain are labeled as pL1 and pL2.

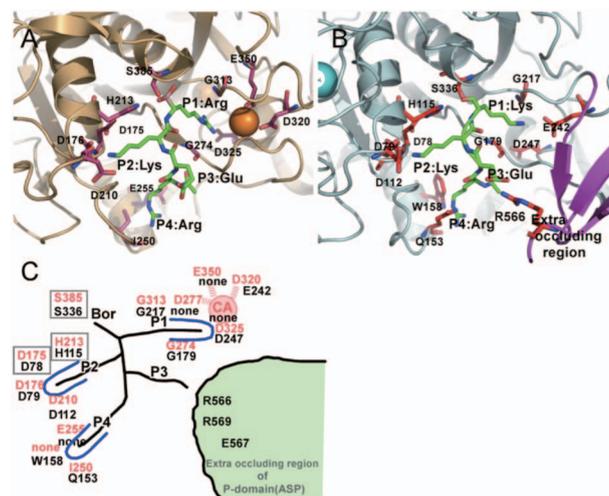


Fig. 3. Structural Comparison of the Subsites in ASP and Kex2

A, close-up view of catalytic site of *S. cerevisiae* Kex2 with a bound inhibitor (Protein Data Bank code 1R64), which is shown in light orange. One Ca²⁺ ion bound to Kex2 is shown as orange spheres. The important residues making up the subsites are shown as orange sticks. B, close-up view of the catalytic site of ASP with a bound substrate model (Lys-Lys-Glu-Arg). The important residues that make up the subsites are shown as red sticks. The Ca²⁺ ion bound to ASP is shown as greenish cyan spheres. The extra occluding region is shown in purple. C, schematic representation of the subsites of Kex2 and ASP. The site of Kex2 and ASP are labeled in red and black letters.

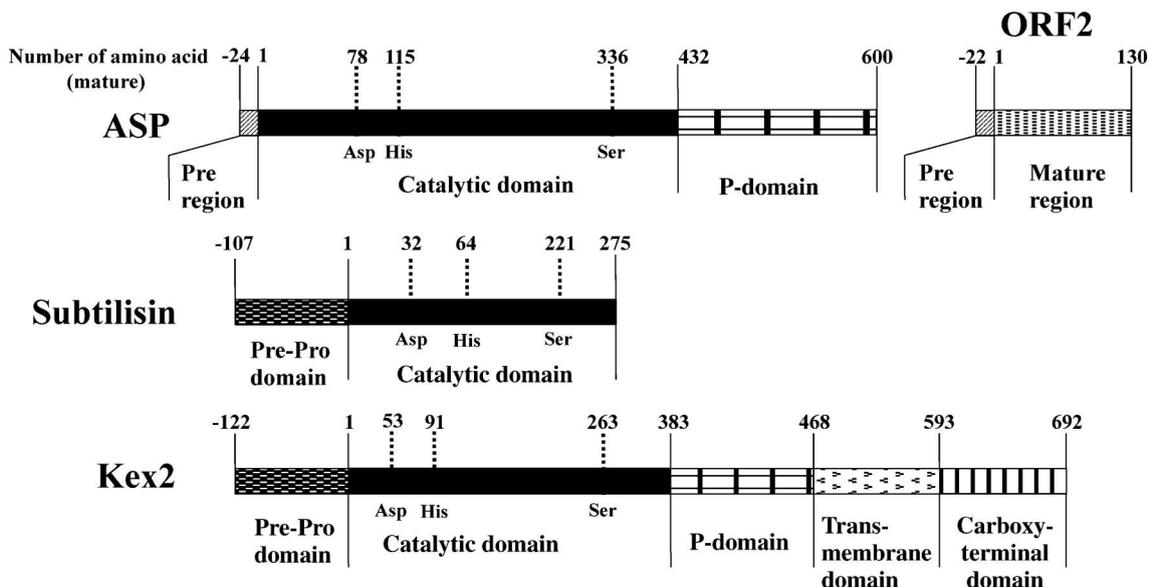


Fig. 4. Domain Structures of Subtilisin Family Serine Proteases

見から、Arg-566のようなASP特異的な残基の存在がP3のアミノ酸残基の選択性を決定しているのではないかと考えている。⁵⁾ また、ASPに特異的なextra occluding regionがプレカリクレインの活性化に関与していることは明らかであり、この領域はASPの基質タンパク質との結合に影響を与えていると推察している。⁵⁾ 今後、これらの知見を基にASP阻害剤の設計を試み、セリンプロテアーゼを標的とする治療薬の開発へと研究を展開したい。

4. ASPの成熟化機構

Kexinファミリープロテアーゼのうち、ASPは特異な成熟化様式を示す。枯草菌プロテアーゼであるsubtilisinは成熟領域のN末端側にプロ領域が存在し、この領域が成熟領域の折りたたみを促進することが知られている。¹³⁾ Kex2もN末端側にプロ領域が存在し、subtilisinと同様な役割を果たすことが予想される (Fig. 4)。一方、ASPでは内膜通過に必要なプレ領域のみでプロ領域は認められない。しかし、ASPでは遺伝子下流に別のopen reading frame 2があり、ORF2をコードしている。遺伝子欠損実験などにより、ORF2はペリプラスム内での成熟化に関与するタンパク質であることが判明した。¹⁴⁾ このような役割から、われわれはORF2をシャペロンタンパク質の一種であると考えた。¹⁵⁾ しかし、両タンパク質がどのような分子機構で相互作用するのかは不明であったため、筆者はORF2との相互作用に必要なASPの構造部位の解明を目指した。

まず、ASPの成熟化に必要な領域を検索する目的で、ASPのC末端領域を欠損させた変異体ASPを作製し解析した。*In vitro*でHis-tag ORF2とともにタンパク質合成を行いNi sepharoseを用いたpull-down assayでASPとORF2との相互作用の検出を行った。もし、ASPがORF2と相互作用するならば、Ni sepharoseと結合したHis-tag ORF2とともにASPも共沈し、SDS-PAGEで両者のバンドが観察される。野生型ASPとHis-tag ORF2を合成しpull-down assayを行った結果、His-tag ORF2のバンドとともにASPのバンドが検出された [Fig. 5(B)]。同様に、ASPのC末端から1, 5, 6, 7, 8, 10, 82個のアミノ酸が欠損した変異ASPをコードする遺伝子を作製し、同様に解析した。その結果、ASPのC末端から1及び5個欠損した変異ASPで

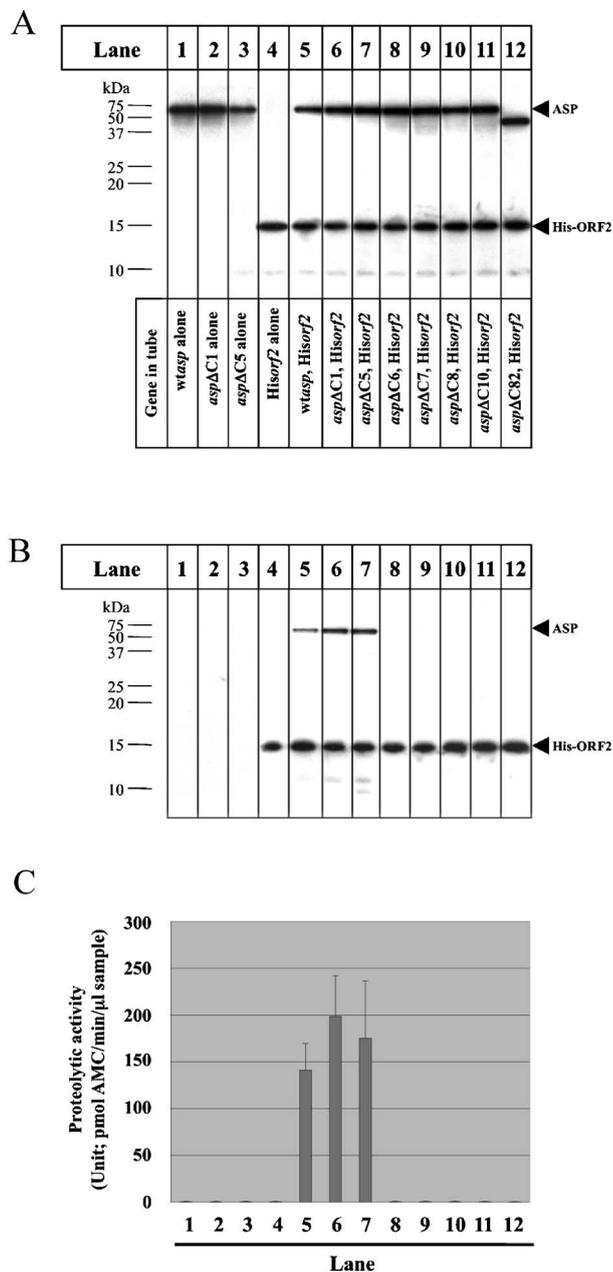


Fig. 5. Analysis of the Role of the Carboxy-terminal Tail of ASP in Protein Production in an *In Vitro* Transcription and Translation System

(A) After protein expression, proteins were separated by SDS-PAGE. The radioactive proteins were visualized by autoradiography. The bands for ASP and ORF2 (His-ORF2) are indicated by the arrows. Numbers along the side indicate molecular masses in kDa. (B) The association of ASP with ORF2 was examined by pull-down assay. The bands for ASP and ORF2 (His-ORF2) are indicated by the arrows. Numbers along the side indicate molecular masses in kDa. (C) The proteolytic activity of samples, as measured using the fluorogenic synthetic peptide substrate. Values are means \pm S.D. ($n=3$).

は野生型ASPと同様にHis-tag ORF2と共沈したASPのバンドが検出された [Fig. 5(B)]。一方、ASPのC末端から6, 7, 8, 10及び82個欠損した変異ASPのタンパク合成量は野生型ASPと同じ量

であるにもかかわらず [Fig. 5(A)], pull-down assay を行うと ASP のバンドが検出されず, ORF2 と相互作用していないことがわかった [Fig. 5(B)]. また, これらのサンプルにおけるプロテアーゼ活性を測定した結果, ORF2 と相互作用が検出されなかった変異 ASP では野生型 ASP の場合と比較して顕著に低い活性しか有していないことがわかった [Fig. 5(C)]. 以上の結果より, ASP の C 末端から 6 個以上の欠損は ORF2 との相互作用が妨げられることにより, ASP の成熟化が進行しないと考察され, 特に C 末端から 6 番目の構成アミノ酸である His595 はそのプロセスの進行に重要な残基であると考えられる. さらに, ASP の His595 を別のアミノ酸残基に置換して同様の解析を行った結果, Asp, Cys, Pro に置換した ASP では ORF2 との相互作用が検出されなかった. このことから, ASP の His595 の付近の立体構造が ORF2 を受容し, ASP を活性体へと導く特異な環境を提供しているのではないかと考えている.¹⁶⁾

細菌性プロテアーゼの成熟化において ASP のようにシャペロンタンパク質を必要とするケースは稀である. また, ORF2 はこれまで類似なタンパク質がみつかっておらず, ORF2 の機能を解明することは生化学的にも貴重な知見となる. Figure 6 には

ASP の成熟化機構の概要について示した. これまでの解析結果から, 細胞内で合成された ASP とその遺伝子下流にコードされる *orf2* 遺伝子産物は, それぞれ内膜通過のためのシグナル配列依存的に細胞質からペリプラスムへと移動する. グラム陰性桿菌においてシグナルペプチド依存的に菌体外へ分泌される種々のタンパク質の成熟化機構を参考にする, フォールディングやジスルフィド結合の形成反応などの過程はペリプラスム中で安定に進行しており, 外膜通過過程は最終的なコンフォメーションをとった成熟体の構造を認識して菌体外への分泌を促すことが一般的である. このような知見から, ORF2 との相互作用に基づく ASP の成熟化もペリプラスム内で進行し, 最終的に完成した ASP の構造を菌体外輸送系が認識して分泌を完結しているのではないかと推察している. しかしながら, 現時点の解析結果は大腸菌を宿主としたものであるため, ASP の成熟化機構の細部は *Aeromonas* を宿主とする系で解析を進める必要がある. 今後, そのような系の確立も試み, ASP の成熟化機構の全貌を明らかにしたいと考えている.

おわりに

1982 年にわが国において *Aeromonas* 属のうち *A. hydrophila* 及び *A. sobria* が新たに食中毒菌に

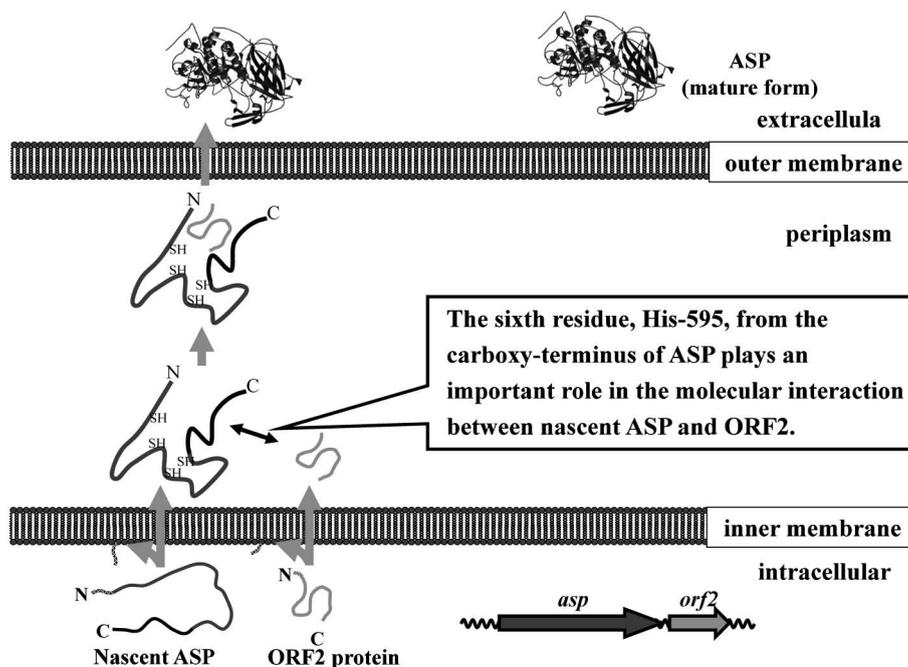


Fig. 6. Model for Maturation Pathway of *A. sobria* Serine Protease in Cells

指定された。本菌による感染症状は、軽度の場合では胃腸炎で治癒する。しかし、免疫力が低下した患者に対して本菌は腸管外感染症に進展することがあり、そのケースでは極めて予後が悪くなる。また、本菌は低温域での増殖性も有しており、食品の低温保存は過信するべきではない。わが国では今後ますます高齢化が進み、免疫力が低下した患者も増加することから本菌に関する研究も決して軽視できないと考える。このような観点からも筆者は病原因子としての ASP に関して分子レベルでの研究をより一層進めるとともに、その成果をいかに応用できるのかについても今後考えていきたいと思っている。

謝辞 本研究の遂行にあたり、懇切なご指導とご鞭撻を賜り、さらに、本総説を執筆するにあたり、貴重な助言を賜りました広島国際大学薬学部山中浩泰教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究における総合的なご指導とご鞭撻を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科岡本敬の介教授に厚く御礼申し上げます。さらに、共同研究をして頂いた京都産業大学総合生命科学部津下英明教授、並びに熊本大学大学院生命科学研究部今村隆寿准教授に心より感謝いたします。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（課題番号：19890254）によって行われたものであることを付記致します。

REFERENCES

- 1) Abbott S. L., Cheung W. K., Janda J. M., *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2348–2357 (2003).
- 2) Soler L., Yanez M. A., Chacon M. R., Aguilera-Arreola M. G., Catalan V., Figueras M. J., Martinez-Murcia A. J., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1511–1519 (2004).
- 3) Altwegg M., Geiss H. K., *Crit. Rev. Microbiol.*, **16**, 253–286 (1989).
- 4) Krovacek K., Dumontet S., Eriksson E., Baloda S. B., *Microbiol. Immunol.*, **39**, 655–661 (1995).
- 5) Kobayashi H., Utsunomiya H., Yamanaka H., Sei Y., Katunuma N., Okamoto K., Tsuge H., *J. Biol. Chem.*, **284**, 27655–27663 (2009).
- 6) Siezen R. J., Leunissen J. A., *Protein. Sci.*, **6**, 501–523 (1997).
- 7) Krysan D. J., Rockwell N. C., Fuller R. S., *J. Biol. Chem.*, **274**, 23229–23234 (1999).
- 8) Susan-Resiga D., Essalmani R., Hamelin J., Asselin M. C., Benjannet S., Chamberland A., Day R., Szumska D., Constam D., Bhattacharya S., Prat A., Seidah N. G., *J. Biol. Chem.*, **286**, 22785–22794 (2011).
- 9) Kobayashi H., Takahashi E., Oguma K., Fujii Y., Yamanaka H., Negishi T., Arimoto-Kobayashi S., Tsuji T., Okamoto K., *FEMS Microbiol. Lett.*, **256**, 165–170 (2006).
- 10) Imamura T., Kobayashi H., Khan R., Nitta H., Okamoto K., *J. Immunol.*, **177**, 8723–8729 (2006).
- 11) Nitta H., Kobayashi H., Irie A., Baba H., Okamoto K., Imamura T., *FEBS Lett.*, **581**, 5935–5939 (2007).
- 12) Holyoak T., Wilson M. A., Fenn T. D., Kettner C. A., Petsko G. A., Fuller R. S., Ringe D., *Biochemistry*, **42**, 6709–6718 (2003).
- 13) Tanaka S., Matsumura H., Koga Y., Takano K., Kanaya S., *J. Mol. Biol.*, **372**, 1055–1069 (2007).
- 14) Okamoto K., Nomura T., Hamada M., Fukuda T., Noguchi Y., Fujii Y., *Microbiol. Immunol.*, **44**, 787–798 (2000).
- 15) Nomura T., Fujii Y., Yamanaka H., Kobayashi H., Okamoto K., *J. Bacteriol.*, **184**, 7058–7061 (2002).
- 16) Kobayashi H., Tateishi A., Tsuge H., Takahashi E., Okamoto K., Yamanaka H., *Microbiol. Immunol.*, **53**, 647–657 (2009).