



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Identification of a bacteriolysis-associated virulence factor against lung epithelial cells in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 cell lysate. (緑膿菌 PAO1 溶菌液における肺上皮細胞障害因子の同定)
Author(s) 著者	品川, 雅明
Degree number 学位記番号	甲第 2759 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報告番号	甲第 2759 号	氏名	品川 雅明
<p>Identification of a bacteriolysis-associated virulence factor against lung epithelial cells in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 cell lysate. {緑膿菌 PAO1 溶菌液における肺上皮細胞障害因子の同定}</p> <p>研究目的</p> <p>緑膿菌は、免疫能の低下した患者に肺炎、敗血症や尿路感染症などの日和見感染を引き起こす、主要なグラム陰性桿菌である。本菌は、盛んに増殖している非溶菌時には、種々の分泌装置を用いて exotoxin、protease、elastase や exoenzyme などを菌体外に放出し、細胞障害性を発揮する。一方、宿主の免疫システムが働き補体および好中球の活性化や defensin の誘導などが惹起された際や、抗菌薬投与で溶菌が起こると、菌体成分が放出され、症状がさらに増悪することがある。これまで、溶菌時に lipopolysaccharide (LPS) が放出され、免疫担当細胞を刺激し細菌性ショックを引き起こすことが知られている。しかし、溶菌した菌体成分が直接細胞障害性を発揮するか否かについては、いまだ報告がなく不明であった。</p> <p>そこで、本研究では、緑膿菌 PAO1 株を溶菌させ、細胞障害分子の単離を試みた。さらに、ヒト肺上皮由来 A549 細胞を上皮細胞のモデルとし、当該分子が実際に細胞障害性を発揮するか否か調べた。</p> <p>研究方法</p> <p>1) 溶菌液の調整法</p> <p>PAO1 株を LB 培地で振とう培養後、SONIFIER 250 (BRANSON) で超音波破碎し、遠心上清(溶菌液)を回収した。</p> <p>2) A549 細胞に対する障害性の評価法</p> <p>96well プレート内の細胞に Cell Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 試薬を添加し、ATP をルシフェラーゼ反応で発光量として捉え評価</p>			

した。発光量の測定には、Veritas Microplate Luminometer を使用した。

3) 細胞障害分子の単離と同定法

ゲル濾過クロマトグラフィーHiPrep 16/60 Seph acryl S-300 HR (GE Healthcare) による分画と、陰イオン交換クロマトグラフィー-RESOURCE Q 1 ml (GE Healthcare)を用いたステップワイズ法で行った。細胞障害分子の同定には、質量分析装置 4800 plus MALDI_TOF/TOF analyzer と ProteinPilot™ ソフトウェア (AB Sciex) を使用した。

4) 遺伝子変異 PAO1 株

遺伝子変異 PAO1 株 7 種は、Washington 大学 Genome Science から入手した。

5) リコンビナント蛋白の作製法

大腸菌 BL21 に pHAT10 ベクターを形質転換し、ABPC 加 LB 培地で 600nm の吸光度が 0.6 になるまで培養後、1mM IPTG を加えさらに 5 時間培養した。超音波破碎後、8M 尿素変性条件下で精製し、段階的透析法で蛋白のリフォールディングを行った。

6) リコンビナント蛋白の A549 細胞への添加法

細胞膜との直接融合やエンドサイトーシスによる取り込み効率を高めるため、リコンビナント蛋白溶液に陽イオン性脂質 (BioPORTER Protein Delivery Reagent) を加えて複合体を形成させ、A549 細胞に添加した。

研究成績

- 1) PAO1 溶菌液 (6.0 mg/mL) を A549 細胞に添加し 48 時間培養すると、94.4% の細胞障害性がみられた。
- 2) 細胞障害分子を分離精製するため、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、各分画の A549 細胞に対する障害性を調べた。その結果、フラクション No.20~26 の分画で細胞障害性がみられた。そこで、分配係数 K_{av} 値を既知の蛋白のそれと比較し、細胞障害分子の分子量分布について解析した。最も細胞障害性が強かったフラクション No.23 についてみると、 K_{av} 値は 0.36 であり、分子量は約 85,000 と推測された。
- 3) 精製をさらに進めるため、ゲル濾過クロマトグラフィーで細胞障害性がみられた分画をプール後、Amicon Ultra で濃縮し、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、ステップワイズ法で再分画した。各分画を 20 mM HEPES buffer で透析

後、A549 細胞に対する障害性を調べたところ、0.05MNaCl 溶出液で最も高い値が得られた。

- 4) また、溶出液に Proteinase K を添加すると、細胞障害性はその濃度依存性に低下し、細胞障害分子は蛋白であった。そこで、0.05MNaCl 溶出液を 4-20% Tris-Glycine Gel (Novex)を用いた Native PAGE で分離後、43.5-100kDa 領域のゲルを切り出し、質量分析したところ、10.6~63.5kDa の7分子が同定された。
- 5) 7 分子の各遺伝子変異株から溶菌液を抽出し、A549 細胞に対する障害性を比較検討した。その結果、PA0423 (191 残基、20.8kDa) の変異株由来溶菌液でのみ、細胞障害性が解除された。
- 6) PA0423 自身が細胞障害分子であることを確認するため、そのリコンビナント蛋白を作製した。なお、陰性対照は細胞障害性の解除がみられなかった PA0122 とし、同様にリコンビナント蛋白を作製した。作製したリコンビナント蛋白が PA0423 および PA0122 であることの確認は、質量分析で行った。
- 7) PA0423 および PA0122 のアミノ酸組成を調べたところ、極めて親水性の高い蛋白であることが確認された。細胞膜透過性が極めて低いことが予想されたため、A549 細胞への添加実験を行うにあたり、陽イオン性脂質(BioPORTER Protein Delivery Reagent)を併用した。その結果、陰性対照である PA0122 を添加し 48 時間培養した際には、増殖抑制はみられなかった。一方、同濃度の PA0423 を添加すると、43.8%の増殖抑制効果が確認された。

考察

本研究の結果から、緑膿菌 PAO1 株の溶菌により放出された菌体蛋白 PA0423 が、肺上皮細胞に対し障害性を発揮することが初めて明らかになった。本分子は、緑膿菌 PAO1 株の PA0423 遺伝子産物であり、Nouwens らが菌体外に放出される機能不明分子と報告している。その後、Marquart らが、PA0423 と 99.5%の遺伝子相同性を持つ *P.aeruginosa* small protease (PASP)を別の緑膿菌 PA103 株から同定し、本分子が兔の角膜にびらんを

引き起こすことを見出した。本蛋白の分子量は、アミノ酸配列上の非修飾状態で約 21kDa である。彼らはゼラチンを用いた zymogram 解析で約 80kDa 前後にバンドを検出し、4 量体形成を示唆している。今回、我々が溶

菌液を用いて細胞障害分画の分子量を推定した結果でも約 85kDa であり、良く一致していた。

また、Marquart と同グループの Tang らは、本分子が緑膿菌株間で広く保存されており、I型およびIV型 collagen を分解することを報告している。さらに、活性が PA103 株の培養上清中にのみ認められ、N 末端側にはシグナルペプチドが存在することから、兎角膜びらんは、菌体外に分泌された本分子が上皮の collagen 分解を惹起した結果と、結論付けている。一方、我々の検討では、A549 細胞への細胞障害性は、菌体蛋白自身によって引き起こされている。加えて、本検討では collagen や gelatin などの細胞外基質が存在しない条件下で、上皮細胞のみを標的に解析している。さらに、Tang らが兎に角膜びらんを引き起こすために用いた蛋白濃度は $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ であるのに対し、我々の検討では 1/10 未満の $4.8 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ で上皮細胞障害性を確認している。以上の事実から、今回明らかとなった PA0423 の A549 細胞に対する障害性は、PASP のそれとは異なっていた。

現在、緑膿菌感染に対して種々の抗菌薬が用いられているが、治療に伴う溶菌時にみられる副反応発現において、LPSによる細菌性ショックに加え、本検討で見い出した肺上皮細胞に対する直接障害性が重要な役割を担っていると想定される。したがって、PA0423を標的とした抗体や低分子ペプチドなど阻害剤の開発が進めば、副反応を防ぐための新たな治療薬となる可能性があり、期待が持たれる。

結論

緑膿菌体由来 PA0423 が肺上皮細胞に直接作用し、障害性を発揮することが明らかになった。

論文審査の要旨及び担当者

平成 26 年 1 月 6 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2759 号	氏名	品川 雅明
論文審査 担当者	主査 渡邊 直樹	副査 横田 伸一	
	委員 高橋 弘毅	委員 小林 宣道	

論文題名	Identification of a bacteriolysis-associated virulence factor against lung epithelial cells in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 cell lysate.(緑膿菌 PAO1 溶菌液における肺上皮細胞障害因子の同定)
結果の要旨	<p>本研究では、ヒト肺上皮由来 A549 細胞に直接障害性を発揮する、緑膿菌 PAO1 株由来菌体内分子の同定を試みた。溶菌液をゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーで精製し、Native PAGE で泳動後、質量分析を行ったところ、7 分子が同定された。そこで、7 分子の各変異株由来溶菌液を作製し、どの分子で障害性が解除されるか調べた。その結果、PA0423 変異株由来溶菌液でのみ、細胞障害性の解除がみられた。さらに、PA0423 のリコンビナント蛋白を作製し A549 細胞に添加したところ、直接障害性が確認された。以上の結果から、緑膿菌由来 PA0423 が肺上皮細胞に直接作用し、障害性を発揮することが明らかになった。</p> <p>本研究の成果は、緑膿菌による肺上皮細胞障害に関する新知見であり、博士論文に値すると審査委員全員から評価を頂いた。</p>