



Title	Molecular Insights of Fish Pathogen, Aeromonas spp.
Author(s)	サイード, カマル アボルガイト
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49189
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	サイード カマル アボルガイト Said Kamal Abolghait
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 9 6 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学 位 論 文 名	Molecular Insights of Fish Pathogen, <i>Aeromonas</i> spp. (魚類病原体 <i>Aeromonas</i> 属菌の分子的知見)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 本 田 武 司 (副査) 教 授 那 須 正 夫 教 授 山 口 明 人 教 授 岡 部 勝

論 文 内 容 の 要 旨

Aeromonas 属菌は通性嫌気性グラム陰性桿菌であり、桿菌が単独あるいは連鎖状に連なった状態で存在する。また、水域環境下に常在しており、魚介類やヒトへの感染症を引き起こすことが知られている。

本研究では、まず *Aeromonas* 属菌の一種である *Aeromonas hydrophila* にヒト endothelin 変換酵素 (ECE)-1 と 32% の相同性を持つ新規亜鉛結合型メタロプロテアーゼを発見し、これを *Aeromonas* Endothelin Converting Enzyme (Aece) と名付けた。endothelin は強力な血管収縮性や潰瘍誘発性を持つ 21 アミノ酸からなるペプチドであり、前駆体である proendothelin として合成され、ホルモン前駆体変換酵素であるフーリンによって切断された不活性型中間体 big endothelin を経て ECE によって最終的に endothelin となる。ヒト ECE-1 は big endothelin-1 に特異性を有するが、Aece は big endothelin-3 に対して高い特異性を有し、big endothelin-1 や big endothelin-2 に対しては非常に弱い活性を示した。この特異性は Aece が、big endothelin-1 や big endothelin-2 のアミノ酸配列には存在せず、big endothelin-3 にのみ存在する 21 番目のトリプトファンと 22 番目のイソロイシンの間を切断することに依ると考えられた。また Aece の endothelin 変換活性は亜鉛結合型メタロプロテアーゼ特異的阻害剤、phosphoramidon によって阻害されることが明らかとなった。さらに Aece は 4℃ から 25℃ で産生され、特に 16℃ で産生量が最大となった。一方で、30℃ を越えるとその産生は抑制され、*Aeromonas hydrophila* の魚介類に対する病原性発現と相関する結果が得られた。キンギョを用いた *Aeromonas hydrophila* 感染実験を行ったところ、キンギョ筋肉中に接種された野生型 *Aeromonas hydrophila* によって接種部位に典型的な潰瘍形成が認められたが、Aece 欠損株では潰瘍の形成は認められなかった。この結果から、*Aeromonas hydrophila* の産生する Aece は endothelin-3 を活性化させることによって魚介類における潰瘍形成を誘導することが考えられた。また、ヒト (恒温動物) と魚介類 (変温動物) における、*Aeromonas hydrophila* 感染症の病態の違いが Aece の産生至適温度の違いによる可能性が考えられた。

また本研究では *Aeromonas veronii* biovar *sobria* の 3 型タンパク質分泌装置 (T3SS) によって分泌される病原因子 (effector)、AexU についてその機能解析を行った。T3SS は主に病原性グラム陰性細菌に存在し、注射針状の構造体の特徴づけられ、菌体内で産生された effector を宿主細胞に直接注入することができる。*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* の T3SS によって分泌される effector としてこれまでに AexT が明らかとなっていたが、これに

類似した effector、AexU を *Aeromonas veronii* biovar *sobria* より同定した。AexT ではその N 末端側に細胞骨格系を制御する Rho family GTPase の Rho、Rac、Cdc42 に対する GAP (GTPase activating protein) 活性が *in vitro* で確かめられており、その相同性から AexU にも同様の活性が存在すると考えられ、Rho、Rac、Cdc42 活性変異体を培養細胞中で強発現させ、AexU の GAP 活性の特異性を検討した。その結果、活性型 Rac を強発現させた HeLa 細胞のみで AexU による細胞骨格の再編成が認められなかった。このことから、AexU は Rac 特異的 GAP 活性を有すると考えられた。また AexU の GAP 活性によって F-actin が G-actin へと脱重合するが、この G-actin と AexU が結合することを免疫沈降法によって確認した。GAP 活性を持たない変異型 AexU では正常細胞より抽出した actin に対して結合活性を示さないが、F-actin 脱重合剤を用いた場合、結合活性が見られた。このことから細胞内で AexU は、自身の GAP 活性によって得られた G-actin に対して結合すると考えられた。

これまでの報告と精製 AexU を培養細胞培地中に添加した実験から T3SS 非依存的にも培養細胞細胞質に取り込まれることが明らかになっている。このメカニズムを検討するにあたり、AexU アミノ酸配列を解析すると 319-321 番目に RGD モチーフが存在する。一般に RGD モチーフは細胞外マトリックスを構成するタンパク質に存在し、インテグリンとの結合に必須である。そこで AexU とインテグリンとの結合を免疫沈降法を用いて検討した結果、 β -4 インテグリンとの結合が認められた。また AexU の培養細胞への取り込みは培養細胞の β -4 インテグリン発現量に依存することを明らかにした。AexU は培養細胞に取り込まれた後、細胞外へ vesicle として分泌されること、さらに分泌された AexU は他の培養細胞へ取り込まれることが観察された。このメカニズムの詳細は依然不明であるが、免疫沈降法により AexU が宿主細胞タンパク質である Rab8、 α -tubulin、calnexin と結合することが明らかとなっており、これらの分子が関与する何らかの経路を利用している可能性が考えられた。

以上のように 2 種の *Aeromonas* 属菌の産生する新規病原因子の機能解析を行い、それら新規病原因子の病原性発揮メカニズムにおける役割を解明する新知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、魚介類やヒトへの感染症を引き起こすことが知られている *Aeromonas* 属菌の一種である *Aeromonas hydrophila* にヒト endothelin 変換酵素 (ECE)-1 と 32% の相同性を持つ新規亜鉛結合型メタロプロテアーゼを発見し、これを *Aeromonas* Endothelin Converting Enzyme (Aece) と名付けた。endothelin は強力な血管収縮性や潰瘍誘発性を持つペプチドであり、前駆体である proendothelin として合成され不活性型中間体 big endothelin を経て ECE によって最終的に endothelin となる。ヒト ECE-1 は big endothelin-1 に特異性を有するが、Aece は big endothelin-3 に対して高い特異性を有した。Aece は 4℃ から 25℃ で産生され、30℃ 以上ではその産生は抑制され、*A. hydrophila* の変温動物である魚介類に対する病原性発現と相関する結果である。金魚を用いた *A. hydrophila* 感染実験では、筋肉中に接種された野生株では接種部位に潰瘍形成が認められたが、Aece 欠損株では潰瘍の形成は認められなかった。これらの結果から、*A. hydrophila* の産生する Acee は endothelin-3 を活性化させることによって魚介類における潰瘍形成を誘導すると考えられた。

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* の T3SS によって分泌される effector としてこれまでに AexT が明らかとなっていたが、本研究ではこれに類似した effector、AexU を *Aeromonas veronii* biovar *sobria* より同定したので機能解析した。AexU の GAP (GTPase activating protein) 活性の特異性を検討したところ、AexU は Rac 特異的 GAP 活性を有すると考えられた。精製 AexU を培養細胞培地中に添加した実験などから T3SS 非依存的にも培養細胞に取り込まれることが明らかになった。AexU アミノ酸配列には RGD モチーフが存在し、 β -4 インテグリンとの結合が認められ、AexU の取り込みは培養細胞の β -4 インテグリン発現量に依存することを明らかにした。AexU は培養細胞に取り込まれた後、細胞外へ vesicle として分泌されること、さらに分泌された AexU は他の培養細胞へ取り込まれ、細胞分裂障害を引き起こすことも明らかにした。こように 2 種の *Aeromonas* 属菌の産生する新規病原因子の機能解析を行い、それら新規病原因子の病原性発揮メカニズムにおける役割を解明する新知見を得た。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文として相応しい内容であると判断する。