

# 論文要旨

## Role of the carboxy-terminal region of the outer membrane protein AatA in the export of dispersin from enteroaggregative *Escherichia coli*

(腸管凝集性大腸菌の dispersin を排出する外膜蛋白 AatA の C 末端の役割)

岩下 真由美

### 【序論および目的】

腸管凝集性大腸菌 *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) は新興下痢原性大腸菌であり、近年下痢症の原因菌としてその重要性が報告されている。EAEC の病原性は腸管粘膜への細菌の付着によるものと考えられており、HEp-2 細胞に特徴的な凝集付着を示す。最近 EAEC 042 株の病原プラスミド pAA2 上に、新たな ABC トランスポーター遺伝子群 aatPABCD (aat cluster) がクローニングされ、その中で AatA が外膜輸送蛋白として、凝集抑制蛋白 Aap (dispersin) をペリプラスムから外膜外へ分泌していることが明らかになった。(Nishi J. et al. *J Biol Chem* 278: 45680-9, 2003)。同時に AatA は蛋白 2 次構造解析から大腸菌の薬剤排出ポンプ TolC のホモログである可能性も報告された。しかし AatA が Aap を分泌する具体的なメカニズムは明らかではなく、今回 AatA のどの部位が分泌に重要であるかを明らかにするために、変異体を用いた構造・機能解析を行った。

### 【材料および方法】

1) 変異体の作成: EAEC042 株の *aatA* 遺伝子の C 末端側を欠落させた変異遺伝子や部分欠損遺伝子を PCR 法によって作成し、arabinose 誘導の発現プラスミド pBAD30 に導入し、さらに electroporation 法により EAEC 042 AatA 欠損株に導入し変異 AatA を発現する変異株を作成した。

2) Aap 分泌能: AatA 変異体を、arabinose 誘導下に M9 培地で 6 時間培養した。培地には菌体表面に付着した Aap を上清に遊離させるため 0.1% TritonX を加えた。培養上清の蛋白を trichloroacetic acid (TCA) 沈降により濃縮し、抗 Aap 抗体を用いたウエスタンブロッティングで Aap を検出し、デンシトメトリーにより分泌能を定量化した。一方、分泌されず菌体に残った Aap についても同様に定量化した。

### 【結果】

AatA 欠損株は Aap 分泌能が低下すること、また AatA 欠損株に全長の AatA を導入した株では、Aap 分泌が回復することが確認されている。AatA の C 末端 9 アミノ酸残基を欠損した変異株では、Aap 分泌能は AatA 導入株と同等であったが、C 末端 12 残基以上の欠損変異株では Aap 分泌は減少した。さらに C 末端 10~12 番目の 3 残基 (381-Phe, 382-Leu, 383-Leu) のみの欠損株でも分泌は減少した。これらのアミノ酸残基の 1 個毎の欠損株では Aap 分泌能は変化なかったが、連続する 2 アミノ酸欠損株では Aap 分泌能は減少した。さらに、この 3 つの非極性アミノ酸を同じ非極性のアミノ酸 Val と極性アミノ酸 Ser に置換したところ、Ser 置換株で Aap 分泌が減少した。分泌能が低下していた欠損株では、Aap は

(裏へ)

菌体内に蓄積しており Aap 産生能には変化がなかった。

**【考察】**

C末端 10~12 番目の 3 非極性アミノ酸残基は AatA が Aap を分泌する機能発現に重要であることが明らかになった。これらのアミノ酸は推定されている AatA の立体構造において、赤道部分にあってペリプラズムに突出する領域の基部に位置する。AatA のホモログと考えられている TolC では C 末端近傍 412 位の Leu 残基が輸送機能に重要であると報告されており、この部位もペリプラズムへの突出領域に位置している。これらの類似点からも AatA と TolC の輸送メカニズムの相同性が示唆された。

大腸菌の薬剤排出ポンプである TolC は、AcrB などの内膜蛋白と結合して機能を発現するが、AcrA などのアダプター蛋白が TolC のペリプラズム突出領域と結合することで、内膜蛋白との結合を強固にしていると推定されている。Aat クラスターの中では、AatC と AatD が内膜に存在し ABC トランスポーターを構成するが、AatA の機能発現にはこの ABC トランスポーターが必須である。機能未知の AatB や AatD がアダプター蛋白であるかどうかは不明であるが、AatA のペリプラズム突出領域とりわけ今回明らかになった C 末端の 3 非極性アミノ酸残基がこれらとの結合に関与している可能性が考えられる。

## 論文審査の要旨

報告番号	医論第 <b>1431</b> 号	氏名	岩下 真由美
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	秋山 伸一	丸山 征郎

**Role of the carboxy-terminal region of the outer membrane protein AatA in the export of dispersin from enteroaggregative *Escherichia coli***

(腸管凝集性大腸菌の dispersin を排出する外膜蛋白 AatA の C 末端領域の役割)

腸管凝集性大腸菌 *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) は新興下痢原性大腸菌であり、近年下痢症の原因菌としてその重要性が報告されている。最近 EAEC 042 株の病原プラスミド pAA2 上に、新たな ABC トランスポーター遺伝子群 *aatPABCD* (*aat cluster*) がクローニングされ、その中で AatA が外膜輸送蛋白として、凝集抑制蛋白 Aap (dispersin) をペリプラズムから外膜外へ分泌していることが明らかになった。同時に AatA は蛋白 2 次構造解析から大腸菌の薬剤排出ポンプ TolC のホモログである可能性も報告された。しかしその実験的根拠はなく、また AatA が Aap を分泌する具体的なメカニズムは明らかではない。TolC では、C 末端 412 位非極性アミノ酸が機能発現に不可欠であると報告されており、本研究では AatA の C 末端領域のどの部位が分泌に重要であるかを明らかにすることを目的として構造・機能解析を行った。

AatA の C 末端のアミノ酸の段階的欠損、部分欠損、アミノ酸置換の変異体を作成し、抗 Aap 抗体を用いた Western blotting により Aap 分泌能を調べた。さらに得られた結果を推定されている AatA の立体構造と照らし合わせることで、以下の知見を得た。

- ① AatA の C 末端、特に 381-383 位の非極性アミノ酸残基が、Aap 分泌に重要である。
- ② 381-383 残基は AatA のペリプラズムに突出する赤道部領域の C 末端基部に存在する。

以上の結果は、AatA 活性における赤道部の役割を解明する上で重要と思われ、また今後のグラム陰性菌の外膜蛋白輸送についての研究にも意義があると思われた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 <b>1431</b> 号	氏名	岩下 真由美
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	秋山 伸一	丸山 征郎
<p>主査および副査の3名は、平成18年6月21日、学位請求者 岩下 真由美 に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれも満足すべき回答を得ることができた。</p> <p><b>質問1：</b> AatA 変異体の外膜での局在は確認されているか。  <b>回答：</b> 抗 AatA 抗体を用いて実験したが、全ての変異体では局在を確認できなかった。原因として、AatA の C 末端をターゲットにした抗体を使用していたためと考えられる。本研究では変異体の外膜への局在があると前提して、研究を進めている。</p> <p><b>質問2：</b> 381-383 位のアミノ酸 1 つだけの欠損株では、Aap 分泌能が保たれているのは、どう解釈するか。  <b>回答：</b> 3 アミノ酸のうち残り 2 つの疎水性が保たれれば、分泌能が維持されると考えた。</p> <p><b>質問3：</b> AatA は Aap 以外の物質は輸送していないか。  <b>回答：</b> 現在のところ、報告されていないが、他にも輸送していることが十分考えられる。</p> <p><b>質問4：</b> AatA の活性を阻害する薬剤は見つかっていないか。  <b>回答：</b> AatA ではまだ検討されていないが、TolC や AcrB などでは構造解析を通じて、薬剤開発の研究が進められている。</p> <p><b>質問5：</b> AatA 欠損株でも Aap 分泌が認められることについてはどう考えるか。  <b>回答：</b> TolC は Aap 分泌していないという結果が実験から得られている。他の未知の輸送蛋白が存在している可能性があると考ええる。</p> <p><b>質問6：</b> 3 アミノ酸残基を変異させることで、AatA の立体構造に変化はないか？  <b>回答：</b> 立体構造が変化している可能性はある。アダプター蛋白との結合部位が変化するという可能性の他に、AatA の構造自体が変化し、例えば開口部が閉鎖したままの状態になる可能性も考えられる。</p> <p><b>質問7：</b> Aap の凝集抑制の作用機序は解明されているか。直接線毛に付着しているか。  <b>回答：</b> 菌体表面に分布することは分かっているが、線毛に直接付着しているかどうかは不明。作用機序はまだ明らかになっていない。</p> <p><b>質問8：</b> 細菌では ATP はどこで産生されているか？  <b>回答：</b> TCA サイクルや糖代謝過程を通じて細胞質内で産生されている。</p>			

質問 9 : Aap の作用として、quorum sensing との関連はないか？

回答 : 菌数が増えると Aap の分泌が促進される可能性など、quorum sensing との関連が予想されるが、まだ詳しく検討していない。

質問 10 : Aap の蛋白の特徴はどのようなものか。

回答 : 10.2kD の分泌蛋白であること以外、まだ詳細は報告されていない。

質問 11 : Aap は、粘液層通過後の EAEC の病原性または細胞への付着に影響を与えるか。

回答 : 菌を散乱させる働きはあるが、付着への影響は現在のところ知られていない。

質問 12 : Aap 欠損株は、動物実験においては実際に病原性が落ちるのか。

回答 : 動物実験における検討はまだ報告がない。

質問 13 : バイオフィルムを形成する菌で、Aap のような散乱因子の報告はあるか。

回答 : *Vibrio cholerae* の Hap というムチナーゼが知られているが、緑膿菌など他の菌でバイオフィルムを抑制する蛋白は報告されていない。

質問 14 : EAEC は凝集と散乱をうまく調和させて病原性を発揮していると理解してよいか。

回答 : そのように考えます。

質問 15 : 他の菌種に対して Aap は作用するか。

回答 : 不明であるが興味深い点であり、今後検討したい。

質問 16 : NIH image を用いて定量化しているが、具体的にはどのようなソフトか。

回答 : Web サイトから入手できるソフトで、バンドの強さを数値化する簡易デンストメトリである。

質問 17 : 下痢症患者の中で EAEC が占める割合、臨床症状の特徴は？

回答 : 日本の小児では約 5% 前後。米国では救急外来の 1 歳未満の下痢症患者では、10% に認められたと報告されている。水様性または粘液性の下痢がみられ、遷延することがあり、臨床症状は EPEC に類似する。

質問 18 : バイオフィルムと関連して、今後の研究の方向性について。

回答 : バイオフィルムに関連した shf 遺伝子の研究をすすめている。また TolC 自体が凝集付着に関連することも見出しており、今後その機能解析を進めたい。

質問 19 : 臨床で一般に EAEC が同定されない理由は何故か。

回答 : 同定が煩雑にもかかわらず、下痢症患者において、EAEC と同定されても、臨床上是治療に大きな差がないためではないかと考えられる。しかし、下痢症の病原診断は疫学的にも重要であり、簡便な検出法の開発が必要と考える。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。