

Serratia liquefaciens セラリシン様メタロプロテアーゼ 遺伝子 *ser1* のクローニング

甲斐原布紗子¹⁾・飯山和弘²⁾*・青木智佐²⁾・清水 進²⁾

¹⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ²⁾九州大学大学院農学研究院

(2009年12月24日受付; 2010年1月20日受理)

Molecular cloning of serralysin like metalloprotease *ser1* gene from *Serratia liquefaciens*

FUSAKO KAIBARA, KAZUHIRO IYAMA, CHISA YASUNAGA-AOKI and SUSUMU SHIMIZU

In our previous work, it was demonstrated that an insecticidal bacterium, *Serratia liquefaciens* Kuo1-1 produced protease(s) in vitro. To investigate the role of the protease(s) on virulence, the gene(s) encoding the protease(s) was isolated in this study. Casein zymography assay and protease inhibitor test indicated that *S. liquefaciens* FK01 (nalidixic acid resistant mutant of Kuo1-1) produced two metalloproteases (approximately 52 and 54 kDa). These results suggested that the proteases were serralysin-like metalloproteases or their relatives. The putative region encoding serralysin-like metalloprotease gene was amplified from genomic DNA of *S. liquefaciens* FK01 by PCR and the DNA fragment amplified was sequenced. The DNA fragment amplified contained the putative serralysin-like metalloprotease gene and protease inhibitor gene.

Key words : *Serratia liquefaciens*, Serralysin-like metalloprotease

結 言

Serratia 属細菌は、広く環境中に存在している腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌である。多くの昆虫種の腸管内で増殖可能であり、宿主昆虫の脱皮期など腸管防壁が弱った時期に血体腔内に侵入し、活発に増殖し敗血症を引き起こす。本菌は日和見細菌に分類されるが、発病頻度が高いことからある程度の血体腔への侵入能を備えていると考えられている。また、この細菌による病気は野外では数種の昆虫で低頻度の発生が認められるに過ぎないが、屋内飼育昆虫ではしばしば流行状態となり(福原, 1991), カイコやミツバチなどでは高い頻度での *Serratia* 属感染症の発生が報告されている。

Serratia 属細菌は、多数の病原因子を産生するが、その中でもプロテアーゼが主要な病原因子であると考えられている。プロテアーゼは病原微生物の感染過程において、タンパク免疫分子の機能を効果的に抑制し、また、宿主組織内への侵入を促す分子として重要な役割を担っている。

本研究において、アリジゴクから分離した *S. liquefaciens* Kuo1-1 が殺虫活性因子を分泌していることを見出した。各種クロマトグラフィーにおいて、殺虫活性とタンパク質分解活性が同一の挙動を示した。そのため、この殺虫活性物質の本体はプロテアーゼであることが強く示唆された(EGAMI et al., 2009)。

本プロテアーゼが本菌の主要な病原因子であるならば、同酵素を何らかの方法で不活化することにより、*Serratia* 感染症を予防することが可能であると考えられる。しかし本菌において、プロテ

アーゼの病原因子としての役割については十分に検討されていない。本研究では、まず *S. liquefaciens* の殺虫活性機構を明らかにする第一歩として、プロテアーゼ遺伝子のクローニングを行い、塩基配列の解析を行った。

材料と方法

供試菌株：アリジゴクから分離した *S. liquefaciens* Kuo1-1 (EGAMI et al., 2009) のナリジキシン酸耐性株を作出し、FK01 と命名して本実験に供試した。

ザイモグラフィーによる阻害試験：*S. liquefaciens* が産生するプロテアーゼの触媒機構を解明するために、ザイモグラフィーにより、プロテアーゼインヒビターを用いた阻害試験を行った。25 °C, 72 時間振盪培養した菌培養液と 2×SDS サンプルバッファー(還元剤不含)を 1 : 1 の割合で混合し、解析試料とした。基質として 0.05% カゼインを共重合させた 10% SDS ポリアクリルアミドゲルを作製し、レーンあたり 10 μl のサンプル溶液を添加し、室温にて電気泳動(定電流 10 mA, 最高電圧 100 V)を行った。

酵素反応へのプロテアーゼインヒビターの影響を検討する場合は、泳動後のゲルをレーン毎に短冊状に切り、2.5% Triton X-100 溶液で 30 分間 2 回震盪して SDS を除去した後、ゲルを一本ずつ試験管に入れ、それぞれ 0.5 M EDTA あるいは complete, EDTA-free (Roche) 錠剤 1 錠を加えた反応バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij 35, 1 mM ZnCl₂) 10 ml 中にて 37 °C, 18 時間振盪した。振盪後のゲルは coomassie brilliant blue (CBB) R-250 染色液にて 30

* 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Tel: 092-642-3033, Fax: 092-642-4421

E-mail: iiyama@grt.kyushu-u.ac.jp

分間程度染色し、脱色液（メタノール：酢酸：水 = 20 : 7.5 : 72.5, v/v/v）で適度に脱色した。

EDTAによるプロテアーゼ活性阻害: Hide powder azure (Sigma) を基質として用い、EDTA を各濃度で加え、全プロテアーゼ活性阻害率との関係を検討した。

クローニング: 予備実験として、*S. liquefaciens* の近縁種である *S. proteamaculans* HY-3 (accession no. AY818193) のメタロプロテアーゼ (セラリシン) 遺伝子の内部領域 (Kwak et al., 2007) を基に設計した各プライマーを用いて PCR を行ったところ、予想された増幅産物が得られた (データ未掲載)。また、本増幅産物をプローブとしたサザンハイブリダーゼーションを行ったところ、約 5.9 kb の位置に陽性シグナルが検出された (データ未掲載)。これらのことより、本菌はセラリシン様メタロプロテアーゼ遺伝子を保持していることが推察された。そこで本遺伝子の全長を含む DNA 断片を得るために、フォワードプライマー (ProF(-811), 5'-GGA TCC CCA TGA TCG TCA G-3') およびリバースプライマー (PinR897, 5'-CCT GCA GGG TAT CTG ATC GT-3') を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物の塩基配列をシーケンス解析により確認した。

系統解析: DNA Data Bank of Japan (DDBJ) から、*Serratia* 属菌、*Pseudomonas aeruginosa* のセラリシン (様メタロプロテアーゼ) のアミノ酸配列を入手した。*S. liquefaciens* FK01 のメタロプロテアーゼ遺伝子の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列および入手した既知配列をもとに、ClustalX を用いて系統解析を行った。

結果と考察

カゼインザイモグラフィーの結果から、*S. liquefaciens* FK01 は約 52 kDa および約 54 kDa の 2 種類のプロテアーゼを産生していることが確認された (Fig. 1A)。また、プロテアーゼインヒビターを用いた活性阻害実験において、EDTA 処理区でのみプロテアーゼ活性が確認されなかった (Fig. 1B, C)。さらに、Hide powder azure を用いた阻害試験でも EDTA の濃度依存的に阻害作用が確認された (Fig. 2) ことから、双方ともメタロプロテアーゼであることが明らかとなった。本菌が産生するプロテアーゼは分子量約 50 kDa のメタロプロテアーゼであったことから、多くの細菌においてその産生が認められており、病原性への関与も報告されているセラリシン様メタロプロテアーゼであると推察された (BRAUN and SCHMITZ, 1980)。

決定した *S. liquefaciens* メタロプロテアーゼの塩基配列は全長 1515 塩基対で、504 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていると推察された (Fig. 3)。本アミノ酸配列を BLAST 検索したところ、多くのセラリシンと相同性があることが明らかとなった。そこで、推定アミノ酸配列をもとに分子系統樹を

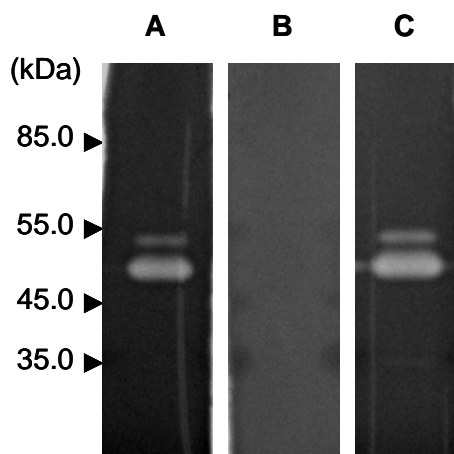


Fig. 1. The effect of protease inhibitors on the proteolytic activity secreted from *S. liquefaciens* FK01. After electrophoresis, the proteins were renatured in the renaturation buffer and incubated in the developing buffer. The buffers supplemented with EDTA (lane B) or complete, EDTA-free (Roche) (lane C) were used. In the control test, the buffers without inhibitors were used (lane A).

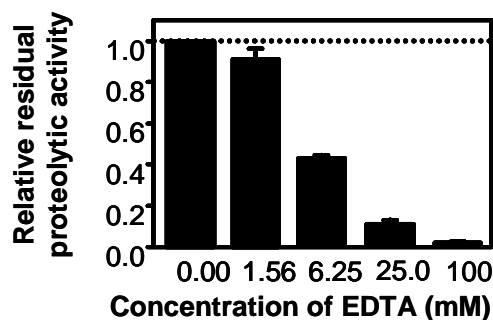


Fig. 2. Inhibition of proteolytic activity by EDTA.

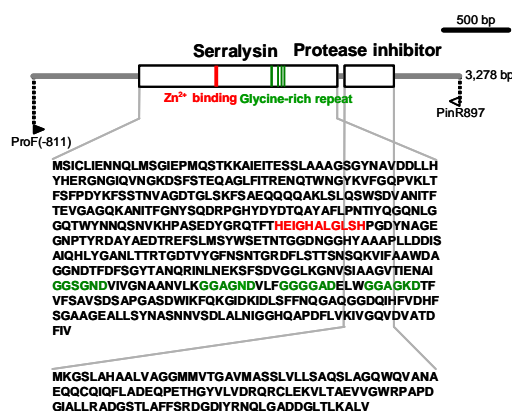


Fig. 3. Deduced amino acid sequences of serratysin-like metalloprotease and protease inhibitor from *S. liquefaciens* FK01.

作成し、他の細菌との比較を行った (Fig. 4)。その結果、用いた配列のうち、*Serratia* sp. KCK および *S. proteamaculans* HY-3 が産生するセラリシンと最も高い相同性を示した (Identities 99.4%)。

また、推定アミノ酸配列中には、セラリシンに特有のモチーフである亜鉛イオン結合領域およびシステイン反復領域が保存されていた (Fig. 3)。したがって、これをセラリシン様メタロプロテアーゼと同一とし、コードしている遺伝子を *ser1* と仮称した。

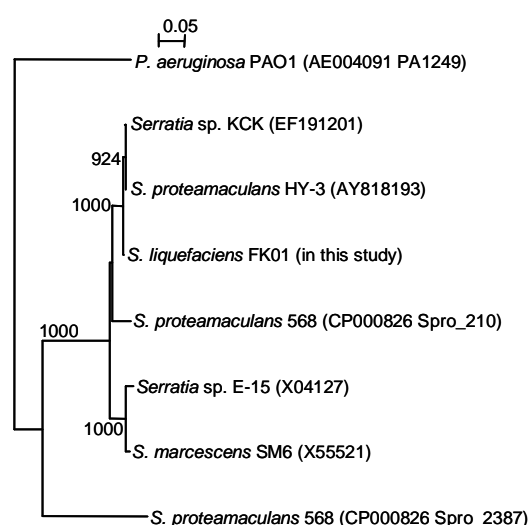


Fig. 4. Phylogenetic tree of the serralysin-like metalloproteases. The tree was generated by using NJ Plot software. Bootstrap analysis was performed using 1000 replicates (Values above 90% are shown).

さらに、*ser1* の下流には、378 塩基対、125 アミノ酸残基からなるプロテアーゼインヒビター (13.3 kDa) をコードしていると予測される領域が存在していた。*S. proteamaculans* HY-3 や *S. proteamaculans* 568 (accession no. CP000826) にもセラリシン遺伝子の下流にプロテアーゼインヒビター遺伝子が座乗し、オペロン構造を形成していると考えられている。そのため、今回供試した *S. liquefaciens* FK01 においても同様の構造であると推察された (Fig. 3)。おそらく本菌は、自己が産生するプロテアーゼから自分自身を守るためにインヒビターを産生していると考えられる。

本研究において、*S. liquefaciens* FK01 は 2 種のメタロプロテアーゼを産生することが明らかとなった。このうち 1 種のメタロプロテアーゼの候補遺伝子をクローニングすることに成功した。今後は、残りの一つの遺伝子のクローニングを行うとともに、両遺伝子の破壊株を作出し、本菌の病原性におけるプロテアーゼの役割を検討する必要があると考えられる。

摘 要

S. liquefaciens Kuo1-1 は培地中にプロテアーゼを産生する。本プロテアーゼの病原性における役割を明らかにする目的で、プロテアーゼ遺伝子のクローニングを行った。カゼインゼイモグラフィーおよびプロテアーゼ阻害剤を用いた実験から、FK01 (Kuo1-1 のナリジキシン酸耐性変異株) は 2 種のメタロプロテアーゼを産生することが明らかとなった。以上のことから、これらプロテアーゼはセラリシン様メタロプロテアーゼであることが推察された。PCR により該当遺伝子領域を増幅し、塩基配列を決定した。得られた推定アミノ酸配列には、セラリシンに特徴的な亜鉛イオン結合領域およびシステイン反復領域が確認された。さらにセラリシン様メタロプロテアーゼ遺伝子の下流に、プロテアーゼインヒビターをコードしていると予測される領域が存在しており、これら遺伝子はオペロン構造を形成していると考えられた。

文 献

- BRAUN, V. and SCHMITZ, G. (1980) Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 55-61.
- EGAMI, I., IYAMA, K., ZHANG, P., CHIEDA, Y., INO, N., HASEGAWA, K., LEE, J.-M., KUSAKABE, T., YASUNAGA-AOKI, C. and SHIMIZU, S. (2009) Insecticidal bacterium isolated from an ant lion larva from Munakata, Japan. *J. Appl. Entomol.*, **133**, 117-124.
- 福原敏彦 (1991) 昆虫病理学 (増補版), p. 67-69, 学研出版センター, 東京.
- KWAK, J., LEE, K., SHIN, D. H., MAENG, J. S., PARK, D. S., OH, H. W., SON, K. H., BAE, K. S. and PARK, H. Y. (2007) Biochemical and genetic characterization of arazyme, an extracellular metalloprotease produced from *Serratia proteamaculans* HY-3. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 761-768.