ビブリオ金属プロテアーゼの微小循環系に対する作用とその制御

三好 伸一

岡山大学薬学部, 〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1

Effects of *Vibrio vulnificus* Metalloprotease on the Capillaries:
Pathological Actions and Inactivation by α -Macroglobulin

Shin-ichi MIYOSHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1, Tsushima-Naka, Okayama 700-8530, Japan

(Received August 4, 2000)

Vibrio vulnificus is an opportunistic human pathogen causing wound infection and septicemia, characterized by hemorrhagic and edematous damage to the skin of limbs. When injected into the dorsal skin, an extracellular metalloprotease from this vibrio (*V. vulnificus* protease: VVP) enhanced the vascular permeability through activation of the Hageman factor-plasma kallikrein-kinin cascade and/or stimulation of exocytotic histamine release. Additionally, VVP caused the hemorrhagic skin lesion through disorganization of the vascular basement membrane layer due to specific degradation of type IV collagen, which is known to form the backbone structure of the basement membrane. However, injected VVP was quickly inactivated by a plasma glycoprotein, α -macroglobulin, at a molar ratio of 1:1. This glycoprotein was leaked from the capillaries by the actions of VVP, which resulted in *in situ* inactivation by physical entrapment. When VVP (45000 Da) was incubated at 37°C, a 35000 Da fragment was generated by the autocatalytic removal of a 10000 Da C-terminal polypeptide. This N-terminal fragment showed significant proteolytic activity, however, because of a markedly decreased affinity to the protein substrates, its permeability-enhancing and hemorrhagic activity was reduced to less than 50%. These findings indicate that the C-terminal polypeptide is not essential for but promotes skin reactions caused by VVP.

Key words—*Vibrio vulnificus*; metalloprotease; kallikrein-kinin; histamine; hemorrhage; α -macroglobulin

はじめに

ビブリオは淡水から海水に至る水域に棲息するグラム陰性の従属栄養細菌である。現在、ビブリオ属 (*Vibrio*) には 47 菌種が含まれているが、そのうちの 11 菌種はヒトの疾患の原因となる (Table 1)。ところで、疾患を起こす病原性ビブリオとして以前より知られていたものは、*Vibrio cholerae* と *Vibrio parahaemolyticus* の 2 菌種のみであった。このうち、*V. cholerae* にはコレラの原因となる *V. cholerae* O1 (コレラ菌) が含まれている。しかし、この病原細菌は特定の流行地域にのみ棲息しており、我が国においては、コレラは輸入感染症として稀に報告されるにすぎない。これに対して、*V. parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ) は、夏季を中心として、我が国の汽水域—海水域に普遍的に棲息し、魚介類の多くを汚染している。それゆえ、魚介類を生食する食習慣を持つ我が国では、この病原細菌が最も頻度の高い食中毒原因菌の 1 つとなっている。さて、1970 年代以降になると、病原微生物学の進展に伴い、病

原性ビブリオに関する新たな知見があまた得られた。そして、*Vibrio vulnificus* など新種の病原性ビブリオの発見が相次いだ。Table 1 に示したように、ビブリオによるヒトの疾患は、消化器系疾患 (コレラ、胃腸炎など) と非消化器系疾患 (創傷感染症、敗血症など) とに大別される。そして、前者の原因となる代表的菌種は *V. cholerae* と *V. parahaemolyticus* であり、後者のそれは *V. vulnificus* である。

1970 年 Roland¹⁾ は、海水浴とハマグリ拾いの後、左下肢に壊死が起こった症例から新種の *Vibrio* 属細菌を単離した。この報告以降、米国や日本などにおいて、同じ細菌が創部あるいは血液から次々と単離された。この新種のビブリオは乳糖分解能を有することから、一時は lactose-positive vibrio (L+ vibrio) と呼称された。しかし、1979 年 Farmer により *Vibrio vulnificus* と命名され、²⁾ 今日に至っている。さて、*V. vulnificus* は創傷感染症と敗血症の 2 つの型の感染症を引き起こす。^{3,4)} 創傷感

Table 1. Human Diseases Caused by *Vibrios*

Species	Disease
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Wound infection, Otitis media
<i>Vibrio cholerae</i> O1 and O139	Cholera
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/O139	Gastroenteritis, Wound infection
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	Meningitis
<i>Vibrio damsela</i>	Wound infection
<i>Vibrio fluvialis</i>	Gastroenteritis
<i>Vibrio furnissii</i>	Gastroenteritis
<i>Vibrio hollisae</i>	Gastroenteritis, Septicemia
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Cholecystitis
<i>Vibrio mimicus</i>	Gastroenteritis
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis, Wound infection
<i>Vibrio vulnificus</i>	Wound infection, Septicemia

感染症は海水などにさらされた創部に細菌が感染することにより発症し、創部周辺に腫脹、出血斑、壊死性潰瘍などの病変が形成される。一方の敗血症は、生魚の造りや寿司などを感染源とする経口感染症である。そして、悪寒、発熱、血圧低下といった敗血症特有の症状に加え、四肢の皮膚に水泡や血泡など創傷感染症と類似した二次病変が形成される。なお、敗血症は日和見的な感染症であり、患者のほとんどが肝硬変やアルコール性肝障害などの基礎疾患を持っている。さらに、敗血症型では予後が極めて悪いことが多く、60%を超える患者が発症後1—2日以内に死亡している。したがって、救命のためには、迅速な診断と早期の適切な治療（治療としては、テトラサイクリン系や第3世代セフェム系抗生物質の投与が効果をあげている）が重要である。

病原性ビブリオが多種類の毒素や病原因子を細胞外に分泌することは良く知られている。例えば、*V. cholerae* O1のコレラ毒素、*V. parahaemolyticus*の耐熱性溶血毒素などはその好例といえる。*V. vulnificus*も例外ではなく、溶血毒素（赤血球膜を破壊して、ヘモグロビンを放出させる毒素）、⁵⁾プロテアーゼ⁶⁾やホスホリパーゼ⁷⁾などの加水分解酵素、さらにはシデロフォア⁸⁾といった病原因子を細胞外に分泌する。これらのうち、溶血毒素と加水分解酵素は蛋白質であるが、シデロフォアは低分子量の鉄イオン特異的キレート化合物である。一般にシデロフォアは、生体内へ侵入した病原細菌に鉄（鉄は細菌においても必須元素となっている）を供給し、その増殖を促進させる因子として機能している。1994年筆者ら⁹⁾は、*V. vulnificus*のシデロフォアを単離し、その化学構造を決定した。そして、これをブルニバクチンと命名した（Fig. 1）。さらに、ブルニバクチンがトランスフェリンやラクトフェリンから鉄を奪い取り、これを細菌細胞に供給する役割を

Fig. 1. Proposed Structure of Vulnibactin, a Siderophore from *V. vulnificus*

担っていることも明らかにした。¹⁰⁾

ところで、プロテアーゼとその阻害因子は生体の恒常性維持に必須である。したがって、微生物プロテアーゼをはじめとする外来性プロテアーゼの侵入により、その平衡状態が打ち破られると生体は危機的な状態に陥る。事実、セラチア菌や緑膿菌などの日和見病原細菌に代表される、強力な毒素を産生しない病原細菌においては、分泌性のプロテアーゼが主要な病原因子の1つと考えられている。^{11,12)} ヒト病原性ビブリオにおいても、細胞外に分泌されるプロテアーゼの病原性への関与が種々報告されている。例えば、*V. cholerae* O1は活性中心に亜鉛イオンを含む金属プロテアーゼを分泌するが、¹³⁾ このプロテアーゼに関しては、コレラ毒素の活性化作用、¹⁴⁾ コレラ菌の腸管粘膜への付着促進作用¹⁵⁾ など病原性に関連する様々な作用が報告されている。そこで筆者らは、*V. vulnificus*の分泌性プロテアーゼ（*V. vulnificus* protease: VVP）に着目した。そして、このプロテアーゼの病原因子としての作用などに関する研究を進めてきた。以下では、微小循環系に対する病原作用を中心として、これまでの研究成果を概説する。

1. 生化学的性状

敗血症患者の血液から単離された *V. vulnificus* L-180株をペプトンを炭素源、窒素源とした培地で培養した。そして、定常期初期の培養上清から限外ろ過濃縮、Sephacry S-200カラムによるゲルろ過、Mono Qカラムによるイオン交換クロマトグラフィーを経て精製VVPを得た。¹⁶⁾ 得られたVVPはサブユニット構造を持たない一本鎖ポリペプチドであり、分子量は45000 Da、等電点は5.8であった。また、この酵素の活性中心には1個の亜鉛イオンが結合していた。それゆえ、重金属イオン（ Hg^{2+} 、 Cu^{2+} など）、あるいは亜鉛イオン特異的キレート化合物（テトラエチレンペンタミン、1,10-フェナンスロリン）との保温により、VVPは酵素活性を失った。¹⁶⁾ ところで、*V. vulnificus*が産生するプロテアーゼとしては、カゼイン分解能を有するもの、⁶⁾ I型コラーゲン分解能を有するもの、¹⁷⁾ そしてエラス

チン分解能を有するもの⁶⁾が報告されていた。しかし精製した VVP は、これらの蛋白質基質のすべてに対して分解作用を発揮した。¹⁶⁾ この結果より、以前より報告されていた 3 種類のプロテアーゼは VVP と同一のものであると考えられた。

金属プロテアーゼは、活性中心を構成する亜鉛イオンの結合モチーフ (亜鉛イオンが結合するアミノ酸残基の種類とその配列) に基づき、10 あまりのファミリーに分類されている。VVP についても遺伝子クローニングを行い、そのアミノ酸配列を調べたところ、サーモリシンファミリーに共通する H¹EXXH⁵.....E²⁵ の亜鉛結合モチーフ (このモチーフでは、1 番目と 5 番目のヒスチジン残基、25 番目のグルタミン酸残基に亜鉛イオンが結合する) が見い出された。¹⁸⁾ また VVP は、他のサーモリシンファミリーに属する金属プロテアーゼと同様に、疎水性のアミノ酸残基 (例えば、ロイシンやフェニルアラニンなど) のイミノ基サイトを特異的に加水分解した。¹⁹⁾ さらに、このファミリーに対する特異的な、かつ競合的なペプチド性阻害因子 (例えば、ホスホラミドン [N-(α -rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-Leu-Trp] や ジンコブ [2-(N-hydroxycarboxamido)-4-methylpentanoyl-Ala-Gly amide]) は VVP を用量依存的に阻害した。¹⁶⁾ これらの生化学的性状より、VVP はサーモリシンファミリーに属する金属プロテアーゼであると結論された。ちなみに、このファミリーには *V. cholerae* の金属プロテアーゼも属している。

2. 機能ドメイン

上述したように精製 VVP の分子量は 45000 Da であったが、これを 37°C で保温したところ、C 末端側の 10000 Da が自己消化され 35000 Da のポリペプチドへと変換された。²⁰⁾ この N 末端側の 35000 Da ポリペプチド (N-ドメイン) は触媒ドメインであり、ペプチド基質に対しては VVP と遜色のない分解作用を発揮できた。²⁰⁾ しかしながら、蛋白質基質 (特に、不溶性の蛋白質基質である I 型コラーゲンやエラスチン) に対する分解活性は著しく低下していた。²⁰⁾ この原因を解明するため、ラインウィーバー-バークプロットによる解析を行った。その結果、蛋白質基質に対する *K_m* 値が VVP では N-ドメインよりも有意に低く、²⁰⁾ VVP が C 末端側ポリペプチドを介して蛋白質基質と高い親和性で結合していることが明らかとなった。このことは、自己消化を受ける C 末端側の 10000 Da ポリペプチド (C-ドメイン) が、蛋白質基質との効率的な結合を仲介するドメインであることを示している (Fig. 2)。

さて、VVP はウサギ赤血球などの哺乳動物赤血球の膜へ付着するが、この付着作用には C-ドメインが必須であった。²⁰⁾ つまり、ウサギ赤血球よりリシールドゴーストを調製し、これに VVP あるいは N-ドメインを作用させたところ、VVP ではゴース

Fig. 2. Schematic Representation of the Structure of VVP Precursor

ト膜への明確な付着が観察されたが、N-ドメインでは付着が観察されなかった。

ところで、サーモリシンファミリーの金属プロテアーゼは、不活性な酵素前駆体として産生されたのち、多段階のプロセッシングを経て活性のある成熟酵素となる。^{21,22)} すなわち酵素前駆体には、N 末端のシグナルペプチドと C 末端の成熟酵素の間に、分子内シャペロン^{22,23)} 及びプロテアーゼ阻害因子^{22,24)} として機能するプロペプチドが存在している。VVP の場合にも、その遺伝子の解析結果から、19000 Da のプロペプチドを持つ酵素前駆体 (66000 Da) として産生されることが明らかとなった (Fig. 2)。

3. 血管透過性亢進作用

最も詳細に検討している VVP の病原作用は血管透過性亢進作用である。筆者らが精製 VVP をラットの皮膚に接種したところ、用量依存的に、数分以内に毛細血管の透過性が亢進し、血漿成分 (実際の実験においては、エバンスブルーで標識したアルブミン) の血管外への漏出が観察された。²⁵⁾ この際、抗ヒスタミン剤であるジフェンヒドラミンを同時投与すると血管透過性の亢進が抑制された (Fig. 3)。さらに、ラット腹腔より肥満細胞を単離し、これに VVP を 37°C で作用させた。その結果、5 秒以内に脱顆粒が惹起され、ヒスタミンが放出された。²⁶⁾ したがって、ラットの皮膚における血管透過性の亢進は、肥満細胞からのヒスタミンの開口分泌に基づいていると結論された。このヒスタミン開口分泌作用は、蛋白質分解作用に依存していたので、²⁵⁾ VVP が肥満細胞のある特定の膜蛋白質を分解することにより、ヒスタミン分泌が惹起されているものと推察される。しかしながら、標的となっている肥満細胞の膜蛋白質はいまだに確定されていない。

VVP をモルモットの皮膚に接種した際にも血管透過性の亢進が観察された。しかし、この透過性亢進作用は抗ヒスタミン剤では抑制されなかった。²⁷⁾ ところが、カリクレイン-キニン系に対する阻害因子の同時投与により抑制された。^{27,28)} つまり、活性化ハーゲマン因子阻害因子であるコーントリプシンインヒビターが 50%、カリクレイン阻害因子である大豆トリプシンインヒビターがほぼ完全に透過性

Fig. 3. Inhibitory Effect of Diphenhydramine, an Antihistaminic Drugs, on the Permeability-Enhancing Reaction Caused by VVP in Rat Skin

VVP mixed with or without diphenhydramine (1.0 μ g) was injected intradermally into the dorsal skin of a rat, which has been previously injected with 5% Evans blue (1 ml/kg of body weight). At 30 min postinjection, the diameters of the blueing spot were measured ($n=2$).

亢進作用を抑制した。これに対して、ブラジキニン分解酵素（アンジオテンシン変換酵素と同一の酵素）阻害因子であるテブロタイド (pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro) は透過性亢進作用を3倍以上増大させた。さらに、モルモットの血漿よりハーゲマン因子及びプレカリクレインを精製し、これにVVPを作用させたところ、両方の酵素前駆体が限定分解作用を受け、活性型酵素（活性化ハーゲマン因子並びにカリクレイン）へと変換された。²⁸⁾したがって、モルモットの皮膚においては、カリクレイン-キニン系の活性化により高分子キニンノーゲンからブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) が切り出され、その薬理作用により血管透過性が亢進していると結論された (Fig. 4)。なお、ブラジキニンには疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンが含まれているため、VVPによって分

解され、透過性亢進活性が失われる (Fig. 4)。また筆者らは、ヒトのハーゲマン因子とプレカリクレインに対するVVPの作用についても検討した。そして、ヒトの酵素前駆体もその両方が活性型酵素へ変換されることを明らかにした。²⁹⁾この結果は、ヒトにおいてもカリクレイン-キニン系が活性化されることを強く示唆している。

生体内において、活性化ハーゲマン因子とカリクレインの活性はC1イナクチベーター (C1-INH) によって調節されている。³⁰⁾VVPはこの調節因子にも直接作用し、これを限定的に分解して不活性化した。³¹⁾すなわち、C1-INHとVVPを30:1のモル比で混合し、37°Cで20分間保温したところ、C1-INHの活性は15%に低下した。このようなC1-INHの不活性化は、カリクレイン-キニン系の働きを増強させ得ると考えられる。

ところで、Fig. 5に示したように、ラットとモルモットのいずれにおいても、N-ドメインのみを接種した際にも血管透過性亢進反応が惹起された。よって、C-ドメインは透過性亢進作用に必須ではないと結論された。

4. 出血作用

VVPを実験動物の皮膚に接種した際には、上述した血管透過性の亢進に加え、出血（すなわち、毛細血管からの赤血球の漏出）が観察された。^{25,27)}毛細血管のキャピラリー構造は血管内皮細胞によって形作られているが、血管内皮細胞がその周囲を覆う血管基底膜（数種類の蛋白質より構成されている薄層）と接着することにより、構造の安定性が高められている。³²⁾VVPの場合、出血活性が蛋白質分解活性に依存していたので、^{25,27)}出血の際に血管基底膜が分解されていると推察された。はたして、再構成した基底膜ゲルにVVPを37°Cで作用させると、VVPの用量並びに作用時間に依存して基底膜ゲルが分解された。³³⁾

Fig. 4. Activation Schema of the Hageman Factor-Plasma Kallikrein Cascade by VVP

Fig. 5. Permeability-Enhancing and Hemorrhagic Reaction Caused by VVP or its N-Domain

VVP (6 to 200 pmol) or the N-domain (12 to 400 pmol) was injected intradermally into the dorsal skin of a rat or guinea pig, and the diameters of the blueing or hemorrhagic spot were measured at 30 min postinjection ($n=6$).

血管基底膜は数種類の蛋白質から構成されているが、基底膜の基本骨格を形成しているIV型コラーゲン、血管内皮細胞とIV型コラーゲンの基本骨格を結び付けているラミニンが主要な二大成分である。³²⁾そこで、この主要成分のうち、いずれがVVPの標的となる蛋白質であるのかを確定するため、以下のような実験を行った。まず、VVPをIV型コラーゲン若しくはラミニンに対して37°Cで作用させたところ、IV型コラーゲンのみがVVPの用量及び作用時間に依存して分解された。³³⁾次に、IV型コラーゲンあるいはラミニンに対する抗体を調製し、各々をVVPと混合してマウスの皮膚に接種した。Fig. 6に示したように、出血作用はIV型コラーゲンに対する抗体によって有意に抑えられた。したがって、VVPによるIV型コラーゲンの分解がトリガーとなり、その後、血管基底膜の崩壊、毛細血管のキャピラリー構造の安定性の低下、毛細血管の破壊へと順次作用が進行し、最終的に出血が起これと考えられた。

さらに、VVPには出血作用を増強し得る作用として、止血に必須な因子であるフィブリンノーゲン並

びにフィブリン塊を分解する作用、³¹⁾好中球エラスターゼ(分泌顆粒中に含まれている組織障害作用の強いプロテアーゼ)の阻害因子である α_1 -アンチトリプシン(α_1 -AT)を不活性化する作用³¹⁾などが見い出された。例えば、 α_1 -ATとVVPを100:1のモル比で混合し、37°Cで保温した場合には、20分以内に、すべての α_1 -ATが分解され、活性を完全に失った。

出血反応もN-ドメインのみの接種により惹起されたが、その強さはVVPの30—40%であった(Fig. 5)。したがって、出血作用においては、C-ドメインがN-ドメインの作用を増強していると考えられた。

5. 赤血球凝集作用

ここまで述べてきた血管透過性亢進作用、出血作用のほか、VVPはウサギ赤血球に対する凝集作用も有している。²⁰⁾しかしながら、VVPの他の作用とは異なり、赤血球凝集作用はN-ドメイン単独では観察されなかった。²⁰⁾このことは、赤血球膜への付着能力を有するC-ドメインが凝集作用には必須であることを示している。ところが、蛋白質分解作用

Fig. 6. Effects of IgG Antibodies against the Vascular Basement Membrane Components, Laminin and Type IV Collagen, on the Hemorrhagic Reaction Caused by VVP

VVP (200 pmol) was mixed with control IgG or the IgG antibody, and each admixture was injected intradermally into the dorsal skin of a mouse. At 30 min postinjection, the area of the hemorrhagic spot was measured ($n=4$).

などと同様に、赤血球凝集作用もホスホラミドンなどの競合的阻害因子で前処理を行うことにより阻害された。³⁴⁾したがって、C-ドメインに加えて、N-ドメインに存在する酵素の活性中心も赤血球凝集作用に関与していると考えられた。そこで、赤血球凝集作用の蛋白質分解作用への依存性を検討するため、リシールド赤血球ゴーストを調製し、これにVVPを作用させた。その結果、ゴースト膜へのVVPの結合は観察されたが、膜蛋白質の分解は観察されなかった。³⁵⁾この結果は赤血球凝集作用に膜蛋白質に対する分解作用が寄与していないことを強く示唆している。

さて、金属プロテアーゼでは、活性中心の亜鉛イオンが他の金属イオンにより置換されると基質との親和性が変化する。^{36,37)}そこで、VVPについても銅イオン、並びにニッケルイオン置換体を調製した。Table 2に示したように、銅イオン置換体では基質との親和性が3倍高くなっており、蛋白質分解活性が85%に低下していた。しかしながら、この置換体について赤血球凝集活性を測定したところ、VVPの2倍の活性を示した (Table 2)。したがって、ウサギ赤血球にはプロテアーゼ阻害因子様の膜蛋白質が存在しており、C-ドメインを介して赤血球膜へ付着したVVPが、そのN-ドメインにある活性中心でもって、この赤血球膜蛋白質と結合するため、結果的に赤血球が架橋され凝集すると推察される。

6. 血漿中の不活性化因子

VVPは血管透過性亢進活性と出血活性を有しているが、皮膚への接種10分後にはそれらが完全に失われた。^{25,27)}この事実より、血漿中にVVPに対する不活性化因子が存在しており、血管透過性の亢進と出血によって、この因子が血管外へと漏出し、VVPを不活性化したと推察された。そこで、ヒ

Table 2. Proteolytic and Hemagglutinating Activities

Protease	Proteolytic activity		Hemagglutinating activity
	Specific activity ^{a)} (U/nmol)	K_m value ^{b)} (mg/ml)	Specific activity ^{c)} (U/nmol)
Native VVP	660 ± 60	2.3 ± 1.2	640
Cu ²⁺ -treated VVP	560 ± 28	0.8 ± 0.4	1,280
Ni ²⁺ -treated VVP	120 ± 16	— ^{d)}	80

a) The extent of hydrolysis of azocasein upon incubation at 30 °C for 15 min was measured spectrophotometrically. One unit of the activity was defined as the amount of the protease which digests 1 μg of azocasein in 1 min. b) The K_m value was determined by Lineweaver-Burk plot. c) The sample was incubated at room temperature for 1 hr, and hemagglutination was monitored visually. The unit was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample causing visible hemagglutination. d) The K_m value was not determined because of low proteolytic activity.

ト、モルモット及びラットの血漿を用いて、VVP不活性化因子を検索した。はたして、いずれの動物種においても、分子量700000 Daの蛋白質がVVPの活性を抑制した。³⁸⁾さらに、モルモット血漿からVVP不活性化因子を精製し、その性状について検討を加えた。モルモット血漿から限外ろ過濃縮、Sephacryl S-400カラムによるゲルろ過、Mono Qカラムによるイオン交換クロマトグラフィーを経て不活性化因子が精製された。³⁹⁾この不活性化因子は180000 Daの同一サブユニット4個から構成されており、免疫電気泳動ではアルブミン領域から α_1 領域に移動した。³⁹⁾したがって、VVP不活性化因子は α -マクログロブリン (αM) であると結論された。精製した αM はVVPと1:1のモル比で複合体を形

成した。その結果、VVP の血管透過性亢進活性、出血活性、並びにエラスチンやカゼインに対する分解活性は阻害された (Table 3)。しかしながら、ペプチドに対する分解活性は全く阻害されなかった (Table 3)。

さて、 α M は各サブユニットの中央付近にプロテアーゼに対する感受性が極めて高い“餌部分”を持っている。⁴⁰⁾そして、この餌部分がプロテアーゼによって切断されることにより、 α M の高次構造が大きく変化し、結果としてプロテアーゼを物理的に取り込むこととなる。このようなトラップ機構によって α M の檻の中に閉じ込められたプロテアーゼにおいては、蛋白質基質との接触は遮断されている。しかしながら、 α M の檻を自由に通り返けるペプチド基質との接触は制限されていない。それゆえ、ペプチド基質に対する分解活性は α M では阻害されない。⁴⁰⁾ Table 3 の結果より、VVP も α M の檻に閉じ込められていると考えられた。この点を明らかに

するため、VVP のリジン残基 10 数残基に直鎖状の活性化モノメトキシエチレングリコール (PEG₁) を結合させ、VVP を α M の檻に収まらない巨大な酵素 (PEG₁-VVP) に修飾した。¹⁹⁾ 期待に違わず、PEG₁-VVP の蛋白質基質に対する分解活性は、過剰量の α M の存在下においても全く阻害を受けなかった。¹⁹⁾ したがって、 α M による VVP の不活性化はトラップ機構に基づいていると結論された (Fig. 7)。

さらに、 α M が *in vivo* において VVP 不活性化因子として機能しているか否か検討した。まず、 α M に対する抗体を調製し、これを VVP と混合してモルモットの皮膚に接種したところ、VVP の血管透過性亢進作用、出血作用がともに 10 倍程度増強された。³⁹⁾ 次に、VVP を皮膚に接種し、その 30 分後に間質組織内に溜っている液体を採集した。そして、TSK G-4000 SW カラムにて分画し、各画分について、そこに含まれている VVP 量を測定した。³⁹⁾ その結果、 α M と同じ画分のみから VVP が検出され、皮膚に接種した VVP のすべてが α M に取り込まれたことが示された。

ところで、 α M の檻に閉じ込められたプロテアーゼは、 α M 受容体を介したエンドサイトーシスによって繊維芽細胞やマクロファージなどに取り込まれ処理される。^{40,41)} α M により不活性化された VVP も同様の処理過程を経ると思われたので、ブラジキニンによって血管透過性を亢進させた条件下において、VVP の皮膚からのクリアランスを検討した。⁴²⁾ VVP とブラジキニンを混合して皮膚に接種し、その 30 分後に間質組織内に溜っている液体を採集した。そして、それに含まれている VVP を定量したところ、接種した量のわずか 10% しか含まれておらず、 α M とその受容体を介した経路により、接種した VVP の大部分が 30 分以内にクリアランスさ

Table 3. Inactivation of VVP by α M

Activity	Inhibitory rate (%)	
	Guinea pig α M	Bovine α M
<i>In vivo</i> activity		
Permeability-enhancing activity	100	95
Hemorrhagic activity	100	95
<i>In vitro</i> activity		
Elastase activity	N.T. ^{b)}	92
Caseinase activity	88	85
Peptidase activity ^{a)}	0	0

a) The activity was measured with carbobenzoxy-glycyl-phenylalanine amide. b) Not tested.

Fig. 7. Schematic Representation of the Inactivation Mechanism of VVP by Plasma α M

Fig. 8. Recovery of VVP or PEG₁-VVP from the Interstitial-Tissue Space

VVP or PEG₁-VVP was added to the solution containing bradykinin (80 nmol)/control Fab (4.5 mg), or bradykinin (80 nmol)/anti-αM Fab antibody (4.5 mg). Each admixture was injected into the dorsal skin of a guinea pig, and the fluid in the interstitial-tissue space was collected at 30 min postinjection. Thereafter, the amount of VVP or PEG₁-VVP was determined by measuring the proteolytic activity toward azocasein ($n=2$).

れたと考えられた (Fig. 8). そこで次に、接種する試料に αM に対する抗体を加え、同様の実験を行った。この場合には、クリアランスがある程度抑えられ、VVP の回収率は 30% にまで上昇した (Fig. 8). さらに、αM に取り込まれない PEG₁-VVP についてクリアランス実験を行った。その結果、αM に対する抗体の添加とは無関係に、ほとんどの PEG₁-VVP が採集液中に回収された (Fig. 8). これらのことより、*in vivo* において、VVP は速やかに αM によって不活性化され、さらに αM 受容体を介したエンドサイトーシスによってクリアランスされると結論された。

7. おわりに

以上、*V. vulnificus* が産生する VVP に関する筆者らの研究成果を概説した。まず、VVP の構造と機能に関して生化学的な検討を加え、この酵素がサーモリシンファミリーに属する金属プロテアーゼであることを明らかにした。次に、皮膚病変の形成に深く関与していると考えられる血管透過性の亢進や出血などの作用について、その発現機構を分子レベルで解明した。さらに、VVP が短時間の内に αM によって不活性化され、クリアランスされることも明らかにした。また、ここではふれなかったが、ヘモグロビンからヘムを獲得するシステム⁴³⁾ 並びにブルニバクチン依存性にトランスフェリンから鉄を獲得するシステム¹⁰⁾ のトリガーを VVP が引くことも報告した。しかし、細菌の生体内への侵入プロセスにおける VVP の役割、VVP 産生の調節システムの解明など残された課題も多い。本菌感染症に対する適切な診断と治療のためには、さらなる研究の進展が望まれる。

多くの病原細菌が金属プロテアーゼを産生することは、かなり以前から知られていた。しかし、筆者

らが VVP の研究に取り組み始めた当時は、細菌の病原因子としては“毒素”が主たる因子であり、金属プロテアーゼは毒素の作用を修飾する補助的な因子として認識されているに過ぎなかった。しかしながら、その後、いくつかの“毒素” (破傷風菌とボツリヌス菌の神経毒素、*Bacteroides fragilis* のエンテロトキシン、そして炭疽菌の致死因子など) が金属プロテアーゼであることが見い出され、金属プロテアーゼに対する認識がこの数年間で大きく変わったように思われる。病原細菌の金属プロテアーゼは、この後いかように研究が展開されて行こうと、興味のつきない研究対象であり続けるものと期待している。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導ご協力をいただきました岡山大学薬学部、衛生薬品科学講座 篠田純男教授、分子細胞薬品科学講座 山本重雄教授、並びに両講座の方々に深く感謝いたします。また、共同研究をお願いした多くの方々にも感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Roland F. P., *N. Engl. J. Med.*, **282**, 1306 (1970).
- 2) Farmer III J. J., *Lancet*, **ii**, 903 (1979).
- 3) Janda J. M., Powers C., Bryant R. G., Abbott S. H., *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 245-267 (1988).
- 4) Tacket C. O., Brenner F., Blake P. A., *J. Infect. Dis.*, **149**, 558-561 (1984).
- 5) Kreger A., Lockwood D., *Infect. Immun.*, **33**, 583-590 (1981).
- 6) Kothary M. H., Kreger A. S., *Infect. Immun.*, **50**, 534-540 (1985).
- 7) Testa J., Daniel L. W., Kreger A. S., *Infect. Immun.*, **45**, 458-463 (1984).
- 8) Simpson L. M., Oliver J. D., *Infect. Immun.*, **41**, 644-649 (1983).
- 9) Okujo N., Saito M., Yamamoto S., Yoshida T., Miyoshi S., Shinoda S., *Biometals*, **7**, 109-116 (1994).
- 10) Okujo N., Akiyama T., Miyoshi S., Shinoda S., Yamamoto S., *Microbiol. Immunol.*, **40**, 595-598 (1996).
- 11) Harrington D. J., *Infect. Immun.*, **64**, 1885-1891 (1996).
- 12) Hase C. C., Finkelstein R. A., *Microbiol. Rev.*, **57**, 823-837 (1993).
- 13) Booth B. A., Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R. A., *Infect. Immun.*, **42**, 639-644 (1983).
- 14) Booth B. A., Boesman-Finkelstein, M.,

- Finkelstein R. A., *Infect. Immun.*, **45**, 558-560 (1984).
- 15) Ichinose Y., Ehara M., Honda T., Miwatani T., *FEMS Microbiol. Lett.*, **115**, 265-271 (1994).
- 16) Miyoshi N., Shimizu C., Miyoshi S., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 13-25 (1987).
- 17) Smith G. C., Merke, J. R., *Infect. Immun.*, **35**, 1155-1156 (1982).
- 18) Shinoda S., Miyoshi S., Wakae H., Rahman M., Tomochika K., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **15**, 327-339 (1996).
- 19) Narukawa H., Miyoshi S., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **108**, 43-46 (1993).
- 20) Miyoshi S., Wakae H., Tomochika K., Shinoda S., *J. Bacteriol.*, **179**, 7606-7609 (1997).
- 21) Kessler E., Safrin M., *J. Bacteriol.*, **170**, 5241-5247 (1988).
- 22) O'Donohue M. J., Beaumont A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 26477-26481 (1996).
- 23) McIver K. S., Kessler E., Olson J. C., Ohman D. E., *Mol. Microbiol.*, **18**, 877-889 (1995).
- 24) Kessler E., Safrin M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 22726-22731 (1994).
- 25) Miyoshi S., Sugiyama K., Suzuki Y., Furuta H., Miyoshi N., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**, 95-98 (1987).
- 26) Miyoshi S., Sugiyama K., Furuta H., Miyoshi N., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 301-304 (1986).
- 27) Miyoshi N., Miyoshi S., Sugiyama K., Suzuki Y., Furuta H., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **55**, 1936-1939 (1987).
- 28) Molla A., Yamamoto T., Akaike T., Miyoshi S., Maeda H., *J. Biol. Chem.*, **264**, 10589-10594 (1989).
- 29) Miyoshi S., Shinoda S., *FEBS Lett.*, **308**, 315-319 (1992).
- 30) Gigli I., Mason J. W., Colman R. W., Austen K. F., *J. Immunol.*, **104**, 574-581 (1970).
- 31) Miyoshi S., Narukawa H., Tomochika K., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **39**, 959-966 (1995).
- 32) Timpl R., *Eur. J. Biochem.*, **180**, 487-502 (1989).
- 33) Miyoshi S., Nakazawa H., Kawata K., Tomochika K., Tobe K., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **66**, 4851-4855 (1998).
- 34) Alam M., Miyoshi S., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **39**, 67-70, 1995
- 35) Miyoshi S., Kawata K., Tomochika K., Shinoda S., *Microbiol. Immunol.*, **43**, 79-82 (1999).
- 36) Holland D. R., Hausrath A. C., Juers D., Matthews B. W., *Protein Sci.*, **4**, 1955-1965 (1995).
- 37) Holmquist B., Vallee B. L., *J. Biol. Chem.*, **249**, 4601-4607 (1974).
- 38) Miyoshi S., Shinoda S., *J. Biochem.*, **106**, 299-303 (1989).
- 39) Miyoshi S., Shinoda S., *J. Biochem.*, **110**, 548-552 (1991).
- 40) Barrett A. T., *Methods Enzymol.*, **80**, 737-754 (1981).
- 41) Glimann J., Davidsen O., Moestrup S. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **980**, 326-332 (1989).
- 42) Miyoshi S., Hirata Y., Tomochika K., Shinoda S., *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 321-326 (1994).
- 43) Nishina Y., Miyoshi S., Nagase A., Shinoda S., *Infect. Immun.*, **60**, 2128-2132 (1992).