
原 著

緑膿菌の主要肺傷害因子

—パタチン様ホスホリパーゼ A₂-III型分泌毒素 ExoU—

佐和 貞治*, 加藤 秀哉, 安本 寛章, 清水 優
濱岡早枝子, 木下 真央, 秋山 浩一

京都府立医科大学大学院医学研究科麻酔科学

A Major Lung Injury-causing Factor of *Pseudomonas Aeruginosa*

—A Patatin-like Phospholipase A₂-type III Secretory Toxin ExoU—

Teiji Sawa, Hideya Katoh, Hiroaki Yasumoto, Masaru Shimizu
Saeko Hamaoka, Mao Kinoshita and Kouichi Akiyama

Department of Anesthesiology,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

緑膿菌III型分泌タンパク質である ExoU は、強力な細胞毒性を有して急性肺傷害や敗血症の原因となる。ExoU の遺伝子は PAPI-2 と呼ばれる病原性遺伝子島の中に存在しており、およそ 20~25% の臨床分離株においてその存在が認められている。ExoU はジャガイモに含まれるパタチンや、ヒトの cPLA₂ および iPLA₂ に認められるパタチン様アシルヒドロラーゼ・ドメイン構造を持ち、標的細胞質内で活性化されて PLA₂ 作用を発揮し、細胞膜の破壊をもたらして肺傷害を引き起こす。ExoU の発現株による人工呼吸関連肺炎では、非発現株に比べて患者の死亡率が有意に上昇することが報告され、また近年には exoU 遺伝子陽性株では高頻度にニューキノロン耐性であることが報告されており、多剤耐性かつ強毒性の緑膿菌の院内蔓延が懸念される状況にある。

キーワード：緑膿菌, ExoU, III型分泌システム, パタチン様アシルヒドロラーゼ, 細菌性ホスホリパーゼ A₂.

Abstract

ExoU, a type III secretory protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is a powerful cytotoxin and causes acute lung injury and sepsis. Approximately 20-25% of clinical isolates possess the ExoU gene, which is located in the *P. aeruginosa* pathogenicity island-2 (PAPI-2). *ExoU* possesses a patatin-like acyl hydrolase domain that is also seen in the potato patatin and in human cPLA₂ and iPLA₂. ExoU is activated

平成27年 3 月 9 日受付 平成27年 5 月 1 日受理

*連絡先 佐和貞治 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路 上ル 梶井町 465 番地
anesth@koto.kpu-m.ac.jp

by a eukaryotic cell factor after translocation into the cytosol of the targeted eukaryocyte, and it destroys cellular membranes through phospholipase A2 activity. *P. aeruginosa* isolates exhibiting the ExoU-positive phenotype have been linked to poor clinical outcomes of ventilator-associated pneumonia. Moreover, a high association between the *exoU* genotype and emerging quinolone-resistance was recently reported. We are therefore in a situation where nosocomial spread of both virulent and multi-drug resistant *P. aeruginosa* strains is becoming of growing concern.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, Type III secretion system, Patatin-like acyl hydrolase, Bacterial phospholipase A₂.

はじめに

人工呼吸管理下にある患者に高頻度に発生する細菌性肺炎は、人工呼吸関連肺炎 (ventilator-associated pneumonia, VAP) と定義され、緑膿菌はその高頻度起炎菌である¹⁻³⁾。肺炎起炎菌が病原毒性の強い緑膿菌株である場合、急速に肺傷害と続発性敗血症が発症して高い致死率につながる⁴⁾⁵⁾。著者らはこれまで病原毒性の強い緑膿菌による肺傷害の病態について研究を進めてきた⁶⁻¹¹⁾。ヒトにおいて致死的な肺傷害をもたらした緑膿菌株を動物の肺へ投与すると、その動物はたちまちに急性肺傷害を発症し、肺水腫、そして続発性敗血症に至る¹²⁻¹⁴⁾。一方で、大腸菌や毒性の低い緑膿菌株を同じように動物の肺に投与しても肺水腫や敗血症には至らない¹²⁾。著者らは、この強い肺傷害を引き起こす緑膿菌の病原性因子の同定とその分子機序の解明を行ってきた¹⁵⁻¹⁸⁾。その結果、緑膿菌のⅢ型分泌システムの関わりと、その関連毒素の一つである ExoU 毒素の同定を行い、肺傷害をもたらす機序として ExoU 毒素の持つパタチン様ホスホリパーゼ活性作用の同定に至った。緑膿菌Ⅲ型分泌システムの詳細については、著者の以前の総説にその解説を委ねる⁶⁾⁸⁾¹⁸⁾。本稿では緑膿菌性肺炎の主要肺傷害因子として同定したこのⅢ型分泌性毒素である ExoU に関して、そのパタチン様ホスホリパーゼ (patatin-like phospholipase, PLP) 作用を中心に、分子生物学的な視点から総説としてまとめる。

パタチン様アシルヒドラーゼ (patatin-like acyl hydrolase)

パタチン (patatin) とはアシルヒドラーゼ (acyl hydrolase) 活性をもつ植物の貯蔵糖タンパク (storage protein) 群であり、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) ではその可溶性タンパク質の約 40% を占める¹⁹⁾²⁰⁾。パタチンはキュウリ (*Cucumis sativus*) やパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) にも含まれている。またパタチンはラテックスアレルギー (天然ゴム-果物症候群, Latex-fruits syndrome) を引き起こす交差反応性ラテックスアレルギーとしても認識されている。逆に、多くのラテックスアレルギーには Hev b7 などのパタチンに類似した構造を有する蛋白質が含まれていることが解っている。パタチンは、植物害虫の幼虫に対して殺虫作用を示すことから植物病理学の分野で「植物界の免疫系」として近年その存在が知られるようになった「感染特異的タンパク質 pathogenesis-related proteins (PRP)」の一つとしても捉えられている。通常の脂質分解酵素は、セリン (Ser)-ヒスチジン (His)-アスパラギン酸 (Asp) (もしくはグルタミン酸 Glu) で特徴付けられる triad 構造を持つ。一方、それらの脂質分解酵素とは異なり、ジャガイモ patatin B2 やヒト cytosolic PLA₂ (cPLA₂) などの PLP では、Ser-Asp で形成される dyad 構造の酵素活性部位を通じて脂質分解能が発揮される²⁰⁾。緑膿菌 ExoU はこのパタチン様の構造を持つ細菌性ホスホリパーゼ (phospholipase, PL) である²¹⁾。つまり、真核生物である植物において殺虫作用を示すパ

タチン様タンパク構造が、原核細胞である病原性細菌に取り込まれて肺上皮細胞傷害を引き起こす毒素として作用している。進化の過程において緑膿菌が PLP 遺伝子を真核細胞より取り込んで、その病原性メカニズムに組み込んだ機序には、遺伝子の水平伝播 (horizontal gene transfer) が関わる。通常、生物は細胞分裂によって母細胞から娘細胞へ染色体を複製する。このような遺伝継承は時間的な垂直方向と捉えることで「垂直伝播 (vertical gene transfer)」と呼ばれることに対して、個体間や種の異なる他生物間 (バクテリオファージの感染や種の異なる細菌の接合など) において水平方向に遺伝子を取り込むことで遺伝情報の一部を組み込むことは「水平伝播」と呼ばれる。この水平伝播は生物の進化に大きな影響を与えてきた。こ

れまでに発見された ExoU の最も近縁のタンパク質としては、リケッチアで発見された PLP である RP534 がある。このタンパクは PLP 構造を持ち、この遺伝子組み換えタンパクには PLA2 活性、ならびにリゾホスホリパーゼ (lysophospholipase, lysoPL) 活性が示されている²²⁾。おそらく緑膿菌の ExoU は、緑膿菌Ⅲ型分泌に必要なアミノ末端側のリーダー配列であろう ExoS と ExoT と共通の M-H-I-Q-S-L/S を獲得して、さらにカルボキシル末端側に酵素作用を一時的に不活性化するスイッチング・ドメインを獲得して、細菌のゲノム内に挿入されたのではないかと考えられる (図 1)²³⁾。

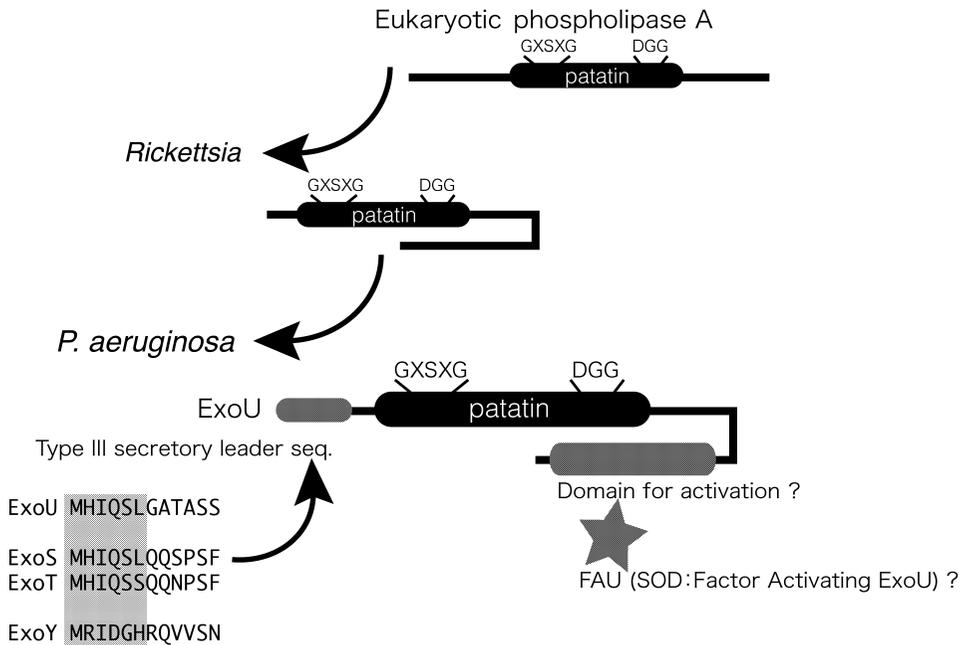


図 1 緑膿菌 ExoU 遺伝子の水平遺伝子伝播 (horizontal gene transfer) とリケッチアの役割

ExoU の最も近縁のタンパク質としてリケッチアの持つパタチン様タンパクである RP534 がある。リケッチアは、このタンパク質遺伝子を真核細胞のホスホリパーゼ A2 遺伝子から獲得し、原核細胞である細菌へ水平遺伝子伝播させる役割を果たしたと考えられる。おそらく緑膿菌の ExoU は、緑膿菌Ⅲ型分泌に必要なアミノ末端側のリーダー配列であろう ExoS と ExoT と共通の M-H-I-Q-S-L/S を獲得して、さらにカルボキシル末端側に酵素作用を一時的に不活性化するスイッチング・ドメイン (FAU, Factor for activating ExoU, ExoU 活性化因子) を獲得して細菌のゲノム内に挿入された。

パタチン様ホスホリパーゼA2 毒素ExoU

緑膿菌 ExoU を含む PLP タンパク群は、ジャガイモの patatin B2 と相同性を持つ 4 つの保存されたドメイン (ブロック I~IV) 構造を持つ (図 2)²⁴⁾²⁵⁾。ブロック I は、oxyanion hole を形成するアルギニンもしくはリジン残基を含むグリシン-リッチ領域である。ブロック II は、ブロック I から 10~20 アミノ酸残基離れた場所にあり、脂質分解酵素活性中心である 142 位の Ser 残基を中心に位置するヒドロラーゼ・モチーフである G-X-S-X-G (もしくは G-X-S-X-S) 配列を含む。ブロック III は Ser 残基を含み、おそらくリン酸化部位もしくは水素結合部位として作用している可能性が示唆され、また保存されている複数のプロリン残基は立体構造上の特徴を保つために重要であると考えられる。ブロック III では、細菌の PLP では A-S-X-X-X-P、真核細胞

胞の PLP では A-A-P とアミノ酸配列に違いが認められる。ブロック IV は、ブロック I の Ser 残基と対をなす catalytic dyad の構成要素である Asp を含む。

ExoU 遺伝子 *exoU* は緑膿菌 PA103 株よりクローニングされ、その open read frame は 2,064 塩基対で構成され、687 個のアミノ酸から成るタンパクをコードする (図 3)²⁶⁾。そのストップ・コドンである TGA は、ExoU のシャペロンタンパクである 137 個のアミノ酸からなる SpcU の開始コドン ATG とオーバーラップしており、*exoU* と *spcU* は連座して存在している²⁷⁾。パタチン様モチーフはアミノ末端側の 110~354 位に位置する。まず、110~125 位のブロック I には、oxyanion hole G-G-G-A-X-X-G/A、139~145 位のブロック II には、142 位の Ser が catalytic dyad を形成する Ser・ヒドロラーゼモチーフ G-X-S-X-G (もしくは G-X-S-X-S) をもつ²¹⁾。ブロック III は 309~325 位に位置し、パタチンに

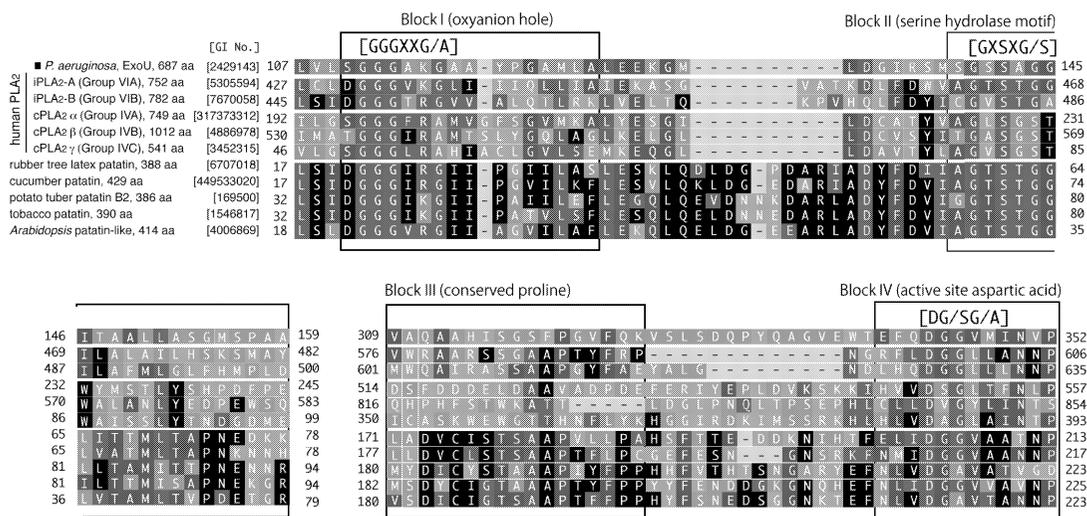


図 2 緑膿菌 ExoU を含むパタチン様アシルヒドロラーゼタンパク質の相同性

緑膿菌 ExoU を含む PLP タンパク群は、ジャガイモの patatin B2 と相同性を持つ 4 つの保存されたドメイン (ブロック I~IV) 構造を持つ。ブロック I は oxyanion hole を形成するアルギニンもしくはリジン残基を含むグリシン-リッチ領域である。ブロック II はブロック I から 10~20 アミノ酸残基離れた場所にあり、脂質分解酵素活性中心である 142 位の Ser 残基を中心に位置するヒドロラーゼ・モチーフである G-X-S-X-G (もしくは G-X-S-X-S) 配列を含む。ブロック III は Ser 残基を含み、おそらくリン酸化部位もしくは水素結合部位として作用している可能性が示唆され、また保存されている複数のプロリン残基は立体構造上の特徴を保つために重要であると考えられる。ブロック III では細菌の PLP では A-S-X-X-X-P、真核細胞の PLP では A-A-P とアミノ酸配列に違いが認められる。ブロック IV はブロック I の Ser 残基と対をなす catalytic dyad の構成要素である Asp を含む。

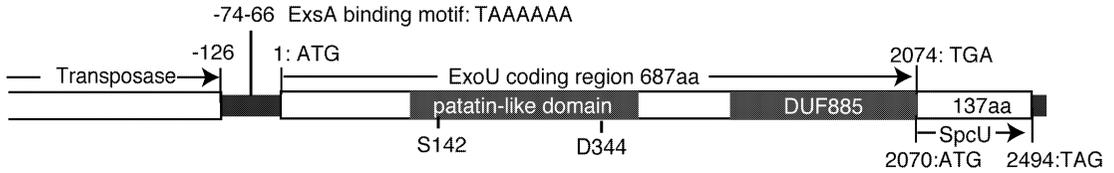


図3 緑膿菌 ExoU 遺伝子の構造

ExoU 遺伝子 *exoU* は緑膿菌 PA103 株よりクローニングされ、2,064 塩基対で構成され、687 個のアミノ酸から成るタンパクをコードする。遺伝子のプロモータ領域である-74-66 位には転写活性因子 ExsA の結合モチーフ TAAAAA が存在する。そのストップ・コドンである TGA は、ExoU のシャペロン・タンパクである 137 個のアミノ酸からなる SpcU の開始コドン ATG とオーバーラップしており、つまり *exoU* と *spcU* は連座して存在している。パタチン様モチーフはアミノ末端側の 110~354 位に位置する。まず、110~125 位のブロック I には、oxyanion hole G-G-G-A-X-X-G/A、139~145 位のブロック II には、142 位の Ser が catalytic dyad を形成する Ser・ヒドロラーゼ・モチーフ G-X-S-X-G を持つ。ブロック III は 309~325 位に位置し、パタチンに特有の 320 位のプロリンを含む。ブロック IV は 341~352 位で、344 位のアスパルギン酸を含むもう一方のヒドロラーゼ・モチーフ D-G/S-G/A を持つ。カルボキシル末端側には、未知の機能の conserved domain 領域 DUF885 が含まれ、活性化に関わるドメインが含まれることが推測されてきた。

特有の 320 位のプロリンを含む。ブロック IV は 341~352 位で、344 位のアスパルギン酸を含むもう一方のヒドロラーゼ・モチーフ D-G/S-G/A を持つ。このブロックは、パラゴムノキのラテックス・パタチン、キュウリ、ジャガイモ、タバコ、そして植物のモデル生物として研究対象となってきたシロイヌナズナの PLP とヒトのカルシウム非依存性 PLA₂ (calcium-independent phospholipase A₂, iPLA₂) と相同性を持つ²⁴⁾。パタチン様ドメインのブロック I と II を含む領域のアミノ酸一次配列を元に作成した系統図においては、ExoU はヒト cPLA₂ とヒト iPLA₂ 及び植物 PLP 群とのちょうど中間に位置する (図 4)。また、カルボキシル末端側には、未知の機能の保存ドメイン (conserved domain) 領域 DUF885 が含まれ、活性化に関わることが推測されてきた。

ExoU 遺伝子構造

1990 年代半ばまでに、緑膿菌全ゲノムプロジェクトの対象となった PAO1 株の解析において、従来には単一の遺伝子由来と考えられていた二つのサイズの異なる Exoenzyme S が、実はそれぞれ別の遺伝子由来の 49-kDa 型 Exoenzyme S (ExoS) と、54-kDa 型の Exoenzyme S (別名 Exoenzyme T, ExoT) であることが判明した²⁸⁾。

またそれらの exoenzyme は、Ⅲ型分泌システム毒素であることも判明した²⁹⁾。Ⅲ型分泌システムとは、1990 年代に病原性グラム陰性菌において広く発見された従来の I 型、II 型分泌システムとは異なる新型分泌システムである。このシステムでは、細菌毒素は特殊な分泌装置にて、直接、細菌菌体から標的真核細胞の細胞質へ注入される。

一方で、PAO1 株と比較して強い急性肺傷害を引き起こす緑膿菌株 PA103 は、ExoS の遺伝子 *exoS* を欠如し、ExoT の遺伝子 *exoT* だけを持つ³⁰⁾。しかしながら、*exoT* の遺伝子欠損変異株においても、動物実験モデルでは高い肺傷害性が認められ、またⅢ型分泌システムの転写活性因子である ExsA の遺伝子欠損変異株では肺傷害性が欠如していることなどから、PA103 株の強い肺傷害性は、ExoS でも ExoT でもない転写活性因子 ExsA で制御された未知の因子であろうと考えられた。その後の探索の結果、ExsA で制御された 74-kDa の未知のタンパクがその原因であることが突き詰められて、このタンパク質は第 3 の Exoenzyme として ExoU と名付けられた²⁶⁾。のちに、第 4 の Exoenzyme として adenylate cyclase 活性を持つ ExoY が発見され、今日までに緑膿菌のⅢ型分泌毒素として ExoS, ExoT, ExoU, ExoY の 4 種類の Exoenzyme が同

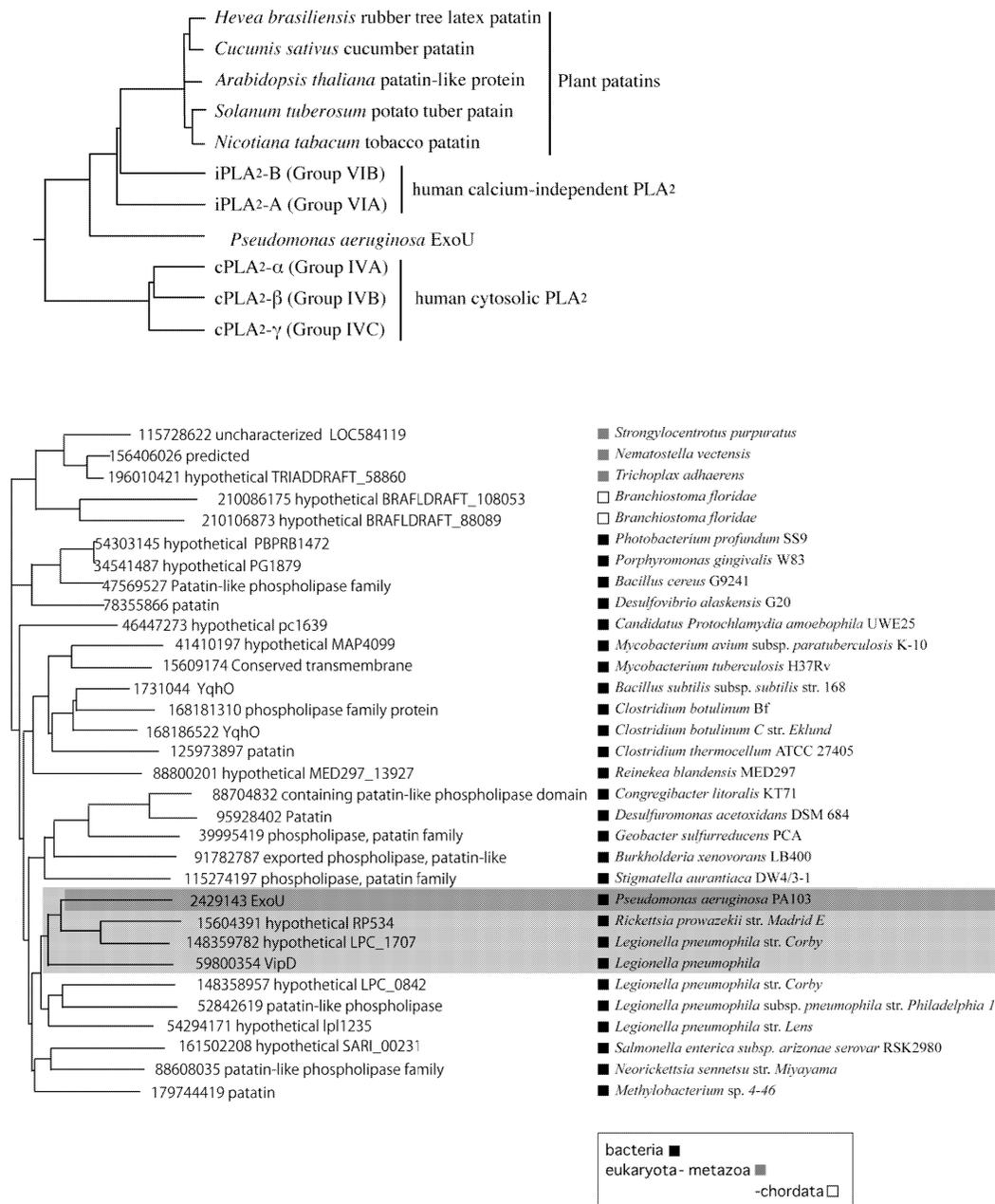


図4 パタチン様アシルヒドロラーゼタンパク質の系統図

パタチン様ドメインのブロック I と II を含む領域のアミノ酸一次配列をもとに作成した系統図において、ExoU はヒト cPLA₂ と iPLA₂ 及び植物 PLP 群とのちょうど中間に位置する (upper). パタチン様アシルヒドロラーゼドメインを含む多くのタンパク質が、原核生物や真核生物において同定されている (lower). 系統樹は ClustalW を用いて作成した⁴⁶⁾.

定された³¹⁾。また、これまでの臨床分離株の解析では、ExoUの遺伝子 *exoU* が陽性である株は、常にExoSの遺伝子 *exoS* が欠損していた。この二つの遺伝子型 *exoS⁺exoU⁻* と *exoS⁺exoU⁺* の排反律については、単に進化学上の流れでそうなっただけなのか、それとも病原性を発揮する上での関係性が認められるのかはこれまでの研究では明らかにされていない。著者らが米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校メディカル・センターにて調査したところ、約20%の臨床分離株において、ExoU発現が陽性であった³²⁾。さらにフランス、日本での調査においても、同様に約20%~25%の分離株においてExoU発現陽性であった³³⁾。

その後、PA103株と同様の強細胞毒性であるPA14株にてゲノム解析が行われ、PAO1株では欠損している2つの病原性遺伝子島 Pathogenicity Island である 108-kb の *Pseudomonas* Pathogenicity Island-1 (PAPI-1) と 11-kb の *Pseudomonas* Pathogenicity Island-2 (PAPI-2) が発見された(図5)。PAPI-2は、tRNA-Lysの領域に挿入された15個の open read frame (ORF) を含む遺伝子島の形態を有する(図6)。4つのトランスポ

ゼースと1つのインテグラーゼとともに、ExoUの遺伝子 *exoU* とそのシャペロンタンパクである SpcU の遺伝子 *spcU* を持つ³⁴⁾。同時にこのゲノム解析では、PA14株では *exoS* の遺伝子領域が欠損していることも判明した。

ExoU 毒素の酵素作用

PLはホスファチジルコリンに代表されるグリセロ三リン脂質を脂肪酸とグリセロール骨格脂質分子に加水分解する酵素であるが、リン脂質分子上の作用部位によりA, B, C, Dの4種に大きく分類される(図7)。PLA₁ (Phospholipase A₁, PLA₁) は1位 (SN-1) のアシル基を切断し、PLA₂ (Phospholipase A₂, PLA₂) は2位 (SN-2) のアシル基を切断してアラキドン酸を生成する。PLB (Phospholipase B, PLB) は lysoPL としても知られており、SN-1 と SN-2 アシル基を共に切断する。PLC (Phospholipase C, PLC) はリン酸ジエステル結合を切断し、セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸を放出し、シグナル伝達において重要な役割を果たす。PLD (Phospholipase D, PLD) はリン酸エステル結合を切断し、ホス

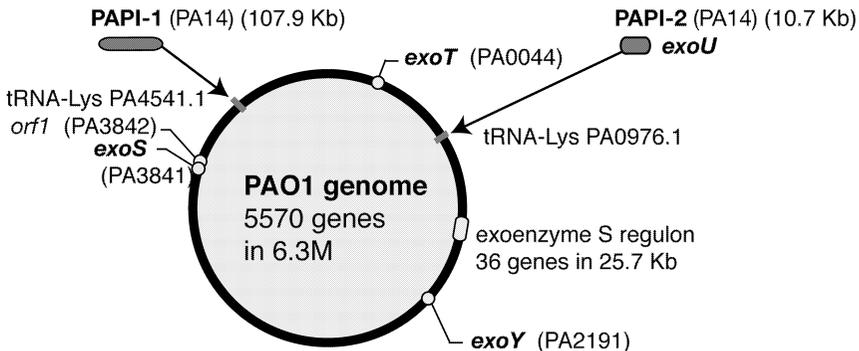


図5 PAO1ゲノムと *Pseudomonas* Pathogenicity Islands

緑膿菌全ゲノムプロジェクトの対象となったPAO1株のゲノム上には、Ⅲ型分泌システムの分泌装置や制御タンパクを含む27.7kbpの exoenzyme S regulon が存在する。またⅢ型分泌毒素として、49-kDa型 Exoenzyme S (ExoS) と、54-kDa型の Exoenzyme S (別名 Exoenzyme T, ExoT) に加えて、adenylate cyclase 活性を持つ ExoY の遺伝子が存在する。のちに解析されたPA14株のゲノム上には、2箇所の *Pseudomonas* Pathogenicity Islands と名付けられた病原性遺伝子群領域(107.9kbpの PAPI-1 と 10.7kbpの PAPI-2) が発見された。ExoUの遺伝子はPAPI-2の中に含まれる。

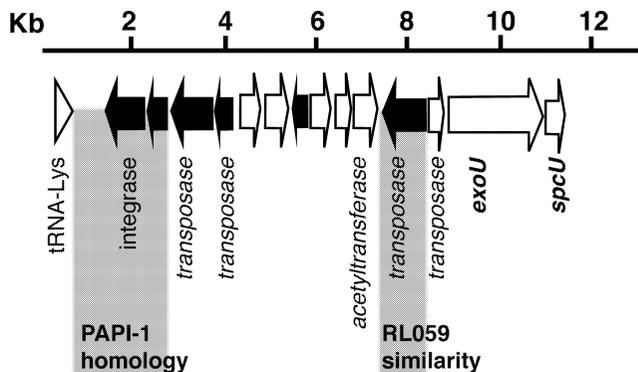


図6 *Pseudomonas* Pathogenicity Islands-2 の構造

Pseudomonas Pathogenicity Islands-2 (PAPI-2) は、tRNA-Lys の領域に挿入された 15 個の open read frame (ORF) を含む遺伝子島の形態を有する。4つのトランスポゼースと1つのインテグラーゼとともに、ExoUの遺伝子 *exoU* とそのシャペロンタンパクである *SpcU* の遺伝子 *spcU* を持つ。

ファチジン酸 (phosphatidic acid) とアルコールを生成する。遺伝子組み換え ExoU の *in vitro* での PLA₂ の酵素活性誘導には、真核細胞質由来の抽出液を加える必要があり、他の exoenzyme らと同様に真核細胞由来の成分がその活性化メカニズムに必要である。活性化された ExoU は当初は PLA₂ 活性毒素として同定されたが、のちの著者らの研究により、lysophosphatidylcholine を基質とする lysoPLA₂ も持つことが判明した³⁵⁾。つまり、リン脂質の SN-1 と SN-2 の両方から脂肪酸を切り出す PLA₂ と PLB 活性を持つ (図8)。ExoU は、パタチン様構造の持つ他のアシルヒドロラーゼと同様に、Ser と Asp で形成される catalytic dyad 構造の酵素活性部位を通じて脂質分解能を発揮する。著者らの実験で示されたように、ExoU 遺伝子に点変異を導入して、142 位の Ser、もしくは 344 位の Asp のいずれかのアミノ酸をグリシン等に置換した変異型 ExoU を分泌する緑膿菌 PA103 変異株は細胞傷害性を完全に失い、動物の肺に投与されても上皮損傷を起こさない³⁶⁾。つまり、緑膿菌の肺の急性上皮傷害性は完全に ExoU のアシルヒドロラーゼ活性に依存している。また、この酵素活性作用は iPLA₂ の特有的阻害剤である bromoenol lactone (BEL)、methyl arachidonyl

fluorophosphate (MAFP) や arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃) で阻害される²¹⁾³⁵⁾。このことは ExoU の PLA₂ 活性を特異的に阻害できる化合物を開発すれば、ExoU 由来の肺傷害を軽減できる可能性を示唆している。これまでにハイスループット解析により ExoU の酵素活性を特異的に阻害できる Pseudolipin がスクリーニングされている³⁷⁾。

ExoU の立体構造と活性化メカニズム

Ⅲ型分泌システムの特徴として、その毒素は真核細胞の細胞質に転移したのちに真核細胞の活性化因子により活性化されて酵素作用を発揮する。例えば、ExoS は ADP-リボシル転移化酵素活性を持つが、その活性は 14-3-3 タンパクファミリーに属する FAS (factor activating exoenzyme S) で活性化される³⁸⁾。ExoY に関して、*in vitro* では未知の真核細胞由来の因子により活性化されて、その adenylate cyclase 活性を発揮する³¹⁾。ExoU の PLA₂ 作用も同様で、*in vitro* では細胞質の抽出液に含まれる活性化因子により活性化される。C 末端側には conserved domain 領域 DUF885 が含まれているが、このカルボキシル末端を欠損した変異タンパクでは、真核細胞質由来の成分により PLA₂ としての酵素作用が活

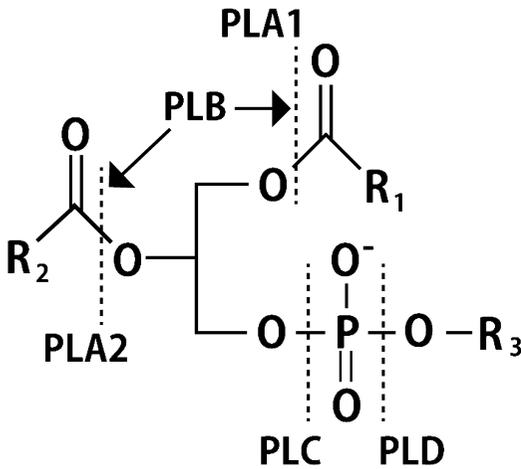


図7 ホスホリパーゼ・ファミリーのグリセロリン脂質作用部位

ホスホリパーゼは、ホスファチジルコリンに代表されるグリセロ三リン脂質を脂肪酸とグリセロール骨格の脂質分子に加水分解する酵素であるが、リン脂質分子上の作用部位により A, B, C, D の4種に大きく分類される。PLA₁ (Phospholipase A₁, PLA₁) は1位 (SN-1) のアシル基を切断し、PLA₂ (Phospholipase A₂, PLA₂) は2位 (SN-2) のアシル基を切断してアラキドン酸を生成する。PLB (Phospholipase B, PLB) は lysoPL としても知られており、SN-1 と SN-2 アシル基を共に切断する。PLC (Phospholipase C, PLC) はリン酸ジエステル結合を切断し、セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸を放出し、シグナル伝達において重要な役割を果たす。PLD (Phospholipase D, PLD) はリン酸エステル結合を切断し、ホスファチジン酸 (phosphatidic acid) とアルコールを生成する。

性化されないことから、この部位に何らかの活性化のメカニズムが有ることは推測されてきた³⁹⁾。2006年に、Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase (SOD1) により活性化されるという報告が行われたが、同時期に178位のリジンや、カルボキシル末端側679~683位のアミノ酸がユビキチン化により活性化されることも報告された⁴⁰⁾⁴¹⁾。その後の追試の結果、前者ではユビキチン化されたSOD1がユビキチンの供与体として作用し、現在ではユビキチン化が活性化の機序であると考えられている⁴²⁾。近年報告された結晶化されたcPLA₂の立体構造においては、パタチン様のモチーフの中で、catalytic dyadを形

成するSer残基とアスパルギン酸残基の立体構造上の位置は大変近接している(図9左)。一方で、結晶化された非活性型ExoUのdyadを形成する142位のSerと344位のAspは、より遠くに存在することから、カルボキシル末端側のユビキチン化が酵素活性中心の立体構造を変化させて、dyad構造を形成するSerとAspを近接させるのではないかと推測できる(図9右)⁴²⁾⁴³⁾。

毒性と抗菌剤耐性の関連性

近年、緑膿菌感染症の治療にかつては有効であった3系統の薬剤、すなわちイミペネム(β-ラクタムのカルバペネム系)、アミカシン(アミノグリコシド)、シプロフロキサシン(ニューキノロン系)などに対して同時耐性を示す多剤耐性緑膿菌(MDRP)が広く出現し社会問題となっている。加えてExoUの発現株によるVAPでは、非発現株に比べて、患者の死亡率が有意に上昇すること、なかでも緑膿菌肺炎が重症化した患者から分離された緑膿菌株において、ニューキノロン系への耐性とExoUの陽性率が有意に高いことが多数報告されている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。抗菌剤への耐性が高くとも菌種そのものの毒性が弱い場合は、感染病態は患者の免疫状態に依存すると考えられるが、抗菌剤への耐性も強くかつ菌種そのものの病原毒性が強い場合、臓器障害等を引き起こすことから臨床的には一層の注意喚起が必要となる。ニューキノロン系の抗菌剤は、肺感染症等では優先して使用されることは大変少なく、むしろ尿路への移行性から圧倒的に泌尿器科領域での使用頻度が高いと考えられる。一方で、現在までのところ、尿路系由来の緑膿菌とⅢ型分泌毒性等についての研究報告は少なく、今後、これらの疫学的な調査が必要と考える。

ま と め

ExoUは1997年に発見された緑膿菌Ⅲ型分泌タンパク質であり、強力な細胞毒性を有して急性肺傷害や敗血症の原因となる。ExoUの遺伝子は、PAPI-2と呼ばれる病原性遺伝子島の中に存在しており、およそ20~25%の臨床分離株に

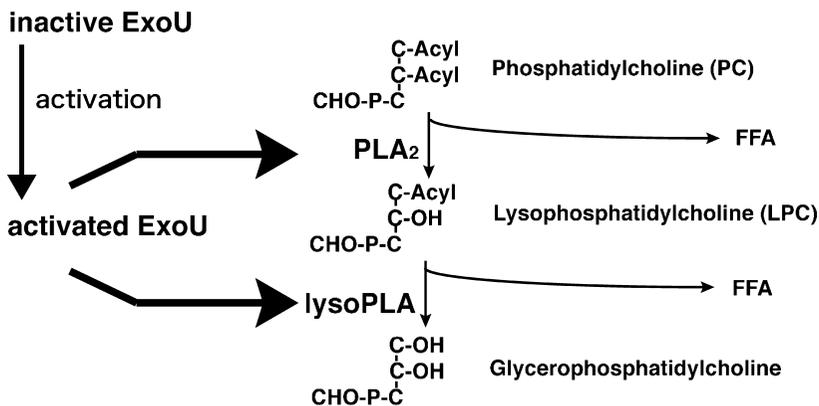


図8 活性化型 ExoU のホスホリパーゼ作用

活性化された ExoU は当初は PLA₂ 活性毒素として同定されたが, lysophosphatidylcholine を基質とする lysoPLA₂ も持つことが判明した。

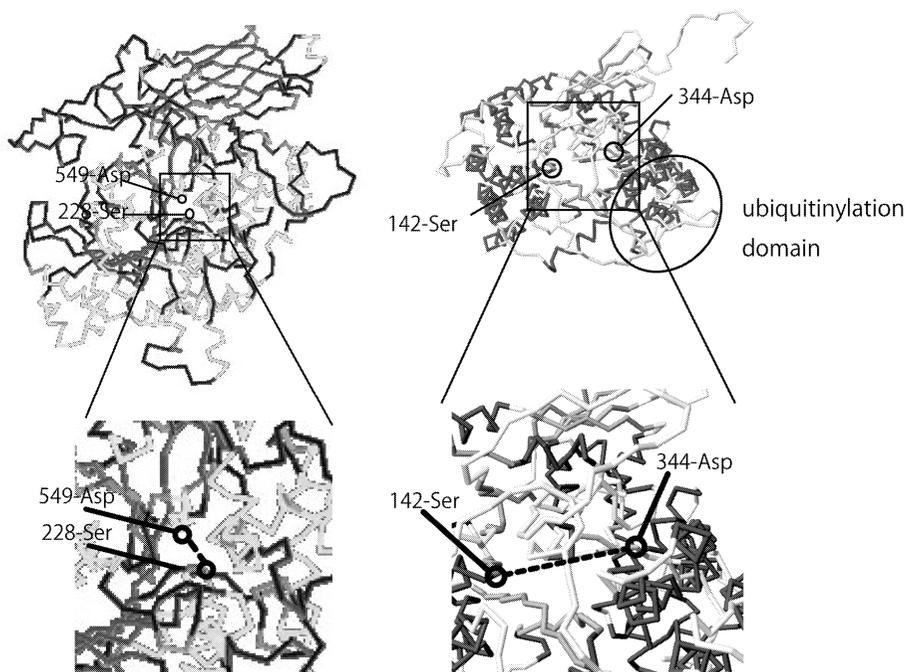


図9 ヒト細胞質型ホスホリパーゼ A2 と緑膿菌 ExoU の結晶構造と酵素活性中心 dyad

結晶化された cPLA₂ の立体構造 (左図) においては, パタチン様のモチーフの中で, catalytic dyad を形成する Ser 残基とアスパルギン酸残基の立体構造上の位置は大変近接している. 一方で, 結晶化された非活性化型 ExoU (右図) の dyad を形成する 142 位の Ser と 344 位の Asp はより遠位に存在する. カルボキシル末端側のユビキチン化が酵素活性中心の立体構造を変化させて, dyad 構造を形成する Ser と Asp を近接させるのではないかと推測できる。

においてその存在が認められている。ExoUはジャガイモに含まれるパタチンやヒトのcPLA₂, およびiPLA₂に認められるPLPドメイン構造を持ち、標的細胞質内で活性化され、PLA₂作用を発揮して細胞膜の破壊をもたらして肺傷害を引き起こす。ExoUの発現株によるVAPでは、非発現株に比べて患者の死亡率が有意に上昇することが報告され、また近年には*exoU*遺伝子陽性

株では、高頻度にニューキノロン耐性であることが報告されており、多剤耐性かつ強毒性の緑膿菌の院内蔓延が懸念される状況にある。これまでの著者らの緑膿菌性急性肺傷害の病態の解明に関わる研究成果が、今後の迅速診断や治療法の開発に広く活かされることが望まれる。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Barbier F, Andremont A, Wolff M, Bouadma L. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med* 2013; 19: 216-228.
- 2) Bassetti M, Taramasso L, Giacobbe DR, Pelosi P. Management of ventilator-associated pneumonia: epidemiology, diagnosis and antimicrobial therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 585-596.
- 3) Sandiumenge A, Rello J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18: 187-193.
- 4) Hauser AR. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*: cap your needles! *Crit Care Med* 2012; 40: 2503-2504.
- 5) Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Valles J, Engel JN, Rello J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2002; 30: 521-528.
- 6) 佐和貞治. Topics. 病原性グラム陰性菌のⅢ型分泌—V抗原ワクチン・抗体療法の開発. 京府医大誌 2011; 120: 659-671.
- 7) 森山 潔, 佐和貞治. グラム陰性菌の毒素について—緑膿菌Ⅲ型分泌毒素を中心に—. 臨麻 2005; 29: 1279-1128.
- 8) 佐和ていじ. 緑膿菌性肺炎・敗血症とⅢ型分泌システム. 日集治医学誌 2001; 8: 305-310.
- 9) 佐和貞治, 森山 潔. 特集細菌感染症への新たな治療戦略. 緑膿菌Ⅲ型分泌毒素に対する治療戦略. 化療の領域 2007; 23: 1265-1272.
- 10) 佐和貞治. 慢性気道感染症—緑膿菌性肺炎における臨床分離株の比較検討—. 化療の領域 2008; 24: 373-379.
- 11) 佐和貞治, 加藤秀哉, 安本寛章. Topics グラム陰性菌の病原性と敗血症. *Anesthesia 21 Century* 2012; 14: 2723-2329.
- 12) Wiener-Kronish JP, Broaddus VC, Albertine KH, Gropper MA, Matthay MA, Staub NC. Relationship of pleural effusions to increased permeability pulmonary edema in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 1988; 82: 1422-1429.
- 13) Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1661-1669.
- 14) Kudoh I, Wiener-Kronish JP, Hashimoto S, Pittet JF, Frank D. Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *Am J Physiol* 1994; 267: L551-556.
- 15) Wiener-Kronish JP, Sawa T, Kurahashi K, Ohara M, Gropper MA. Pulmonary edema associated with bacterial pneumonia. In: Matthay MA, Ingba DH editors. *Pulmonary edema*. New York: Marcel Dekker Inc, 1998; 247-267.
- 16) Wiener-Kronish JP, Frank DW, Sawa T. Mechanisms of lung epithelial cell injury by acute by *Pseudomonas aeruginosa*. In: Clark RSB, Carcillo JA. Editors. *Molecular biology of acute lung injury*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001; 149-161.
- 17) Sawa T, Wiener-Kronish JP. A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiol Clin North America* 2004; 22: 591-606.
- 18) Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care* 2014; 2:10.
- 19) Racusen D. Lipid acyl hydrolase of patatin. *Can J Bot*

- 1984; 62: 1640.
- 20) Andrews DL, Beames B, Summers MD, Park WD. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J* 1988; 252: 199-206.
 - 21) Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbancon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* 2003; 22: 2959-2969.
 - 22) Housley NA, Winkler HH, Audia JP. The *Rickettsia prowazekii* ExoU homologue possesses phospholipase A1 (PLA1), PLA2, and lyso-PLA2 activities and can function in the absence of any eukaryotic cofactors in vitro. *J Bacteriol* 2011; 193: 4634-4642.
 - 23) Kulasekara BR, Kulasekara HD, Wolfgang MC, Stevens L, Frank DW, Lory S. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006; 188: 4037-4050.
 - 24) Banerji S, Flieger A. Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiol* 2004; 150: 522-525.
 - 25) Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 487-510.
 - 26) Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SM, Wu C, Mende-Mueller L, Frank DW. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *MolMicrobiol* 1997; 25: 547-557.
 - 27) Finck-Barbancon V, Yahr TL, Frank DW. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* 1998; 180: 6224-6231.
 - 28) Yahr TL, Barbieri JT, Frank DW. Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; 178: 1412-1419.
 - 29) Yahr TL, Goranson J, Frank DW. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 1996; 22: 991-1003.
 - 30) Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, Vallas V, Mostov KE, Kanada D, Sawa T, Yen TS, Frank DW. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun* 1997; 65: 579-586.
 - 31) Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13899-13904.
 - 32) Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kronish JP. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 2001; 183: 1767-1774.
 - 33) Lynch SV, Flanagan JL, Sawa T, Fang A, Baek MS, Rubio-Mills A, Ajayi T, Yanagihara K, Hiraoka Y, Kohno S, Misset B, Nguyen JC, Wiener-Kronish JP. Polymorphisms in the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion protein, PcrV - implications for anti-PcrV immunotherapy. *Microb Pathog* 2010; 48: 197-204.
 - 34) He J, Baldini RL, Deziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, Rahme LG. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2530-2535.
 - 35) Tamura M, Ajayi T, Allmond LR, Moriyama K, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 316: 323-331.
 - 36) Pankhaniya RR, Tamura M, Allmond LR, Moriyama K, Ajayi T, Wiener-Kronish JP, Sawa T. *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Crit Care Med* 2004; 32: 2293-2299.
 - 37) Lee VT, Pukatzki S, Sato H, Kikawada E, Kazimirova AA, Huang J, Li X, Arm JP, Frank DW, Lory S. Pseudolipasin A is a specific inhibitor for phospholipase A2 activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun* 2007; 75: 1089-1098.
 - 38) Fu H, Coburn J, Collier RJ. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2320-2324.
 - 39) Schmalzer KM, Benson MA, Frank DW. Activation of ExoU phospholipase activity requires specific C-terminal regions. *J Bacteriol* 2010; 192: 1801-1812.

- 40) Sato H, Feix JB, Frank DW. Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *Pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochem* 2006; 45: 10368-10375.
- 41) Stirling FR, Cuzick A, Kelly SM, Oxley D, Evans TJ. Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1294-1309.
- 42) Anderson DM, Schmalzer KM, Sato H, Casey M, Terhune SS, Haas AL, Feix JB, Frank DW. Ubiquitin and ubiquitin-modified proteins activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS cytotoxin, ExoU. *Mol Microbiol* 2011; 82: 1454-1467.
- 43) Halavaty AS, Borek D, Tyson GH, Veessenmeyer JL, Shuvalova L, Minasov G, Otwinowski Z, Hauser AR, Anderson WF. Structure of the type III secretion effector protein ExoU in complex with its chaperone SpcU. *PLoS One* 2012; 7: e49388.
- 44) Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 330-336.
- 45) Sullivan E, Bensman J, Lou M, Agnello M, Shriner K, Wong-Beringer A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2014; 42: 48-56.
- 46) Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW. [<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>]