

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08482

研究課題名(和文) C.perfringens特異的溶菌酵素Psmの種特異性分子機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of the species-specific molecular mechanism of C. perfringens-specific lytic enzyme Psm and its application

研究代表者

玉井 栄治 (Tamai, Eiji)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：40333512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウエルシュ菌特異的溶菌酵素Psmの種特異性はその細胞壁結合ドメインにあることを明らかにした。また、Psm腸溶性製剤は、腸内のウエルシュ菌に対して一部効果を示した。Acpに関しては、その触媒ドメインが3つのサブドメインからなる三日月型構造を取っていることを明らかにし、その反応メカニズムが、Neighboring-group mechanismであることを明らかにした。CPE1138に関しては、触媒ドメインと細胞壁結合ドメインを同定した。更に、触媒ドメインの結晶を得ることができ、X線構造解析により2.0オングストロームの解像度のデータを得ることに成功した。現在、構造解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, molecular mechanism of Clostridium perfringens specific lytic enzyme (Psm, Acp, CPE 1138) and its application study were carried out. The species specificity of Psm was found to be in its cell wall binding domain. In addition, enteric coated preparations of Psm showed some effect on C. perfringens in the intestine. Furthermore, in this study, it was clarified that the catalytic domain of Acp adopts a crescent structure composed of three subdomains, and revealed that the reaction mechanism is Neighboring - group mechanism. In addition, the catalytic domain and cell wall binding domain of CPE 1138 were identified. Furthermore, crystals of the catalytic domain of CPE 1138 were obtained, and data with resolution of 2.0 angstroms was successfully obtained by X-ray structural analysis. Currently, this structural analysis is carried out.

研究分野：細菌学

キーワード：溶菌酵素 ウエルシュ菌

1. 研究開始当初の背景

細菌の細胞壁は、N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸が交互に β (1 \rightarrow 4) 結合でつながったグリカン鎖を 8~12 個のアミノ酸 (種や属により異なる) のペプチド鎖が架橋した網目構造のペプチドグリカンからなる。溶菌酵素は、ペプチドグリカンを分解する酵素であり、その分解部位により 4 種類に分類される (図 1)。また、細菌性溶菌酵素は、ファージ由来 (エンドライシン) と菌由来 (オートライシン) に分けられ、前者はファージの放出に、後者は細胞分裂などに伴うペプチドグリカンの再構築に重要な働きをしているが、細胞外から作用させると菌を死滅させることができる。溶菌酵素の特徴として、触媒ドメインと細胞壁結合ドメインからなる物が多く、種もしくは属特異的に作用することが知られている。また、細胞壁結合ドメインが特異性を担っていると考えられているが、分子レベルで特異性機構が明らかにされているものは無い。

私たちは、*Clostridium perfringens* よりファージ由来のエンドライシン Psm (ムラミダーゼ) を発見し、*C. perfringens* 特異的に作用することを明らかにした。また、Psm の各種変異体の解析及び X 線構造解析によりその立体構造 (図 2) や酵素活性に関するアミノ酸の同定と推定される分解機構を明らかにした。これらの結果を受け、黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンモデルを基に *in silico* 解析により細胞壁結合ドメインのペプチド結合部位がペプチド鎖に結合すると触媒ドメインが分解基質であるグリカン鎖にフィットするという細胞壁分解モデル (図 3) を提唱している。しかし、結合基質に関する実験的データは無く、このモデルでは Psm の種特異性を説明することはできない。一方、Psm は対数増殖期の菌に強い溶菌活性を示すこと、Psm が結合はするが溶菌しない、もしくは溶菌が弱い菌種を発見している。また、ペプチドグリカンの格子構造は、ペプチド鎖や架橋度の違いにより増殖ステージや菌種によって異なる。これらのことから、結合のみが種特異性を決めているのではなく「結合後の触媒ドメインの位置」と「ペプチドグリカンの格子構造」が複合的に関係していると考えている。すなわち、溶菌活性を示すためには、リンカー部位でつながれた 2 つのドメインがそれぞれの基質にフィットする必要があり、基質とドメインの立体的配置が種特異性機構の一部を担っていると考えている。

種特異性を明らかにするためには、他の溶菌酵素との比較解析が有用である。私たちは、*C. perfringens* のゲノム情報からファージ由来の新規アミダーゼ遺伝子 (CPE1138) と細胞分裂に関与するアミダーゼ遺伝子 (CPR1483) をクローニングし種特異性があることを明らかにしている。これらの溶菌酵素は、触媒ドメインと細胞壁結合ドメインか

らなるものであることが分かっている。更に、他の *Clostridium* 属菌のゲノム情報からいくつか溶菌酵素を発見しており Psm と同じ SH3 ドメインを持つ物もある。

更に、溶菌酵素の抗菌剤としての可能性は高く、その応用研究は興味深い。クロストリジウム属菌には *C. perfringens*、*C. difficile*、*C. botulinum* などの多くの病原細菌が属している。*C. perfringens* は、集団食中毒の原因菌であるとともに、人の腸に生息する悪玉菌として知られており、加齢に伴い増加し様々な疾患の原因になると考えられている。また、*C. difficile* は、広域抗菌薬の副作用である偽膜性大腸炎の原因菌として医療現場で問題となっている。近年、肺炎球菌、黄色ブドウ球菌に特異的な溶菌酵素は、それら感染症の治療薬 (次世代の抗菌薬) として利用するための *in vivo* 研究で成果を上げており、

図1. *C. Perfringens*の細胞壁の模式図

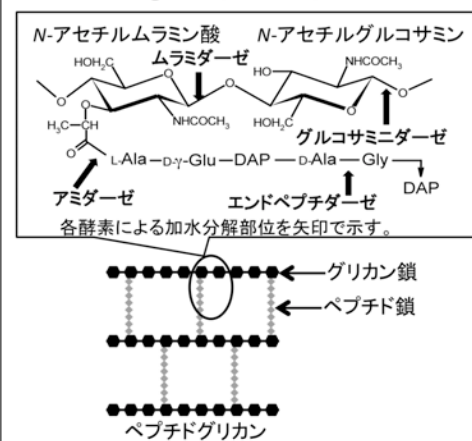


図2. Psmの立体構造

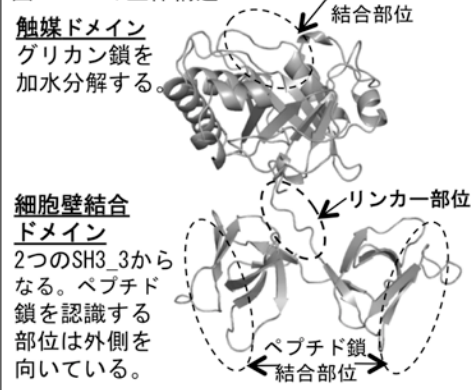
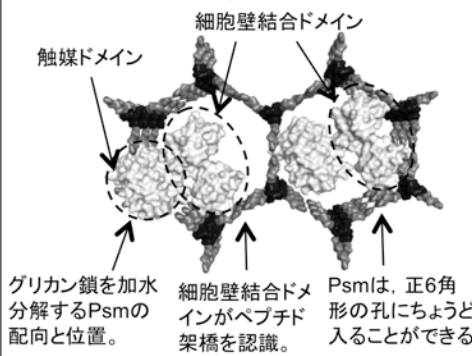


図3. Psmの細胞壁分解モデル



中には臨床応用に向けた安全性の確認が行われている物もある。このことから *Clostridium* 属菌特異的な溶菌酵素は、食中毒や偽膜性大腸炎の治療、更には、腸内環境の改善薬（整腸剤）として利用可能であると考えている。

2. 研究の目的

C. perfringens のエンドライシン Psm は、触媒ドメインと細胞壁結合ドメインからなる 2 ドメインの溶菌酵素で *C. perfringens* 特異的に作用する。しかし、その種特異性の分子機構は明らかにされていない。本研究では、Psm の種特異性が結合性にだけあるのではなく、「触媒ドメインと細胞壁結合ドメインの立体的位置関係」と「ペプチドグリカンの立体構造」にも起因していると考えている。そこで、Psm 変異体およびクロストリジウム属菌の様々な溶菌酵素を用いて、分子生物学的手法、X 線構造解析法、*in silico* 解析で種特異性の分子機構明らかにすることを目的とする。更に、溶菌酵素の応用面として次世代の抗菌薬としての実用化を目指した基礎研究も行う。

3. 研究の方法

Psm の触媒ドメインと細胞壁結合ドメインをつなぐリンカー部位を変えた変異体を作成し、種特異性を解析する。また、これら変異体の立体構造を決定し各ドメインの位置関係と種特異性の関係を明らかにする。一方、細胞壁を溶菌酵素で処理して得られたペプチドグリカン断片を HPLC により分離し、結合基質を Tof-MS にて同定し、*in silico* 解析でドッキングモデルを構築する。更に、*Clostridium* 属菌のゲノム情報より推定される溶菌酵素遺伝子をクローニングし、溶菌活性および結合活性の種特異性を解析し、Psm と比較解析を行い種特異性を決めるアミノ酸の同定を行う。一方、応用面では、*Clostridium* 属菌の腸管内感染モデルマウスに溶菌酵素を投与し、糞便の状態や糞便中の菌数の測定により有効性を評価する。

①Psm 変異体の作製と種特異性の解析

これまでの解析により、Psm の種特異性は細胞壁結合ドメインのみにあるのではなく、触媒ドメインと細胞壁結合ドメインの位置関係が重要なのではないかと考えている。そこで、ドメインをつなぐリンカー部位のアミノ酸をプロリンなどの構造を大きく変えるアミノ酸に変えたものやその長さを変えたリンカー変異体を作製する。また、基質結合に関与すると思われるアミノ酸や結合ポケット形成するアミノ酸を他の SH3 ドメインを持つ溶菌酵素のアミノ酸配列を元に変異させた結合部変異体を作製する。更に、これら変異 Psm を精製し、*Clostridium* 属菌や他のグラム陽性菌を用いて、溶菌活性測定（濁度の減少により溶菌活性を測定する方法）、ザイモグラフィー（菌体を封入した SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い活性の有無を解析する方法）、結合活性測定

（菌体と酵素を低温で反応させ遠心分離し上清中のタンパク質を SDS-PAGE により解析する方法）を行い、それぞれの種特異性を明らかにする。Psm リンカー変異体では、結合活性は変化しないが溶菌活性及びザイモグラフィー活性は低下することや結合するが溶菌しない菌種に対して溶菌活性を示すようになることが予想される。また、結合部変異体ではこれまで結合しなかった菌種に結合するようになることが考えられる。

②Psm 変異体の X 線構造解析と *in silico* 解析

野生型 Psm の結晶化条件をもとに Psm 変異体の結晶化を行い X 線構造解析を行う。得られたデータに基づきタンパク質立体構造モデリングソフトで触媒ドメインと結合ドメインの位置関係を解析し種特異性との関係を明らかにする。

③クロストリジウム属菌の溶菌酵素遺伝子のクローニング・大腸菌大量発現系の構築・精製・種特異性の解析

これまでに解析されている溶菌酵素と Psm の SH3 ドメインのアミノ酸配列をもとにゲノム塩基配列が決定されているクロストリジウム属菌から溶菌酵素遺伝子を検索する。本研究では、主に *C. perfringens* の他に *C. difficile*、*C. tetani*、*C. botulinum* を中心に検索を行う。候補遺伝子を PCR 法で増幅し、各種発現ベクターに His-tag を融合させた状態でクローニングする。これまでの予備実験により、*C. perfringens* St. 13 および SM101 のゲノムより 7 個、*C. difficile* より 1 個の溶菌酵素と推定される遺伝子をクローニングし、そのうちの 4 個が可溶性状態で精製できることを確認している。Ni-キレートイオンカラム、陰イオン・陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて高度精製法を確立する。更に、溶菌活性測定、ザイモグラフィー、結合活性測定によりそれぞれの溶菌酵素の菌種特異性の詳細を明らかにする。また、立体構造を考慮して、他の溶菌酵素の細胞壁結合ドメインとアミノ酸配列の比較解析を行うことにより種特異性を決めてアミノ酸を推定し、変異体を作製し解析する。

④結合基質の分離・同定と *in silico* 解析

クロストリジウム属菌のペプチドグリカンの化学構造（図 1）は 1970 年に提唱されているが、現在も不明な点が多い。申請者らは、細胞壁結合ドメインはペプチド鎖に結合すると考えているが、実験的証拠は無い。また、推定のペプチド鎖にはジアミノピメリン酸（DAP）や γ-アミノ基の分岐などが含まれるため一般的なペプチド合成では基質を合成することができない。そこで、菌体をオートクレーブ-SDS-フッ化水素処理してペプチドグリカンを調製し、各種溶菌酵素を作用させてペプチドグリカン断片を調製し結合基質の分離同定を行う。具体的には、ペプチドグリカン断片を HPLC で分離し、GST 融合細胞壁結合ドメイン（作製済み）をプローブとして

ドットプロットを行い、結合基質を含むフラクションを同定する。更に、タンデム質量分析 (MS/MS) を行い構造決定する。一方、Psmには2つの細胞壁結合ドメインがあるが、それぞれのドメインをGSTに融合した変異体を作製している。得られた基質とそれぞれの細胞壁結合ドメインとの親和性をBiacor3000を用いて測定する。更に、他の溶菌酵素についても同様の解析を行い、構造と基質親和性の関係を明らかにする。前年度までに蓄積した3次元情報に基づいて、同定した基質についてドッキングシミュレーションを行い、親和性・相互作用について分子レベルでの解析を行う。

⑤溶菌酵素の *in vivo* での有効性試験

Psmは熱にも強く凍結乾燥させても活性はほとんど低下しないため製剤化に適している。凍結乾燥させたPsmを用い腸溶性マイクロカプセルの作製を行い、*C. perfringens* 腸管感染モデルマウスに投与して糞便中の *C. perfringens* の菌数を測定することによりその有効性を検討する。なお、共同研究者の成谷らは、*C. perfringens* の毒素遺伝子をすべてノックアウトした変異株を作製している。この変異株を用いることにより安全で安定的にPsmの *in vivo* での有効性解析が行える。また、本研究では、*C. difficile*、*C. tetani*、*C. botulinum* の溶菌酵素に関しても物理的性質を明らかにして製剤化できるかを検討し、可能な物に関しては腸溶性マイクロカプセルを作製する。更に、これらの菌についても毒素遺伝子や病原性遺伝子をすべて欠損させた変異株を作製し、感染モデルマウスの作製を行い *in vivo* での有効性解析を行う。

4. 研究成果

– *C. perfringens* の各種溶菌酵素の種特異性分子メカニズムの解析 –

我々は、Psmの種特異性のメカニズムが、結合ドメインの親和性のみあるのではなく触媒ドメインと結合ドメインの立体的位置関係にも起因していると考えている。そこで、触媒ドメインと結合ドメインの間のリンカーの長さを変えた変異体や結合ドメインの数を変えた変異体を作製し、その特異性を解析した。その結果、リンカー部位の変異体では、特異性に大きな変化は見られなかったが、結合ドメインの数を変えた変異体ではその特異性に変化が現れた。このことから、増加させた結合ドメインと触媒ドメインの位置関係が種特異性に影響を及ぼしたと考えられる。今後、種特異性の変化した変異Psmの立体構造をX線構造解析により決定し、新たな知見を得るように研究を行っていく。また、他の溶菌酵素との比較を行うため、ウェルシュ菌やデフィシル菌の溶菌酵素をクローニングし、大量発現系と精製系の構築を行った。なお、そのうちの一つのウェルシュ菌オートライシンであるAcpの触媒ドメイン (AcpCD) の結晶化に成功し (図4)、Se-Metで標識したAcpCDを用いてX線構造解析によ

り2.25オングストロームの分解能でデータを得ることができた。更に、得られたデータよりそのカタリティックドメインの構造は、3つのサブドメインからなる三日月型構造を取っていることを明らかにした (図5)。また、



図4 Acp-CDの結晶

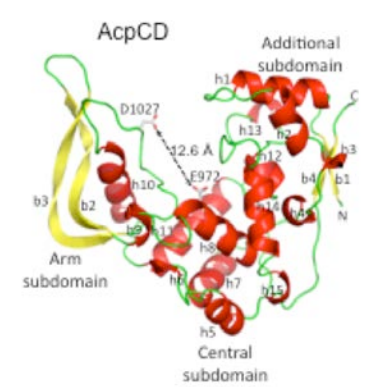


図5 Acp-CDの構造

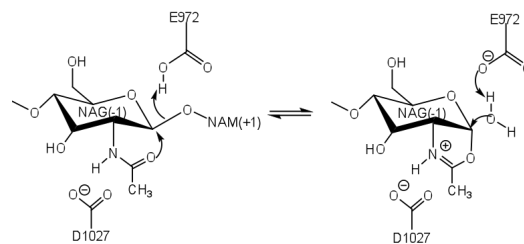


図6 Acp-CDの反応メカニズム

AcpCDの変異体を作成し、ザイモグラフィを用いて解析した結果、その活性中心を明らかにし、その反応メカニズムはNeighboring-group mechanismであることを明らかにした (図6)。また、細胞壁結合ドメインを持つAcp変異体では、*C. perfringens* St13と*C. tetani*にのみ溶菌活性を示すことを明らかにした。更に、Acpに関しては、細胞壁結合ドメインの構造を決定するため10個のSH3ドメインのうち1~8個持つ変異体を構築した。これらの変異体は、すべて細胞への結合活性を持っていたが、SH3ドメインが3個以下の物は結合が弱かった (図7)。また、これらの変異体を高度に精製し、結晶化

を試みたが現在結晶は得られていない。一方、Acp のカタリティックドメインがフィブロネクチン結合タンパク質と結合することを明らかにした。

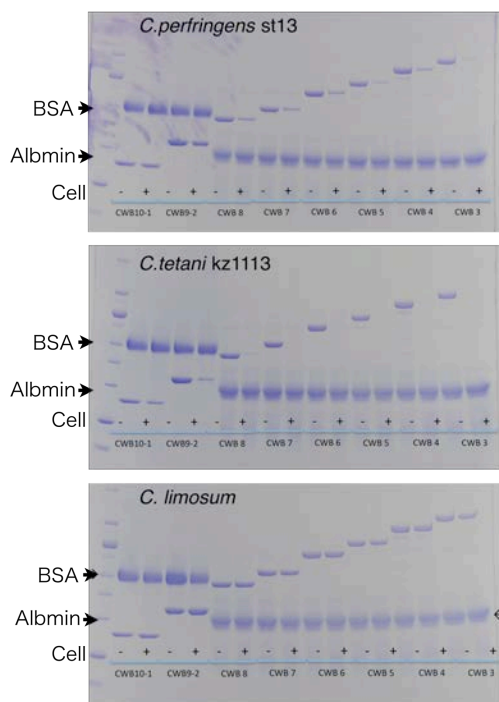


図7 Binding Assyの結果

CPR1483 に関しては、この酵素の最適条件が 100mM NaCl、pH7.5 であること、*C. perfringens*、*C. tetani* に対して溶菌活性を持つことが分かった。現在、結晶化のスクリーニングを行っているところであり、X 線結晶構造解析及び生化学的性状を明らかにすることにより、その構造や反応機構が明らかになることが期待される。

一方、CPE1138 は、N 末端にアミダーゼドメインを C 末端に細胞壁結合ドメインを持つエンドライシンである。なお、アミダーゼドメインは、T7 Lysozyme Zinc Amidase と相同性を示すが、細胞壁結合ドメインは相同性を示すタンパク質は見つかっておらず、新規のドメインであると考えられる。本研究で CPE1138 を高度に精製し、様々に菌に作用させその種特異性を解析した。その結果、ウエルシュ菌に特異的に作用することを明らかにした。現在、詳細な生化学的性状を明らかにしているところである。更に、CPE1138 の最小ドメインを明らかにするために N 末端及び C 末端から段階的に欠損させた欠損変異体を作成し、溶菌活性（ザイモグラフィー）や結合活性の必須の領域を解析した。その結果、溶菌活性には 1~146 番目のアミノ酸まで、細胞壁結合には 165~304 番目のアミノ酸までが必要であることを明らかにした（図 8, 9）。更に、これらの変異体のいくつかを大量に高純度に精製し結晶化を行った。その結果、N 末端領域 1~152 番目のアミノ酸をもつ変異体で結晶を得ることができたが（図 10）、C

図8 Zymography

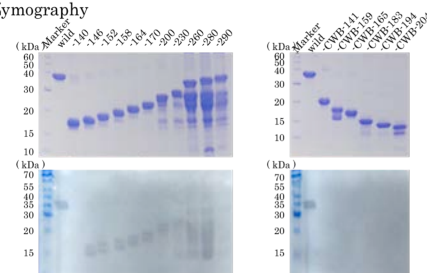
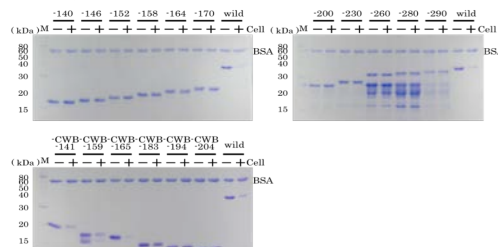


図9 Binding Assay



末端領域の結晶はまだ得られていない。なお、N 末端領域の結晶を用いて X 線構造解析を行った所、2.0 オングストロームの解像度のデータを得ることに成功し、現在、構造決定を行っている。

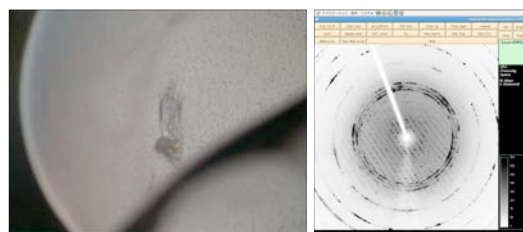


図10 CPE1138CDの結晶とX線回折の結果

ー Psm を用いた腸溶性製剤の開発研究 ー

精製 Psm を用いて凍結乾燥により Psm パウダーを調整し、ヒプロメロースフタル酸エステルを用いて Dip コーティングにより腸溶性 Psm カプセルを作製した。作製した腸溶性 Psm カプセルは、液中で約 30 分後に崩壊し、溶出した Psm は十分な溶菌活性を持っていた。腸溶性 Psm カプセルをウエルシュ菌定着無菌マウスに投与した結果、1 匹において、ウエルシュ菌の菌数が 1/10 に減少していることが確認された。また、コントロールカプセルでは、胃内もしくは十二指腸レベルで徐々に溶解している様子が確認されたことから、カプセルの性能が十分ではなく投与した Psm の一部のみが腸内で機能したと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Tamai E, Sekiya H, Maki J, Nariya H, Yoshida H, Kamitori S.

X-ray structure of *Clostridium perfringens* sortase B cysteine transpeptidase.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有り、2017、493(3)、1267-1272

② Tamai E, Sekiya H, Goda E, Makihata N, Maki J, Yoshida H, Kamitori S.
Structural and biochemical characterization of the *Clostridium perfringens* autolysin catalytic domain. FEBS Lett. 査読有り、2017、591(1)、231-239

[学会発表] (計 14 件)

① 関谷洋志, 檜垣恵二, 玉井栄治, 牧 純
溶菌酵素 Psm に対するタイコ酸の影響
第 91 回 日本細菌学会総会 2018

② 岡田真歩, 玉井栄治, 関谷洋志, 島本敏, 島本整, 成谷宏文
Biocontrol of *Clostridium perfringens* by using two types of specific endolysins
第 91 回 日本細菌学会総会 2018

③ 藤本佳那子, 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 櫃本泰雄
Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the *Clostridium perfringens* cell surface
第 91 回 日本細菌学会総会 2018

④ 藤本佳那子, 松永望, 片山誠一, 玉井栄治, 櫃本泰雄
Clostridium perfringens 由来 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の細菌表層表出とその機能
第 70 回 日本細菌学会中国・四国支部総会 2017

⑤ 関谷洋志, 玉井栄治, 神鳥成弘, 牧純
ウエルシュ菌細胞壁分解酵素の機能解析
第 29 回 微生物シンポジウム 2017

⑥ 玉井栄治
溶菌酵素を用いた腸内環境改善薬の開発
8th Forum of Network Association of Microbiologists in Ehime (NAME) 2017

⑦ 玉井栄治, 関谷洋志, 牧純
ウエルシュ菌オートライシン Acp の構造と機能解析
第 69 回 日本細菌学会 中四国支部会 2016

⑧ 関谷洋志, 玉井栄治, 牧純
溶菌酵素 Psm の腸内常在菌に対する作用および変異体解析
第 69 回 日本細菌学会 中四国支部会 2016

⑨ 玉井栄治, 関谷洋志, 巻幡奈保美, 吉田裕美, 神鳥成弘, 牧純
ウエルシュ菌細胞壁分解酵素 Acp の構造と機能解
第 90 回 日本細菌学会 総会 2017

⑩ 関谷洋志, 玉井栄治, 牧 純
腸内細菌叢構成菌に対する溶菌酵素 Psm の影響
第 90 回 日本細菌学会 総会 2017

⑪ 玉井栄治, 神鳥成弘
今日から始める細菌タンパク質の構造機能解析
第 68 回 日本細菌学会中国・四国支部総会 (招待講演) 2015

⑫ 関谷洋志, 玉井栄治, 成谷宏文, 牧純
溶菌酵素 Psm における細胞壁結合ドメイン変異体の解析
第 68 回 日本細菌学会中国・四国支部総会 2015

⑬ 関谷洋志, 玉井栄治, 成谷宏文, 牧純
溶菌酵素 Psm の種特異性に対する細胞壁結合ドメインの影響
第 89 回 日本細菌学会 総会 2016

⑭ 吉田裕美, 神鳥成弘, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧純
ウエルシュ菌溶菌酵素オートライシン触媒ドメインの X 線結晶解析
日本生化学会、日本分子生物学会 2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉井 栄治 (TAMAI, Eiji)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：40333512

(2) 研究分担者

成谷 宏文 (NARIYA, Hirofumi)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30452668

(3) 連携研究者

吉田 裕美 (YOSHIDA, Hiromi)

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号：10313305

(4) 研究協力者