

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07131

研究課題名（和文）ウエルシュ菌溶菌酵素の種特異性機構の解明と応用研究

研究課題名（英文）Study on the species-specificity mechanism of *C. perfringens* lytic enzymes and its application research

研究代表者

玉井 栄治 (Tamai, Eiji)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：40333512

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：溶菌酵素（エンドライシンやオートライシン）は、ペプチドグリカン分解し細菌を死滅させる酵素である。また、その分解部位によりムラミダーゼ、グルコサミニダーゼ、アミダーゼ、エンドペプチダーゼの4種類に分類される。さらに、構造学的には、触媒ドメインと細胞壁結合ドメインから構成されている。本研究では、ウエルシュ菌のエンドライシンであるPsaとディフィシル菌のオートライシンであるAcd24020の生化学的性質および構造解析を行った。その結果、これらの溶菌酵素は、共にそれぞれの菌に特異的に作用すること、さらには、Acd24020の特異性は基質結合溝の構造に依存していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、PsaとAcd24020がそれぞれウエルシュ菌やディフィシル菌に対して特異的に働くことを明らかにし、その特異性が触媒ドメインの構造に依存していることを明らかにした。このことは溶菌酵素の種特異性に関して新たな学術的知見を得ることができた。また、PsaとAcd24020がそれぞれウエルシュ菌とディフィシル菌に特異的に作用し死滅させることを明らかにした。このことは、食中毒やガス壊疽の原因菌であるウエルシュ菌や臨床現場で問題となっている抗菌薬誘発性偽膜生大腸炎の原因菌であるディフィシル菌に対して新たな治療薬の候補となることを明らかにしたものであり、社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lytic enzymes (endolysins or autolysins) are enzymes that degrade peptidoglycans and kill bacteria. They are classified into four types according to their degradation site: muramidase, glucosaminidase, amidase, and endopeptidase. Furthermore, structurally, they are composed of a catalytic domain and a cell wall binding domains. The aim of this study is to elucidate the substrate recognition and binding mechanism of lytic enzymes at the molecular level. In this study, we clarified the biochemical properties and the structure of the catalytic domain of Psa, an endolysin of *C. perfringens*, and Acd24020, an autolysin of *C. difficile*. We found that both of these lytic enzymes are specific to their corresponding bacteria, and that the specificity of Acd24020 depends on the structure of the substrate-binding groove.

研究分野：細菌学

キーワード：溶菌酵素 エンドライシン オートライシン ペプチドグリカン ウエルシュ菌 ディフィシル菌 X線結晶構造解析 酵素触媒反応機構

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細菌の生存に必須の細胞壁を構成するペプチドグリカン、グリカン鎖を 8~12 個のアミノ酸からなるペプチド鎖 (種や属により異なる) が架橋した網目構造のペプチドグリカンにより構成されている。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 (Fig. 1)。また、溶菌酵素は、ファージの放出に関与するエンドライシンと細胞分裂時のペプチドグリカン再構築に関与するオートライシンに分けられ、共に細胞外から作用させると細胞壁を破壊し、菌を死滅させることができる。溶菌酵素は、種もしくは属特異的に溶菌活性を示すことが知られており、一般的に種特異性は前者が高く後者は低い。また、溶菌酵素は、触媒ドメインと菌に結合する結合ドメインからなるものが多く、結合ドメインがその種特異性を担っていると考えられているが、分子レベルで種特異性や基質認識・結合機構が明らかにされているものはほとんど無い。従って、溶菌酵素の結合ドメインが何をどのように認識してどのように結合しているのかを明らかにすることは学術上極めて興味深い。

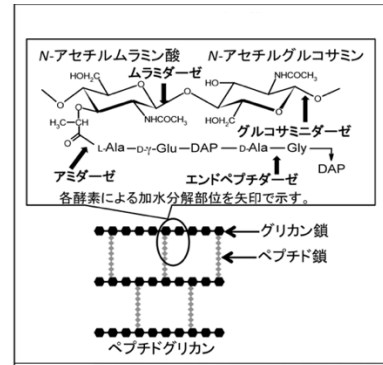


Fig. 1 Schematic diagram of the cell wall of *C. perfringens*

2. 研究の目的

本研究では、ウエルシュ菌の溶菌酵素 (Psm, Acp, CPE1138) やディフィシル菌の溶菌酵素 (CD24020) に焦点を当て、その結合ドメインの結合基質と基質認識・結合機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。また、食中毒やガス壊疽の原因菌であるウエルシュ菌や臨床現場で問題となっている抗菌薬投与より誘発される偽膜生大腸炎の原因菌であるディフィシル菌に対する新たな抗菌薬としての知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の調整

ウエルシュ菌のゲノムから、PCR より得た目的遺伝子を発現ベクター (pCold, Takara Bio Inc., Japan) にクローニングし、大腸菌 (BL21-CodonPlus-RIL, Agilent Technology, Inc., USA) に導入し、大量培養することにより目的量のタンパク質を得た。Ni アフィニティークロマトグラフィーを始めとする各種カラムクロマトグラフィーにより精製した後、必要に応じて濃縮し、各種実験に用いた。

(2) 溶菌酵素の生化学的解析

精製した溶菌酵素を用いて、濁度低下法、ザイモグラフィー、Cell Binding Assay, MIC 測定により溶菌酵素の生化学的解析を行った。

(3) X 線結晶構造解析

各種結晶化スクリーニングキットを用いて、293 K 下、リザーバー溶液と 1:1 で結晶化ドロップを作成し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。X 線データの収集は、100 K 下、リガク社製 R-AXIS VII イメージングプレートシステム/MicroMax 回転対陰極 X 線発生装置、および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory にて行った。

4. 研究成果

(1) Psa の生化学的解析

ウエルシュ菌 st13 株のゲノム情報を用いて BLAST サーチを行い、溶菌酵素の候補遺伝子である CPE1138 を発見し Psa と名付けた (Fig. 2a)。さらに、PCR により CPE1138 遺伝子を増幅し、発現ベクター pColdII の NdeI-XhoI サイトにクローニングし、N 末端に His-Tag を融合した Psa を発現するベクターを構築した。同様に、Psa の N 末端ドメイン (触媒ドメイン) と C 末端ドメイン (結合ドメイン) に関してもクローニングを行い、発現ベクターを構築した。それぞれのタンパク質は、問題なく発現し、精製を行うことができた (Fig. 2b)。さらに、ザイモグラフィーを用いた解析により野生型 Psa (Psa-his) と Psa の触媒ドメインのみの変異体 (PsaCD-his) だけが溶菌活性を持つことがわかった (Fig. 2c)。一方、細胞への結合活性を調べるため Cell binding assay を行った。その結果、野生型 Psa (Psa-his) と Psa の結合ドメインのみの変異体 (PsaBD-his) だけが細胞に結合することがわかった (Fig. 2d)。さらに、Psa の種特異性を調べた結果、ウエルシュ菌に特異的に作用することがわかった。さらに、Psa の溶菌活性に与える pH、塩、金属、温度の影響を調べた結果、pH は 6~8、塩濃度 200mM 以上、37 度で活性が高いこと、Zn の添加によりその活性が低下することがわかった (Fig. 3a-d)。また、様々な菌を用いた Cell Binding Assay を行ったところ、ウ

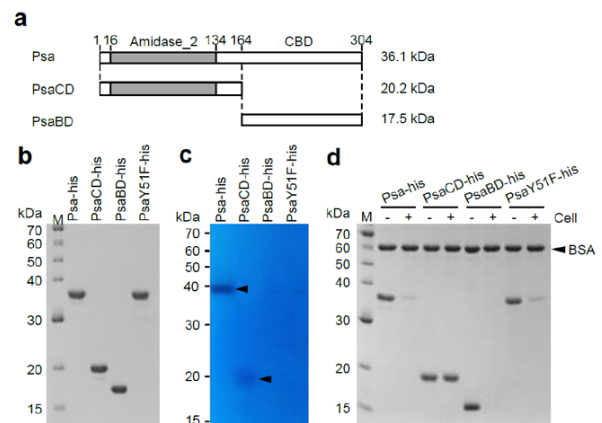


Fig. 2 SDS-PAGE analysis, zymography analysis, and binding analysis of Psa-his, PsaCD-his, PsaBD-his, and PsaY51F-his. (a) Schematic diagrams of Psa, PsaCD, and PsaBD are shown Psa has an N-terminal catalytic domain (CD) of the amidase 2 family (indicated by gray bar) and a novel C-terminal cell wall-binding domain (CBD). These proteins were expressed and purified with a histidine-tag (MNHKVHHHHHH) fused to the N-terminus. The molecular weights of each histidine-tagged protein are shown on the right of the corresponding horizontal bar. (b) Purified Psa-his, PsaCD-his, PsaBD-his, and PsaY51F-his (1 µg each) were subjected to 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie blue R. (c) Zymography analysis was carried out according to the Materials and Methods. Purified Psa-his (0.5 µg), PsaCD-his (2.0 µg), PsaBD-his (2.0 µg), and PsaY51F-his (0.5 µg) were electrophoresed in a 12.5% SDS-polyacrylamide gel containing 20 OD600 of heat-inactivated and SDS-treated *C. perfringens* HN1314 cells. The arrowheads indicate cell lysis. (d) Binding activity was measured according to the Materials and Methods. The purified protein and non-binding internal standard, bovine serum albumin (BSA), were combined with (+) or without (-) *C. perfringens* HN1314 cells; the mixtures then were centrifuged, and the resulting supernatants were analyzed by 12.5% SDS-PAGE.

エルシ菌に特異的に結合することがわかった。

(2) Psa と Psm の相乗効果

Psa はそのアミノ酸配列からアミダーゼであることが予想される。一方、以前報告した Psm はムラミダーゼであり、Psa と異なるペプチドグリカンの部位を分解し、菌を殺すことができる溶菌酵素である。また、異なる切断部位の溶菌酵素を組み合わせることにより相乗効果があるという報告がある。そこで Psa と Psm による相乗効果の有無を検討した。その結果、FIC index が Psa 34.6 nM (1.25 μg/mL) と Psm 3.9 nM (0.16 μg/mL) の時に 0.5 となったことから相乗効果があることがわかった (Fig. 4)。

(3) Psa の触媒ドメインの構造解析と反応機構

精製した Psa-CD (38.5 mg/mL in 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。その結果、reservoir solution が 200 mM Potassium bromide, 200 mM Potassium thiocyanate, 0.1 M Sodium acetate, 3 % w/v poly-γ-glutamic acid, 5% w/v PEG 3350, pH 5.0 の条件でタンパク質の結晶を得ることができた。さらに、X 線構造解析を行ったところ、1.65 オングストロームの分解能で構造を決定することができた (Fig. 5)。この結果より、活性中心に Zn を含むタンパク質であることも明らかとなった。さらに、活性中心に隣接するアミノ酸を変異させた変異体の溶菌活性を測定した。その結果、26 番目と 27 番目のヒスチジン、28 番目のプロリン、37 番目のロイシン、46 番目のフェニルアラニン、51 番目のチロシン、65 番目のアルギニン、72 番目のアラニン、123 番目のヒスチジン、129 番目のスレオニン、131 番目のシステインの変異体で大きく活性が低下することがわかった。これらの情報をもとに Fig. 6 に示す反応メカニズムを提唱した。

(4) Acd24020 の生化学的解析

ディフィシル菌 630 株のゲノム情報よりオートライシンと思われる遺伝子 CD24020 を発見し、Acd24020 と名付けた。この遺伝子のアミノ酸配列より、N 末端にシグナルシーケンス、3つの SH3b ドメイン (細胞壁結合ドメイン) と C 末端にデンドペプチダーゼである NlpC/P60 ドメインをもつことがわかった (Fig. 7)。さらに、この遺伝子のシグナルシーケンスを除いた全長、N 末端細胞壁結合ドメイン、C 末端触媒ドメインをそれぞれ発現ベクター (pColdII) にクローニングし大腸菌 BL21-RIL を用いて発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィー及び陰イオン交換樹脂を用いて精製した。さらに、精製したタンパク質を用いてその生化学的性状をディフィシル菌を用いた濁度低下法により解析した。その結果、pH6 以下および pH8 以上で活性が大きく低下すること、触媒ドメインのみでも溶菌活性があること、NaCl の添加により活性が低下することを明らかにした (Fig. 8)。なお、結合ドメインのみの変異体および触媒ドメインのみの変異体でもディフィシル菌に結合することも明らかにした。さらに、様々な菌株を用いて溶菌活性を測定することによりその種特異性を解析した。その結果、ディフィシル菌に加え、*Clostridium novyi* ATCC17861 や *Clostridium ramosum* ATCC25582 にも溶菌活性を示すことがわかった。さらに、Acd24020、Acd24020-CD および Acd24020-BD の様々な細菌への結合活性を Cell binding assay により測定した。その結果、Acd24020 が溶菌活性を示さない細菌への結合も多く見られた (Fig. 9)。

(5) Acd24020 の構造解析

精製した Acd24020-CD (125 mg/ml in 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.5) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。その結果、reservoir solution (200 mM ammonium citrate dibasic, 20% (w/v) polyethylene glycol

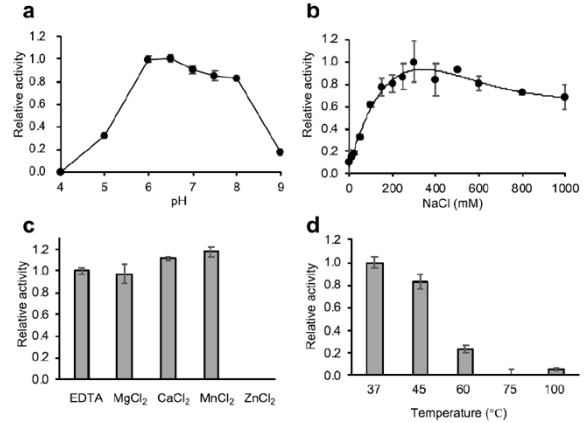


Fig. 3. Characterization of the lytic activity of Psa-his. The lytic activity of Psa (1 U) against *C. perfringens* HN1314 was determined using the turbidity reduction assay. (a) Optimal pH of Psa-his. The relative activity at pH 6.0 was set as 1. (b) The effect of NaCl on Psa-his lytic activity was determined, and the relative activity at 300 mM NaCl was set as 1. (c) The effects of divalent metal cations on Psa-his lytic activity were determined by the addition of 1 mM MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, or EDTA. The relative activities are shown with activity in the absence of divalent cations (with 1 mM EDTA) set as 1. (d) The thermal-stability of Psa-his lytic activity was determined by measuring lytic activity after 10 min of heat treatment at 37, 45, 60, 75, and 100 °C. The relative activity at 37 °C was set as 1.

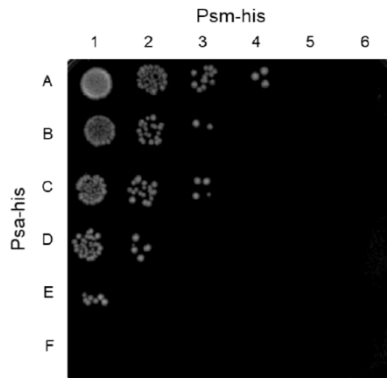


Fig. 4. Synergistic killing by Psa-his and Psm-his of *C. perfringens* HN1314 in a checkerboard assay. Serial 2-fold dilutions with PBS (-) of Psa-his and Psm-his (20 μL; individually and in combination) were mixed with 20 μL (4 × 10⁶ cells) of *C. perfringens* HN1314 on ice. After a 30-min incubation at 37 °C, 2 μL (2 × 10⁵ cells) of each mixture were spotted to GAM/2 agar plates and incubated anaerobically at 37 °C for 12 h. Rows A-F are Psa-his concentrations of 4.3, 8.7, 17.3, 34.6, 69.2, and 138.5 nM. Columns 1-6 are Psm-his concentrations of 1.0, 1.9, 3.9, 7.8, 15.5, and 31 nM.

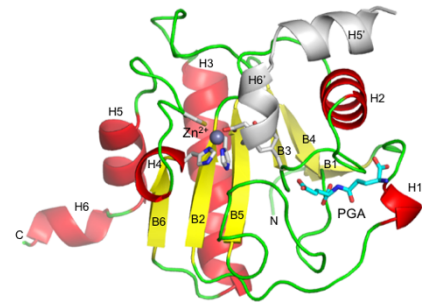


Fig. 5. Structure of Psa-CD

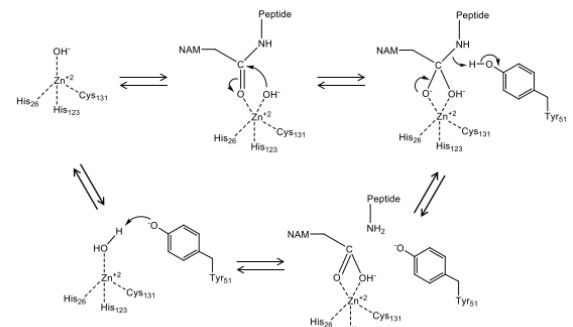


Fig. 6 Predicted catalytic reaction mechanism of Psa-CD

citrate dibasic, 20% (w/v) polyethylene glycol

3, 350, pH 5.1) の条件で良好な結晶を得ることができた。さらに、X 線構造解析を行ったところ、1.56 オングストロームの分解能で構造を決定することができた (Fig. 10a)。

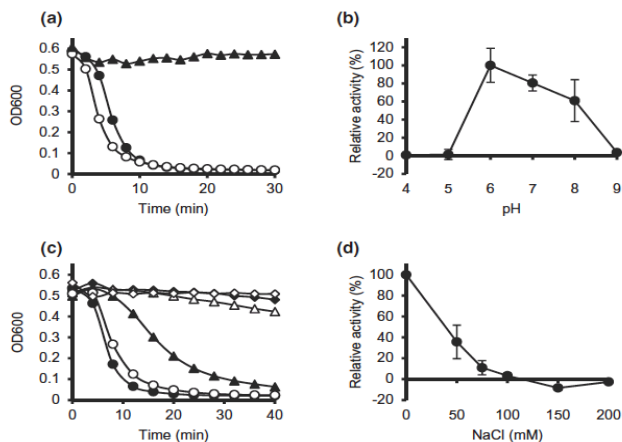


Fig. 8 Characteristics of lytic activities of Acd24020, Acd24020-CD, and Acd24020-BD. (a) The lytic activities of the enzymes were determined by the Turbidity Reduction Assay using *C. difficile* 630 cells. Fifteen $\mu\text{g/ml}$ ($0.37 \mu\text{M}$) of Acd24020 (filled circles), 5 $\mu\text{g/ml}$ ($0.33 \mu\text{M}$) of Acd24020-CD (open circles), or buffer (filled triangles) was added to the cells, and then, the optical density at 600 nm (OD600) was measured at 2-min intervals for 30 min. (b) The optimal pH for Acd24020 lytic activity was determined using borate phosphate universal buffer. The lytic activity was tested with 15 $\mu\text{g/ml}$ ($0.37 \mu\text{M}$) of Acd24020 and calculated after 15 min, as follows: $[\Delta \text{OD600 test (Acd24020 added)} - \Delta \text{OD600 control (buffer only)}] / \text{initial OD600}$. The relative activities at pH 6.0 are shown as 100%. (c) Inhibitor, MTSET; 0 μM (filled circles), 100 μM (open circles), 120 μM (filled triangles), 140 μM (open triangles), 160 μM (filled diamonds), and 15 $\mu\text{g/ml}$ ($0.37 \mu\text{M}$) of Acd24020, or buffer (open diamonds) were added to preincubated cells. The turbidity was measured every 2 min. (d) The effect of salt (NaCl) on Acd24020 (15 $\mu\text{g/ml}$, $0.37 \mu\text{M}$) lytic activity was determined using 25 mM Tris-HCl (pH 7.0). Relative activity of 100% was assigned to the value of 0 mM NaCl. Means in all experiments were calculated based on three independent experiments. Standard deviations in (b) and (d) were calculated by three independent experiments, each with triplicate samples.

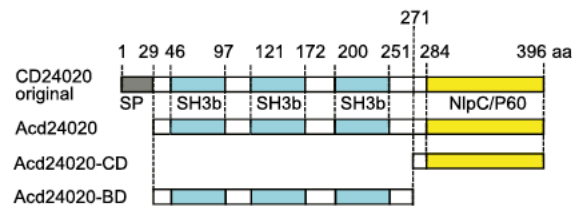


Fig. 7 Gene Structure of Acd24020

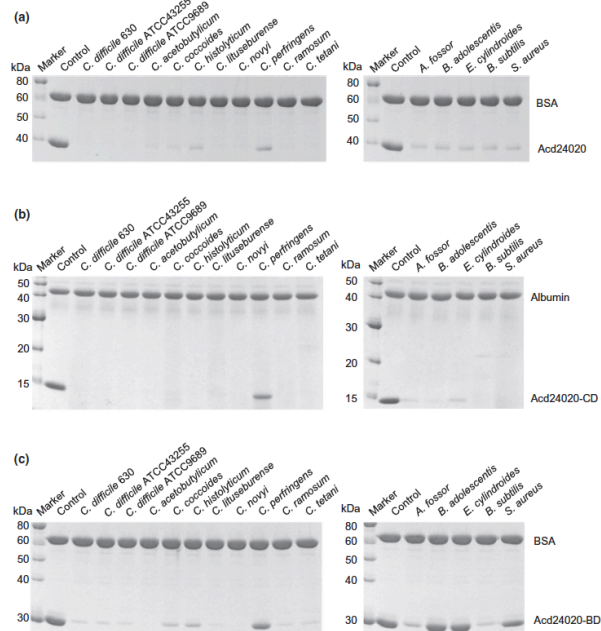


Fig. 9 Binding assay of Acd24020, Acd24020-CD, and Acd24020-BD for various bacteria. Experiments were repeated three times with similar results. (a) Two μg of purified Acd24020 (49 pmol) and BSA as a nonbinding internal standard were incubated on ice with or without heat-inactivated cells, indicated at the top of the gel. After centrifugation, the supernatants were analyzed by 12% SDS-PAGE. (b) Binding assay of Acd24020-CD (2 μg , 132 pmol) using albumin as a nonbinding internal standard and 15% SDS-PAGE is shown. (c) Binding assay of Acd24020-BD (2 μg , 74 pmol) using BSA as a nonbinding internal standard and 12% SDS-PAGE is shown.

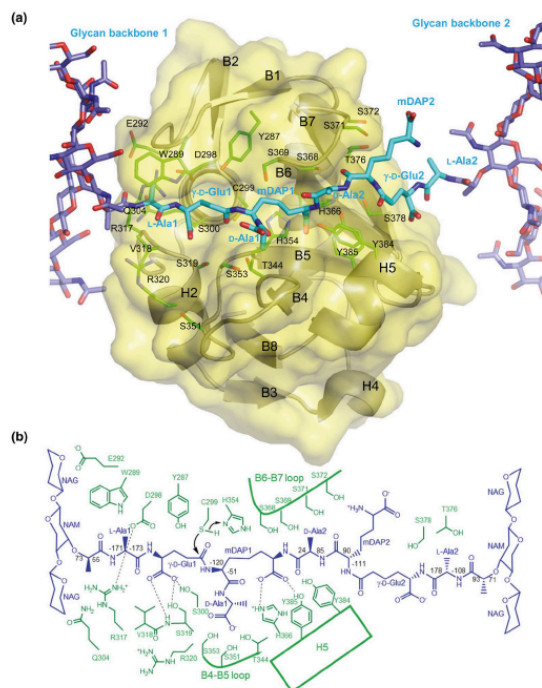


Fig. 10 Modeling structure of Acd24020-CD/peptidoglycan complex and proposed catalytic reaction mechanism. (a) The hourglass-shaped substrate-binding groove of Acd24020-CD with the modeled peptide side chains cross-linking two glycan backbones is illustrated. The residues of the peptide side chains and the residues of the enzyme interacting with peptide side chains are labeled. (b) Schematic diagram of the interactions between Acd24020-CD and the modeled peptidoglycan is shown. The peptide bond conformations of (φ , ϕ) are labeled on the residues of the modeled peptidoglycan. Putative residues interacting with the modeled peptidoglycan are shown with hydrogen bonds and salt bridges by dotted lines. (c) The catalytic Cys299 and His354 residues in form-A and form-B are illustrated. Cys299 in the intermediate position to be activated is shown by a thin bond (left). The proposed catalytic reaction mechanism (dynamic Cys/His catalyzing mechanism) of Acd24020 is shown (right).

さらに、この構造をもとにディフィシル菌のペプチドグリカンのモデルを用いてドッキングシミュレーションを行った (Fig. 11 a,b)。ドッキングシミュレーションより得られた情報より、基質結合溝を構成するアミノ酸の変異体を構築し、その活性を測定した。その結果、299 番目のシステイン、354 番目のヒスチジン、287 番目のチロシン、289 番目のトリプトファン、298 番目のアスパラギン酸、317 番目のアルギニン、300 番目のセリン、318 番目のバリン、320 番目のアルギニン、317 番目のアルギニン、366 番目のヒスチジン、385 番目のチロシン、368 番目のセリン、などにおいて溶菌活性が大きく低下した (Table1)。これらの結果より、このドッキングシミュレーションがほぼ正しいことが推測される。また、これらの変異体解析により Fig. 10c に示す反応メカニズムを提唱した。

(6) Psa のまとめ

Psa は、pH6-8、塩濃度 300mM 程度でウエルシュ菌特異的に作用する溶菌酵素であることがわかった。EDTA により活性の低下が見られないことより、Psa に含まれる Zn は強固にタンパク質に結合していることがわかる。また、Zn と配位結合を形成しているアミノ酸の変異体では、その活性が大きく低下することから、この Zn はペプチドグリカン分解活性に重要な役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、過剰な Zn の添加により Psa の活性は消失する。これは一般的な Zn による影響であると考えられ、過剰な Zn が非特異的にタンパク質に結合してその活性を阻害する現象であると考えられる。その他の金属による影響はほとんど受けない。また、Psa の N 末端触媒ドメインのみではウエルシュ菌に結合しないが、C 末端結合ドメインは単独でウエルシュ菌に結合する (Fig. 2d)。また、Psa はウエルシュ菌にしか結合しない。このことからウエルシュ菌に対する特異性は、C 末端の結合ドメインに依存していることが強く推定されるが、その分子メカニズムは不明である。今後、C 末端ドメインの構造解析を行うと同時に、結合ドメインの結合基質を明らかにしそのメカニズムを明らかにする必要があると考えている。

さらに、Psa (アミダーゼ) は、分解部位の異なる Psm (ムラミダーゼ) と混合することにより相乗効果を示すことを明らかにした。このことは、今後、溶菌酵素を新規の抗菌薬として臨床応用していくためには、重要な情報である。

(7) Acd24020 のまとめ

Acd24020 は pH6-8 において低塩濃度でディフィシル菌に比較的特異的に作用する溶菌酵素であることを明らかにした。一般的にオートライシンは種特異性が低いと言われているが Acd24020 は種特異性があることからのオートライシンと比較して特殊であると考えられる。また、溶菌酵素は、一般的に細胞結合ドメインがないと触媒ドメインが機能しないが、Acd24020 に関しては、その触媒ドメイン (Acd24020-CD) 単独でも結合ドメインを持つ野生型と同等の溶菌活性を持つことを明らかにした。この点においても Acd24020 がユニークな溶菌酵素 (オートライシン) であることがうかがえる。さらに、Acd24020 および Acd24020-CD、Acd24020-BD が様々な菌に結合することから、Acd24020 の種特異性は、その結合特異性にあるのではなく触媒機構にあることが示唆された。

Acd24020 の触媒ドメイン (Acd24020-CD) の構造解析に成功した。その結果、Fig. 10a に示す基質結合溝があることがわかった。さらに、基質結合溝を構成するアミノ酸の変異体を作成して Acd24020 の溶菌活性を調べたところ、それら大半は溶菌活性の低下が見られた。なお、構造情報と変異体の溶菌活性の情報より、299 番目のシステインと 354 番目のヒスチジンは触媒反応に直接関与するアミノ酸であることがわかった。また、287 番目のチロシン、289 番目のトリプトファン、298 番目のアスパラギン酸、317 番目のアルギニンは、L-Ala1- γ -D-Glu1 を認識するアミノ酸であることなど多くのアミノ酸の役割が明らかとなった (詳細は、Table 1 参照)。

さらに、エンドペプチダーゼ活性を有する他の溶菌酵素の構造とディフィシル菌のペプチドグリカンをドッキングさせて比較した (Fig. 11)。その結果、他の溶菌酵素 (BcYkfC、CdCwlT、SaCwlT) では、ディフィシル菌のペプチドグリカンと衝突する部位や大きく乖離する部位が形成されることが明らかとなった。このことから、Acd24020 の種特異性のメカニズムは、Acd24020 の基質結合溝の構造にあることが明らかとなった。すなわち、Acd24020 の基質結合溝は、ディフィシル菌のペプチドグリカンのペプチドブリッジの構造にフィットするため Acd24020 はディフィシル菌のみを溶菌させるが、他の菌に対しては結合するが溶菌活性を示さないと考えられる。しかしながら、Acd24020 は *Clostridium novyi* や *Clostridium ramosum* にもある程度の活性を有していることから、これらの菌はディフィシル菌のペプチドブリッジの構造と似た構造を取っていることが考えられる。

Table1 Relative activities for Acd24020 and the mutant forms of Acd24020

Sample	Relative activity (%)	Sample	Relative activity (%)
Acd24020	100.0 ± 1.00	Recognition of mDAP2, γ -D-Glu2, and L-Ala2	
		S371A	98.6 ± 2.60
Catalytic residue		S371Y	98.9 ± 3.20
C299A	-6.2 ± 4.40	S372A	90.0 ± 15.0
C299S	-3.0 ± 2.20	S372Y	98.3 ± 2.80
H354A	-5.2 ± 3.90	T376A	91.3 ± 15.5
Recognition of L-Ala1- γ -D-Glu1		T376Y	67.3 ± 22.2
Y287A	-4.0 ± 1.50	S378A	91.8 ± 15.0
W289A	0.8 ± 2.70	S378Y	7.1 ± 4.80
D298A	5.3 ± 12.1	Recognition of D-Ala1	
R317A	-4.4 ± 2.40	T344A	72.2 ± 31.4
Recognition of the carboxyl group of γ -D-Glu1		T344Y	50.4 ± 4.00
S300A	18.8 ± 15.8	S351A	94.4 ± 6.10
V318A	29.0 ± 22.0	S351Y	54.4 ± 33.3
S319A	102.1 ± 0.40	S353A	25.4 ± 15.2
R320A	61.2 ± 26.5	S353Y	2.4 ± 2.60
D298R	-6.3 ± 4.50	Recognition of glycan backbone	
		E292A	95.4 ± 9.90
R317D	-2.9 ± 3.30	Q304A	43.8 ± 15.3
Recognition of mDAP1-D-Ala2			
H366A	2.4 ± 2.60		
H366E	-5.4 ± 4.40		
Y385A	-5.0 ± 2.90		
S368A	60.8 ± 7.70		
S368Y	5.3 ± 1.10		
S369A	95.2 ± 2.40		
S369Y	6.5 ± 1.00		
Y384A	83.9 ± 20.4		

Note: The lytic activity was calculated after 15 min as follows: $(\Delta OD_{600} \text{ test } (15 \mu\text{g/ml } (0.37 \mu\text{M}) \text{ Acd24020 added}) - \Delta OD_{600} \text{ control (buffer only)}) / \text{initial } OD_{600}$. The relative activity of the bacteria is shown with the lytic activity of Acd24020 as 100%. Means and standard deviations were calculated by three independent experiments, each with triplicate samples.

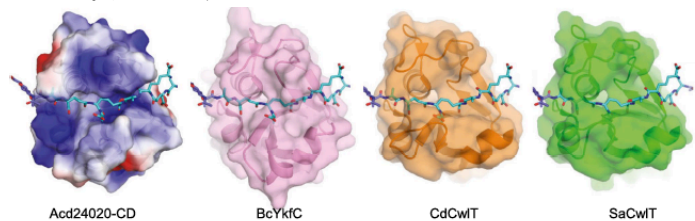


Fig. 11 Structural comparison between the catalytic domains of the NlpC/P60 enzymes. The substrate-binding grooves of Acd24020-CD with the distribution charge, BcYkfC (pink), CdCwlT (orange), and SaCwlT (green) are illustrated by surface representation with the modeled peptidoglycan.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sekiya Hiroshi, Tamai Eiji, Kawasaki Jurina, Murakami Kaho, Kamitori Shigehiro	4. 巻 115
2. 論文標題 Structural and biochemical characterizations of the novel autolysin Acd24020 from <i>Clostridioides difficile</i> and its full function catalytic domain as a lytic enzyme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 684 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tamai Eiji, Sekiya Hiroshi, Nariya Hirofumi, Katayama Seiichi, Kamitori Shigehiro	4. 巻 554
2. 論文標題 X-ray structures of <i>Clostridium perfringens</i> sortase C with C-terminal cell wall sorting motif of LPST demonstrate role of subsite for substrate-binding and structural variations of catalytic site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sekiya Hiroshi, Okada Maho, Tamai Eiji, Shimamoto Toshi, Shimamoto Tadashi, Nariya Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 A Putative Amidase Endolysin Encoded by <i>Clostridium perfringens</i> St13 Exhibits Specific Lytic Activity and Synergizes with the Muramidase Endolysin Psm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 245 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10030245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kincses Annamaria, Szabo Stefania, Racz Balint, Szemeredi Nikoletta, Watanabe Genki, Saijo Ryosuke, Sekiya Hiroshi, Tamai Eiji, Molnar Joseph, Kawase Masami, Spengler Gabriella	4. 巻 9
2. 論文標題 Benzoxazole-Based Metal Complexes to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 649 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics9100649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamai Eiji, Katayama Seiichi, Sekiya Hiroshi, Nariya Hirofumi, Kamitori Shigehiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Structures of major pilins in Clostridium perfringens demonstrate dynamic conformational change	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 718 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798319009689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SPENGLER GABRIELLA, KINCSES ANNAMARIA, RACZ BALINT, VARGA BORISZ, WATANABE GENKI, SAIJO RYOSUKE, SEKIYA HIROSHI, TAMAI EIJI, MAKI JUN, MOLNAR JOSEPH, KAWASE MASAMI	4. 巻 38
2. 論文標題 Benzoxazole-based Zn(II) and Cu(II) Complexes Overcome Multidrug-resistance in Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6181 ~ 6187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.12971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Genki, Sekiya Hiroshi, Tamai Eiji, Saijo Ryosuke, Uno Hidemitsu, Mori Shigeki, Tanaka Toru, Maki Jun, Kawase Masami	4. 巻 66
2. 論文標題 Synthesis and Antimicrobial Activity of 2-Trifluoroacetylbenzoxazole Ligands and Their Metal Complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 732 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga Nozomu, Shimizu Haruka, Fujimoto Kanako, Watanabe Kanako, Yamasaki Tsutomu, Hatano Naoya, Tamai Eiji, Katayama Seiichi, Hitsumoto Yasuo	4. 巻 51
2. 論文標題 Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of Clostridium perfringens cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 124 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉井栄治
2. 発表標題 はじめてみようX線結晶構造解析共同研究2 -線毛と溶菌酵素の構造 と機能-
3. 学会等名 第94回細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青野りよ, 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 櫃本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来オートリシンの分子量変化と溶菌活性
3. 学会等名 第94回細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江見尚悟, 青野りよ, 松永望, 成谷宏文, 玉井栄治, 櫃本泰雄, 片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌の溶菌酵素オートリシンの機能解析
3. 学会等名 第94回細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神鳥成弘, 関谷洋志, 玉井栄治
2. 発表標題 ディフィシル菌オートライシンCD24020触媒ドメインのX線結晶解析に基づく基質認識機構の検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関谷洋志, 玉井栄治
2. 発表標題 デオフィシル菌のエンドペプチダーゼAcd24020の機能解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江見尚悟, 青野りよ, 松永望, 成谷宏文, 玉井栄治, 檀本泰 雄, 片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌の自己溶解酵素オートリシンの機能解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青野りよ, 江草星良, 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 檀本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶菌酵素オートリシンの性状解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉井栄治, 神鳥成弘, 関谷洋志, 片山誠一, 成谷宏文
2. 発表標題 ウェルシュ菌線毛の構造解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野りよ, 藤本佳那子, 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 櫃本泰雄
2. 発表標題 Autolysin and GAPDH as the functioning fibronectin-receptors on the Clostridium perfringens cell surface
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷洋志, 西原剣風, 牧純, 玉井栄治
2. 発表標題 ディフィシル菌由来グルコサミニダーゼの解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉井栄治, 片山誠一, 関谷洋志, 成谷宏文
2. 発表標題 ウエルシュ菌の線毛の構造と機能解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷洋志, 玉井栄治
2. 発表標題 C. difficile のエンドペプチダーゼCD630_11350 の生化学的解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 檀本泰雄
2. 発表標題 Clostridium perfringens が産生するmembrane vesicle 中のフィブロネクチン結合タンパク質の解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野りよ, 松永 望, 玉井栄治, 片山誠一, 檀本泰雄
2. 発表標題 Clostridium perfringens 菌体表層のglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)とオートリシンの結合解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江見尚悟, 青野りよ, 河相朋美, 松永 望, 玉井栄治, 成谷宏文, 島本 整, 檀本泰雄, 片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌の菌体表層に存在するフィブロネクチン (Fn) 結合タンパク質 (FbpC, FbpD) と溶菌酵素オートリシンの機能解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉井栄治, 神鳥成弘, 関谷洋志, 河崎樹里奈, 村上佳穂
2. 発表標題 ディフィシル菌のオートリシンCD24020 触媒ドメインの構造と機能解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山誠一, 江見尚悟, 青野りよ, 河相朋美, 松永望, 玉井栄治, 成谷宏文, 島本 整, 檀本 泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌のフィブロネクチン結合タンパク質FbpC, FbpD と溶菌酵素オートリシンの機能解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 檀本泰雄
2. 発表標題 Detection of fibronectin-binding proteins in membrane vesicle produced by Clostridium perfringens
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青野りよ, 松永望, 玉井栄治, 片山誠一, 檀本泰雄
2. 発表標題 ペプチドグリカン上でのウェルシュ菌由来GAPDH とオートリシンの結合
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成谷宏文, 岡田真歩, 玉井栄治, 関谷洋志, 島本敏, 島本整
2. 発表標題 Biocontrol of Clostridium perfringens by using Two Types of Specific Endolysins
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神鳥成弘, 玉井栄治, 関谷洋志, 成谷宏文, 片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌線毛タンパク質CpaAとSortase CのX線結晶構造解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神鳥成弘, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧純, 成谷宏文
2. 発表標題 X-ray structure of Clostridium perfringens CPE1138 catalytic domain hydrolyzing bacterial cell
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉井栄治, 神鳥成弘, 成谷宏文, 関谷洋志, 渡部あずさ, 牧純
2. 発表標題 ウェルシュ菌細胞壁分解酵素CPE1138の生化学的解析とX線構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	神鳥 成弘 (Kamitori Shigehiro) (00262246)	香川大学・医学部・教授 (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	成谷 宏文 (Nariya Hirofumi) (30452668)	十文字学園女子大学・人間生活学部・教授 (32415)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関