

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007 ~ 2008
課題番号：	19570141
研究課題名(和文)	ストレプトコッカスのバイオフィーム感染関連蛋白質 ComA の基質認識機構の解明
研究課題名(英文)	Substrate Recognition Mechanism of the Peptidase Domain of ComA from <i>Streptococcus</i> Associated with Biofilm Infection
研究代表者	
	石井 誠志 (Ishii Seiji)
	大阪医科大学・医学部・講師
	研究者番号： 10247851

研究成果の概要： バイオフィームがひきおこす様々な感染症に関与しているにもかかわらず、これまで生化学研究が進んでいなかったグラム陽性菌の Quorum-Sensing のシグナル産生ペプチダーゼの基質認識機構を *Streptococcus* 属細菌の ComA ではじめて明らかにした。(ComA は N 末側にペプチダーゼドメイン (PEP) をもつ ABC トランスポーター) PEP は、基質 ComC の切断部位近傍の Gly-Gly 配列だけでなく N 末領域の広い領域 (-4 から-15) にある保存性の高い 4 つの疎水性残基を特異的に認識することが判明した。このような基質認識機構はきわめてめずらしい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,900,000	570,000	2,470,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：感染症、酵素、細菌、シグナル伝達、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus 属細菌は、口腔内でう蝕の原因となるばかりでなく、血管内へ侵入すると心内膜炎や人工弁感染症などの難治感染症をひきおこす。これらの感染症は菌体がバイオフィームを形成するため抗生物質の浸潤・拡散に耐性を示すようになり難治化する。

Streptococcus 属細菌では Quorum-sensing-system (QSS) という細胞間情報伝達系がバイオフィームの形成開始に重要であることがわかっている。我々は QSS の初発段階で機能する ABC トランスポーター、特にそのペプチダーゼドメイン (以下 PEP) が阻害剤開発のターゲットに最適であると

考えた。すなわち研究代表者は上記の *Streptococcus* 感染症に対する有効な予防・治療法の開発の一環として複数の *Streptococcus* 属細菌に由来する PEP に共通する基質認識メカニズムを解明し、阻害剤の開発を目指したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 複数の *Streptococcus* 属細菌から PEP および基質分子 ComC をクローニング、大量発現・精製したものをを用いて、それぞれの基質特異性を比較検討する。

(2) *Streptococcus* 属細菌・ComC のアミノ酸一次構造を比較すると、PEP の切断部位より N 末側で保存性の高い残基が多く存在することがわかる。そこで *S. pneumoniae* ComC を用いて、これらの保存性残基をアラニンに改変した種々の変異型ペプチド基質を作製し、活性ならびに諸性質を比較検討することで ComC のどの部分が PEP による基質認識に重要であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PEP および ComC の発現と精製

発現は pET システムを用いた。PEP は BL21 (DE3) pLysS、ComC は JM109 (DE3) pLysS 内で行った。PEP は His・Bind Resin で精製を行った。また、ComC は His・Bind Resin、続けて HiTrapQHP を用いて精製した。

(2) 変異型 ComC 遺伝子の作製

QuikChange Site-Directed Mutagenesis キットを用いた。

(3) 活性測定

PEP の酵素反応は 50 mM Tris-HCl, 150 mM 硫酸, pH 7.0, 25°C 下で行った。また、分解産物を逆相高速クロマトグラフィーにて分離し、同定、定量を行った。

(4) 円二色性 (CD) スペクトルの測定

円二色計を用いて CD スペクトルを測定した。光路長 1 mm のセルを用いた。

(5) PEP の立体構造解析

得られた PEP の中で最も熱安定性の高かった *S. mutans* の PEP を sitting-drop 蒸気拡散法で結晶化し、MAD 法を用いて構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 複数の PEP-ComC の組み合わせを使った活性測定

発現した、すべての PEP と ComC の組み合わせで活性測定を行った。すべての組み合わせで ComC は PEP により特異的に切断され、*Streptococcus* 属の PEP に共通する基質認識機構が存在することがうかがえた。そこで各 ComC に対する活性のパターンが異なる *S. pneumoniae* と *S. mutans* の PEP を用いて各 ComC に対する速度論的パラメーターを求めたところ、いずれに対しても高い親和性がみとめられた。

(2) *Streptococcus* の PEP に共通する基質認識機構

(1) で明らかとなった PEP の基質認識機構について、ComC の N 末側に保存性残基が多いことに注目し、

① *Streptococcus* 属細菌の ComC 間で完全に保存されており PEP による基質認識に最も重要であることが予想される残基 (F-15 と L-7)

② 保存性が高くある程度重要であると予想される残基 (L-12、E-10、I-4、E+1、R+3)

③ 保存性がなく基質認識にあまり関与していないと予想される残基 (V-14、Q-6、K-3) に分類し、それぞれの残基をアラニンに改変した変異型 ComC を作製し、PEP に対する

速度論的パラメーターを求めたところ、保存性残基のうち F-15, L-12, L-7, および L-4 といった疎水性残基に変異を導入したときのみ k_{cat}/K_m の著しい低下がみとめられた。すなわち、PEP がこれら 4 つのアミノ酸残基を認識することが示された。また、ComC のファミリー分子であるバクテリオシンとの構造比較により、これらの疎水性残基が両親媒性ヘリックスの疎水面を形成していることが示唆された。

(3) ComC の CD スペクトル

S. pneumoniae を含む 3 種類の ComC の CD スペクトルを TFE 存在下で測定したところ、いずれもヘリックス構造を形成した。また、ComC は PEP 共存下で CD を測定してもヘリックス構造を形成することが判明した。これらの結果から PEP は、ComC の N 末領域が形成するヘリックス構造を認識することが明らかとなった。(2) の結果と考えると、PEP は ComC の N 末領域が形成する両親媒性ヘリックスの疎水面を結合するだけでなく、F-15, L-12, L-7, および L-4 を特異的に認識することがわかった。

(4) 変異型 ComC の CD スペクトル

(2) で活性の著しい低下がみられた変異型 ComC について各濃度の TFE 中で CD スペクトルの測定を行ったところ、WT ComC のスペクトルと顕著な違いがみられなかった。この結果から F-15, L-12, L-7, および L-4 は「 α ヘリックス構造のとりやすさ」には寄与しないことが判明した。

(5) ComC の切断部位より C 末側の役割

(1) より k_{cat}/K_m が低い PEP-ComC の組み合わせでは低活性は k_{cat} が小さいことに起因しており、PEP の ComC に対する親和性はむしろ高い傾向にあった。さらに(2)より PEP

との親和性は各 ComC に共通の N 末領域の結合の寄与が大きいことから ComC の C 末端領域が k_{cat} に影響すると考えられた。この仮定を証明するために *S. pneumoniae* の PEP および *S. mutans* の PEP いずれに対しても k_{cat} の低かった *S. gordonii* の ComC の C 末側に k_{cat} の高かった *S. pneumoniae* の配列をつなぎ換えたキメラ基質を作製し活性測定を行った。その結果 *S. pneumoniae* の ComC と同様の k_{cat} が得られ、確かに ComC の C 末端領域が k_{cat} を決めていることが明らかとなった。

(6) PEP の立体構造解析

得られた PEP の中で最も熱安定性の高かった *S. mutans* の PEP を結晶化し、MAD 法を用いて構造決定を行った。*S. mutans* の PEP は、他のパパイン様のシステインプロテアーゼ (Papain と StaphopainA) と同様のフォールド構造をもち、活性中心では Cys17、His96、Asp112 が catalytic triad を形成していた (図 1)。これらの結果から PEP は、他のパパイン様システインプロテアーゼと同様のメカニズムで ComC を切断すると考えられた。

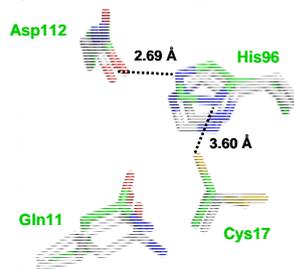


図 1: PEP と他のパパイン様システインプロテアーゼの活性中心残基の比較

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 Kotake Y., Ishii S., Yano T., Katsuoka Y., and Hayashi H. Substrate Recognition Mechanism of the Peptidase Domain of the

Quorum-Sensing-Signal-Producing ABC
Transporter ComA from *Streptococcus* (2008)
Biochemistry, 47, 2531-2538、査読あり

- ② 石井誠志 *Streptococcus* 難治感染症に関
わるフェロモン産生ペプチダーゼの解析
(2008) *The Journal of Osaka Medical College*,
67, 27-28、査読なし

[学会発表] (計 4 件)

- ① 石井誠志 ストレプトコッカスの細胞外シグ
ナル産生トランスポーターのペプチダーゼド
メインの立体構造解析、第 82 回日本細菌
学会総会、2009 年 3 月 12 日、名古屋
- ② 石井誠志 ストレプトコッカスの細胞外シグ
ナル産生トランスポーターのペプチダーゼド
メインの基質認識機構、第 81 回日本細菌
学会総会、2008 年 3 月 24、25、26 日、京都
- ③ 古武彌嗣 肺炎球菌の Quorum sensing
system (QSS)におけるシグナル分子合成に
ついての酵素学的解析、第 17 回泌尿器科
分子・細胞研究会、2008 年 2 月 16 日、東京
- ④ 石井誠志 *Streptococcus* 難治感染症に関
わるフェロモン産生プロテアーゼの解析、第
80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 13
日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 誠志 (Ishii Seiji)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10247851