

平成21年 5月23日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19791345  
 研究課題名（和文） 口腔レンサ球菌の産生する自己溶解酵素に関する研究

研究課題名（英文） Research on autolytic enzyme produced by oral streptococci

研究代表者

藤原 環 (FUJIWARA TAMAKI)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：90274092

研究成果の概要：臨床から分離した *S. mutans*, *S. sobrinus* を用いて Aml の溶菌活性を評価し、一株を除いてこれらの菌が planktonic, biofilm の両状態で感受性を示すことを明らかにした。Aml の基質特異性は菌のペプチドグリカンに対する Aml の結合の有無に関する結果が得られた。しかし、その違いの生化学的根拠（ペプチドグリカンの構造の違い）は今もって不明である。*S. gordonii*281 由来の溶菌酵素の単離、同定はできなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔レンサ球菌、溶菌酵素、う蝕、

#### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内には、レンサ球菌属に属するさまざまな菌種が生息している。なかでも口腔レンサ球菌は口腔細菌叢の主要な構成細菌である。口腔レンサ球菌も多様性に富み、salivarius 菌群、mutans菌群、mitis菌群、anginosus菌群に分類され、これらの菌が口腔環境で棲み分けをしながら共存している。

細菌が産生する細胞壁ペプチドグリカン加水分解酵素 (PGH、溶菌酵素) は細胞分裂の際の細胞の分離や、細胞壁の代謝、伸長等に重要な働きを担っている (Microbiol

Immunol. 2002;46(9):601-12.)。

(1) *S. mutans* が産生する Aml は mutans レンサ球菌の細胞壁のみを選択的に消化する

私は *S. mutans* が産生する PGH に着目し、菌体抽出物を *S. mutans* 菌体を含む含有するアクリルアミドゲルを用いたザイモグラムによって分子量約 100kDa の PGH を見いだした。遺伝子をクローニングし、組換えタンパクを作製、精製し、様々な菌体を含む含有したアクリルアミドゲルを用いたザイモグラムによって溶菌活性を検討したところ、この PGH は *S. mutans*, *S. sobrinus* 以外のレンサ

球菌菌体 (*S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis*)、*S. aureus*、*M. luteus*菌体を用いた場合には溶菌バンドは認められなかった。このことからこの溶菌酵素は*S. mutans*、*S. sobrinus*に特異的に作用する自己溶解酵素と考えられ、automutanolysin (Aml) と命名した (Microbiol Immunol. 2006;50(9):729-42.)。Amlによる*S. mutans*ペプチドグリカンの消化産物を逆相カラムクロマトグラフィーおよび質量分析を用いて解析したところ、この酵素は*N*-acetylmuramic acidと*N*-acetylglucosamineの結合を切断する*N*-acetylmuraminidaseであることが明らかとなった。*N*-acetylmuramic acidと*N*-acetylglucosamineからなるグリカン構造は全ての細菌が共通して保有するペプチドグリカンの構造である。Amlは何故、Mutanレンサ球菌にのみ作用するのか? mutanolysin (muramidase)やlysozyme等の既存の溶菌酵素はこのような基質特異性を持たない。タンパク質の推定一次構造より、AmlはC末端側にmuramidaseやlysozyme等の既存の溶菌酵素と相同性を示す酵素活性領域を持ち、N末端側には13アミノ酸残基からなる5回の繰り返し構造の基質結合部位と推測される領域を持つことが明らかにされていた。

(2) *S. gordonii*が産生する新規溶菌酵素は*S. gordonii*とmutansレンサ球菌の細胞壁を選択的に消化する

私はザイモグラムを用いたスクリーニングによって、新規に*S. gordonii*株よりAml様の活性を示す分子量約45kDaの溶菌酵素を見いだした。このPGHは培養上清中に分泌され、粗精製したタンパク質の様々な菌体に対する溶菌活性について検討したところ、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. gordonii*に特異的に作用する事を明らかにした。

基質特異性を持ったPGHとしてはブドウ球菌属が産生し黄色ブドウ球菌を特異的に溶菌するLysostaphine, ALEのグループが唯一知られている。私はこれらの酵素は酵素として細胞壁結合ドメインと酵素活性ドメインの2つを持ち、両ドメインが黄色ブドウ球菌ペプチドグリカンに対する特異性を発揮することが明らかにした。両者は黄色ブドウ球菌ペプチドグリカンに特異的なグリシン5量体を認識することで特異性を発揮し、細胞壁結合ドメインについては結晶構造から、そのドメインがSH3ドメインであることを発見した (JBC 281. 549-558, 2006)。

一方、Amlは*N*-acetylmuraminidaseであり

ながら極めて特異的にmutans菌群の細胞壁を消化する。また*S. gordonii*の新規PGHは架橋構造の異なるmutans菌群と*S. gordonii*を消化することから、やはり*N*-acetylmuraminidaseとして作用している可能性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究ではペプチドグリカンのグリカン鎖に作用するPGHがmutans菌群に特異的に作用する分子メカニズムを明らかにすることにより、PGHの新しい基質選択性を分子レベルで解明することを目的とした。

(1) *S. mutans*が産生する特異的溶菌酵素Amlの組換えタンパクを作製し、その機能、3次元構造および基質特異性の解明を目的として、以下の実験を行う。

①Amlの基質結合部位の組換えタンパクを作製、様々な菌体への結合実験およびピアコアシステムを用いた結合速度解析を行い、基質特異性を解明し、また、基質結合部位の結晶構造解析を行う。

②Amlの酵素活性領域の組換えタンパクを作製、大量に精製し、結晶構造解析を行う。

(2) *S. gordonii* 281株が産生する新規の特異的溶菌酵素を精製し、その遺伝子クローニングならびに酵素活性作用機序の解明を目的として、以下の実験を行う。

①*S. gordonii* 281株の培養上清から*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. gordonii*特異的溶菌酵素の精製を行う。

②精製した特異的溶菌酵素のプロテアーゼ消化産物のアミノ酸配列情報をもとにして、酵素遺伝子のクローニングを行う。

③精製した特異的溶菌酵素を用いて、酵素活性作用機序について検討する。

④クローン化した遺伝子をもとに、組換えタンパクを作製し、酵素の生化学的特徴および基質特異性の分子メカニズムについて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Amlの基質結合特異性の解析

Amlの基質結合部位の組換えタンパクを作製し、大量に精製し、結晶化に用いる。得られた結晶についてのX線構造解析を行う。また、得られたタンパクを用い、様々な菌体への結合能を測定する。さらに、ピアコアシステム (Anal Biochem. 2006 Sep 22; [Epub ahead of print])を用いて*S. mutans*のペプチドグリカンのリガンドとした時のAmlの基質結合部位の結合速度および親和性の解析を行う。

(2) *S. gordonii* 281株の培養上清から*S.*

*mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*, *S. sanguis* 特異的溶菌酵素の精製

*S. gordonii* 281株の培養上清から、*S. mutans*に対する溶菌活性を指標として、種々のカラムクロマトグラフィーならびに免疫アフィニティー精製法を用いて、*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*, *S. sanguis* 特異的溶菌酵素の精製法を確立する (J Bacteriol. 1997 Feb;179(4):1193-202.)。

(3) *S. gordonii* 281株が産生する特異的溶菌酵素遺伝子のクローニング

精製した *S. gordonii* 281株が産生する特異的溶菌酵素をV8プロテアーゼで消化し、得られたペプチド断片を逆相高速液体クロマトグラフィーにかけ、複数のペプチド断片をTOF-MASS分析によりMAS/MAS解析を行う。その結果得られたアミノ酸配列を基に degenerated primers を設計し、PCR法により増幅される断片を特定する。特定された DNA断片をプローブとして用いる。*S. gordonii* 281株より染色体DNAを調整し、適当な制限酵素で切断した後、ジェノミクライブラリーを作製する。このライブラリーとDNAプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、目的とするクローンを得る。得られたクローンについては定法に従ってDNA配列を決定する (J Bacteriol. 1997 Jun;179(11):3625-31)。

(4) Amlの酵素活性領域の結晶構造解析

Amlの酵素活性領域の組換えタンパクを作製し、大量に精製し、結晶化に用いる。得られた結晶についてのX線構造解析を行う (J Mol Biol. 2005 Dec 2;354(3):578-90)。

(5) *S. gordonii* 281株が産生する新規の特異的溶菌酵素の酵素活性作用機序についての検討

精製酵素を用いて、*S. gordonii* 精製ペプチドグリカン消化物を消化し、消化産物についてアミノ末端の増加、還元糖の増加を検討する。アミノ末端が増加している場合は末端アミノ酸をDNFBラベルによって同定する。還元糖が増加している場合は *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmuramic acid のいずれの還元糖が増加しているかを定量する。さらに得られたペプチドグリカン消化物をTOF-MASSにかけ、最終的に精製溶菌酵素の酵素活性を同定する (Microbiol Immunol. 2006;50(9):729-42.)。

(6) *S. gordonii* 281株が産生する新規の特異的溶菌酵素の酵素活性と基質特異性の解析

クローン化した遺伝子をもとに組換えタ

ンパクを作製、精製し、様々な阻害剤等を使用し、酵素活性について *S. gordonii* 菌体を基質とした時の濁度の減少を測定することで検討する。また、様々な菌体を基質に用いて結合実験等を行い、その基質特異性について検討を行う。

*S. gordonii* 281株が産生する新規の特異的溶菌酵素のクローニングが計画どおりに進まない場合、不完全ではあるがゲノム情報が公開されていることから、Aml と相同性のある遺伝子領域をすべて抽出し、その領域を増幅するためのプライマーを設計し、組換えタンパクを作製して、溶菌活性および、基質特異性があるか否かについて検討を行い、特異的溶菌酵素をコードする遺伝子をつきとめる。また、*S. gordonii* 281株の培養上清からの特異的溶菌酵素の精製が計画どおりに進まない場合、菌体からの精製も試みる。さらに、*S. sobrinus* からも、*S. mutans* 菌体を含むアクリルアミドゲルで Aml 様の溶菌酵素を保持している事を明らかにしているため、*S. sobrinus* の溶菌酵素で以上の検討を行うことも出来る。

#### 4. 研究成果

(1) Aml の酵素活性感受性を他の臨床分離レンサ球菌を基質にして検討したところ、一株だけ Aml の溶菌活性に耐性を示す株を見出した。この耐性株の細胞壁を精製し、逆相クロマトグラフィーによりペプチドグリカンの解析を行ったが、感受性株との間に差異は見られなかった。さらに、ペプチドグリカンのO-アセチル化による Aml 感受性への影響について検討を行ったが、感受性への関与は見られなかった。

(2) Aml の基質結合部位の maltose 融合タンパクの作製を行った。この組換えタンパクを組み込んだ大腸菌を培養し、菌体破碎画分を用いて Amylose レジンにより精製を行った。その結果、単一のタンパクバンドとして精製できた。

Aml の基質結合部位の maltose 融合タンパクおよび、より分子量の小さいタグを用いる目的で質結合部位の His-tag 融合タンパクも作製し精製した。得られたタンパクを用い、様々な菌体への結合能を測定した。maltose 融合タンパクでは *S. mutans* に特異的に弱い結合が見られた。His-tag 融合タンパクでは *S. mutans* に特異的な結合が濃度依存的に強く見られた。

ELISA 法、ビアコアシステムを用いて、Aml 基質結合部位の His-tag 融合タンパクの *S. mutans* の Aml 感受性株と耐性株に対する結合

親和性を検討した。感受性株に比べ、耐性株では Aml His-tag 融合タンパクはほとんど結合しないことが明らかとなった。

Aml 感受性株および耐性株のペプチドグリカンを経験し、Mutanolysin での消化産物について TOF-MS および、エドマン分解後の TOF-MS 解析したが、それらの間に差異は見いだされなかった。

(3) *S. gordonii* 281 株の培養上清から、*S. mutans* に対する溶菌活性を指標として、種々のカラムクロマトグラフィーならびに免疫アフィニティー精製法を用いて、*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*, *S. sanguis* 特異的溶菌酵素の精製を試みたが、活性のあるタンパクを単離することは出来なかった。

そこで、*S. gordonii* 281 株のゲノム情報から、Aml と相同性のある遺伝子領域を抽出し、その領域を増幅するためのプライマーを設計し、組換えタンパクを作製した。しかし、この組換えタンパクには溶菌活性が見られなかった。次に *S. gordonii* 281 株より染色体 DNA を調整し、適当な制限酵素で切断した後、ジェノミクライブラリーを作製し、*S. mutans* 菌体を含有するアクリルアミドゲルで溶菌活性を保持しているクローンのスクリーニングを行ったが、現時点では特異的溶菌酵素のクローニングは成功していない。

## 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 1 件) ① Panida Thanyasrisung, Hitoshi Komatsuzawa, Goh Yoshimura, Tamaki Fujiwara, Sakuo Yamada, Katsuyuki Kosai, Kazuhiro Eto, Yuichi Izumi, Motoyuki Sugai. Automutanolysin disrupts clinical isolates of cariogenic streptococci in biofilms and planktonic cells. Oral Microbiology and Immunology. In press. 2009

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 環 (FUJIWARA TAMAKI)

広島大学・大学院歯学総合研究科・助教  
研究者番号：90274092

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者