

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592702

研究課題名(和文) う蝕原因菌を特異的に溶解する新規溶菌酵素 Aml の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of automutanolysin conferring substrate selectivity on cariogenic streptococci

研究代表者

林 幾江 (Hayashi, Ikue)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：00346503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：S.mutansが産生する自己溶菌酵素(Aml)は、口腔レンサ球菌のなかでS.mutansとS.sobrinusを選択的に溶菌する。この基質特異性発現のメカニズムを明らかにするため、口腔レンサ球菌のペプチドグリカン構造を解析し比較した。また、Amlの遺伝子組換え体を作成し、C末端側にcatalytic domainが、N末端側にbinding domainが存在し、活性発現には両者が必要なことを明らかにした。Binding domain領域の13アミノ残基よりなる5個の繰り返し構造が基質認識に重要であり、ペプチドグリカンのPenta体に対しAmlは低い活性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Automutanolysin (Aml) produced by S.mutans selectively lyses S. mutans and S. sobrinus but not other oral streptococci. To unveil the mechanism how Aml draws this distinction, we analysed the peptidoglycan structures of oral streptococci. We made various recombinant Aml. It consists of two domains: a C-terminal catalytic domain and an N-terminus containing five repeats presumably acting as a cell wall targeting domain. A full length of targeting domain revealed the highest binding ability to the tested strain. Moreover, it clearly distinguished cariogenic bacteria from other oral streptococci. Comparison of the muropeptide profiles of oral streptococci strains with different level of susceptibility to Aml appeared to be correlated with ratio of muropeptides carrying a Penta-peptide chain for Aml resistance. Binding domain of Aml clearly differentiate cariogenic streptococci from others by recognizing peptidoglycan structure.

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：溶菌酵素 ペプチドグリカン 基質特異性

## 1. 研究開始当初の背景

大多数の細菌は、表層をペプチドグリカンと呼ばれる強靱な巨大分子を主要構成成分とする細胞壁で覆われている。細菌が産生する溶菌酵素(細胞壁ペプチドグリカン加水分解酵素)は、基質となる細胞壁ペプチドグリカンの加水分解部位により、glucosaminidase, muramidase, endopeptidase, amidase に分類され、細菌の分離、分裂、細胞壁の代謝等、細菌にとって重要な働きを担っている。

申請者らは、*S. mutans* が産生する自己溶菌酵素・Automutanolysin(Aml)をクローニング、同定し、その性状解析から Aml が muramidase であることを明らかにした (Microbiol. Immunol., 50, 29-742, 2006)。Aml は、う蝕(虫歯)原因細菌の *S. mutans* と *S. sobrinus* を選択的に溶解し殺菌作用を示すが、他の口腔レンサ球菌 (*S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*) は溶解しない性質を有していた。う蝕(虫歯)は多くの国民が原因菌に罹患している国民病の一つであるが、依然として効果的予防法は開発されておらず、個人の歯磨きや洗口剤によるうがい、といった予防に頼っている。う蝕(虫歯)原因菌のみを特異的に溶菌する Aml は、口腔内環境を壊すことなく、う蝕防止が可能となり、う蝕の治療薬としての可能性を秘めている。

Muramidase 作用を有する mutanolysin 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。ペプチドグリカンのグリカン鎖に作用する溶菌酵素に関する研究で、特異性発現の作用メカニズムを分子レベルで解明した知見はこれまでに報告されていない。唯一、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 に関する報告があるのみである (J. Biol. Chem., 281, 549-558, 2006)。溶菌酵素の基質特異性発現のメカニズムを分子レベルで解明することは、基質特異的な薬剤のデリバリーシステムの基盤情報としても重要である。

## 2. 研究の目的

Aml はペプチドグリカンを認識し、その基質特異性を発現すると示唆されたため、Aml が基質としうるペプチドグリカンの構造、Aml が基質とする事が出来ないペプチドグリカンの構造の違いを明らかにするため、“general method”としてのペプチドグリカンの構造解析法を確立し、口腔レンサ球菌のペプチドグリカンの構造解析に応用する。

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ドメインをもち、N 末端側には 13 アミノ酸残基からなる 5 個の繰り返し構造を有する基質結合ドメインと推定される領域を持っている。Aml の基質結合ドメインの組み換えタンパクを作成し、繰り返し構造が基質認識に関与

するか、繰り返し構造の数と酵素活性の関係を明らかにする。

また、*S. mutans* 菌を用いて、基質特異性に関与する遺伝子を欠失あるいは改変し、Aml に対する感受性の変化を検討する。

## 3. 研究の方法

ペプチドグリカンの構造解析法の確立  
4%SDS 沸騰水中より調製したペプチドグリカンを mutanolysin で消化し、可溶化する。ムロペプチドを HPLC にて分離・分画し、各々の画分について質量分析、エドマン分解、アミノ酸分析からペプチドグリカン構造を解析する。

ペプチドグリカンの基本骨格構造をグリカン鎖、軸ペプチドの 3 位アミノ酸の種類、架橋様式(直接結合、オリゴペプチド架橋)、アセチル化または脱アセチル化の修飾とその部位、軸ペプチド 2 位アミノ酸の amidation の有無、軸ペプチドのアミノ酸数の割合 (tri, tetra, penta 体)、グリカン鎖長、架橋度等について解析する。

Aml の基質特異性を規定する候補遺伝子の選択と評価

ペプチドグリカンの構造上の多様性はペプチドグリカンの合成に関わる数種類の酵素、penicillin binding proteins(PBPs)等の働きを反映していると考えられる。Aml 感受性細菌を PBPs 酵素の阻害剤存在下で培養し細胞壁構造を変化させたペプチドグリカンを得、Aml に対する感受性の変化を検討する。具体的には、penta 体のグループと tri 体のグループの量的な比が Aml に対する感受性と相関しているか、PBP3 酵素の阻害剤を作用させた *S. mutans* 菌のペプチドグリカンを調製し Aml の感受性を評価する。

酵素 Aml の一次構造から推定される基質結合ドメイン、および酵素活性ドメインの組換えタンパクの作成と基質認識に関与する役割(結合能及び活性)の評価

繰り返し構造(モチーフ)の役割解明を目的として異なる繰り返し構造数(1個からすべて含む5個まで)の組み換えタンパクを作成し、繰り返し構造が基質認識に関与するか、また、繰り返し構造の数と酵素活性の強度について検討する。組み換えタンパクの結合を蛍光で標識し顕微鏡観察(免疫染色)する方法で結合タンパクを可視化する。また菌体に結合した組み換えタンパクを SDS-PAGE 分離し染色したバンドのデンストグラフを数値化し定量解析する。また、ピアコアシステムを用いてムロペプチドと組換えタンパクの結合速度の解析を試みる。

## 4. 研究成果

ペプチドグリカンの構造解析法の確立  
“General method”となるペプチドグリカンの構造解析法を確立し、口腔レンサ球菌

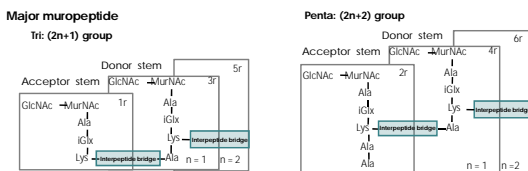
(*S. mutans* C67-1, *S. sobrinus* OMZ176a, *S. salivarius* H665, *S. salivarius* ATCC9222, *S. sanguinis* ATCC10556, *S. sanguinis* H2, *S. mitis* ATCC9811, *S. mitis* H65 など) の構造解析に応用した。

細菌のペプチドグリカンに muramidase 処理し可溶化したペプチドグリカンを NaBH<sub>4</sub> にてグリカン鎖の末端還元糖を還元(アルコール化)した試料を RP HPLC で分離・分画し、ムロペプチドを得た。各 Fraction を濃縮後、ZipChip C18 で脱塩し MALDI-TOF/MS にて質量を測定した。必要に応じて、アミノ酸分析、エドマン反応を行い、構造解析の情報とした。アセチル修飾及び脱アセチル修飾部位は PSD-MALDI MS にて解析した。また、O-アセチル修飾体は、アルカリ性下(pH10, 3h, 37 )で加水分解されることで、N-アセチル修飾体と区別した。

口腔レンサ球菌は細菌の種類に関わらず軸ペプチド3位アミノ酸を Lys 型とするが、架橋ペプチド鎖のアミノ酸組成は、菌種によりアミノ酸の組成が異なっていた。(下図 table 参照)

ペプチドグリカンの主要な構造と Aml に対する感受性に明らかな相関はなかったことから、Aml が有する基質特異性はペプチドグリカンに存在している多様かつ微細な構造の違いを識別するためと考えられた。

	<i>S. sobrinus</i> OMZ176a	<i>S. mutans</i> C67-1	<i>S. salivarius</i> ATCC9222	<i>S. salivarius</i> H665	<i>S. sanguinis</i> H2	<i>S. sanguinis</i> ATCC10556	<i>S. mitis</i> ATCC9811	<i>S. mitis</i> H65
Interpeptide bridge	Thr-Ala	Ala-Ala	Ala-Ala	Thr-Gly	Ala-Ala	Ala-Ala	-	-
% Tri : (2n+1)	42.5%	35.0%	21.0%	39.4%	29.7%	21.5%	63.6%	64.1%
% Tetra	1.4%	2.2%	1.4%	1.7%	4.2%	-	1.8%	7.9%
% Penta : (2n+2)	6.8%	5.4%	10.8%	8.4%	27.9%	28.7%	-	1.8%
% cross linkage	50.1%	57.4%	59.5%	50.3%	38.0%	49.8%	34.7%	27.2%

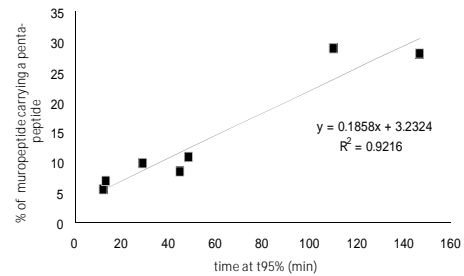


	<i>S. sobrinus</i> OMZ176a	<i>S. salivarius</i> H665	<i>S. salivarius</i> ATCC9222	<i>S. sanguinis</i> ATCC10556	<i>S. sanguinis</i> H2	<i>S. mutans</i> C67-1	<i>S. mitis</i> ATCC9811	<i>S. mitis</i> H65
% deacetylation								
total	3.4%	18.3%	-	14.7%	5.7%	6.6%	-	37.9%
per disaccharide	2.3%	9.8%	-	9.1%	5.7%	4.1%	-	29.2%
% acetylation								
total	39.6%	10.2%	6.5%	19.8%	19.1%	27.4%	15.3%	14.4%
per disaccharide	21.2%	4.2%	3.5%	8.1%	11.1%	9.5%	10.1%	11.5%
% deamidation								
total	2.9%	11.4%	-	8.7%	38.3%	5.4%	51.5%	20.2%
per disaccharide	2.1%	8.3%	-	8.7%	33.1%	4.5%	41.9%	16.5%

その中で、Aml に対する口腔レンサ球菌の感受性(経時的な濁度の減少から外挿して求めた値)が penta 体(2n+2) ムロペプチドの割合と相関した。言い換えると、軸ペプチドのアミノ酸が3個の Tri 体に比し、5個の Penta

体の割合が高い PG を有する口腔レンサ球菌に対し、Aml は低い感受性を示す傾向があった(Fig.1)。

Fig 1



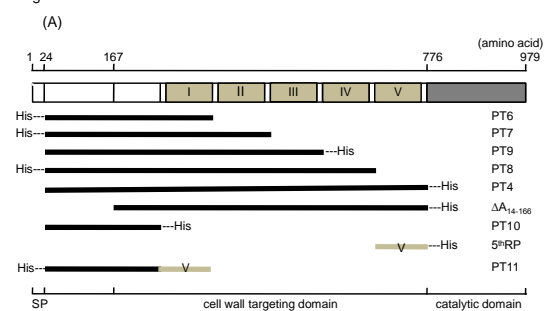
Aml の基質特異性を規定する候補遺伝子の選択と評価

*S. pneumoniae* の細胞壁構造を変化させる手法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 504, 1997) を *S. mutans* に応用し、clavulanic acid 存在下で細胞壁構造を変化させる実験を行ったが、*S. mutans* ではペプチドグリカン構造に変化はなく、細胞壁構造が変化した菌体の作成は困難であった。また、ペプチドグリカンのアセチル修飾が Aml の溶菌活性に及ぼす影響を調べた結果、Lysozyme 活性はアセチル修飾により活性が低下するのに対し、Aml の活性はアセチル修飾で活性が低下せず、アセチル修飾の影響は観察されなかった。

Aml の組換えタンパクの作成と基質認識における役割(結合能及び活性)

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ドメインをもち、N 末端側にアミノ酸の繰り返し構造を有する基質結合ドメインと推定される領域を持っている。(Fig.2 参照)

Fig. 2

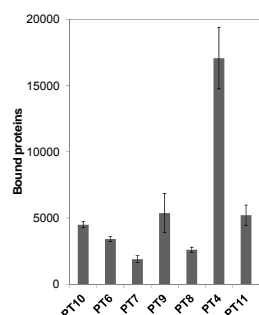


さまざまな組み換えタンパク (full Aml, N-term Aml, N,C-term Aml, 213 AAs, full Aml D869A 等) を作成し、各領域の役割について検討した結果、C 末端側にアスパラギン酸 (D) を活性中心とする catalytic domain が存在する事が明らかとなった。N 末端側は

菌体との結合に關与していると推測される繰り返し配列を有し、Aml が十分な活性を示すには、catalytic domain と binding domain 両方の構造が必要であった。

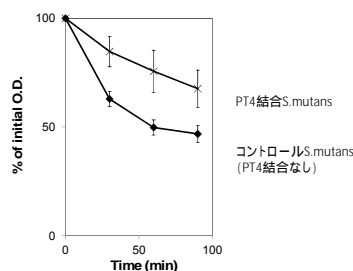
13 アミノ酸からなる5個の繰り返しモチーフが binding domain として働くことにより Aml の基質選択性の発現に關与している事が示唆されたため、繰り返し構造の数異なる組み換えタンパク (繰り返し構造数 1 ~ 5 個) を作成し (PT6, PT7, PT4 等) その結合能を *S. mutans* 菌の加熱死菌体や *S. mutans* ペプチドグリカンについて検討した。繰り返しモチーフ数をすべて有する繰り返し数 : 5 個の組み換えタンパク (PT4) が、*S. mutans* 菌に最も多く結合した (Fig.3 参照)。

Fig. 3 Binding モチーフを含む組み換えタンパクの *S. mutans* における結合量



また、PT4 をあらかじめ *S. mutans* に吸着させた *S. mutans* は Aml の溶菌活性がコントロール (PT4 吸着なしの *S. mutans*) に比べ低下したことから、PT4 は Binding モチーフとして作用していることが明らかとなった (Fig.4)。

Fig. 4 PT4結合 *S. mutans* の Aml に対する感受性



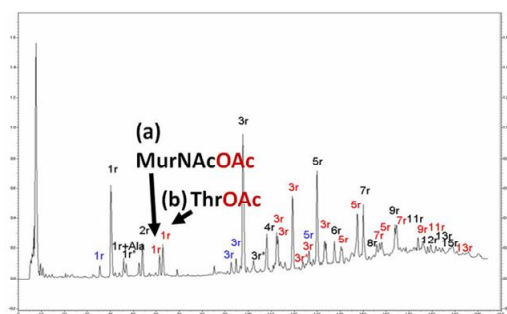
繰り返しモチーフ数をすべて有する PT4 は、口腔レンサ球菌の中で、う蝕原因菌となる *S. mutans* 及び *S. sobrinus* (加熱死菌体) に特異的に結合する事が免疫染色より明らかとなった。

Aml の N 末端側に存在するアミノ酸 13 個よりなる繰り返し構造は既存のモチーフと相同性は有していないが、結合ドメインとして働き、酵素の基質特異性に重要な役割を担う事が示唆された。繰り返し構造の基質認識における分子機構の解明は、酵素の基質特異性を

規定する新たな因子となる可能性があった。

本実験における口腔レンサ球菌のペプチドグリカンの構造解析において、*S. sobrinus* には、従来報告されていない新しいペプチドグリカンのアセチル修飾体 (b)ThrOAc が (a)MurNAcOAc に加えて存在する事を見出した (Fig.5)。

Fig.5 *S. sobrinus* の mutanolysin 消化ムロペプチドの RP-HPLC クロマトグラム



*S. sobrinus* の架橋アミノ酸、スレオニン (Thr) がアセチル化の修飾を受けている事を、エドマン分解や MALDI-PSD 解析等から明らかにした。

この TypeII アセチル修飾体は架橋アミノ酸に Thr を含む *S. downei* 及び *S. cricetus* (いずれも mutans group) に認められたが、*S. salivarius* (salivarius group) は、架橋アミノ酸に同じ Thr を含んでいるが ThrOAc の存在は認められなかった。

ゲノム解析から、この TypeII アセチル修飾体を有する菌種 (現在のところ、*S. sobrinus*, *S. downei*, *S. cricetus* の 3 菌種) は、従来報告されているアセチル修飾遺伝子 (Type I) とは別種の新しい TypeII アセチル化遺伝子も保有し、種類の異なるアセチル遺伝子を 2 個有していた。この acetyltransferase 遺伝子の役割を解明する新たな展開が期待される。

## 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 1 件)

The *Listeria monocytogenes* serotype 4b autolysin IspC has *N*-acetylglucosaminidase activity: Ronholm J., Wang L., Hayashi I., Sugai M., Zhang Z., Cao X., Lin M. : *Glycobiology*, 22(10), 1311-1320, 2012

〔学会発表〕(計 1 件)

The N-terminal cell wall targeting domain of automutanolysin confers substrate selectivity on cariogenic streptococci : P. Thanyasrisung, I. Hayashi, T. Fujiwara, K. Tsuruda, M. Sugai : 2<sup>nd</sup>

Meeting of the International Association for  
Dental Research –Asia Pacific Region (Bangkok)  
2013年8月21日~23日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

林 幾江 (HAYASHI Ikue)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：00346503

##### (2)研究分担者

小原 勝 (OHARA Masaru)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号：80253095

加藤 文紀 (KATOU Fuminori)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：70452589

##### (3)連携研究者

菅井 基行 (SUGAI Motoyuki)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：10201568

##### (4)研究協力者

タニヤスリスン パニダ (THANYASRISUNG  
Panida)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・留学生