

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06973

研究課題名(和文) X線構造に基づくクロストリジウム属特異的溶菌酵素の細胞壁認識分解機構の解明

研究課題名(英文) Cell wall peptidoglycan recognition/hydrolysis mechanisms of *Clostridium perfringens* lytic enzymes based on X-ray structures

研究代表者

神鳥 成弘 (Kamitori, Shigehiro)

香川大学・総合生命科学研究センター・教授

研究者番号：00262246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陽性菌は強固な細胞壁を持ち、細胞の形態を保持している。細菌細胞壁は、グリカン鎖をペプチド鎖が架橋した網目構造の高分子ペプチドグリカンを主要骨格とする。オートライシンは細胞壁ペプチドグリカンを部分的に加水分解する酵素で、細胞分裂・成長を調整する。ウェルシュ菌オートライシン触媒ドメインの立体構造をX線結晶構造解析により決定し、細胞壁分解機構について新たな知見を得た。グラム陽性菌の宿主細胞への感染は、細胞表面にある多種類の表面タンパク質が関与しており、Sortaseと呼ばれる酵素により細胞壁に固定化される。ウェルシュ菌Sortase Bの立体構造をX線結晶構造解析により決定した。

研究成果の概要(英文)：Gram-positive bacteria possess a thick cell wall that surrounds their cytoplasmic membranes and provides physical protection. The bacterial cell wall is a mesh polymer of peptidoglycans, in which linear glycan backbones are cross-linked by species-specific peptide side chains. Autolysins can partially hydrolyze cell wall peptidoglycan into small sections to regulate cell separation/division and the growth-phase of bacteria. An X-ray structure of *Clostridium perfringens* autolysin catalytic domain was determined, giving new insights into the catalytic reaction mechanism for the hydrolysis of cell wall peptidoglycan. The pathogenesis and infectivity of Gram-positive bacteria are mediated by many surface proteins that are covalently attached to peptidoglycans of the cell wall. The covalent attachment of these proteins is catalyzed by sortases. X-ray structures of *Clostridium perfringens* sortase B and its inactive mutant form were determined.

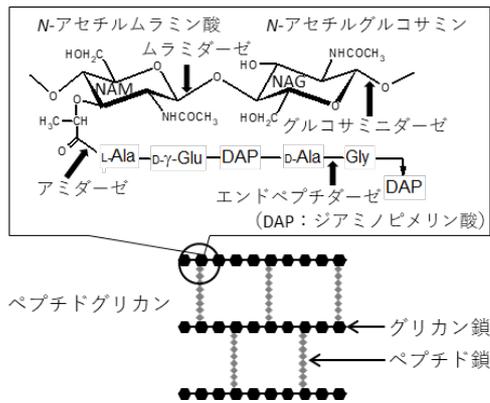
研究分野：タンパク質X線結晶構造解析

キーワード：X線結晶構造解析 溶菌酵素 グリコシドヒドロラーゼ 細菌細胞壁 ペプチドグリカン ウェルシュ菌

1. 研究開始当初の背景

細菌は、グラム染色により、外膜を持たないグラム陽性菌と外膜を持つグラム陰性菌に分けられる。グラム陽性菌は、外膜を持たない代わりに、約 250 Å の厚さの強固な細胞壁を持ち、細胞の形態を保持している。本研究で対象とするクロストリジウム属はグラム陽性菌であり、病原性のウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、ディフィシル菌 (*Clostridium difficile*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 等が含まれる。細菌細胞壁は、*N*-アセチルグルコサミン (NAG) と *N*-アセチルムラミン酸 (NAM) が交互に β(1→4) 結合でつながった糖鎖 (グリカン鎖) を 8~12 アミノ酸のペプチド鎖が架橋した網目構造の高分子ペプチドグリカン を主要骨格とする (図 1)。グリカン鎖の構造は共通であるが、ペプチド鎖の成分・構造は細菌の種類により異なる。溶菌酵素は、ペプチドグリカンを加水分解する酵素で、その作用部位により、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に分かれる (図 1)。溶菌酵素の多くは、ペプチドグリカン分解ドメイン (触媒ドメイン) と細胞壁結合ドメインの 2 つのドメインを持つ。溶菌酵素の溶菌活性は種特異的であることから、ペプチド鎖部分が細胞壁結合ドメインによって厳密に認識されていると考えられる。

図 1. ウェルシュ菌細胞壁の模式図。各種溶菌酵素による加水分解部位を矢印で示す。



2. 研究の目的

本研究の目的は、クロストリジウム属の細胞壁に働く溶菌酵素について X 線結晶構造解析により立体構造を決定し、これら溶菌酵素の細胞壁認識分解機構を分子レベルで解明することである。本研究は、ウェルシュ菌、ディフィシル菌由来の溶菌酵素を対象として行ったが、ここでは、最も研究が進捗したウェルシュ菌由来オートライシンの触媒ドメイン (AcpCD) について報告する。

細菌細胞壁ペプチドグリカンの立体構造については不明な点が多く、多層構造モデル、ケーブルモデル、足場モデルの 3 つのモデルが提唱され、議論が続いている。細胞壁中で働き、細胞壁と相互作用することにより機能する酵素の立体構造は、細菌細胞壁の立体構造情報を部分的に与える可能性がある。本研

究に関連する成果として、細菌表面タンパク質を細菌細胞壁に共有結合により固定化する酵素であるウェルシュ菌由来 Sortase B、(CpSrtB) の X 線結晶構造解析についてもあわせて報告する。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の調製と結晶化

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens* strain 13) ゲノムから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、大腸菌に導入することにより、必要な量の目的タンパク質を得た。カラムクロマトグラフィーにより精製した後、各種結晶化スクリーニングキットを用いて、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。結晶化条件を示す。

AcpCD: タンパク質濃度 87.9 mg/ml, リザーバー溶液 (100 mM CHES, 10 % (w/v) PEG3000, pH9.5)

CpSrtB: タンパク質濃度 18.4 mg/ml, リザーバー溶液 (200 mM sodium nitrate, 20% (w/v) PEG3350, pH6.8)

CpSrtB_C232S (CpSrtB の不活性型変異体): タンパク質濃度 30.2 mg/ml, リザーバー溶液 (200 mM ammonium phosphate monobasic, 20% (w/v) PEG3350, pH4.6)

(2) X 線結晶構造解析

X 線データの収集は、研究室内設置のリガク社製 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。AcpCD については、SeMet 置換体の結晶を作製し、Se 原子による MAD 法で初期位相を得た。CpSrtB については、ディフィシル菌由来 SrtB (PDB: 4UX7) をモデルとした分子置換法により初期位相を得た。データ収集と構造精密化の結晶学的データを表 1 に示す。

表 1. データ収集と構造精密化の結晶学的データ。

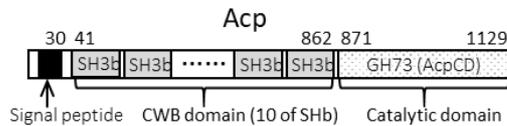
	AcpCD	CpSrtB	CpSrtB_C232S
X線源	MicroMax	PF-BL5A	PF-BL5A
分解能 (Å)	1.76	2.20	1.80
観測反射数	82,680	175,050	72,087
独立反射数	22,481	24,588	19,621
完全性 (%)	96.0	99.8	99.7
R_{merge} (%)	7.0	6.3	3.9
空間群	$P2_1$	$P2_12_12_1$	$C2$
格子定数 $a =$	50.26 Å	58.34 Å	74.67 Å
$b =$	37.10 Å	94.87 Å	59.73 Å
$c =$	63.85 Å	64.81 Å	56.22 Å
$\beta =$	100.2 °	90.0 °	121.39 °
R_{factor} (%)	16.2	22.6	18.4
R_{free} (%)	19.2	27.5	22.8
PDB code	5WQW	5B23	5YFK

4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌由来オートライシン触媒ドメインの X 線結晶構造解析

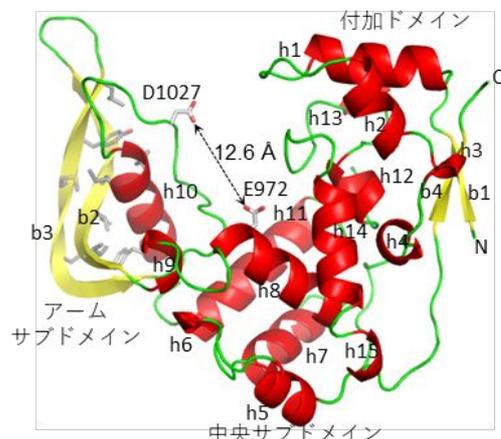
オートライシンは、細菌自身が持つ酵素で、その活性は細胞壁ペプチドグリカンを部分的に加水分解し、細胞分裂・成長を調整している。ウェルシュ菌が持つオートライシン Acp (Autolysin *Clostridium perfringens*) は、アミノ酸配列から、N 末側に bacterial SH3 構造モチーフを持つドメインが 10 個タンDEM につながっている細胞壁結合ドメイン (Cell Wall Binding domain) を、C 末側に GH73 (グリコシドヒドロラーゼ 73) ファミリーに属するグルコサミニダーゼ活性の触媒ドメインを持つことが予想される(図 2)。本研究では、Acp の触媒ドメイン (AcpCD) について X 線結晶構造解析により 1.76 Å 分解能で立体構造を決定することに成功した。

図 2. Acp の 1 次構造模式図。



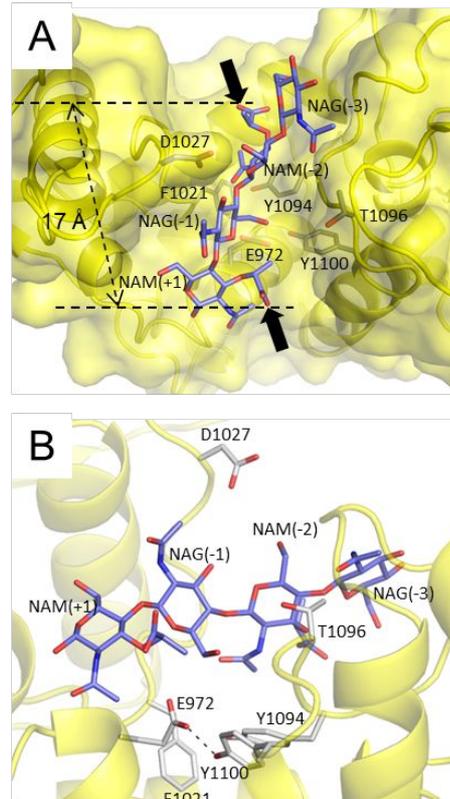
AcpCD の全体構造を図 3 に示す。AcpCD は三日月型の構造で中央に深い溝を形成しており、基質はこの溝に結合する。全体構造は、中央サブドメイン、アームサブドメイン、付加サブドメインに分けられる。中央サブドメインは、6 本の α ヘリックス (h5, h7, h8, h11, h12, h14) が束になった α バンドル構造である。アームサブドメインは、基質結合部位の片方の壁を形成しており、長い 2 本の β ストランド (b2, b3) が α ヘリックス (h10) に巻きついた珍しい構造で疎水性アミノ酸による疎水相互作用により安定化されている。付加サブドメインは、アームサブドメインと反対側に位置しており、基質結合部位のもう一方の壁を形成している。予想される触媒残基の Glu972 と Asp1027 は、それぞれ中央サブドメインとアームサブドメインに位置しており、それらの間の距離は 12.6 Å である。

図 3. AcpCD の全体構造。ヘリックスは h, β ストランドは b で示す。2 つの触媒残基とアームサブドメインの疎水アミノ酸を棒モデルで示す。



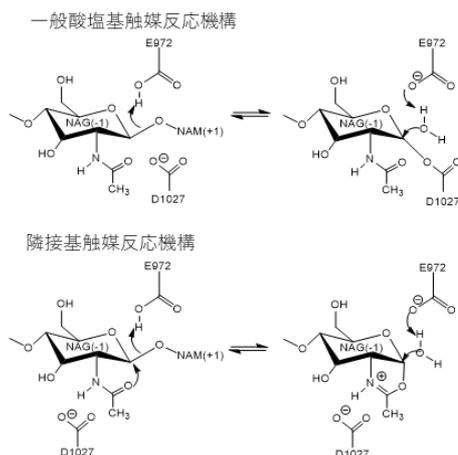
中央サブドメインの立体構造は、溶菌酵素として最もよく研究されているニワトリ卵白リゾチームの立体構造と相同性があったので、ニワトリ卵白リゾチーム・(NAG)₄複合体の X 線構造 (PDB: 2XEN) に基づいて AcpCD・基質複合体のモデリングを行った。図 4 に示すように、ペプチドグリカンの部分構造である (NAG-NAM)₂ が基質結合部位にフィットするモデリング構造が得られた。単糖単位のサブサイトは -3, -2, -1, +1 と定義し、加水分解部位は、-1 と +1 との間である。予想される触媒残基の Glu972 と Asp1027 は、基質の両側に位置しており、触媒反応に必須であると考えられる。また、Phe1021, Tyr1094, Thr1096, Trp1100 は基質結合部位の底および壁に位置し基質と接しており、基質認識に重要なアミノ酸残基だと考えられる。これらのアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異体を作製し、ザイモグラフィーの実験により活性が有意に低下することを確認した。細菌細胞壁のペプチドグリカンは、NAM の 3 位カルボキシル基にペプチド鎖が付く (図 4A の黒矢印)。モデリング構造において、NAM(+1) と NAM(-2) の 3 位は、17.0 Å 離れて基質結合部位の両端に位置しており、ペプチド鎖はタンパク質と衝突することなく NAM の 3 位に付くことができる。その結果、NAG(-1) は Glu972 と Asp1027 の間に位置することとなる。基質結合部位の幅 17.0 Å は、基質を NAG(-1) の還元末端で切断するグルコサミニダーゼ活性と密接に関係している。

図 4. AcpCD に (NAG-NAM)₂ が結合したモデリング構造。(A) 基質結合部位の上から見た図、(B) 基質結合部位の横から見た図。



ニワトリ卵白リゾチームをはじめ、多くのグリコシド結合を加水分解する酵素の触媒反応機構として一般酸塩基触媒機構が提唱されている(図5上)。AcpCDを、この機構にあてはめてみると、Glu972がプロトンを付加することによりグリコシド結合を切断、その後Asp1027が共有結合中間体を形成し、水分子の求核攻撃により加水分解反応が終わる。しかし、この機構では、Glu972とAsp1027が十分基質に近づいている必要がある。実際、ニワトリ卵白リゾチームにおいては2つの触媒残基間の距離は5.8 Åである。AcpCDでは、2つの触媒残基間の距離は12.6 Åもあり、反応を触媒するにはアームサブドメインが中央サブドメインに近づく大きなコンホメーション変化が必要である。GH18ファミリー酵素では、隣接基触媒反応機構が提唱されている(図5下)。この機構においては、Glu972がプロトンを付加することによりグリコシド結合を切断、その後、2位N-アセチル基が1位炭素を求核攻撃し、オキサゾリウムイオン中間体を生成し、Asp1027はこれを安定化する。AcpCDのモデリング構造では、Glu972はグリコシド結合の酸素原子に、Asp1027はNAG(-1)の2位アセチル基に向いている。距離的には、まだ若干遠いが、小さなコンホメーション変化で、隣接基触媒反応機構は可能である。Asp1027をAsnに置換した場合、残存活性が41%あった。Asn1027は、共有結合中間体の形成は難しいが、オキサゾリウムイオン中間体を安定化することはできる。このことから、Acpは隣接基触媒反応機構で働いている可能性が高いと考えられる。

図5. グリコシド結合を加水分解する酵素の2つの触媒反応機構。



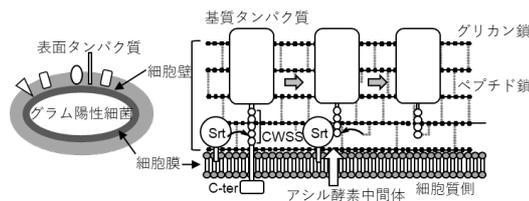
現在、Acpの細胞壁結合ドメインの立体構造を決定するため、10個ある細胞壁結合サブドメインのうち、AcpCDに1~4つ加えたタンパク質について結晶化を行っている。また、新たなウェルシュ菌由来溶菌酵素(CPE1138, アミダーゼ)についても結晶化を行っており、溶菌酵素の細胞壁認識・分解機構についてさらに研究を進めていきたい。

本成果は学術誌にて報告した(5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕)。

(2) ウェルシュ菌由来 Sortase B の X 線結晶構造解析

グラム陽性菌の宿主細胞への感染は、細胞表面にある多種類の表面タンパク質が関与している。こうした表面タンパク質は、システイントランスペプチダーゼである Sortase, (Srt)と呼ばれる酵素によって細胞壁のペプチドグリカンに共有結合で固定化される。Srtは、基質となる表面タンパク質(基質タンパク質)のC末側にある5アミノ酸からなるCell Wall Sorting Signal motifs(CWSS)を認識し、4番目と5番目のアミノ酸の間のペプチド結合を切断する。その後、Srtは、基質タンパク質とアシル酵素中間体を形成して、ペプチドグリカン中にあるアミノ基(未架橋のペプチド鎖のN末端)と基質タンパク質との間でアミド結合を形成する(図6)。Srtは、アミノ酸配列と機能によりA-Fの6つのクラスに分けられている。クラスA(SrtA)は、多くの種類の表面タンパク質を基質とすることから、ハウスキーピング Srt と呼ばれ、CWSSとしてLeu-Pro-X-Thr-Gly(LPXTG)を認識する。これに対して、他のクラスのSrtは、特異的な基質タンパク質を細胞壁に固定化する。本研究では、Srtが細胞壁中でどのように機能しているのか、またどのように細胞壁を認識しているのかについて新たな知見を得るために、ウェルシュ菌由来 Sortase B (CpSrtB) およびその不活性型変異体(CpSrtB_C232S)についてX線結晶構造解析を行った。

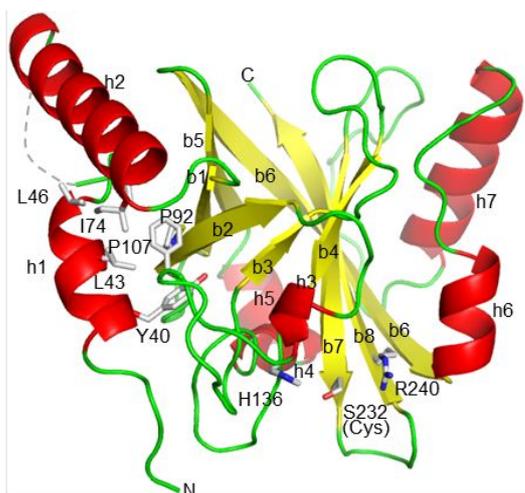
図6. グラム陽性菌の細胞壁と Srt による表面タンパク質の固定化。



不活性型変異体である CpSrtB_C232S を作製したのは、CWSS との複合体の構造を決定するためである。CpSrtB の基質タンパク質は、まだ実験的には同定されていないので、ゲノム上の配置等から CpSrtB の基質タンパク質だと予想した表面タンパク質の CWSS を受託合成により得て、結晶化に供してきた。現在のところ、複合体構造は得られていない。しかしながら、CpSrtB_C232S は、CpSrtB と異なる結晶系で結晶化し、より高分解能の X 線回折データを与え、電子密度も良質であった。CpSrtB_C232S の全体構造を図7に示す。CpSrtB_C232S は、中央に8本のβストランド(b1 - b8)からなる歪んだβバレルを持ち、周囲に5つのヘリックス(h3 - h7)が配置されている。N末には付加的に2つのαヘリックス(h1, h2)が疎水性アミノ酸間の疎水相互作用によって逆平行に会合しており、その間を結ぶループ部分の電子密度は見られなかった。CpSrtB の構造では、N末の2つのα

ヘリックスの電子密度も見られなかったことから、N 末領域は運動性が高いと考えられ、このことは CpSrtB の機能と関係があるかもしれない。基質が結合する溝が 3 本のβストランド(b6, b7, b8)と 2 つのαヘリックス(h3, h6)によって形成されており、予想される 3 つの触媒残基 (His136, Ser232 (Cys), Arg240)は、溝の底および壁に位置していた。

図 7. CpSrt_C232S の全体構造。ヘリックスは h, βストランドは b で示す。3 つの触媒残基と N 末領域の疎水アミノ酸を棒モデルで示す。



CpSrtB の機能および細胞壁認識機構を明らかにするためには、基質タンパク質を同定し、その基質タンパク質の CWSS との複合体、さらには細胞壁中の未架橋のペプチド成分との複合体の立体構造が必要である。これまで予想した CWSS を用いて複合体の結晶が得られなかったのは、予想した表面タンパク質が CpSrtB の基質タンパク質ではない可能性が高い。現在、生化学的な実験により CpSrtB の基質タンパク質の同定を行っており、CpSrtB と基質タンパク質とのアシル酵素中間体に近い状態の立体構造の決定を目指している。

本成果は学術誌にて報告した (5 . 主な発表論文等 [雑誌論文]) 。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Tamai, E., Sekiya, H., Maki, J., Nariya, H., Yoshida, H. & Kamitori, S. (2017). X-ray structure of *Clostridium perfringens* sortase B cysteine transpeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439**, 1267-1272. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.144.

Tamai, E., Sekiya, H., Goda, E., Makihata, N., Maki, J., Yoshida, H. & Kamitori, S. (2017). Structural and biochemical characterization of the *Clostridium perfringens* autolysin catalytic domain. *FEBS Lett.* **591**, 231-239. 査読有 doi: 10.1002/1873-3468.12515.

[学会発表] (計 5 件)

神鳥成弘, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧 純,

成谷宏文「ウェルシュ菌線毛タンパク質 CppA の X 線結晶解析」第 90 回日本生化学会大会・第 40 回日本分子生物学会年会合同大会 (ConBio2017), 2017 年 12 月 6 日~9 日, 神戸

玉井栄治, 関谷洋志, 巻幡奈保美, 吉田裕美, 神鳥成弘, 牧 純「ウェルシュ菌細胞壁分解酵素 Acp の構造と機能解析」第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 19 日~21 日, 仙台

神鳥成弘, 吉田裕美, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧 純, 成谷宏文「ウェルシュ菌 Sortase B の X 線結晶解析」第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日~27 日, 仙台

吉田裕美, 神鳥成弘, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧 純, 「ウェ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」第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会, 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸

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」日本細菌学会中国・四国支部総会(招待講演), 2015 年 10 月 3 日, 岡山

[図書] (計 1 件)

Kamitori, S. & Yoshida, H. (2015). Structure-function relationship of bacterial SH3 domains. in: Kurochkina, N. (Ed.) "SH Domains - Structure, Mechanisms and Applications", Springer International Publishing AG Switzerland. 2015, pp71-89.

[その他]

ホームページ :

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/report/kaken/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

神鳥 成弘 (KAMITORI, Shigehiro)

香川大学・総合生命科学研究センター・教授

研究者番号 : 00262246

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

玉井 栄治 (TAMAI, Eiji)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 40333512

(4) 連携研究者

野口 恵一 (NOGUCHI, Keiichi)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号 : 00251588