

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15693

研究課題名(和文) Psmの種特異性に関する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism for species specificity of Psm

研究代表者

関谷 洋志 (Sekiya, Hiroshi)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：70454890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の細胞壁を加水分解する溶菌酵素は菌を溶菌させ死滅させる。溶菌酵素Psmはウェルシュ菌に特異的に強力な溶菌活性を示すがその分子メカニズムはよくわかっていない。Psmはウェルシュ菌に結合しなければ溶菌活性を示さない。本研究では、細胞壁の構成成分であるタイコ酸が、Psmの結合に影響していることを明らかにした。また、医療現場ではディフィシル菌が問題となっている。そこで、Psmの細胞壁結合ドメインとディフィシル菌の溶菌酵素の細胞壁結合ドメインを組み替えた。しかし、今回作成したキメラ酵素は、ディフィシル菌に対して溶菌活性を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

溶菌酵素は細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンを直接的に加水分解するため、菌に作用すると細胞質成分が菌体外に漏出し、菌は瞬時に死に至るため、従来の抗菌薬よりも耐性菌が出現する可能性は極めて低いと考えられる。そこで、私は溶菌酵素が抗菌薬に代わる有力な治療薬のひとつになるのではないかと考え、ウェルシュ菌に特異的に強力な溶菌活性を示す溶菌酵素Psmの菌種特異性に関する分子メカニズムを明らかにすることを目指した。本研究で得られた知見から、強い溶菌活性を保持したまま任意の菌種に溶菌活性を示すキメラ酵素の構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lytic enzymes that hydrolyze the cell wall of bacteria lyse and kill the bacteria. The lytic enzyme Psm has a strong lytic activity specifically for *Clostridium perfringens*, but its molecular mechanism is not well understood. Psm shows no lytic activity unless it binds to *C. perfringens*. In this study, it was revealed that teichoic acid, which is a constituent of cell wall, influences the binding of Psm. In addition, *C. difficile* is a problem in the medical field. Therefore, the cell wall binding domain of Psm and the cell wall binding domain of the lytic enzyme of *C. difficile* were recombined. However, the chimeric enzyme prepared this time did not show lytic activity against *C. difficile*.

研究分野：細菌学

キーワード：溶菌酵素 細胞壁 クロストリジウム ウェルシュ菌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

溶菌酵素はペプチドグリカン分解する酵素であり、作用部位の違いでムラミダーゼ、グルコサミニダーゼ、アミダーゼ、エンドペプチダーゼなどに分類される。これらの酵素は特にグラム陽性菌に対して作用し、細胞壁を破壊して菌を死滅させる。一般的に、ファージ由来の溶菌酵素は種特異性が高いことが知られているが、その種特異性に関する分子メカニズムは不明な点が多い。溶菌酵素 Psm はウェルシュ菌 SM101 株のゲノムより発見されたファージ由来の溶菌酵素である。私は、Psm がウェルシュ菌に強い溶菌活性を示す一方、同族の他の菌に対して溶菌活性を示さず、高い種特異性を持つことを明らかにしている。また、Psm の結晶化及び X 線構造解析に成功し、Psm が 2 つのドメイン (触媒ドメイン、細胞壁結合ドメイン) から構成されることも明らかにしている。しかし、なぜ Psm が高い種特異性を示すのかはわかっていない。

### 2. 研究の目的

Psm の結合基質を同定し、Psm の変異体を用いた解析を行い、基質である細胞壁の構造解析により、Psm の種特異性に関する分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

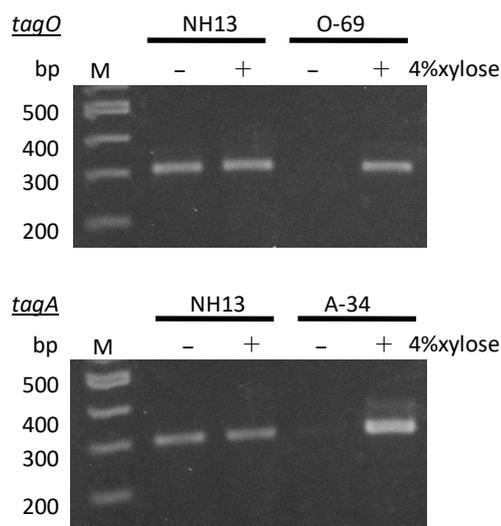
Psm の菌との結合に細胞壁中に存在するタイコ酸が関与しているかどうかを明らかにするために、タイコ酸の発現を抑制した株を作成した。まず、キシロース転写制御遺伝子 *xyIR* を PCR 法でクローニングしたウェルシュ菌のタイコ酸合成遺伝子 *tagO*、*tagA* の上流に組み込み、pGALK に組み込んだ。これらのプラスミドをウェルシュ菌 HN13 ( $\Delta galKT$ ) に導入し、相同組み換えにより *xyIR* をゲノム上の *tagO*、*tagA* の上流に組み込んだ株を作製した。これらの株を用いて、RT-PCR 法による *tagO*、*tagA* の発現量測定、顕微鏡を用いた菌体観察、タイコ酸量の比較、バインディングアッセイ、ザイモグラフィー解析を行い、解析した。

また、*C. difficile* 630 のゲノム DNA を鋳型として、SH3\_3 を有する 4 つのエンドペプチダーゼ遺伝子 (*CD630-01830*, *-11350*, *-24020*, *-27680*) の細胞壁結合ドメインを PCR 法でクローニングを行い、Psm の細胞壁結合ドメインを組み替えたキメラ酵素を作成した。

### 4. 研究成果

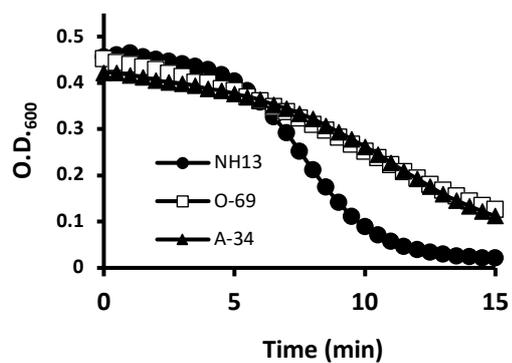
ウェルシュ菌のタイコ酸合成遺伝子 *tagO*、*tagA* の上流に *xyIR* を組み込んだ株は、キシロースを加えずに培養すると *tagO*、*tagA* の発現が mRNA レベルで大きく低下した。しかし、菌のタイコ酸量を定量すると、*tagO*、*tagA* 発現抑制株 (O-69、A-34) は親株であるウェルシュ菌 HN13 株と比べてタイコ酸量は大きく低下していたが、完全には抑制できなかった。バインディング解析の結果、Psm は *tagO* の発現抑制株に対する結合がわずかに低下していた。また、*tagO*、*tagA* の発現抑制株に対する Psm の溶菌活性を溶液中で経時的に測定した結果、HN13 株よりも Psm の溶菌活性が低下することがわかった。このことから、Psm の溶菌活性に対してタイコ酸はわずかだが影響していることがわかった。

また、Psm はウェルシュ菌に強い溶菌活性を示す一方で、同じ *Clostridium* 属菌に対しても溶菌活性をほとんど示さない。Psm は触媒ドメインだけでは溶菌活性を示さず、菌種特異性には菌への結合が重要なのではないかと考えられた。本研究では、Psm の細胞壁結合ドメインとして存在する SH3\_3 ドメインをデフィシル菌に存在するエンドペプチダーゼの SH3\_3 ドメインと組み替えた。作成したキメラ酵素の 1 つである CD11350BD\_PsmCD は、ウェルシュ菌だけではなく、デフィシル菌、*C. coccoides*、*C. lituseburense*、*C. novyi* などにも結合した。しかし、CD11350BD\_PsmCD はデフィシル菌には溶菌活性を示さなかった。今回作成したキメラ酵素はターゲットとしたデフィシル菌に対して



タイコ酸合成遺伝子の発現量

溶菌活性を示さなかったが、細胞壁結合ドメインを変えることで強い溶菌活性を保持したまま任意の他菌種に溶菌活性を示すキメラ酵素の構築できるのではないかと予想された。



タイコ酸発現制御株の溶菌活性に対する影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関谷 洋志、檜垣 恵二、玉井 栄治、牧 純
2. 発表標題 溶菌酵素Psmに対するタイコ酸の影響
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018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 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
---------------------------	-----------------------	----