

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580078

研究課題名 (和文) 連鎖球菌におけるヘパリン分解・輸送系の構造・機能相関とその感染症への関与

研究課題名 (英文) Structure and function of streptococcal system for heparin degradation/import and its involvement in infectious diseases

研究代表者

橋本 渉 (HASHIMOTO WATARU)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30273519

研究成果の概要 (和文)：

病原性連鎖球菌における宿主細胞外マトリックス (グリコサミノグリカン) の分解に関わる多糖リアーゼと不飽和グルクロニルヒドロラーゼ UGL の構造と機能を解析した。連鎖球菌ゲノムにおいて、多糖リアーゼと UGL の各遺伝子は一つのクラスターを形成する。グリコサミノグリカン存在下で発現上昇する UGL は、高度に硫酸化されているグリコサミノグリカンに由来するオリゴ糖に作用する。硫酸化基質の分解には、活性モチーフ「R-//-Sxx(S)xK」が重要である。以上のことから、両酵素は宿主細胞外マトリックスの分解に寄与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Pathogenic streptococci produce unsaturated glucuronyl hydrolase (UGL) together with polysaccharide lyase responsible for completely degrading glycosaminoglycans, and the streptococcal UGLs prefer sulfated substrates. This suggests that the substrate specificity is feasible for bacterial infection through degradation of mammalian extracellular matrices with sulfate groups. The motif "R-//-Sxx(S)xK" in UGL is prerequisite for degradation of sulfated substrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：連鎖球菌、宿主細胞外マトリックス、グリコサミノグリカン、多糖リアーゼ、不飽和グルクロニルヒドロラーゼ、侵入・感染

## 1. 研究開始当初の背景

化膿性溶血型連鎖球菌に分類される *Streptococcus pyogenes*、*S. agalactiae*、及び *S. pneumoniae* は、重篤な疾患を誘発する。特に、*S. pneumoniae* による肺炎で、全世界の約 500 万人/年の幼児が命を落としている。そのため、数種の連鎖球菌の全ゲノム

配列が決定され、その感染症発症機構に関する研究が国内外で進展している。*S. pneumoniae* の細胞表在性病原因子として、ヒアルロン酸リアーゼ (HLY)、ノイラミニダーゼ、オートリジン、コリン結合タンパク質、及び表在タンパク質 A が知られている。その中で、3 種類の溶血型連鎖球菌に共通する HLY

は、ヒトを含む動物細胞の細胞外マトリックス（グリコサミノグリカン：ヒアルロン酸、コンドロイチン、ヘパリンなど）である酸性多糖ヒアルロン酸を不飽和オリゴ糖に分解し、病原性発現に関連することが示唆されている。しかし、感染過程における HLY の正確な機能は不明である。本研究者は、酸性多糖分解細菌 (*Bacillus* 属) GL1 株において HLY の反応産物である不飽和オリゴ糖を単糖に分解する新規酵素[不飽和グルクロニルヒドロラーゼ (UGL)] の実体を明らかにし、UGL ホモログ遺伝子を 3 種類の溶血型連鎖球菌を始めとする種々の病原性細菌(ビブリオ菌、腸球菌、ウェルシュ菌など)のゲノムに見出した。UGL は、コンドロイチンオリゴ糖も分解する。そこで、病原性細菌において HLY と UGL が宿主への侵入・伝播の第一関門である宿主細胞外マトリックスの破壊分子として機能する宿主細胞侵入・感染モデルを提唱した。

## 2. 研究の目的

連鎖球菌のゲノムを調べた結果、UGL 遺伝子の近傍に多糖(ヘパリン)リアーゼ(HepC)とアミノ糖(グリコサミノグリカン構成糖)の輸送に関わるホストトランスフェラーゼ系(PTS)の各サブユニット(PTS-IIA, B, C, D)をコードする遺伝子と相同性を示すクラスターを見出した。連鎖球菌におけるヘパリン分解・輸送機構は不明である。しかし、本遺伝子クラスターは、連鎖球菌がヘパリンを菌体外で HepC により不飽和糖に分解し、それを PTS により菌体内に取り込んだ後 UGL により単糖にまで分解することを示唆する。HepC が分類されるファミリー PL-12 において、高次構造に関する報告はない。そこで、本研究では、連鎖球菌ヘパリン分解・輸送系を分子生物学と構造生物学の観点から解析することにより、本遺伝子クラスターの感染過程への関与及び HepC と UGL の構造・機能相関を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヘパリン分解・輸送系遺伝子クラスターの発現と機能解析

連鎖球菌 (*S. pyogenes*) 由来ヘパリンリアーゼ(HepC)に関して、GST 融合タンパク質として大腸菌発現系を構築し、京都大学農学研究科設置の GE ヘルスケア AKTA システムを用いて各種クロマトグラフィーにより精製した。3 種類の連鎖球菌 (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*) 由来 UGL は大腸菌発現系より同様に精製した。HepC の酵素活性は、基質の分解に伴い生成する不飽和糖 (C=C 二重結合) に由来する 235 nm における吸光度の上昇を測定することにより決定した。一方、UGL の酵素活性は、不飽和糖基質の分解に伴い消失する C=C 二重結合について、

235 nm における吸光度の減少を測定することにより決定した。グリコサミノグリカン存在及び非存在下で培養した連鎖球菌 (*S. agalactiae*) の菌体より全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。これにより、グリコサミノグリカン分解におけるヘパリン分解・輸送系遺伝子クラスターの発現レベルを決定した。酵素の基質認識や触媒反応における残基の役割は、部位特異的変異体を作製し、その速度パラメーターを決定することにより明らかにした。

### (2) HepC と UGL の X 線結晶構造解析

連鎖球菌 HepC と UGL の構造解析のため、96 或いは 24 穴プレートを用いた多検体結晶化条件の探索を行った。X 線回折実験により、結晶の基礎的データ(結晶系、空間群、格子定数、分解能など)を収集した。結晶学的データの収集には、京都大学農学研究科設置の X 線回折装置(ブルカー-M18XHF, ブルカー-AXS HI-STAR)を用いた。高分解能でのデータ収集は、SPring-8 の放射光実験施設にて行った。京都大学及び SPring-8 で各々収集したデータのプロセスには、SADIE, SAINT 及び HKL2000 プログラムを用いた。UGL 不活性変異体(D175N)と硫酸化コンドロイチン二糖(基質)との複合体の高次構造を、連鎖球菌野生型 UGL の構造をサーチモデルとした分子置換法により決定した。

## 4. 研究成果

### (1) ヘパリン分解・輸送系遺伝子クラスターの発現と機能

HepC の分子多様性を解析するため、各種 DNA/タンパク質データベースを用いて、ホモログ遺伝子をもつ生物種を検索した。その結果、多数の連鎖球菌を始め、腸球菌、ウェルシュ菌やバクテロイデス菌など、哺乳類の細胞に感染する細菌群が HepC 遺伝子をゲノムにもつことが分かった。また、それらの生物ゲノムにおける HepC の遺伝子座位が UGL 遺伝子の近傍に位置することを明らかにし、ヘパリン分解・輸送系に関わる遺伝子クラスターが哺乳類細胞との相互作用に深く関わることを示唆した。

連鎖球菌 (*S. agalactiae*) をグリコサミノグリカンの一種であるヒアルロン酸存在及び非存在下で培養し、各培養菌体における転写レベルを DNA マイクロアレイにより決定した。UGL 遺伝子は、ヒアルロン酸存在下で有意に誘導発現していた (2.5 倍)。また、UGL 遺伝子の下流に位置するアミノ糖輸送に関わるフォスフォトランスフェラーゼ系 (PTS) ホモログの発現もヒアルロン酸により促進されていた (図 1)。一方、HepC に関しては顕著な発現変動は見られなかった。これは、HepC の基質特異性に依存することが考えら

れた。今後、ヘパリン存在下での培養菌体での発現レベルを調べる必要がある。

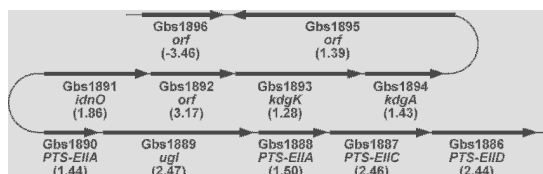


図1. 連鎖球菌遺伝子クラスター  
括弧内数値：発現上昇度

3種の連鎖球菌 UGL は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、及びヘパリンから、多糖リアーゼ反応により生じる不飽和二糖の全てに作用した。従って、本酵素はグルクロン酸とイズロン酸を含む全てのグリコサミノグリカンに由来する不飽和二糖の分解に関与することが示された。硫酸基をもつ不飽和コンドロイチン 6 硫酸二糖と不飽和ヘパリン N 硫酸二糖が良好な基質であった。

## (2) HepC と UGL の構造

*S. pyogenes* 由来 HepC を GST 融合タンパク質 (GST-HepC) として大腸菌発現系より精製した。また、トロンピンを作用させて、GST タグを除去したタンパク質 (HepC) も調製した。両タンパク質について、多検体結晶化スクリーニングを行った結果、HepC を含む溶液ドロップに微小な結晶が得られた。今後、結晶の性状解析と質的改良が必要である。

*S. agalactiae* 由来 UGL は、GalNAc の 6 位が硫酸化された不飽和コンドロイチン二糖 ( $\Delta 6S$ ) を最良の基質とした。UGL の不活性変異体 D175N と  $\Delta 6S$  との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により分解能 2.0 Å で決定した (図 2)。

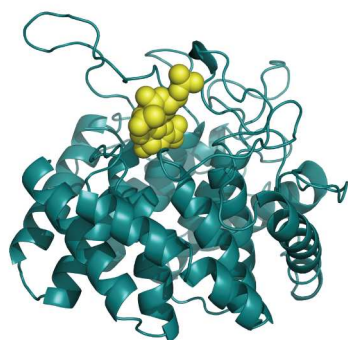


図2. UGL 変異体と基質との複合体構造  
UGL D175N, 水色; 基質  $\Delta 6S$ , 黄色

UGL は  $\alpha_6/\alpha_6$  バレル構造を示し、分子中央のクレフトで基質  $\Delta 6S$  と結合する。基質の認識に関わるループ (残基番号: 219-236) がフレキシブルな構造をとることが明らかになった。ループに位置する Thr235 は基質と相互作用し、その変異体 T235A では基質との親和性が顕著に低下する。従って、ループの

動的構造は、基質を活性部位に固定するために重要であることが示された (図 3)。

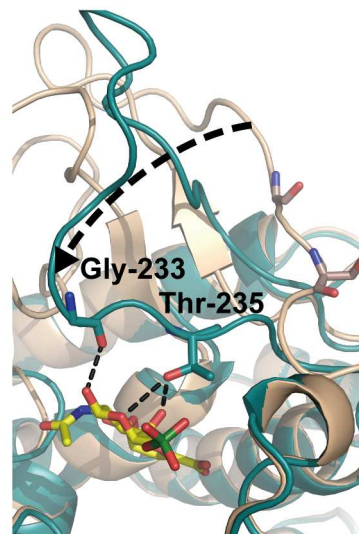


図3. ループの動的構造

UGL の Ser365 と Ser368 は、 $\Delta 6S$  の硫酸基と水素結合を介した相互作用を示す (図 4)。また、硫酸基周辺に位置する正電荷アミノ酸残基 Lys370 は負電荷の基質を安定化することが示唆された (図 5)。そこで、部位特異的変異体 (365H, S368G、及び K370A) を作製し、 $\Delta 6S$  に対する速度パラメーターを決定した。その結果、野性型酵素の親和性と比較すると、変異体における  $\Delta 6S$  と親和性は、2~20 倍低下した。従って、Ser365、Ser368、及び Lys370 が硫酸基との相互作用に重要であることが分かった。4 位が硫酸化された不飽和コンドロイチン二糖 ( $\Delta 4S$ ) の結合には、Arg236 が重要である。

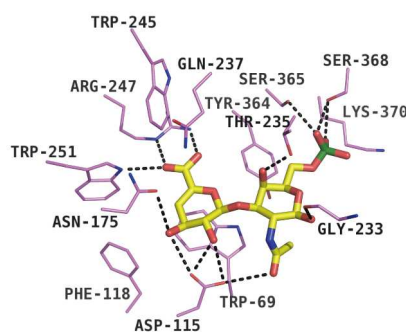


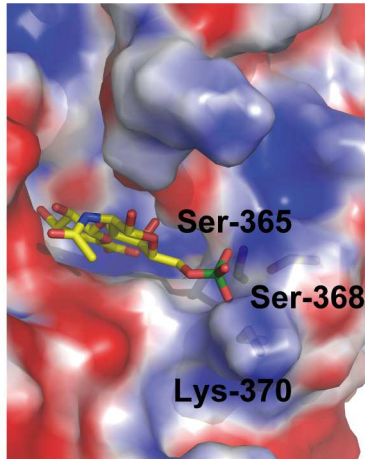
図4. UGL と基質との相互作用

以上の結果から、硫酸化基質の分解には、「R-/-Sxx(S)xK」が活性モチーフとして機能することを明らかにした。このモチーフは他の病原性細菌由来 UGL ホモログにもよく保存されていた。哺乳動物におけるグリコサミノグリカンは高度に硫酸化されているため、硫酸化糖に作用する連鎖球菌 UGL は宿主細胞外マトリックスの分解へ寄与していることが考えられる。

図 5. 活性部位における電荷  
酸性, 赤色; 塩基性, 青色

(3) 今後の展望

本研究は、ヘパリン分解 (HepC と UGL) ・輸送 (PTS) 系に焦点を当て、連鎖球菌によるグ



リコサミノグリカンの完全分解機構、宿主への侵入・感染機構、及びその防御法を、微生物生態学 (エコシステム) ・酵素学・遺伝学・構造生物学、並びにゲノム生物学に基づいて解析した。HepC と UGL の分子・構造生物学的解析による連鎖球菌のグリコサミノグリカン分解系の解明は、宿主細胞外マトリックスの分解による本菌の侵入・感染機構の完全理解を可能とし、感染症予防と治療のための薬剤の開発に繋がる。

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 16 件)

- (1) Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Structural determinants in streptococcal unsaturated glucuronidase for recognition of glycosaminoglycan sulfate groups. *J. Biol. Chem.*, 286 (8), 6262-6271 (2011). 査読有り
- (2) Akihito Ochiai, Masayuki Yamasaki, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.*, 285 (32), 24519-24528 (2010). 査読有り

- (3) Wataru Hashimoto, Shigeyuki Kawai, and Kousaku Murata. Bacterial supersystem for alginate import/metabolism and its environmental and bioenergy applications. *Bioengineered Bugs*, 1 (2), 97-109 (2010). 査読有り
- (4) Kohei Ogura, Masayuki Yamasaki, Takashi Yamada, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action. *J. Biol. Chem.*, 284 (51), 35572-35579 (2009). 査読有り
- (5) Yukie Maruyama, Yusuke Nakamichi, Takafumi Itoh, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Substrate specificity of streptococcal unsaturated glucuronidase for sulfated glycosaminoglycan. *J. Biol. Chem.*, 284 (27), 18059-18069 (2009). 査読有り
- (6) Akihito Ochiai, Takafumi Itoh, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Structural determinants responsible for substrate recognition and mode of action in family 11 polysaccharide lyases. *J. Biol. Chem.*, 284 (15), 10181-10189 (2009). 査読有り
- (7) Kohei Ogura, Masayuki Yamasaki, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Substrate recognition by family 7 alginate lyase from *Sphingomonas* sp. A1. *J. Mol. Biol.*, 380(2), 373-385 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 31 件)

- (1) ○中道優介、丸山如江、三上文三、橋本 渉、村田幸作. 連鎖球菌由来不飽和グルクロニドラーゼのグリコサミノグリカン二糖に対する硫酸基認識. 日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学.
- (2) ○橋本 渉、丸山如江、中道優介、村田幸作. 連鎖球菌におけるグリコサミノグリカン分解・輸送・代謝に関わる遺伝子クラスター. 日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学.

- (3) ○中道優介、丸山如江、三上文三、橋本 渉、村田幸作. 硫酸化グリコサミノグリカンに作用する連鎖球菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼの基質認識機構.  
日本農芸化学会 2010 年度関西支部大会、2010 年 10 月 3 日、近畿大学.
- (4) ○橋本 渉、村田幸作. 細菌由来多糖分解酵素の構造と機能.  
第 11 回関西グライコサイエンスフォーラム、2010 年 5 月 15 日、大阪市立大学.
- (5) ○落合秋人、三上文三、橋本 渉、村田幸作. Structural determinants responsible for mode of action in polysaccharide lyases for biofuel production.  
日本生化学会 2009 年度大会、2009 年 10 月 24 日、神戸国際会議場.
- (6) ○中道優介、丸山如江、三上文三、橋本 渉、村田幸作. A novel streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolase specific for sulfated glycosaminoglycans.  
日本生化学会 2009 年度大会、2009 年 10 月 24 日、神戸ポートピアホテル.
- (7) ○橋本 渉、伊藤貴文、三上文三、村田幸作. 多糖の輸送・分解に関わる細菌由来超分子の構造と機能.  
日本生化学会 2009 年度大会、2009 年 10 月 21 日、神戸ポートピアホテル.
- (8) ○小倉康平、山崎正幸、橋爪貴也、山田隆、三上文三、橋本 渉、村田幸作. アルギン酸リアーゼ vAL-1(S) は反応 pH により異なる作用様式 (エンド/エキソ型) を示す.  
日本生物工学会 2009 年度大会、2009 年 9 月 24 日、名古屋大学.
- (9) ○小倉康平、山崎正幸、橋爪貴也、山田隆、三上文三、橋本 渉、村田幸作. ファミリー PL-14 多糖リアーゼ vAL-1(S) の構造・機能相関.  
日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡.
- (10) ○落合秋人、三上文三、橋本 渉、村田幸作. 褐藻アルギン酸の糖化に関わる細菌由来エキソ型リアーゼの構造・機能相関.  
日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡.
- (11) ○Akihito Ochiai, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Structural determinants responsible for substrate recognition and mode of action in polysaccharide lyases.  
Korea-Japan Joint Meeting on Biotechnology、2008 年 12 月 12 日、石川県立大学.

- (12) ○橋本 渉、三上文三、村田幸作. 細菌における多糖の輸送と分解-構造・機能・移植-.  
日本応用糖質科学会第 28 回近畿支部会、2008 年 10 月 31 日、京都大学.
- (13) ○小倉康平、山崎正幸、橋爪貴也、山田隆、三上文三、橋本 渉、村田幸作. クロレラウイルス CVK-1 由来ファミリー 14 多糖リアーゼの X 線結晶構造.  
日本農芸化学会 2008 年度関西支部大会、2008 年 9 月 13 日、京都学園大学.
- (14) ○伊藤貴文、三上文三、橋本 渉、村田幸作. サルモネラ菌由来マンノースイソメラーゼ YihS の機能と立体構造.  
日本農芸化学会関西支部第 454 回例会、2008 年 5 月 31 日、京都府立大学.

[図書] (計 2 件)

- (1) Wataru Hashimoto, Yukie Maruyama, Takafumi Itoh, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata. Bacterial system for alginate uptake and degradation.  
*In "Alginates: Biology & Applications"* Microbiology Monographs 13: (Ed. Bernd Rehm), Springer, pp73-94 (2009).

[その他]

アウトリーチ活動 (計 3 件)

- (1) 2010 年 8 月 12 日、「京都大学オープンキャンパス 2010」の開催にあたり、本成果を含めた研究内容を高校生やその保護者に紹介した。
- (2) 2010 年 9 月 14 日 文部科学省の「平成 23 年度科学・技術関係予算についてのパブリック・コメント」募集に際し、科学技術研究に関する意見を提出した。
- (3) 2010 年 10 月 23、24 日、「京都大学宇治キャンパス祭」にて、一般市民向けに研究内容を紹介するパンフレットとポスターの作成に協力した。

ホームページ情報 (計 35 件)

研究成果データベース

- (1) Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Ryuichi Takase, Yu Nishitani, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Loop movement over the active cleft in streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolase.  
*SPring-8 User Experiment Report*, 2010A1279.

- (2) Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase from *Streptococcus agalactiae*.  
*PDB ID, 3ANJ*, 2010年9月2日.
- (3) Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase mutant D175N from *Streptococcus agalactiae*.  
*PDB ID, 3ANI*, 2010年9月2日.
- (4) Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase mutant D175N from *Streptococcus agalactiae* complexed with dGlcA-GalNAc6S  
*PDB ID, 3AMK*, 2010年9月2日.
- (5) Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Takafumi Itoh, Akihito Ochiai, Kohei Ogura, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolase in complex with sulfated substrate.  
*SPring-8 User Experiment Report*, 2009B1201.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 渉 (HASHIMOTO WATARU)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：30273519

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

村田 幸作 (MURATA KOUSAKU)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：90142299