

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07503

研究課題名(和文) 病原細菌由来のフィブロネクチン結合タンパク質と線毛の構造生物学的病原性機能の研究

研究課題名(英文) Functions of the fibronectin-binding proteins and pili from *Clostridium perfringens*

研究代表者

片山 誠一 (Katayama, Seiichi)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：70169473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌は、ヒトフィブロネクチン(Fn)分子に結合する。この菌の自己溶解酵素 Autolysin(Acp)がFn結合活性を持つこと、acp遺伝子の相補実験からウェルシュ菌のFnレセプターであることが明らかとなった。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)もFnとプラスミノゲンに結合することが示された。他のFn結合タンパク質FbpCとFbpDはウェルシュ菌のFn結合に関与しないことが示された。線毛については、その構成タンパク質CcpA, CcpBがsortase Cによってどのように連結するか、その過程を模式的に示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、ヒトにガス壊疽と食中毒を引き起こす病原菌である。この細菌は、創傷感染する際、まずフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質に結合することが必要になる。今回の科学研究費の支援によって、我々は、ウェルシュ菌の菌体表層に存在するフィブロネクチンレセプタータンパク質が、自己溶解酵素オートリシンであることを見出した。さらに他の付着因子と考えられている線毛の形成過程を模式的に示した。これらの発見は、ウェルシュ菌の宿主組織への付着のメカニズムを明らかにするもので学術的に意義があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens cells bind to the human fibronectin (Fn) molecules. Autolysin (acp), an autolysing enzyme of this bacterium, has Fn-binding activity, and the complementation experiments of the acp gene have revealed that it is the Fn receptor of Clostridium perfringens. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also shown to bind Fn and plasminogen. Other Fn-binding proteins, FbpC and FbpD, were shown not to be involved in Welsh Fn binding. However, FbpD was suggested to have peptidoglycan-degrading activity. As for the pili, the process of lineage formation by its compotent proteins, CcpA and CcpB, and the sortase C that links them, is schematically shown.

研究分野：細菌学

キーワード：Clostridium perfringens fibronectin (Fn) Fn-binding protein autolysin GAPDH pili

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原細菌は、宿主細胞に付着して増殖し、感染巣(コロニー)を形成した後、その細菌が産生する毒素や侵襲性により、感染症を引き起こす。よって感染症が成立するためには、病原細菌の細胞への付着を担う付着(定着)因子が重要であることが認知されている。

ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、ヒトにガス壊疽と食中毒をもたらすグラム陽性偏性嫌気性の細菌である。我々は、ウェルシュ菌菌体に細胞外マトリックスタンパク質の一つであるフィブロネクチン(Fn)が結合すること、複数のFn結合タンパク質(Fbp)が、この細菌の粗細胞壁画分に存在することを明らかにした [Katayama, S., et al. *Acta Medica Okayama*. **60**(6): 351-355. 2006.]。そして、今までにこの細菌から多数のFbpを分離・同定してきた。これらのタンパク質にはFbpA (*fbpA*;CPE0737), FbpB (*fbpB*;CPE1847) [Katayama, S., et al. *Anaerobe* **15**:155-159. 2009.], FbpC (*fbpC*;CPE0625), FbpD (*fbpD*;CPE0630) [Katayama, S., et al. *Int. J. Anal. Bio-Sci.* **3**(1):1-9. 2015.], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapC*; CPE1304), 溶菌酵素 Autolysin (*acp*; CPE1231) [Matsunaga, N., Katayama, S., et al. *Anaerobe* **51**:124-130. 2018.]が含まれる。これらの複数のタンパク質のどれが、付着因子としてはたらくかは全く不明であった。

もう一つの付着因子の候補として線毛が注目されていた。ウェルシュ菌の場合、従来から type IV 線毛の存在が知られていたが、我々はそれとは別の線毛が存在することを示し、その主要な線毛構成タンパク質 CppA (*cppA*;CPE0156)の立体構造を明らかにした [Tamai, E., Katayama, S., et al. *Acta Cryst.* **D75**:718-732. 2019.] この線毛の形成メカニズムについては、全く不明であった。

2. 研究の目的

(1)今までにいくつかのFbpは見出されているが、これらのどのタンパク質が、ウェルシュ菌菌体表面に存在し、実際にFn分子の菌体への結合に貢献しているのか明らかにした。

(2)新しく見出された線毛の構成タンパク質には、CppAとCppBの2つが存在する。CppAが主要なタンパク質で、CppBが先端に存在していることが、他のグラム陽性細菌の線毛研究から推測された。線毛変異体を用いてその形成メカニズムを明らかにした。

3. 研究の方法

(1)FbpC, FbpD 欠損株と相補株の作製

in-frame deletion 法 (Nariya, H., et al. *Appl Environ Microbiol* 2011. **77** : 1375-1382.)を用いてウェルシュ菌 HN13 (13 *AgalK ΔgalT*) 株の *fbpC* 遺伝子と *fbpD* 遺伝子の両方の遺伝子を欠失した株 (HN13 *ΔfbpC ΔfbpD*)を作製した。次に、ウェルシュ菌 - 大腸菌のシャトルベクターである pJIR418 に *fbpC* 遺伝子と *fbpD* 遺伝子をクローニングした。このプラスミド pfbpC fbpD を HN13 *ΔfbpC ΔfbpD* 株に形質転換して相補株とした。

(2)GAPDH 欠損株の作製

前述の in-frame deletion 法を用いて glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をコードする *gapC* 遺伝子の欠失をウェルシュ菌で試みたが、成功しなかった。GAPDH が、解糖系の酵素の一つであり、欠失すると菌が死んでしまうためと考えられた。

(3)オートリシン欠損株と相補株の作製

ウェルシュ菌のオートリシンの解析が、Camiade らによってなされ、彼らのグループによりオートリシン欠損株 (13 *acp::erm*) 株が作製された [Camiade, E., et al. *J. Bacteriol.* **192**:2373-2384. 2010.] この欠損株は、パリ・パスツール研究所の Bruno Dupuy 博士から分与していただいた。欠失したオートリシン (*acp*) 遺伝子の相補プラスミド (pacp) は、キシロース誘導型プロモーターを持つ pXC [Nariya, H., et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:1375-1382. 2011.] に *acp* 遺伝子をクローニングすることによって作製した。エレクトロポレーション法により、形質転換を行って相補株 (13 *acp::erm/pacp*) を得た。

(4)ウェルシュ菌のFn結合能の測定

ウェルシュ菌のFn結合能はELISAによって行った。対数増殖期のウェルシュ菌 (OD₆₀₀ = 0.5) をマイクロプレートのウェルに固着させ、ウシ血清アルブミン(BSA)でビオチン標識したFnを結合させた。HRP-streptoavidin と反応させたのち、2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)で発色させ、吸光度(A₄₀₅)を測定した。pacp 上の *acp* 遺伝子の発現誘導は、4%キシロースを培養時に培地中に加えることにより行った。

(5)ウェルシュ菌線毛構成蛋白質の抗体作製

ウェルシュ菌の線毛形成メカニズムを明らかにするためには、線毛構成タンパク質 CppA と CppB の抗体が必要になる。それぞれのタンパク質を大量精製してウサギに接種して、抗血清を得た。抗 CppA 抗体はすでに得られていた [Tamai, E., Katayama, S., et al. *Acta Cryst.* **D75**:718-

732. 2019.] が、今回の研究では、抗 CppB 抗体を作製した。精製したこれらの抗体を共に western blotting に用いた。

4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌菌体上の FbpC, FbpD の Fn 結合能

ウェルシュ菌 HN13 *ΔfbpC ΔfbpD* 株の菌体への Fn 結合量をビオチン化 Fn を用いた ELISA で調べたところ、野生株(HN13)とほぼ同じ量で差が認められなかった。相補株(HN13 *ΔfbpC ΔfbpD/pfbpC fbpD*)株においても同様であった。このことから、FbpC と FbpD は、Fn 結合活性を有するものの、ウェルシュ菌菌体への Fn 分子の結合には関与していないことが明らかとなった。

(2) GAPDH の Fn レセプターとしての可能性

ウェルシュ菌の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は、解糖系の酵素の一つであるとともに、Fn 分子やプラスミノーゲンと結合するタンパク質として認識されてきた [Matsunaga, N., et al. *Anaerobe*. 51:124-130. 2018.] GAPDH は菌体表層にも存在し、自己溶解酵素オートリシン(Acp)と相互作用することが示唆されている。しかしながら、本当にそのようなはたらきがあるのか、Fn レセプターとして機能するのかは、GAPDH の欠損株が得られていないため証明できていない。本研究でも、GAPDH をコードする *gapC* 遺伝子の欠失を試みたが、失敗に終わった。GAPDH がウェルシュ菌の生存に関わるため欠失株が得られないと考えられた。

(3) オートリシンの Fn 結合能

最初に、ウェルシュ菌の自己溶解酵素オートリシン(Acp)が Fn 結合活性を有しているかどうかを抗 Acp-CD (catalytic domain)抗体を用いて western blotting 法で調べた。(図 1) Acp は Fn 結合活性を持っていることと、ウェルシュ菌の細胞壁内のタンパク質には、Fn 結合タンパク質が複数含まれていることが、明らかになった(図 1B)。Acp 欠損株(13 *acp::erm*)では、バンドは認められない。

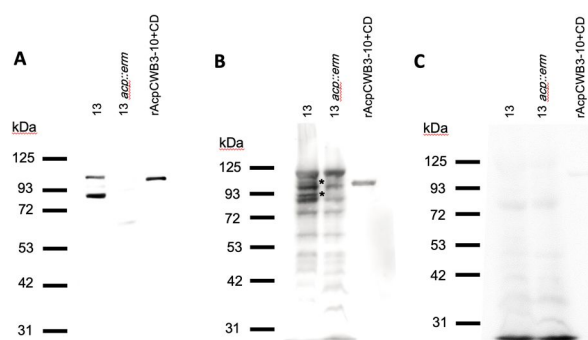


図 1 (A)細胞壁から抽出されたタンパク質と組換え Acp タンパク質の抗 Acp-CD 抗体を用いた western blotting のパターン。(B)最初に膜上のタンパク質に Fn を結合させ、抗 Fn モノクローナル抗体 HB91 を用いて western blotting を行ったパターン。Acp のバンドが * で示されている。(C)Fn を結合させずに同様の実験を行った。この場合、ほとんどバンドは見られない。

(4) オートリシン欠損株と相補株の Fn 結合能

Acp 欠損株(13 *acp::erm*)株では、ウェルシュ菌菌体への Fn 結合量が減少した。4%キシロース存在下では、Fn 結合量は、野生株(13)と同等にまで回復した(図 2A)。このことから、オートリシンは、ウェルシュ菌菌体表面に存在し、Fn レセプターとしてはたらくことが明らかになった。

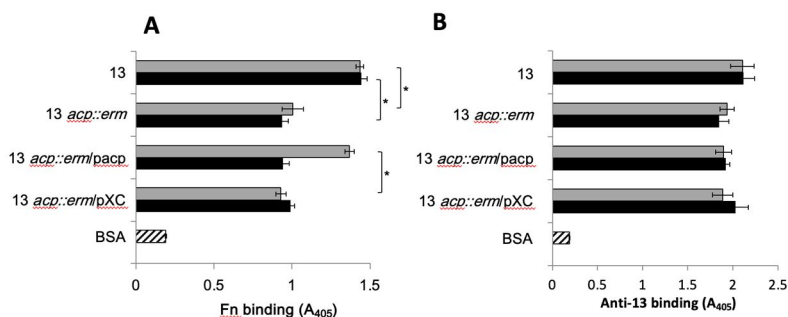


図 2 (A)ウェルシュ菌 13 株、13 *acp::erm* 株、13 *acp::erm/pacp* 株、13 *acp::erm/pXC* 株の Fn 結合量 (B)抗 13 株抗体で反応させた ELISA の結果。どの菌株もプレート上の菌量には差がないことが確認された。データは平均値±SD (n = 3)で示している。*, p < 0.01

(5) ウェルシュ菌の線毛形成のメカニズムの解明

ウェルシュ菌の新たに見出された線毛の構成タンパク質は CppA と CppB の 2 つである。これらのタンパク質がどのように繋がって線毛を形成するのかは不明であった。抗 CppA 抗体と抗 CppB 抗体を作製し、これらの遺伝子の様々な変異株を用いて線毛の western blotting を行った。その結果から、sortase C という酵素が、ペプチドグリカン層内で最初に CppB を CppA につなげ、その分子に次々と CppA がつながるといった線毛形成メカニズムが明らかになった (図 3)。

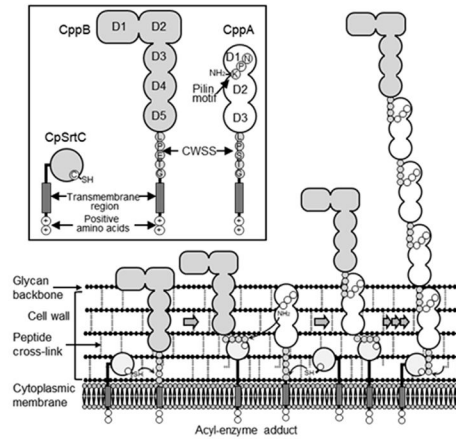


図 3 ウェルシュ菌線毛形成のメカニズムを示した模式図。CpSrtC は sortase C である。

(6) 結論

ウェルシュ菌は、ヒトの細胞外マトリックスタンパク質の一つであるフィブロネクチン(Fn)分子に結合する。その Fn レセプターとして自己溶解酵素であるオートリシンがはたらくことが、本研究で明らかとなった。ウェルシュ菌が宿主の組織に結合する際にオートリシンが貢献していると考えられ、本研究で得られた知見がこの菌による感染症発生メカニズムの解明の一助になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamai Eiji, Sekiya Hiroshi, Nariya Hirofumi, Katayama Seiichi, Kamitori Shigehiro	4. 巻 554
2. 論文標題 X-ray structures of Clostridium perfringens sortase C with C-terminal cell wall sorting motif of LPST demonstrate role of subsite for substrate-binding and structural variations of catalytic site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Riyo Aono, Shogo Emi, Kanako Okabe-Watanabe, Hirofumi Nariya, Nozomu Matsunaga, Yasuo Hitsumoto, Seiichi Katayama	4. 巻 83
2. 論文標題 Autolysin as a fibronectin receptor on the cell surface of Clostridium perfringens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2023.102769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Seiichi Katayama, Riyo Aono, Syogo Emi, Kanako Okabe-Watanabe, Hirofumi Nariya, Nozomu Matsunaga, Yasuo Hitsumoto
2. 発表標題 Autolysin as a fibronectin receptor on the cell surface of Clostridium perfringens.
3. 学会等名 The 13th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of The Clostridia (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青野りよ, 松永望, 櫃本泰雄, 片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶菌酵素オートリシンのFnレセプターとしての機能
3. 学会等名 第17回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂田 楓連, 松永 望、片山 誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌エンテロトキシン産生株 (HNSM101) の線毛欠失株の作製
3. 学会等名 第17回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永望、青野りよ, 岡部-渡邊加奈子、檀本康雄、片山誠一
2. 発表標題 The interaction of fibronectin conformation with Clostridium perfringens Fbps and autolysin.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青野りよ、松永望、玉井栄治、成谷宏文、檀本康雄、片山誠一
2. 発表標題 Function of the cell wall-binding domain of Clostridium perfringens autolysin
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永望、青野りよ, 岡部加奈子、檀本康雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌Fbps, GAPDHおよびAcpとのフィブロネクチン構造の相互関係
3. 学会等名 第33回生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青野りよ、松永望、櫃本康雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来オートリシンのドメイン機能解析
3. 学会等名 第33回生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青野りよ、松永望、櫃本康雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶解酵素オートリシンのドメイン機能解析
3. 学会等名 第16回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青野りよ、松永望、玉井栄治、櫃本康雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶菌酵素オートリシンのドメイン機能解析
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青野りよ、松永望、玉井栄治、片山誠一、櫃本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶解酵素オートリシンの分解
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤松綾介、松永 望、片山誠一、檀本泰雄
2. 発表標題 Clostridium perfringensの菌体表層におけるフィブロネクチンレセプターの同定
3. 学会等名 第31回・第32回生物試料分析科学会合同年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青野りよ、松永望、玉井栄治、片山誠一、檀本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来オートリシンの切断
3. 学会等名 第31・32回生物試料分析科学会合同年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青野りよ、松永 望、玉井栄治、片山誠一、檀本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶解酵素オートリシンの分解と溶菌活性
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山誠一、江見尚悟、青野りよ、松永 望、成谷宏文、玉井栄治、檀本泰雄
2. 発表標題 自己溶解酵素オートリシンのウェルシュ菌菌体へのフィブロネクチン結合における関与
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riyo Aono, Shogo Emi, Nozomu Matsunaga, Seiichi Katayama, Yasuo Hitsumoto
2. 発表標題 Involvement of both autolysin and GAPDH in the fibronectin binding of Clostridium perfringens cells
3. 学会等名 12th International Conference on the Molecular Biology & Pathogenesis of the Clostridia (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤松綾介、松永 望、片山誠一、櫃本泰雄
2. 発表標題 Clostridium perfringensの菌体表層におけるGAPDHと複合体を形成するタンパク質の同定
3. 学会等名 第15回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江草星良、松永 望、片山 誠一、櫃本 泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌のTritonX-100誘導溶菌における自己細胞壁溶解酵素オートリシンの関与
3. 学会等名 第15回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青野りよ、江見尚悟、松永 望、櫃本泰雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己細胞壁溶菌酵素オートリシンのフィブロネクチン結合への関与
3. 学会等名 第15回生物試料分析科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江見尚悟、青野りよ、松永 望、成谷宏文、玉井栄治、榎本泰雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌の自己溶解酵素オートリシンの機能解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青野りよ、江草星良、松永 望、玉井栄治、片山誠一、榎本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌自己溶解酵素オートリシンの性状解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青野りよ、松永 望、玉井栄治、片山誠一、榎本泰雄
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来オートリシンの分子量変化と溶菌活性
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江見尚悟、青野りよ、松永 望、成谷宏文、玉井栄治、榎本泰雄、片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌の溶菌酵素オートリシンの機能解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	松永 望 (Matsunaga Nozomu) (30780142)	岡山理科大学・理学部・講師 (35302)	
研究 分担者	檀本 泰雄 (Hitsumoto Yasuo) (90136333)	岡山理科大学・理学部・名誉教授 (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------