

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870116

研究課題名(和文) 臨床分離腸球菌が産生するバクテリオシンBac41の抗菌作用機序と耐性機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of antimicrobial mechanism and self resistance of bacteriocin Bac41 produced by *Enterococcus faecalis* clinical isolate.

研究代表者

久留島 潤 (Kurushima, Jun)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50636488

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)：腸球菌(*Enterococcus faecalis*)臨床分離株が産生するバクテリオシンBac41による溶菌作用の分子機構について解析を行なった。

Bac41の溶菌実効タンパク質の一つであるBacL1は、*E. faecalis*の細胞壁を分解する酵素活性を有しており、標的細胞表面における細胞分裂に関連する構造体に結合することを明らかにした。一方、増殖を停止した*E. faecalis*細胞の表面にはBacL1が結合せず、溶菌活性も認められなかった。BacL1の結合は、L-Ala-L-Ala型の架橋構造を有する細胞壁に特異的であり、Bac41の狭域な抗菌スペクトルの一因であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanism underlying the bacteriolytic activity of bacteriocin Bac41 that is produced by *Enterococcus faecalis* clinical isolate. BacL1 protein, which is an essential secreted component of Bac41, showed a cell wall degrading activity against *E. faecalis* peptidoglycan, and binds to cell dividing-associated region of the target *E. faecalis* cell surface to lead bacteriolysis. By contrast, neither the binding of BacL1 nor the bacteriolysis was observed in the static *E. faecalis* cells. The binding of BacL1 was specifically detected in L-Ala-L-Ala crossbridged peptidoglycan but not in peptidoglycan with other crossbridge structure, potentially explaining narrow antimicrobial spectrum of Bac41.

研究分野：分子細菌学

キーワード：腸球菌 溶菌酵素 細胞壁 細胞分裂 プラスミド *Enterococcus faecalis* ペプチドグリカン 臨床分離株

1. 研究開始当初の背景

バクテリオシンは、細菌が産生する抗菌ペプチドあるいはタンパク質の総称であり、一般的には、同種ならびに類縁菌種に対して特異的な活性を有し、狭域な抗菌スペクトルを示す。バクテリオシン Bac41 は、臨床分離腸球菌 *Enterococcus faecalis* から見出された新規バクテリオシンであり、同種である *E. faecalis* にのみ限定的な殺菌作用を示す (Tomita et al. J. Bacteriol, 2008)。これまでの分子遺伝学的な研究の結果、以下のことが明らかにされている。

() Bac41 関連遺伝子は、プラスミド上にコードされる *bacl₁*、*bacl₂*、*bacA*、*bacI* の4つの遺伝子から成る。

() Bac41 の殺菌作用の本体は菌体外に分泌される BacL₁ と BacA であり、両者が菌体外で相補的に働くことで初めてバクテリオシン活性が認められる。

() BacL₂ は 因子であり、*bacl₁* と *bacl₂* 自身の遺伝子の転写を活性化する。

() BacI は免疫因子であり、自身が産生する Bac41 に対する耐性を与える。

このように、Bac41 と命名した溶菌活性の実効因子は、*bacl₁* と *bacA* の遺伝子産物であること、また、産生菌自身は免疫因子 *bacI* によって耐性を獲得していることが示唆されているが、詳細な分子機構については不明であった。

2. 研究の目的

E. faecalis は健全なヒトや動物の腸内から検出される非病原性の常在菌であるが、一方で、易感染宿主に対しては日和見感染症の原因菌となる。しかしながら、常在菌である *E. faecalis* が、どのようにして疾患を惹起するに至るかは不明な点が多く、明確な病原因子も見出されていない。近年の疫学研究から、臨床から分離される *E. faecalis* 株の約半数がバクテリオシン Bac41 を産生することが明らかにされている (Ike et al. 3rd International ASM Conference on Enterococci, 2010)。この事実は、Bac41 と *E. faecalis* 感染症との関連を強く示唆している。本研究では、実際の臨床における *E. faecalis* の性質を理解することを目的として、Bac41 系における溶菌と自己耐性化の分子機構を詳細に解析した。

3. 研究の方法

(1) 分泌型 BacL₁、BacA の決定

BacL₁、BacA による溶菌作用の機序を分子レベルで精査するにあたり、他の *E. faecalis* 因子の影響を排除するために、精製タンパク質を用いた生化学的な解析が好ましいと考えられた。これまでに報告されている多くのバクテリオシンは、N 末端にシグナル配列を有している。この場合、実際に活性を示すのは、分泌に伴って N 末端数残基が切断・除去されたポリペプチドである。したがって、活

性を解析する際には、分泌型のタンパク質を材料として用いる必要がある。そこで、タンパク質精製のためのクローン化に先立って、BacL₁ と BacA の分泌型の同定を行った。具体的には、C 末端にヒスチジンタグを付加した各タンパク質を発現する *E. faecalis* 株を構築した。これらのタグ付加タンパク質を発現する *E. faecalis* の培養菌液から遠心・濾過により菌体を除去した培養上清をスタート標品とし、ニッケル担体を用いて分泌型を濃縮・精製した。得られた上清由来タンパク質を、SDS-PAGE で分離後、目的のバンドについてエドマン分解法による N 末端シーケンスを行い、分泌型 BacL₁ と BacA の N 末端配列を決定した。

(2) タンパク質発現系の確立

(1) で同定された分泌型の BacL₁ あるいは BacA を発現するように、大腸菌の発現プラスミドにクローン化した。精製には、(1) と同様に各タンパク質の C 末端に付加したヒスチジンタグとニッケル担体を利用した。

(3) 精製 BacL₁、BacA を作用させた *E. faecalis* 細胞の解析

(2) で得られた分泌型 BacL₁ ならびに BacA の精製タンパク質をそれぞれ単独、あるいは混合して *E. faecalis* 生菌、あるいは精製細胞壁成分に作用させた後、その影響について非処理細胞との以下の比較解析を行うことで、各因子の機能を明らかにした。具体的には、*E. faecalis* 懸濁液に BacL₁、BacA を添加し、濁度の変化を計測するとともに、生菌数を colony forming units (cfu) で求めた。また、BacL₁、BacA を作用させた *E. faecalis* を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡下で観察し、細胞の形態変化を解析した。

BacL₁ と BacA はそれぞれ既知のペプチドグリカン分解酵素と高い相同性を示すことから、細胞壁を標的基質としている可能性を検討する。培養した *E. faecalis* 細胞より細胞壁画分を精製し、これを基質として BacL₁、ならびに BacA の分解活性を懸濁液濁度の減少を指標として評価した。また、分解産物を質量分析に供することで、遊離した細胞壁成分の分析を行い、分解様式の解析を行なった。

(4) 細胞表面における局在解析

生細胞上における動態を解析するために、組換えタンパク質を蛍光色素で標識した。蛍光標識体を *E. faecalis* 細胞を混合・培養した後に化学固定を行い、蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルの局在を観察した。

(5) BacL₁-BacA 相互作用の解析

BacL₁ と BacA と同様に二種類のタンパク質が菌体外で相補的にバクテリオシン活性を示す例として、*E. faecalis* が産生する hemolysin/bacteriocin が既に報告されている。hemolysin/bacteriocin では、それぞれ

菌体外に分泌された前駆体リシン CyIL が活性化因子 CyIA に活性化される。

BacL₁ と BacA についても同様の相互作用が存在する可能性を検討した。具体的には、BacL₁ と BacA を混合後、SDS-PAGE を行い分子量の変化を検討した。また、両タンパク質が直接結合するかどうかを、共沈実験により検討した。

(6) BacI 依存的な耐性化機構の解析

bacl 遺伝子を外来的に発現させた *E. faecalis* 株では、BacL₁ と BacA による殺菌作用が全く認められないことから、BacI は Bac41 の耐性化に参与している。しかしながら、BacI のアミノ酸配列には既知の機能ドメイン等の特徴的な配列が見出されず、その分子機能は未知であった。そこで、BacI を外来的に発現させた *E. faecalis* 株を用いて、(3)と同様に濁度、cfu 測定、形態変化（光学・電子顕微鏡）ならびに細胞壁成分の分析（質量分析）を行い、野生型(*bacl*)との比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 分泌型 BacL₁ と BacA の同定

両タンパク質が細胞外に分泌される際に N 末端が切断されるかどうかを明らかにするために、C 末端にヒスチジンタグを付加した、BacL₁ あるいは BacA を *E. faecalis* 細胞に発現させ、培養上清中に存在する分泌型、および細胞内に存在する細胞内型の BacL₁-His、ならびに BacA-His をニッケルカラムを用いてそれぞれ分離精製した。得られた分泌型 BacL₁ ならびに BacA は、それぞれの細胞内型と SDS-PAGE において同一の分子量を示した。さらに、エドマン分解により N 末端のアミノ酸配列を決定したところ、分泌型の BacL₁ と BacA はともに N 末端配列は開始メチオニンを含めた intact な配列が保存されていた。以上の結果から、両タンパクは少なくとも N 末端の切断を受けずに、intact な全長ポリペプチドが細胞外に分泌されることが示唆された。

(2) 組み替えタンパク質の調製と活性の検討

(1) で得られた結果に基づき、それぞれ全長ポリペプチドを活性型 BacL₁、ならびに BacA タンパク質として C 末端にヒスチジンタグを付加した組み替えタンパク質を調整した。*E. faecalis* に対して、BacL₁ と BacA、両タンパク質を同時に処理した場合では、顕著な溶菌活性を認めた。一方、それぞれ単独の処理では、全く活性を認めなかった。以上の結果から、BacL₁ と BacA は、溶菌活性に必要な成分であること、また両タンパク質は単独では溶菌活性を示さずに、両者が共存してはじめて協調的に活性を発揮することを明らかにした。

(3) 細胞壁分解活性の検討

BacL₁ と BacA のアミノ酸配列を解析したところ、細胞壁結合ドメインとペプチドグリカン分解酵素と相同性を示す領域が見出された。このため、両タンパク質は細胞壁を標的としていることが推察された。そこで、*E. faecalis* から調整した精製細胞壁に BacL₁ ならびに BacA を作用させたところ、BacL₁ のみ細胞壁分解活性を認めた。一方、BacA については、細胞壁分解活性が観察されなかった。分解様式を明らかにするために BacL₁ で処理した細胞壁の分解産物を逆走液体クロマトグラフィーと MALDI-TOF-MS を用いて解析した。その結果、BacL₁ は、*E. faecalis* のペプチドグリカンを構成するグリカン鎖を架橋するステムペプチド内の₀-iGln と₁-Lys 間のペプチド結合を加水分解する活性を有していることを明らかにした。

(4) BacL₁ のドメイン解析

BacL₁ (全長 595 a. a.) は推測される 3 つの機能ドメイン、ファージ型細胞壁分解酵素 (ドメイン 1)、NlpC 型細胞壁分解酵素 (ドメイン 2)、3 回繰り返し SH3 様 (ドメイン 3) から構成される。各ドメインの部分欠失変異体を構築し、その活性を検討した結果、いずれのドメインを欠失した場合も、*E. faecalis* に対して BacA と協調的に発揮される溶菌活性を消失した。また、細胞壁分解活性については、ドメイン 1 の欠失では影響がなかったが、ドメイン 2 とドメイン 3 の欠失により分解活性は消失した。黄色ブドウ球菌に見出される BacL₁ のドメイン 3 と相同な SH3 ホモログは、細胞壁結合ドメインとして報告されている。そこで、BacL₁ の各部分欠失変異体と、*E. faecalis* 由来の精製細胞壁と混合してブルダウン解析を行い、相互作用を検証した。その結果、ドメイン 3 領域のみで細胞壁と結合すること、これに対してドメイン 3 の欠失体では結合能が消失することを明らかにした。以上の結果から、BacL₁ のドメイン 1 は細胞壁分解に影響せず分子機能は不明であるが生細胞の溶菌には必須であること、ドメイン 2 は細胞壁分解活性を有すること、ドメイン 3 は細胞壁への結合ドメインであることを明らかにした。

(5) 標的細胞表面における BacL₁ の局在解析

溶菌の標的となる *E. faecalis* 細胞における BacL₁ の挙動を明らかにするために、蛍光標識した BacL₁ タンパク質の標的細胞表面における局在を解析した。その結果、BacL₁ は細胞分裂に伴って生じる構造物、赤道面、分裂面や新生細胞壁に対応する領域に特異的に局在していることを明らかにした。

(6) 溶菌感受性における標的細胞の細胞分裂依存性の検討

溶菌作用が標的細胞の分裂状態に影響を受けるか検討するために、*E. faecalis* の増殖曲線における各増殖期での BacL₁ と BacA に

よる溶菌感受性を検討した。その結果、増殖の初期や中期では、BacL₁とBacAタンパク質の添加によって顕著に溶菌されるのに対して、増殖停止期では溶菌を認めなかった。また、静菌的な抗生物質であるクロラムフェニコールやテトラサイクリン処理により強制的に*E. faecalis*の増殖を停止させた場合も、BacL₁とBacAによる溶菌を認めなかった。さらに、このような増殖を停止した細胞では、BacL₁の細胞表面局在が観察されなかった。以上の結果から、BacL₁とBacAによる溶菌作用は、標的細胞が増殖・分裂中であることが必要であることが示唆された。

(7)異なる菌種由来の細胞壁に対する BacL₁の結合特異性の検討

細菌のペプチドグリカンにおいて、グリカン鎖を架橋するペプチド鎖は、菌種間で多様性を示すことが知られている。黄色ブドウ球菌の溶菌酵素に見出されるSH3ドメインでは、標的である黄色ブドウ球菌に特有の構造である、ペンタグリシン架橋を特異的に認識・結合することが報告されている。そこで、上述のとおり*E. faecalis*細胞壁に結合するBacL₁のSH3ドメインが、様々な構造を持つペプチドグリカンを認識するか検討を行なった。*E. faecalis*と同様のペプチド架橋構造、_L-Ala-_L-Alaをもつ *Streptococcus pyogenes* や *Streptococcus pneumoniae* の細胞表面には BacL₁ が結合した。これに対して、*E. faecalis* とは異なるペプチド架橋構造の細胞壁を有する *Enterococcus faecium*(_L-Asp)、*Enterococcus hirae*(_D-Asn)、*Staphylococcus aureus*(Gly₅)や *Listeria monocytogenes*(直接架橋)では、BacL₁の結合が観察されなかった。以上の結果から、BacL₁は_L-Ala-_L-Alaペプチドにより架橋されたペプチドグリカンを特異的に認識して結合することが強く示唆された。

(8)BacL₁とBacA間の相互作用の検討

E. faecalis 生細胞に対して溶菌活性を発揮する際に、BacL₁とBacAは互いに依存関係にあるが、その相補性の実体については不明である。BacL₁とBacAタンパク質を混合し、プルダウン実験を行なったが、互いに対する共沈現象は観察されなかった。しかしながら、BacAの蛍光シグナルが極めて微弱ながら、標的細胞表面においてBacL₁とBacAの共同在を示唆する像が観察された。このことから生細胞においては間接的な相互作用が存在する可能性が推察された。

(9)免疫因子 *bacI* の役割

免疫因子 *bacI* は BacL₁ と BacA による溶菌作用に対する耐性を与えることが示唆されているが、その分子機能については不明であった。BacI 発現プラスミドを導入した *E. faecalis* 細胞は溶菌に対する耐性を獲得するが、コントロールプラスミドを導入した細

胞と同様に、細胞表面における BacL₁ の結合を認めた。また、BacI 発現細胞から精製した細胞壁は、コントロールと同様に BacL₁ により分解された。以上の結果から、*bacI* による耐性化は、BacL₁ の細胞壁結合および分解作用には影響しないことが示唆された。

(10)まとめと今後の展望

これまでの研究の成果として、BacL₁ の分子機能については、大部分を明らかにすることができた。一方で、もう一つの溶菌タンパク質である BacA については、生細胞を溶菌するのに必須な因子であること除いて、その機能は未だ不明である。また、BacI による耐性化は、BacL₁ の働きには影響を与えなかつことから、BacI は BacA に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。今後、BacA ならびに BacI の分子機能を精査することで、Bac41 システムの溶菌と自己耐性に関わる分子機構の全体像を明らかにしていく予定である。

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2件)

Jun Kurushima, Ikue Hayashi, Motoyuki Sugai, Haruyoshi Tomita:
Bacteriocin protein BacL₁ of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan _D-isoglutamyl-_L-lysine endopeptidase.
Journal of Biological Chemistry, 査読あり, 巻:288, 発行年:2013, ページ:36915-36925
doi: 10.1074/jbc.M113.506618

Jun Kurushima, Daisuke Nakane, Takayuki Nishizaka, Haruyoshi Tomita
Bacteriocin protein BacL₁ of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes _L-Ala₂-crossbridged peptidoglycan.
Journal of Bacteriology, 査読あり, 巻:197, 発行年:2015, ページ:286-295,
doi: 10.1128/JB.02203-14

[学会発表](計9件)

久留島潤, 富田治芳, 腸球菌 *Enterococcus faecalis* が産生するバクテリオシン Bac41 の機能解析, 第45回レンサ球菌研究会, 東京都港区, 2013年6月

久留島潤, 林幾江, 菅井基行, 富田治芳, 腸球菌バクテリオシン Bac41 の機能解析, 第7回細菌学若手コロッセウム, 広島県三原市, 2013年8月

Jun Kurushima, Haruyoshi Tomita,
Functional analysis of bacteriocin Bac41 produced by *Enterococcus faecalis*

clinical isolates, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 兵庫県淡路市, 2013年9月

久留島潤, 富田治芳, 腸球菌バクテリオシン Bac41 による殺菌メカニズムの解析, 第96回日本細菌学会関東支部総会, 東京都文京区, 2013年11月

Jun Kurushima, Functional analysis of bacteriocin Bac41 produced by *Enterococcus faecalis*, Sociomicrobiology Meeting at Gunma University, 群馬県前橋市, 2014年1月

Jun Kurushima, Ikue Hayashi, Daisuke Nakane, Takayuki Nishizaka, Motoyuki Sugai, Haruyoshi Tomita, Functional analysis of bacteriocin Bac41 produced by *Enterococcus faecalis*, 4th ASM Conference on Enterococci, Cartagena, Colombia, 2014年3月

久留島潤, 富田治芳, 腸球菌 *Enterococcus faecalis* が産生するバクテリオシンタンパク質 BacL₁ の細胞壁ターゲティング, 第46回レンサ球菌研究会, 東京都文京区, 2014年6月

久留島潤, 中根大介, 西坂崇之, 富田治芳, 腸球菌バクテリオシン BacL₁ の細胞壁ターゲティング, 第8回細菌学若手コロッセウム, 北海道虻田郡, 2014年8月

久留島潤, 中根大介, 野村隆浩, 西坂崇之, 富田治芳, 臨床分離 *Enterococcus faecalis* が産生する溶菌タンパク質 BacL₁ の特異的ターゲティング, 第88回日本細菌学会, 岐阜県岐阜市, 2015年3月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/envmed/envmed-defense/155.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久留島潤 (KURUSHIMA JUN)

群馬大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号: 50636488