

特別寄稿

新規抗菌薬の可能性を探る — グラム陽性細菌の細胞壁分解酵素のX線結晶構造解析 —

松山大学薬学部感染症学研究室 玉井 栄治, 関谷 洋志

【はじめに】

近年、抗菌薬（抗生物質）が効かない薬剤耐性（AMR; Antimicrobial Resistance）を示す菌が世界的に増加しています。一方、新たな抗菌薬の開発は減少傾向にあります。この薬剤耐性に対して有効な対策を講じなければ2050年には全世界で年間1000万人が薬剤耐性菌により死亡することが推定されています¹⁾。我が国では、2016年に「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」が決定されました²⁾。当研究室では、新規抗菌薬の候補としての「溶菌酵素」や感染に関与すると考えられる「細菌表面のタンパク質」の構造と機能に関する基礎研究（香川大学総合生命科学センターの神鳥成弘先生、広島大学農学部食品衛生学研究室の成谷宏文先生との共同研究）、抗菌活性を持つ新規化合物の探索（松山大学薬学部有機化学研究室の河瀬雅美先生との共同研究）などを行っています。本稿では、溶菌酵素に関するこれまでの研究成果と現在進行中及び今後の課題について報告させていただきます。

— 溶菌酵素の研究 —

細菌の細胞壁は、グリカン鎖を8～12個のアミノ酸からなるペプチド鎖（種や属により異なる）が架橋した網目構造のペプチドグリカンにより構成されています。溶菌酵素は、ペプチドグリカン分解酵素であり、その分解部位により大きく4種類に分類されます（図1）。また、溶菌酵素は、ファージの放出に関与するエンドリシンと細胞分裂時のペプチドグリカン再構築に関与するオートリシンに分けられ、共に細胞外から作用させると細胞壁を破壊し、菌を死滅させることができます。なお、溶菌酵素は、菌の種もしくは属特異的に溶菌活性を示すことが知られており、一般的に種特異性は前者が高く後者は低い傾向にあります。当研究室では、溶菌酵素が感染症治療の薬として利用できるのではないかと考え、その基礎研究と応用研究を行っています。

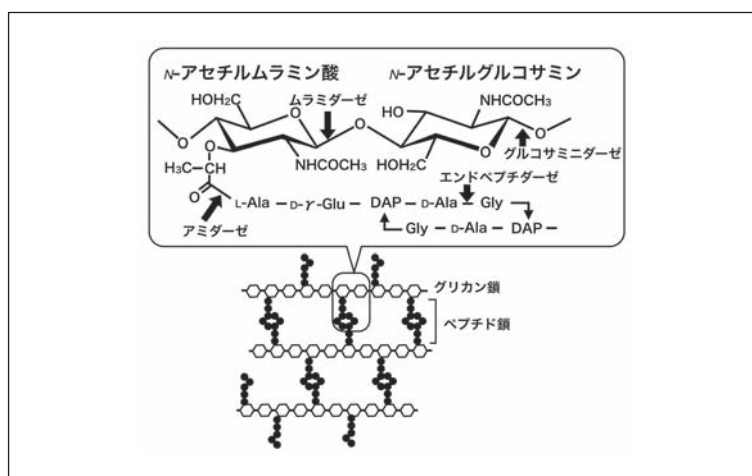


図1 ウエルシュ菌の細胞壁の模式図

溶菌酵素（ムラミダーゼ、アミダーゼ、グルコサミニダーゼ、エンドペプチダーゼ）で切断される場所を太い矢印で示している。DAP: ジアミノピメリン酸

当研究室は、食中毒やガス壊疽を起こすグラム陽性嫌気性芽胞形成桿菌のウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)に着目して研究を行っています。これまでに、ウエルシュ菌のゲノムよりエンドリシン(ムラミダーゼ)の遺伝子 (psm) を発見し、その遺伝子産物である溶菌酵素 (Psm) の性質の解析を行いました。その結果、Psm は、ウエルシュ菌に対して高い種特異性を有しており (ウエルシュ菌にのみ作用し、同属のデフィシル菌や破傷風菌にはほとんど作用しない)、1 μ g の酵素で約 10⁹ 個のウエルシュ菌を 5 分で溶菌させる強力なものであることを明らかにしています³⁾。更に私たちは、Psm の X 線結晶構造解析に成功し、図 2 に示すようなカタリティックドメインと 2 つの細胞壁結合ドメイン (SH3_3) からなる構造 (PBD code ; 4KRT) であることを明らかにしました⁴⁾。また、カタリティックドメインの活性中心を構成すると思われるアミノ酸を異なるアミノ酸に変異させた様々な変異体の解析結果より、その反応メカニズムが Neighbouring-group mechanism⁵⁾であることを明らかにしました⁴⁾ (図 3)。更に、Psm の細胞壁への結合モデル (図 4) を提唱し *Molecular Microbiology* 誌の表紙に起用されました⁴⁾。Psm の基礎研究に関しては、細胞壁のどの分子を認識しているのか、なぜ種特異性があるのか (種特異性の分子メカニズム) などがまだ明らかにされていません。今後、これらを明らかにする研究を行いたいと思っています。一方、ウエルシュ菌は、人の腸に生息する悪玉菌としても知られており、老年期では腸内フローラに占める割合が増加し、様々な疾患の原因になると考えられています。

ウエルシュ菌の増加 → 便秘 → 腸内の腐敗 → 発がん性物質を含む有害物質の増加
→ 大腸がんを含む各種疾患

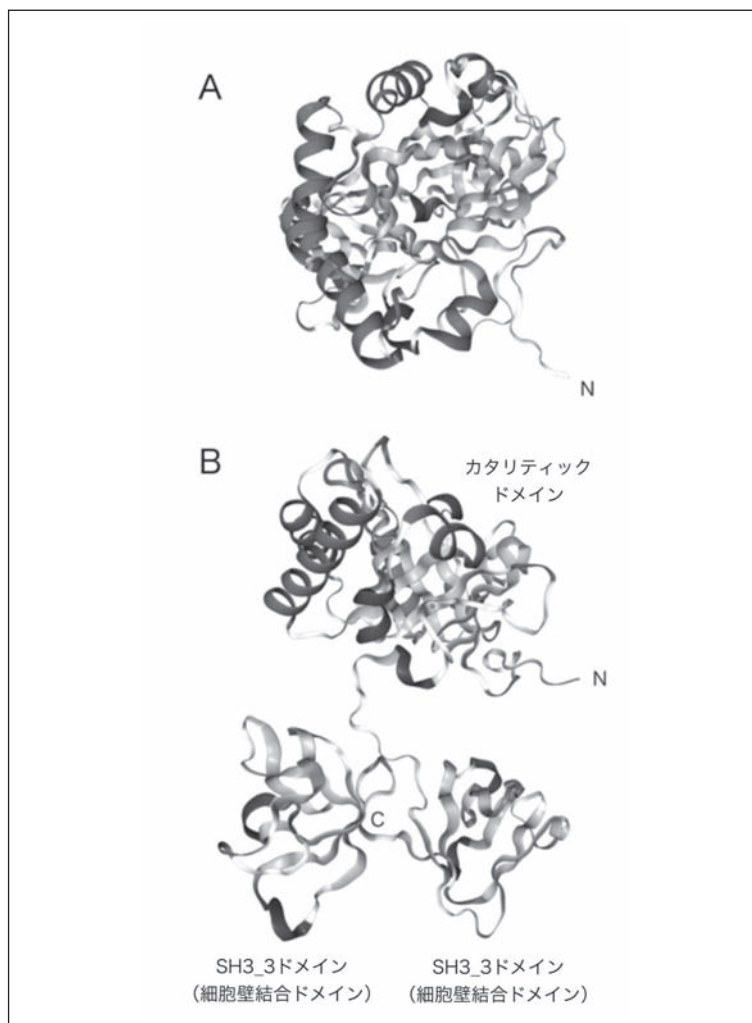


図 2 Psm の立体構造

A: 上から見た Psm の立体構造, B: 横から見た Psm の立体構造, SH3_3ドメイン: 細胞壁結合ドメイン

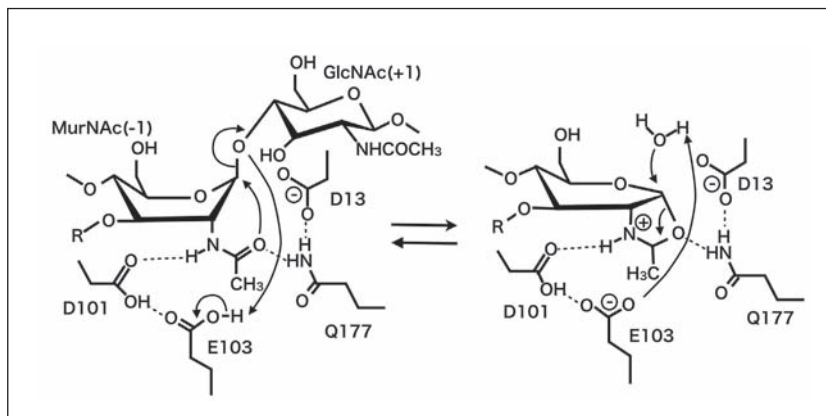


図3 Psm の反応メカニズム (Neighbouring-group mechanism)

101 番目のアスパラギン酸 (Asp101), 135 番目のチロシン (Tyr135) および 177 番目のグルタミン (Gln177) が, N-アセチルムニン酸 (MurNAc) の N-アセチル基を最適な条件で固定する。その後, MurNAc の N-アセチルカルボニル基が求核的に MurNAc の C1 を攻撃してオキサゾリニウムイオン中間体を形成すると同時に 103 番目のグルタミン酸 (Glu103) が, グルコシド酸素 (O4) をプロトン化する。オキサゾリニウムイオン中間体は, 13 番目, 101 番目, 192 番目のアスパラギン酸 (Asp13), (Asp101), (Asp192) の負に荷電した残基により安定化されることにより反応が進行する。最終的にオキサゾリニウムイオン中間体が N-アセチル基に戻る。

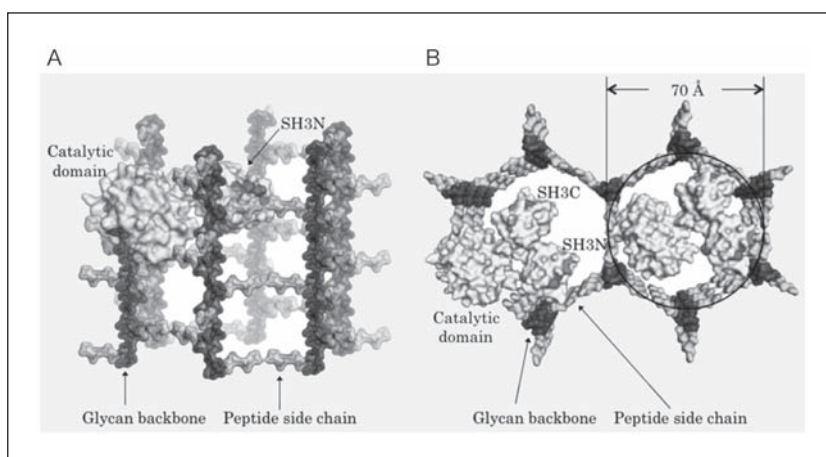


図4 Psm の細胞壁結合モデル

A:横から見たモデル図, B:上から見たモデル図 (左:カタリティックドメインがグリカン鎖に結合しているモデル, 右:推定されるペプチドグリカンの孔の大きさと Psm の比較。Psm は十分ペプチドグリカンの中に入って行ける大きさであることがわかる。)

私たちは, Psm の種特異性を利用して腸内の細菌叢に影響することなくウエルシュ菌のみを減少させ, 腸内環境の改善ができるのではないかと考え, Psm 腸溶性製剤の開発も行っています。

また, 当研究室では, ウエルシュ菌の細胞分裂時に細胞壁の再構築に関与するオートリシン (グルコサミニダーゼ) Acp⁶⁾ に関する基礎研究も行っています。これまでに, Acp のカタリティックドメイン (CD) の X 線結晶構造解析に成功しており, その構造は図5に示すような3つのサブドメインからなる三日月様構造 (PBD code ; 5WQW) であることを明らかにしました⁷⁾。また, AcpCD の様々な変異体の解析により, その反応メカニズムが Neighbouring-group mechanism⁵⁾ であることも明らかにしています⁷⁾。なお, Acp には, N 末端側に 10 個の細胞壁結合ドメイン (SH3₃) がありますが, このドメインがなぜ 10 個もあるのか, どのような構造になっているのか, 何を認識して結合しているのか, 更には, 細胞分裂をどのように制御しているのかなどを今後明らかにしたいと考えています。また, 最近では, 更にウエルシュ菌ゲノムより新規のエンドリ

シン (アミダーゼ) 遺伝子を発見し、その大量発現系及び精製系を確立しました。また、そのタンパク質の生化学的解析により、ウエルシュ菌特異的に作用することがわかりつつあります。更に、そのカタリティックドメインの X 線結晶構造解析および変異体の解析もほぼ終わっています。なお、このアミダーゼの細胞壁結合ドメインは、他のタンパク質のアミノ酸配列と相同性が無いため、新規のドメインであることが予想されます。現在、その構造を決定するためこの細胞壁結合ドメインを大量精製し、結晶化スクリーニング (1 回あたり約 1000 種類) を行っています。もし、新規のドメイン構造を決定することができれば、生物学的にも意義のある研究となると思っています。

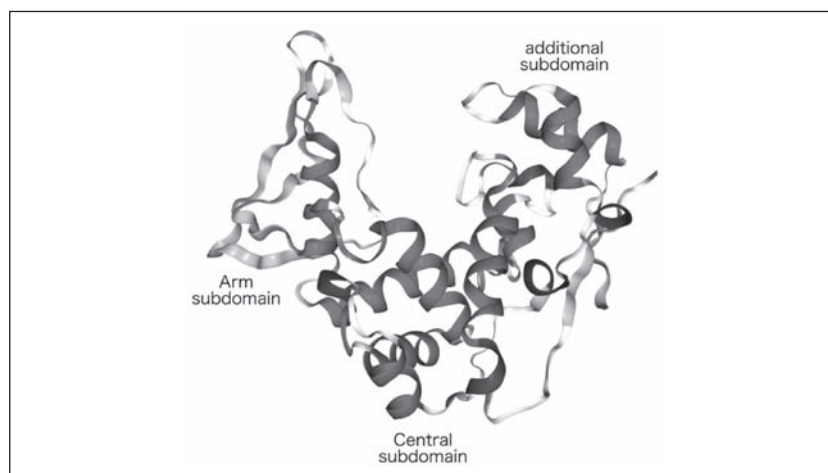


図5 Acp のカタリティックドメインの立体構造

一方、当研究室では、感染予防に役立つため感染に関与すると思われる細菌表面 (ペプチドグリカンに結合している) タンパク質の構造と機能に関する基礎研究も行っています⁸⁾。細菌の産生するタンパク質に関して分子のレベルでそのメカニズムを解明し、感染症の治療や予防につなげて行きたいと考えています。これらの研究に関心のある方は、一緒に研究してみませんか。

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000179184.html>
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>
- 3) H. Nariya, S. Miyata, E. Tamai, H. Sekiya, J. Maki, A. Okabe. (2011) Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90(6), 1973-1979.
- 4) Tamai, E., Yoshida, H., Sekiya, H., Nariya, H., Miyata, S., Okabe, A., Kuwahara, T., Maki, J. & Kamitori, S. (2014). X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. Mol. Microbiol. 92, 326-337.
- 5) Martinez-Fleites C, Korczynska JE, Davies GJ, Cope MJ, Turkenburg JP, Taylor EJ. (2009) The crystal structure of a family GH25 lysozyme from *Bacillus anthracis* implies a neighboring-group catalytic mechanism with retention of anomeric configuration Carbohydrate Res 344:1753-1757
- 6) Camiade E, Peltier J, Bourgeois I, Couture-Tosi E, Courtin P, Antunes A, Chapot-Chartier MP, Dupuy B and Pons JJ (2010) Characterization of Acp, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium perfringens* with N-acetylglucosaminidase activity that is implicated in cell separation and stress-induced autolysis. J. Bacteriol. 192, 2373-2384.
- 7) 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.
- 8) 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.