

学位論文

Staphylococcus capitis EPK1が産生する溶菌酵素 ALE-1
に関する研究

学位申請者 藤原 環

広島大学大学院・医歯薬学総合研究科
創生医科学専攻・探索医科学講座
細菌学教室

(主任:菅井 基行教授)

2002年度

謝辞

本研究に際し、終始御懇親なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻探索医科学講座 菅井基行教授ならびに終始懇篤なる御指導を賜りました前広島大学歯学部口腔細菌学講座教授 杉中秀壽名誉教授に心より感謝いたします。また、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました同大学院病態探究医科学講座 土肥敏博教授ならびに同大学院探索医科学講座 加藤幸夫教授に感謝いたします。

本研究遂行上および本論文作成上、終始御助言と御鞭撻を戴きました同大学院探索医科学講座 小松澤均助教授および小原勝博士、同大学院薬学専攻創薬科学講座 青木伸助教授、Joshua Sakon 博士 (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arkansas) に厚くお礼申し上げます。

さらに、多大なる御支援御協力を戴きました本講座細菌学教室関係者各位に厚くお礼申し上げます。

最後に常に私を支えてくれた両親ならびに家族に感謝します。

本論文の要旨は以下の学会および研究会において発表した。

- 第 40 回 ブドウ球菌研究会 (1995 年 9 月、広島)
- 第 69 回 日本細菌学会総会 (1996 年 3 月、福岡)
- 第 41 回 ブドウ球菌研究会 (1996 年 9 月、東京)
- 第 70 回 日本細菌学会総会 (1997 年 3 月、栃木)
- 第 26 回 薬剤耐性菌シンポジウム (1997 年 8 月、千葉)
- 第 42 回 ブドウ球菌研究会 (1997 年 9 月、岡山)
- 第 71 回 日本細菌学会総会 (1998 年 3 月、松本)
- 第 72 回 日本細菌学会総会 (1999 年 3 月、東京)
- 第 73 回 日本細菌学会総会 (2000 年 5 月、札幌)
- 第 74 回 日本細菌学会総会 (2001 年 4 月、岡山)

本論文の一部は以下の雑誌に掲載された。

- 1) Motoyuki Sugai, Tamaki Fujiwara, Tomoko Akiyama, Masaru Ohara, Hitoshi Komatsuzawa, Shingo Inoue and Hidekazu Suginaka. (1997)
Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK1.
Journal of Bacteriology : 179, 1197-1202.
- 2) Motoyuki Sugai, Tamaki Fujiwara, Kouji Ohta, Hitoshi Komatsuzawa, Masaru Ohara and Hidekazu Suginaka. (1997)
epr, which encodes glycylglycine endopeptidase resistance, is homologous to *femAB* and affects serine content of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus aureus*.
Journal of Bacteriology : 179, 4311-4318.
- 3) Motoyuki Sugai, Tamaki Fujiwara, Hitoshi Komatsuzawa and Hidekazu Suginaka. (1998)
Identification and molecular characterization of a gene homologous to *epr* (endopeptidase resistance gene) in *Staphylococcus aureus*.
Gene : 224, 67-75.

目次

	ページ
序論 1
本論	
第 1 章 溶菌酵素 ALE-1 の精製及び性状と <i>ale-1</i> 遺伝子のクローニング および塩基配列の決定 3
第 1 節 概要 3
第 2 節 材料および方法 4
第 1 項 使用菌株および培養条件	
第 2 項 ALE-1 の精製方法	
第 3 項 抗 ALE-1 血清の作製	
第 4 項 Zymography およびウエスタンブロッティングによる ALE-1 の検出法	
第 5 項 ALE-1 の溶菌活性の測定	
第 6 項 ペプチドグリカンの精製方法	
第 7 項 ALE-1 によるペプチドグリカン切断部位の決定	
第 8 項 ALE-1 の溶菌酵素活性に及ぼす様々な物質の影響	
第 9 項 タンパク分解能の測定	
第 10 項 N 末端アミノ酸配列の決定	
第 11 項 ALE-1 の亜鉛含有量の測定	
第 12 項 <i>S. capitis</i> EPK1 の DNA 調整	
第 13 項 <i>ale-1</i> 遺伝子のクローニング	
第 14 項 <i>ale-1</i> 遺伝子の塩基配列の決定	
第 3 節 結果 10
第 1 項 ALE-1 の精製	
第 2 項 ALE-1 によるペプチドグリカン切断部位の検討	
第 3 項 ALE-1 の亜鉛含有量	
第 4 項 溶菌酵素 ALE-1 の性状	
第 5 項 <i>ale-1</i> 遺伝子のクローニング	
第 6 項 <i>ale-1</i> 遺伝子の塩基配列決定と推定アミノ酸配列	

第7項	ALE-1 はプラスミドにコードされている	
第4節	考察ならびに小括 15
第2章	ALE-1 の機能解析 27
第1節	概要 27
第2節	材料および方法 28
第1項	使用菌株および培養条件	
第2項	<i>ale-1</i> 遺伝子の PCR-Mutagenesis	
第3項	各部位を含んだ組み換え ALE-1 の作製	
第4項	His-tag 組み換えタンパク質の精製法	
第5項	溶菌酵素活性の測定	
第6項	結合能の測定	
第7項	トリプシン消化に対する感受性	
第8項	CD スペクトロメトリー	
第9項	亜鉛およびマグネシウム含量の測定	
第3節	結果 30
第1項	Δ N-term ALE-1 の過剰発現	
第2項	Δ N-term ALE-1 の PCR-Mutagenesis	
第3項	様々な大きさの ALE-1 の His-tag 組み換えタンパク質	
第4項	野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の トリプシン消化	
第5項	野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の 溶菌活性	
第6項	野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の <i>S. aureus</i> 菌体への結合能	
第7項	野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の CD スペクトロメトリー	
第8項	野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の 亜鉛およびマグネシウム含量	
第9項	様々な組み換え ALE-1 の <i>S. aureus</i> 菌体への結合飽和曲線	
第10項	様々な組み換え ALE-1 の <i>S. aureus</i> 菌体への結合能	
第11項	様々な組み換え ALE-1 の CD スペクトロメトリー	
第12項	様々な組み換え ALE-1 の溶菌活性	

第4節	考察ならびに小括	・ ・ ・ ・ ・ 34
第3章	ALE-1 の細胞壁選択的結合部位の機能と構造	・ ・ ・ ・ ・ 49
第1節	概要	・ ・ ・ ・ ・ 49
第2節	材料および方法	・ ・ ・ ・ ・ 49
第1項	使用菌株および培養条件	
第2項	<i>S. aureus</i> FDA209P 菌体への 92AA の結合実験	
第3項	様々な菌体への 92AA の結合実験	
第4項	92AA の <i>S. aureus</i> FDA209P 菌体からの解離実験	
第5項	92AA の <i>S. aureus</i> FDA209P 菌体への結合に及ぼす 様々な物質の影響	
第6項	GST-pentaglycine と 92AA の結合実験	
第7項	92AA 結合部位の RP-HPLC 解析	
第8項	FLAG-tag 92AA の作製、精製	
第9項	FLAG-tag 92AA の結晶化	
第10項	<i>S. aureus</i> FDA209P 菌体への変異型 92AA の結合実験	
第3節	結果	・ ・ ・ ・ ・ 53
第1項	様々な処理菌体への 92AA の結合能	
第2項	様々なペプチドグリカンへの 92AA の結合能	
第3項	92AA の <i>S. aureus</i> FDA209P 菌体への結合強度	
第4項	92AA の <i>S. aureus</i> FDA209P 菌体への結合に及ぼす 様々な物質の影響	
第5項	様々な SDS 加熱処理菌体への 92AA の結合能	
第6項	<i>S. aureus</i> FDA209P 菌体あるいは BB1221 菌体に対する Δ N-term ALE-1 と Δ N,C-term ALE-1 の結合能	
第7項	GST-pentaglycine への 92AA の結合能	
第8項	92AA 結合部位の RP-HPLC 解析	
第9項	FLAG-tag 92AA Se-Met 誘導体の結晶化	
第10項	<i>S. aureus</i> FDA209P 菌体への変異型 92AA の結合能	
第4節	考察ならびに小括	・ ・ ・ ・ ・ 57
第4章	ALE-1 に対する耐性を担う <i>epr</i> 遺伝子のクローニング、塩基配列 の決定および Epr の機能解析	・ ・ ・ ・ ・ 67

第1節	概要	・ ・ ・ ・ ・ 67
第2節	材料および方法	・ ・ ・ ・ ・ 68
第1項	使用菌株および培養条件	
第2項	<i>S. capitis</i> EPK1 からの大プラスミド脱落方法	
第3項	エンドペプチダーゼに対する耐性度の測定	
第4項	メチシリン、バンコマイシン感受性試験	
第5項	<i>epr</i> 遺伝子の塩基配列の決定	
第6項	コアグララーゼ陰性ブドウ球菌属での <i>epr</i> 遺伝子の検出	
第7項	<i>epr</i> 遺伝子の形質転換および形質導入	
第8項	溶菌酵素感受性試験	
第9項	<i>epr</i> 遺伝子の試験管内転写、翻訳	
第10項	ペプチドグリカンのアミノ酸分析	
第3節	結果	・ ・ ・ ・ ・ 71
第1項	<i>epr</i> 遺伝子のクローニング	
第2項	<i>epr</i> 遺伝子の塩基配列	
第3項	<i>epr</i> 発現、非発現時の細胞壁のアミノ酸組成	
第4項	<i>epr</i> 発現による溶菌酵素感受性の影響	
第5項	<i>epr</i> 遺伝子の検出	
第6項	<i>S. aureus</i> のメチシリン、バンコマイシンの感受性に及ぼす Epr の過剰発現の影響	
第4節	考察ならびに小括	・ ・ ・ ・ ・ 75
第5章	<i>S. aureus</i> の <i>epr</i> 遺伝子と相同性のある <i>eprh</i> 遺伝子のクローニング、 塩基配列の決定および機能解析	・ ・ ・ ・ ・ 85
第1節	概要	・ ・ ・ ・ ・ 85
第2節	材料および方法	・ ・ ・ ・ ・ 85
第1項	使用菌株および培養条件	
第2項	エンドペプチダーゼに対する耐性度の測定	
第3項	<i>eprh</i> 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定	
第4項	<i>eprh</i> 遺伝子の試験管内転写、翻訳	
第5項	ノーザンブロットィング	
第6項	<i>eprh</i> 遺伝子の形質転換	
第7項	Campbell 型挿入変異	

第8項	<i>epr-eprh</i> キメラ遺伝子の作製	
第9項	ペプチドグリカンのアミノ酸分析	
第3節	結果	・ ・ ・ ・ ・ 87
第1項	<i>S. aureus eprh</i> 遺伝子のクローニング	
第2項	<i>eprh</i> 遺伝子の塩基配列	
第3項	<i>eprh</i> 遺伝子の転写活性	
第4項	エンドペプチダーゼに対する耐性	
第4節	考察ならびに小括	・ ・ ・ ・ ・ 89
第6章	<i>ale-1</i> 遺伝子と <i>epr</i> 遺伝子のプロモーター解析	・ ・ ・ ・ ・ 93
第1節	概要	・ ・ ・ ・ ・ 93
第2節	材料および方法	・ ・ ・ ・ ・ 93
第1項	使用菌株および培養条件	
第2項	プライマーエクステンション	
第3項	ノーザンブロッティング	
第4項	プロモーター転写活性の測定	
第3節	結果	・ ・ ・ ・ ・ 96
第1項	<i>ale-1</i> 、 <i>epr</i> 遺伝子の転写開始点	
第2項	<i>ale-1</i> 、 <i>epr</i> 遺伝子の各増殖期の転写量	
第3項	<i>ale-1</i> 、 <i>epr</i> 遺伝子のプロモーター転写活性	
第4節	考察ならびに小括	・ ・ ・ ・ ・ 97
総括		・ ・ ・ ・ ・ 105
参考文献		・ ・ ・ ・ ・ 108

序論

細菌の細胞壁は、細菌の形態と大きさを保持し、細胞質を保護する役割を担っており、グラム陽性菌の細胞壁は大部分がペプチドグリカンとよばれる網目状の構造物によって構成されている。一般に黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンは、*N*-acetyl-glucosamine と *N*-acetylmuramic acid が、交互に β -1,4 グリコシド結合したグリカン鎖を形成し、*N*-acetylmuramic acid に L-alanyl-D-glutamyl-L-lysyl-D-alanine のテトラペプチドがアミド結合している。さらに、そのテトラペプチドの L-lysine のアミノ基と、隣り合うテトラペプチドの D-alanine のカルボキシル基末端との間を glycine pentapeptide が、ペプチド結合して架橋しており（図 A）、その架橋度は 90%程度である。*Staphylococcus simulans* bv. *Staphylolyticus* が産生する lysostaphin は、glycine 5 量体よりなる架橋構造を切断する glycyglycine endopeptidase として知られており [32, 65, 66]、ブドウ球菌の分子生物学に欠くことのできない試薬として用いられている。

また、黄色ブドウ球菌はヒトの鼻腔や口腔に常在し、化膿性疾患の最も重要な起炎菌であり、近年ペニシリン系抗生物質に対して耐性を示す黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA）が院内感染の原因菌として臨床的に大きな問題となっている。MRSA に対する対策として、バンコマイシン等の MRSA にも有効な抗生物質が使われている。また、近年 lysostaphin も MRSA 感染症の治療薬に利用できるのではないかと研究が進められている。このような酵素は黄色ブドウ球菌の細胞壁の生理学を理解する上で欠かせないと同時に、細菌の代謝を阻害する事で殺菌する従来の抗生物質とは異なり、直接的に細菌を溶解する事で殺菌する次世代の細菌性の抗菌物質としての可能性もあり、このような酵素についての研究は重要であると考えられる。

Staphylococcus capitis EPK1 は lysostaphin と類似した 溶菌酵素 ALE-1 を産生する事が報告されている [82]。しかしその酵素の特異性や、なぜ産生株自身は溶菌しないのかについてはよく理解されていない。本研究では EPK1 の培養上清から *S. aureus* 溶菌活性を指標にして黄色ブドウ球菌溶解酵素 ALE-1 を精製し、その性状について検討した。また、その酵素による溶菌に対して耐性を担う遺伝子を同定、その機能について検討を行った。

- 1 : endo- β -*N*-acetylglucosaminidase
 2 : endo- β -*N*-acetylmuraminidase
 3 : *N*-acetylmuramyl-L-alanine-amidase
 4 : glycine endopeptidase

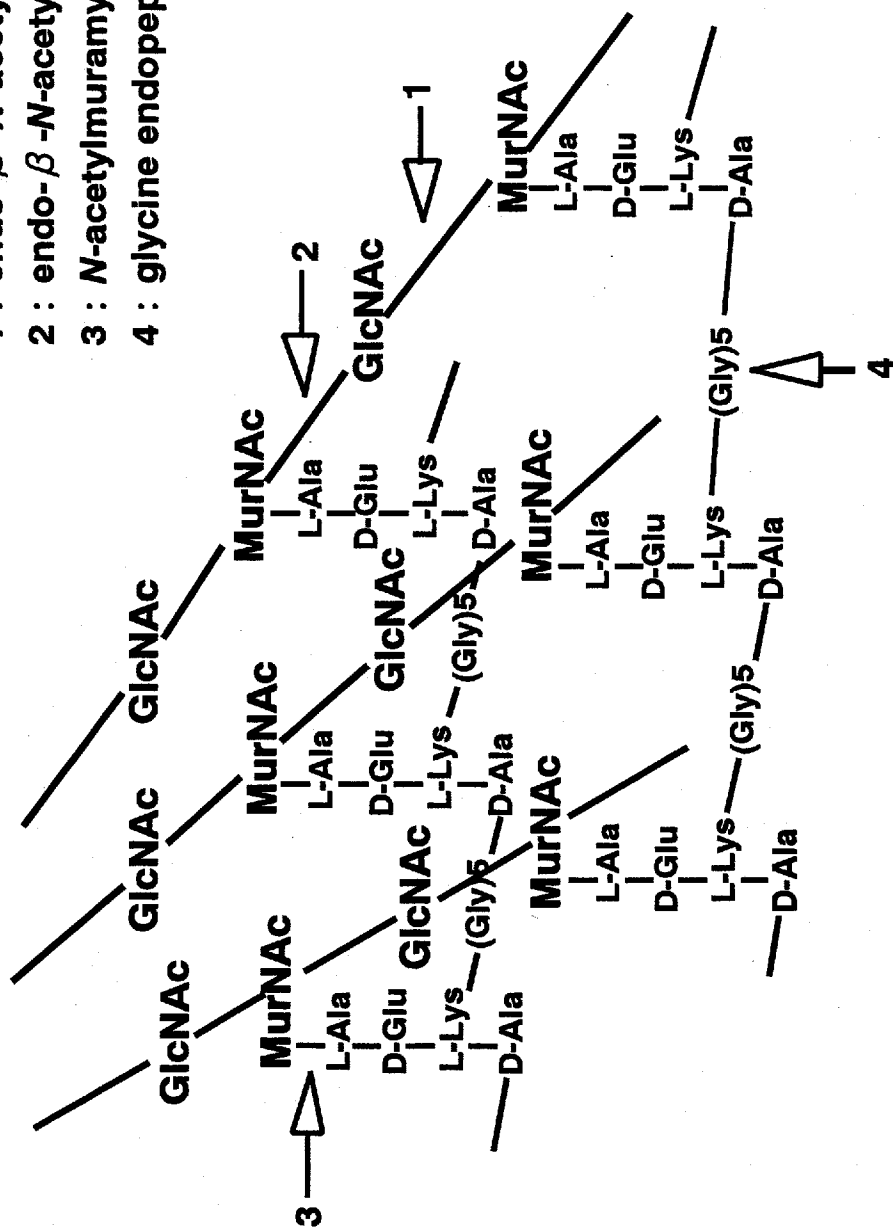


図 A 黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンの化学構造と細胞壁分解酵素の作用点

GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; MurNAc, *N*-acetylmuramic acid; Ala, alanine; Glu, glutamic acid; Lys, lysine; Gly, glycine

本論

第 1 章 溶菌酵素 ALE-1 の精製及び性状と *ale-1* 遺伝子のクローニング および塩基配列の決定

第 1 節 概要

多くの細菌種は *Staphylococcus* 属を特異的に溶解するペプチドグリカン加水分解酵素を産生する。これらの酵素の生理学的機能の多くは明らかにされていない。lysostaphin は *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* が産生する分子量 25,000 Da の溶菌酵素で、*S. aureus* のペプチドグリカンの架橋部分の glycylglycine の結合を加水分解することが知られている。本研究では *Staphylococcus capitis* EPK1 が菌体外に産生する新規の溶菌酵素 ALE-1 を、EPK1 の培養上清から *S. aureus* 菌体に対する溶菌活性を指標に精製し、その性状について検討した。また、ALE-1 をコードする遺伝子 *ale-1* をクローニングし、その塩基配列の決定を行った。

ALE-1 の溶菌活性の至適 pH は 7 から 9 であり、*S. aureus* ペプチドグリカン加水分解産物を DNFB 処理して得られた DNP 化産物の分析から、N 末端アミノ酸、C 末端アミノ酸ともに DNP glycine を検出し、ALE-1 は glycylglycine endopeptidase であることが明らかとなった。また、ALE-1 に対する抗血清は lysostaphin と交差反応を示した。*S. aureus* FDA209P あるいは *S. capitis* EPK1 を基質として ALE-1 の溶菌活性を検討したところ、ALE-1 は *S. aureus* 菌体を濃度依存的に溶解したが、*S. capitis* 菌体では、わずかにしか溶菌活性を示さなかった。様々な阻害剤を用いて *S. aureus* 溶菌活性に対する影響を検討したところ、*o*-phenanthroline、iodoacetic acid、diethylpyrocarbonate および Cu^{2+} は溶菌活性を阻害した。このことから、溶菌活性に histidine 残基が重要な役割を果たしていると考えられた。ALE-1 遺伝子の塩基配列から、*ale-1* は 362 個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードすることが推測された。N 末端アミノ酸配列は STKVDPKVE で、ALE-1 は 39.3 kDa の前駆体として合成され 35 位の alanine の後ろでプロセスされ、35.6 kDa の成熟型 ALE-1 として産生されることが明らかとなった。成熟型 ALE-1 の構造は lysostaphin の前駆体と非常に類似していた。ALE-1 の 1 次構造は N 末端に 13 個のアミノ酸からなる 6 回の繰り返し配列があり、C 末端領域を含む活性部位につながる。lysostaphin と異なり、ALE-1 は液体培養上清中で N 末端繰り返し配列部位ではプロセッシングを受けないが、アミノ酸配列の相同性検索から、ALE-1 は構造的、機能的に lysostaphin と非常に類似したプロテアーゼファミリーの一つであることが示唆された。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株および培養条件

菌株は *Staphylococcus capitis* EPK1 [82]、*Staphylococcus aureus* FDA209P、*Escherichia coli* JM109 [97] と *E. coli* XL1-Blue [7] を使用した。 *S. capitis* EPK1、*S. aureus* FDA209P は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) を用いて、*E. coli* JM109 と *E. coli* XL1-Blue は Luria-Bertani (LB) broth (yeast extract 5 g, polypeptone 10 g, NaCl 10 g per liter (pH 7.2)) を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要に応じて ampicillin (50 µg/ml) を添加した培地で培養を行った。

第2項 ALE-1 の精製方法

S. capitis EPK1 を TSB で定常期に達するまで 37°C で 18 時間培養した。その後、遠心 (10,000 x g, 30 min, 4°C) し、上清をメンブレンフィルター (pore size, 0.22 µm; Nihon Millipore Kogyo K.K., Yonezawa, Japan) でろ過し、80 % 飽和硫酸アンモニウム沈澱によって濃縮上清画分 (CCF 画分) を得た。CCF 画分を 10 mM リン酸バッファー (pH 7.0) (バッファー 1) で透析し、バッファー 1 で平衡化した TSKgel Blue-5PW (Tosoh, Tokyo, Japan) カラムに添加、バッファー 1 で洗浄後、1 ml/min のバッファー 1 から 1 M NaCl 含有バッファー 1 のリニアグラディエント溶出を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。得られた活性画分 (活性測定については後述) を 4°C、バッファー 1 で透析し、バッファー 1 で平衡化した TSKgel HA1000 (Tosoh) カラムに添加、バッファー 1 で洗浄後、1 ml/min のバッファー 1 から 0.5 M リン酸バッファー (pH 7.0) へのリニアグラディエント溶出をした。得られた活性画分を 4°C、バッファー 1 で透析し、7 倍量の冷アセトンを加え、-20°C で 30 分静置後、遠心 (12,000 x g, 30 min, 4°C) し、沈澱を乾燥させた。得られた沈殿物を 0.1 M Na₂SO₄ 含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) (バッファー 2) で溶解し、TSKgel G3000SW_{XL} に添加、0.5 ml/min のバッファー 2 で溶出した。得られた活性画分を 4°C、バッファー 1 で透析した。精製した酵素の純度は TSKgel phenyl 5PW 逆相カラムを用いて H₂O-CH₃CN-5 % トリフルオロ酢酸の比率が 90 : 10 : 1 のバッファー A から 40 : 60 : 1 のバッファー B の 30 分のリニアグラディエント溶出を用いて分析した。

第3項 抗 ALE-1 血清の作製

精製した ALE-1 (500 µg) を等量の Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) と混合しエマルジョン化した後、日本白色ウサギ (体重 2 kg) の皮下に注射した。2 週間後および 4 週間後に 100 µg の精製した ALE-1 を等量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.2 g, KH_2PO_4 0.14 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g per liter) と混合し再度注射した。抗血清は最初の注射から 5 週間後に採取した。

第 4 項 Zymography およびウエスタンブロッティングによる ALE-1 の検出法

SDS-PAGE は Laemmli の方法 [42] に従い、10 %のポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパク質は銀染色試薬 (Daiichikagaku, Tokyo, Japan) を用いて検出した。SDS-PAGE を用いた Zymography は *S. aureus* FDA209P 加熱処理菌体を 0.5 mg/ml になるように分離ゲルに封入し電気泳動をおこない、その後ゲルを十分量の精製水を用い室温で 30 分間緩やかに洗浄後、0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で 37°C でインキュベートした [52]。溶菌活性は immunoviewer MU (Jookoo Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) で透明なバンドとして検出した。ウエスタンブロッティングはミニトランスブロット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) を用いて行い、1 次抗体として 2,000 倍希釈の抗 ALE-1 血清を、2 次抗体として peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom) を用い、37°C で 1 時間反応後、Renaissance 4CN plus (Dupont NEN, Boston, MA, USA) を用いてバンドを検出した。タンパク質濃度は BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) を使用して決定した [71]。

第 5 項 ALE-1 の溶菌活性の測定

通常の溶菌酵素活性を測定する場合は、基質として *S. aureus* FDA209P の SDS 加熱処理菌体を使用した。いくつかの実験では *S. aureus* FDA209P の生菌、*S. capitis* EKP1 の SDS 加熱処理菌体、あるいはその生菌を使用した。SDS 加熱処理菌体の作製法は、被検菌を TSB 中で一晚 37°C で培養した培養液を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、得られた菌体を PBS で洗浄後、4 % SDS で懸濁し、1 時間沸騰水の中に静置後、PBS で 6 回洗浄し、SDS を可及的に除き、測定に使用した。活性の測定は、菌体を 0.1 M Tris-HCl バッファー (pH 8.5) に 1 mg/ml になるように懸濁し、その 2 ml にサンプルを加え 37°C でインキュベートした。経時的に濁度の減少を吸光光度計、595 nm の波長で測定した [78]。1 時間に吸光度を 0.25 から 0.125 に減少させるタンパク質量を 1 ユニットとした。

第 6 項 ペプチドグリカンの精製方法

S. aureus のペプチドグリカンの精製は Maidhof らの方法 [47] に準じて行った。被検菌を TSB 11 で一晚培養し、遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) 後、得られた菌体を PBS で洗浄、4 % SDS 30 ml に懸濁し、100°C で 30 分加熱した後、遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) した。菌体を精製水で 6 回洗浄後、3 倍量の PBS に懸濁し、glass beads (6 g/10 ml) を加え、cell homogenizer (B. Braun Biothec. Int., Melsungen, Germany) で output level 4 で 30 秒間、4 回で菌体を破碎した。その後、遠心 (2,000 x g, 15 min, 4°C) し、得られた上清に DNase (最終濃度 10 µg /ml)、MgCl₂ (最終濃度 20 mM) を加え、室温で 2 時間静置した後、トリプシン (最終濃度 100 µg /ml)、CaCl₂ (最終濃度 10 mM) を加え 30°C で 17 時間静置した。最終濃度 1 % になるよう SDS を加え、室温で 15 分間静置後、超遠心 (24,000 x g, 60 min, 18°C) し、沈査を 3 ml の精製水で 2 回洗浄後、3 ml の 8 M LiCl で洗浄した。さらに 3 ml の 100 mM EDTA (pH 8.0) で 1 回、精製水で 2 回洗浄後、アセトンで洗浄、得られたペプチドグリカンを凍結乾燥して実験に用いた。

第 7 項 ALE-1 によるペプチドグリカン切断部位の決定

精製した ALE-1 を用いてペプチドグリカン切断部位の決定をおこなった。精製したペプチドグリカンを 0.1M リン酸バッファー (pH 7.0) で 5 mg/ml になるように懸濁し、精製した ALE-1 を加え全量を 4 ml として 37°C でインキュベートした。経時的に濁度の変化を測定し、懸濁液を採取し、還元糖及び遊離アミノ基の測定を行った。還元法は Park-Jhonson の変法 [86] で、遊離アミノ基は 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を用いた Ghuyssen の方法 [18] によって求めた。ヒドラジン分解は乾燥させた検体を無水ヒドラジンと共に 100°C で 6 時間インキュベートすることにより行った。2,4-ジニトロフェニル (DNP) アミノ酸は薄層クロマトグラフィーにより分析した。まず室温で *n*-ブタノール - 1 % アンモニアで 2.5 時間展開し、その後乾燥させ、4°C でクロロホルム - メタノール - 酢酸 (85:14:1 (vol/vol/vol)) で 45 分間展開した。

第 8 項 ALE-1 の溶菌酵素活性に及ぼす様々な物質の影響

ALE-1 の溶菌酵素活性に及ぼす pH の影響を検討するために、溶菌活性の測定を種々のバッファー (0.1 M Tris-maleate (pH 4.74)、0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.025 M diethanolamine-HCl (pH 9.5)、0.025 M diethanolamin-HCl (pH 10.5)) を用いて行った。ALE-1 の溶菌酵素活性に及ぼす阻害剤の影響を検討するために、精製した ALE-1 をそれぞれの阻害剤と共に室温で 10 分間インキュベートし、その後 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) バッファー中の SDS 加熱処理菌体の懸濁液に加え、濁度の変化を測定した。それぞれの阻害剤の最終濃度は phosphoramidon 20

μ M、*o*-phenanthroline 10 mM、EDTA 10 mM、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM、benzamidinium 12.8 mM、dithiothreitol 10 mM、iodoacetic acid 0.1 mM、そして diethylpyrocarbonate 5 mM とした。diethylpyrocarbonate の影響は 0.1 M リン酸バッファー (pH 8.5) 中で検討した。

第 9 項 タンパク質分解能の測定

ALE-1 による pentaglycine 分解能を β -casein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA)、elastin-Congo red (Sigma)、pentaglycine (Sigma) を用いて検討した [35, 54]。カゼイン分解活性を検討するため、10 μ l の β -casein 液 (1 mg/ml in 25 mM ethanolamine-HCl バッファー (pH 9.5)) を ALE-1 あるいは lysostaphin と共に 37°C で 1 時間インキュベートした。その後、混合液の一部を 12 % のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行い、ゲルをクーマシーブルー染色液で染色した。エラスチン分解活性を検討するため、elastin-Congo red の懸濁液 (4.6 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM CaCl_2 (pH 7.5)) に様々な濃度の ALE-1 あるいは lysostaphin を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。その後遠心 (9,000 x g, 10 min) し、上清の吸光度を 495 nm の波長で測定した。pentaglycine の加水分解能は薄層クロマトグラフィーを用いて測定した [35]。pentaglycine を 4 mM になるように 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解し、50 μ l に 1.5 μ g の ALE-1 あるいは lysostaphin を加え、37°C で 5 時間インキュベートした。その後、5 μ l を PESIL G (0.25 mm; Whatman Ltd., Kent, England) の薄層クロマトグラフィーを用い、ブタノール - 酢酸 - 精製水 (4 : 1 : 1) で展開し、20 % ニンヒドリン / エタノールを吹き付け 80°C に熱して発色させた。

第 10 項 N 末端アミノ酸配列の決定

精製した ALE-1 のアミノ末端のアミノ酸配列を決定するために、N 末端アミノ酸シーケンスを行った。約 33 μ g の精製した ALE-1 タンパク質をアセトンを用いて沈澱濃縮し、SDS-PAGE で分離し、0.02 % SDS 含有 30 mM Tris-borate バッファー (pH 8.5) で Trans-Blot membrane (polyvinylidene difluoride membrane; Bio-Rad) に転写した [48]。転写した膜を 0.1 % クーマシーブルーで染色し、50 % メタノールで脱色、バンドを切り出し精製水で洗浄した。これをサンプルとし、Shimazu Gas Phase Protein Sequencer PSQ-1 (Shimazu, Kyoto, Japan) で N 末端シーケンスを決定した。N 末端 10 残基の相溶性検索は BLAST network service (National Center for Biotechnology Information) を使用した。

第 11 項 ALE-1 の亜鉛含有量の測定

精製した ALE-1 の亜鉛含量を Zeeman-effect 原子吸光光度計 (Hitachi 170-70; Nissei Sangyo, Co., Tokyo, Japan) で測定した。サンプルは硝酸で洗浄したプラスチックチューブにて Milli-Q-water (Millipore) を用いて作製した。3 回の測定結果を平均して含有量を決定した。

第 12 項 *S. capitis* EPK1 の DNA 調整

S. capitis EPK1 の染色体 DNA 及びプラスミド DNA の抽出は通法に準じて行った [63]。すなわち 100 ml の TSB で対数増殖期まで培養した *S. capitis* EPK1 を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、得られた菌体を 20 ml の CS バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) で洗浄し、5 ml の CS バッファーに懸濁、lysozyme を 60 µg/ml になるように添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後さらに proteinase K (最終濃度 0.1 mg/ml)、SDS (最終濃度 0.1 %) を加え 50°C、120 分間インキュベートした。次に等量の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) バッファー飽和フェノールで 3 回水層を抽出し、そこに 2 倍量の冷エタノールを加え遠心して得られた沈殿物を 70 % エタノールで洗浄後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に溶解して実験に用いた。

第 13 項 *ale-1* 遺伝子のクローニング

遺伝子ライブラリーの作製

S. capitis EPK1 の DNA を制限酵素 *Hind*III で部分消化後、0.7 % アガロースゲル電気泳動を行い、5-8 kbp の DNA 断片を Gene-clean Kit II (BIO 101, CA, USA) を用いてアガロースゲルから抽出した。制限酵素 *Hind*III で消化後 Shrimp alkaline phosphatase (Roche, Mannheim, Germany) 処理したクローニングベクター pUC19 に回収した DNA 断片を加え、T4 ligase (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 16°C で一晩インキュベートし、ライゲーションを行った。その後 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) と 2.5 倍量の冷エタノールを加え、-80°C で 15 分静置した後、遠心 (12,000 x g, 10 min, 4°C) することでエタノール沈澱を行い、70 % エタノールで洗浄後乾燥させ、TE バッファーに溶解した。得られたライゲーションサンプル 4 µl に *E. coli* JM109 のコンピテントセル 40 µl を混合し、129 Ω、2.0 kV の条件で Electro cell manipulator 600 (BTX Electroporation system, BTX Inc., San Diego, Calif., USA) を用いてエレクトロトランスフォーメーションを行った。直後に LB broth を加え 1 時間 37°C で静置し、その後 ampicillin (50 µg /ml) 含有 LB 寒天培地にまき、一晩 37°C で培養後、*lacZ* を発現しないことで白色になったコロニーを選択した。

溶菌活性の検出

溶菌活性を発現するコロニーを選択するため、得られた *E. coli* クローンを *S. aureus* FDA209P 加熱処理菌体 (0.5 mg/ml)、リゾチーム (4 mg/ml)、イソプロピル- β -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) (1 mM) 含有 1.5 % TSB 寒天培地にまいた。37°C で二晩培養後、コロニーの周囲に透明な溶菌斑ができているものを選択した [9, 23, 58, 80]。選択した形質転換株を IPTG 添加 LB 培地で対数増殖期後期まで培養し、遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) 後、10 mM PBS (pH 7.0) で懸濁し超音波破碎した。得られた細胞抽出画分の溶菌活性パターンは Zymography によって検出した [52]。

プラスミド抽出法 (煮沸法)

少量のプラスミド DNA を抽出するために煮沸法を行った。LB 寒天培地で 37°C 一晚培養した菌を白金耳でかきとり、TEST バッファー (8 % スクロース, 0.5 % トリトン X-100, 50 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) に懸濁し、8 μ l のリゾチーム (10 mg/ml) を加え攪拌、沸騰水浴中で 40 秒間処理した後、遠心 (12,000 x g, 10 min, 4°C) し、上清に 40 μ l の 10.5 M 酢酸アンモニウムと 165 μ l イソプロパノールを加え、-80°C で 15 分静置、遠心 (12,000 x g, 10 min, 4°C) 後、得られた沈殿を 70 % エタノールで洗浄後、乾燥させ、30 μ l の TE バッファーに溶解した。

サザンハイブリダイゼーションおよび PCR 反応

DNA を適当な制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動を行い、変性バッファー (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で 10 分間、20 分間と 2 回振とうさせた後、中和バッファー (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)) で 10 分間、20 分間の 2 回振とうした。その後、10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate (pH 7.0)) 存在下で Hybond-N Nylon membrane (Amersham Pharmacia) へ DNA の転写を行った。DNA を転写した膜を 5 x SSC を用い 5 分間室温で洗浄後、UV クロスリンカー (CL-1000 ULTRAVIOLET Cross Linker: Funakoshi, Tokyo, Japan) で処理した。プローブの標識とハイブリダイゼーションは ECL nucleic acid labelling and detection system (Amersham) を用い、化学発色によりバンドを検出した。検出には Fuji RX-U film (Fuji Film Co., Tokyo, Japan) を使用した。プローブとして ALE-1 の N 末端が欠損した DNA 断片を *Taq* DNA polymerase (Toyobo) を用いた PCR 反応により増幅、作製した。プライマーとして、5'-GGGGATCCGCTGCTCAATCT-3' と 5'-GGGAATCCCCCTTCGTGTTG-3' を用いた。

コロニーハイブリダイゼーション

得られた形質転換体のコロニーを 50 μ g/ml の ampicillin 含有 LB 寒天培地にプロットし 37°C で一晚培養し、得られたコロニーの上に Hybond-N Nylon membrane (Amersham) を 3 分間置き、菌体を膜に転写した。その後変性バッファーで 5 分間、中和バッファーで 10 分間、膜を放置し、5 x SSC で洗浄後、UV クロスリンカー (Funakoshi) で処理した。プローブの標識とハイブリダイゼ

ーション以後はサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

第 14 項 *ale-1* 遺伝子の塩基配列の決定

プラスミドの精製は plasmid miniprep kit (Bio-Rad) を用いて行った。塩基配列の決定を行うために部分欠失変異株の作製を TAKARA Kilo-Sequence Deletion Kit (Takara, Tokyo, Japan) を用いて以下の方法で行った [24]。

10 µg のプラスミドを 3'末端突出、5'末端突出の適当な制限酵素で消化後、等量のフェノール-クロロホルムを加え遠心 (12,000 x g, 10 min, 4°C) し、上清をエタノール沈澱し、得られた沈澱を 70 % エタノールで洗浄後、乾燥した。その後 100 µl の Exo III buffer で溶解し、1 µl の Exonuclease III (180 U/µl) を加え 37°C でインキュベート、1 分毎に 10 µl ずつ 100 µl の MB buffer に移し、65°C で 5 分間処理し酵素を失活させた。その後 2 µl の Mung Bean Nuclease (25 U/µl) を加え 37°C で 60 分間反応後、等量のフェノール-クロロホルムを加え遠心 (12,000 x g, 10 min, 4°C) し、上清をエタノール沈澱し、得られた沈澱を 70 % エタノールで洗浄後、乾燥した。得られた DNA 断片を 50 µl の klenow buffer で溶解し、1 µl の klenow fragment (2 U/µl) を加え 37°C で 15 分間反応後、エタノール沈澱し、得られた沈澱を 70 % エタノールで洗浄後、乾燥した。得られた DNA 断片を ligase (TAKARA) を用い、16°C で一晩インキュベートし、ライゲーションサンプルを 3'末端突出の制限酵素で消化後、第 13 項の方法で *E. coli* JM109 に形質転換した。得られた形質転換株のプラスミドを煮沸法で抽出し、適当な制限酵素で消化後、1 % アガロース電気泳動を行い、挿入断片の適当な長さの部分欠失変異株をスクリーニングした。

選択した部分欠失変異株からプラスミドを plasmid miniprep kit (Bio-Rad) を用いて抽出した。得られたプラスミドを鋳型として T7 DNA polymerase (Pharmacia, Tokyo, Japan) を用いた dideoxy chain-termination method [64] と Auto-Read sequencing Kit (Pharmacia) を用いて塩基配列の決定を行った。反応には pUC19 の *lacZ* 領域のマルチクローニングサイトの両端にアニールする Cy5 標識した universal primer 5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3' と reverse primer 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' を用いた。泳動には ALFred DNA sequencer (Amersham pharmacia biotech) を使用した。塩基配列決定、解析は ALF win™ Sequence Analyser (Amersham)、GENE WORKS 2.5.1 (IntelliGenetics, CA, USA) を用いた。

第 3 節 結果

第 1 項 ALE-1 の精製

S. aureus の産生する *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase [79] と endo- β -*N*-acetylglucosaminidase [78, 79]、*S. simulans* bv. *staphylolyticus* の産生する glycyglycine endopeptidase (lysostaphin) [77]、*B. subtilis* の産生する *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase [72] 等の溶菌酵素の精製には色素親和性カラムクロマトグラフィー担体を使用されている。そこで本研究でも *S. capitis* EPK1 の溶菌酵素を精製するために第一段階としてトリアジン系色素 Cibacron blue affinity gel 高速液体クロマトグラフィーを用いたところ、CCF 画分中の活性画分が TSKgel Blue-5PW カラムに結合した。この活性画分はバッファー中の塩濃度を上げることによって溶出した。次にこの活性画分を TSKgel HA1000 を用いてハイドロキシアパタイト HPLC にかけたところ、活性はカラムに結合し、リン酸バッファーの濃度を上げることによって溶出した。さらに、溶出画分を TSKgel G3000SW_{XL} カラムを用いて、ゲル濾過 HPLC にかけたところ、単一ピークとして溶出できた (図 1-1)。精製した酵素の純度を逆相 HPLC によって分析した結果、単一ピークとして示された (データ示さず)。精製サンプルを SDS-PAGE 後、銀染色したところ、分子量 48 kDa の単一バンドとして認められた (図 1-2a)。また、等電点アガロースゲル電気泳動の結果、その酵素の等電点は 9.0 であった。精製された酵素の N 末端アミノ酸配列は STKVDPKVE で、lysostaphin をはじめ既知のタンパク質との相同性は認められなかった。そこでこのタンパク質を新規溶菌酵素 ALE-1 と名付けた。*S. aureus* 菌体を封入したポリアクリルアミドゲルによる Zymogram で、ALE-1 に相当する位置に単一の溶菌活性バンドを認めた (図 1-2b)。また、ALE-1 に対する抗血清によるウェスタンブロッティングでは、CCF、精製した酵素で、48 kDa に単一バンドが認められ、*S. simulans* bv. *staphylolyticus* の産生する lysostaphin と交差反応を示した (図 1-2c)。精製をまとめたものを表 1-1 に示した。4つの段階を経ることによって、TSKgel G3000SW_{XL} カラムに示したように、Purification fold が 350 倍で、回収率が 32.7 %と、高い割合で精製され、31 培養から 156 μ g の酵素が精製できた。

第2項 ALE-1 によるペプチドグリカン切断部位の検討

S. aureus FDA209P あるいは *S. capitis* EPK1 を基質として ALE-1 の溶菌活性を検討したところ、ALE-1 は生菌および SDS 加熱処理した *S. aureus* 菌体を濃度依存的に溶解したが、*S. capitis* 菌体では生菌および SDS 加熱処理菌体両方とも、わずかにしか溶菌活性を示さなかった (図 1-3)。*S. aureus* の細胞壁に精製した ALE-1 を反応させたときの濁度と遊離アミノ酸および還元糖の変化を経時的に計測した。濁度が減少すると共に遊離アミノ酸が増加した (図 1-4)。このことより、ALE-1 は amidase かあるいは endopeptidase であると考えられた。さらに ALE-1 による *S. aureus* ペプチドグリカンの溶解反応中に生じた N 末端アミノ酸を決定するため、反応液の上清を DNFB 化した後加水分解し、薄層クロマトグラフィーで分析した結果 2,4-dinitrophenol-glycine を認めた。C 末

端アミノ酸をヒドラジン分解し分析すると同様に 2,4-dinitrophenol-glycine を認めた。これらのことから ALE-1 は glycylglycine endopeptidase であると示唆された。

第3項 ALE-1 の亜鉛含有量

lysostaphin は 1 分子中に 1 亜鉛原子を含有する zinc enzyme として報告されている [92]。ALE-1 は lysostaphin に抗原性や機能が似ているため、ALE-1 も亜鉛原子を含有するか否かを検討した。Zeeman-effect 原子吸光光度計で測定した結果、ALE-1 は 1 mol のタンパク質あたり、0.94 mol の亜鉛を含有する事が明らかとなった（データ示さず）。

第4項 溶菌酵素 ALE-1 の性状

pH 4.74 から pH 10.5 のバッファー中で溶菌活性を測定した結果、ALE-1 の至適 pH は 7 から 9 の間であり lysostaphin のそれとは異なっていた。SDS 加熱処理した *S. aureus* FDA209P 菌体を基質としたときの ALE-1、lysostaphin の溶菌活性におよぼす様々な阻害剤の影響を検討した(表1-2)。o-phenanthroline、iodoacetic acid および diethylpyrocarbonate が ALE-1 の活性を阻害し、他の serineprotease および thiolprotease inhibitor は影響を及ぼさなかった。lysostaphin についても同様の結果が得られた。10 mM の Cu^{2+} は ALE-1 の活性を完全に阻害し、また lysostaphin の活性も部分的 (39 %) に阻害した。一方、10 mM の Fe^{2+} では lysostaphin の活性は阻害したが、ALE-1 の活性は阻害しなかった。 Zn^{2+} は 5 mM 以上の濃度では沈澱するために測定は不可能だったが、1 mM でわずかに ALE-1 と lysostaphin の活性に影響を及ぼした。 Na^+ と NH_4^+ は ALE-1 の活性を増強したが、lysostaphin には影響しなかった。さらに *Pseudomonas aeruginosa* の産生する溶菌酵素の基質である β -casein、elastin、pentaglycine が ALE-1 の基質になり得るか否かを検討した。ALE-1 あるいは lysostaphin 65 $\mu\text{g/ml}$ まで、 β -casein を加水分解することのできるマイナーバンドは検出されず、基質として用いた β -casein のバンドの減少も見られなかった。組成の 3 分の 1 が glycine で占められる elastin についても elastin-Congo red を用いて ALE-1 と lysostaphin の活性を検討した。200 $\mu\text{g/ml}$ の ALE-1 あるいは lysostaphin を elastin-Congo red と 2 時間以上反応させた上清の Congo-red の濃度の増加は見られなかった。0.2 μmol の pentaglycine を基質とし 1.5 μg の酵素を 5 時間作用させても、ニンヒドリン反応したスポットは pentaglycine の位置にみられ、ほんのわずかの量しか triglycine、tetraglycine の位置に見られなかった。このことから ALE-1、lysostaphin は pentaglycine を加水分解しないと考えられた。

第5項 ale-1 遺伝子のクローニング

S. capitis EPK1 株の遺伝子ライブラリーは pUC19 を用いて作製し、*S. aureus* FDA209P の加熱処理菌体を含有したアガロースプレートにおける大腸菌形質転換株のブドウ球菌溶菌活性を指標にして、酵素をコードしている遺伝子をクローニングした。800 の形質転換株を 2 日間インキュベートしたところ、6 個のコロニーが溶菌斑を形成した。*S. aureus* FDA209P の加熱処理菌体を含有したゲルを用いた Zymography でこれら 6 個のクローンの溶菌活性を検討したところ、すべてのクローンの抽出画分で溶菌バンドが検出された。さらに、ウェスタンブロッティング解析でもすべてのクローン抽出画分の溶菌バンドに相当する位置のバンドが ALE-1 に対する抗血清と反応した。それらの形質転換株はいずれも 2 kbp の *Hind*III 断片を持っていた。そのうちの一つのプラスミドを pTF1 とした (図 1-5)。溶菌活性を示す最小の DNA 領域を決定するために、*Hind*III 断片の部分欠失変異株を作製し、pUC19 にクローニングした。pTF11、pTF12 と pTF15 を持った菌株が溶菌活性を示した (図 1-5)。一方 pTF13、pTF14 と pTF16 を持った菌株は溶菌活性を示さなかった (図 1-5)。溶菌活性を発現する DNA 断片をシーケンスした結果、その断片には不完全な open reading frame (ORF) が含まれていた。その ORF は N 末端が欠けていたので、pTF1 の *Hind*III 断片をプローブとして *S. capitis* EPK1 の DNA を再度スクリーニングし、6 kbp の *Eco*RI 断片を単離した。この *Eco*RI 断片を pUC19 にクローニングし pTF2 とした。pTF1 の *Hind*III 断片をプローブとして 6 kbp の *Eco*RI 断片の *Hinc*II 消化したものをスクリーニングし、3.5 kbp の *Hinc*II 断片を単離、pUC19 にクローニングし pTF3 とした。pTF2、pTF3 クローンは両方とも溶菌活性を発現した。pTF3 の *Hinc*II 断片の *Exo*III 部分欠失変異を両方向から行った。溶菌活性の発現と制限酵素地図から 3.5 kbp の *Hinc*II 断片に完全な ORF が含まれている事が示唆された。

第 6 項 *ale-1* 遺伝子の塩基配列決定と推定アミノ酸配列

クローニングした ALE-1 の ORF を含んだ DNA 断片を用いた DNA 塩基配列の決定により、362 個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードする ORF が明らかとなった。ORF の位置を図 1-5 に、ORF 全体を含む 1,540 bp の塩基配列と、推定アミノ酸配列を図 1-6 に示した。AGGAGGT の Shine-Dalgarno 配列が推定開始コドンの 9 塩基上流に見られた。ORF の上流にはプロモーターと推定される領域が見られた。TTGATA (160 から 165) 配列と TACATA (183 から 188) 配列はそれぞれ大腸菌で -35 と -10 のプロモーターとして機能すると考えられた。終止コドンの下流 1,337 から 1,379、1,392 から 1,432 に 2 つのループ構造をなす rho 非依存性推定ターミネーターが存在していた。GC 含量は 35.1 %であった。

推定アミノ酸配列の 36 位から 45 位の配列は、精製した ALE-1 から決定された N 末端アミノ酸配列と一致した。ATG コドンから始まるアミノ酸配列には、ALE-1 の決定された N 末端配列の前

に 35 残基のアミノ酸があり、ALE-1 が *S. capitis* EPK1 の細胞外に分泌されるタンパク質である事から、シグナル配列であると考えられた。362 個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードする ORF の推定分子量は 39,306 Da で、推定シグナル配列が切断されると 35,596 Da になると推測された。すべてのアミノ酸配列から推定される等電点 (pI) は 9.61 で、シグナル配列が切断されると pI は 9.62 になると考えられ、精製された ALE-1 の等電点と一致した。

ALE-1 の N 末端には 32 位から始まり 111 位まで 13 個のアミノ酸からなる 6 回の繰り返し構造を持っており、繰り返し構造の 2 つ目から 6 つ目まで完全に保存されており、最初の繰り返し構造では、N 末端側の 5 つが異なるアミノ酸であった (図 1-6)。

タンパク質相同性検索より、ALE-1 は *S. simulans* bv. *staphylolyticus* [14, 21] の産生する glycylglycine endopeptidase である lysostaphin と 50 %の同一性がある事が明らかとなった。これらの酵素は構造的にも類似しており、ALE-1 の繰り返し構造 (Glu-32 から Gln-111) と lysostaphin の繰り返し構造 (Glu-33 から Thr-222) はアミノ酸レベルで 23 %の同一性を示した。一方、ALE-1 の 199 から 362 の推定活性ドメインの同一性はアミノ酸レベルで 83 %であった (図 1-7)。lysostaphin は N 末端繰り返し構造がプロセッシングを受け、成熟型が溶菌活性を示すと言われている。成熟型 lysostaphin (Ala-119 から Lys-362) の N 末端アミノ酸に相当する Ala-119 からの N 末端繰り返し構造を欠失した ALE-1 に相当する DNA 断片を PCR 反応で作製、pUC19 にクローニングしたものを pTF4 とした。pTF4 をもった大腸菌株の抽出画分は低い分子量の溶菌バンドを示した (データ示さず)。

ALE-1 の 198 から 233 位の領域のアミノ酸の相同性は、*Lysobacter enzymogenes* β -lytic metalloendopeptidase [96]、*Achromobacter lyticus* β -lytic protease [44]、*P. aeruginosa* LasA [35, 69]、*E. coli* OrfU [34]、*Haemophilus influenzae* H10409 [17]、*Vibrio cholerae* TagE [40]、*H. somnus* LppB [86]、*H. influenzae* NlpD [17]、*P. aeruginosa* NlpD [84]、*Salmonella typhimurium* NlpD [59]、*Yersinia enterocolitica* NlpD [30]、*E. coli* NlpD [29, 41]、*P. putida* NlpD、*Syneccococcus elongates* Orf1 にも見られた (図 1-8)。アミノ酸配列において、ALE-1 の Gly-160、Try-198、His-200、Val-212、Gly-225 と His-233 が 16 個のすべてのタンパク質の配列で保存されていた。ALE-1 のアミノ酸配列と高く類似した領域は *S. aureus* amidase [94] の C 末端アミノ酸配列にも見られた。

lysostaphin は 42 kDa のタンパク質として産生、分泌され、後に培養上清中でプロセッシングを受け 25 kDa の成熟型酵素となると報告されている [23, 58]。また、そのプロセッシングは主に定常期で起こると言われている [58]。そこで様々な増殖期の *S. capitis* EPK1 の培養上清について Zymography と抗 ALE-1 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、すべての増殖期において、ALE-1 由来の一つのバンドだけを認めた (データ示さず)。このことから ALE-1 は液体培養上清中ではプロセッシングを受けない事が示唆された。

第7項 ALE-1はプラスミドにコードされている

lysostaphin は大プラスミドにコードされていると報告されている [21, 22]。ale-1 遺伝子もプラスミドにコードされているか否か検討した。pTF1 の HindIII 断片をプローブとして用いたサザンブロット解析より、その遺伝子が大プラスミドにコードされる事が示唆された(データ示さず)。S. capitis EPK1 を ethidium bromide で 42°Cで処理したプラスミド脱落株は ALE-1 を産生しなくなった。この株で同様にサザンブロット解析を行うと、HindIII 断片とハイブリダイゼーションするプラスミド DNA のバンドが消失していた (データ示さず)。この事からも ale-1 遺伝子はプラスミドにコードされることが示唆された。

第4節 考察ならびに小括

本章では S. capitis EPK1 が産生する glycylglycine endopeptidase である ALE-1 の精製、塩基配列決定および性状について述べた。ALE-1 と lysostaphin は両酵素とも S. aureus のペプチドグリカンの glycylglycine 部分を加水分解する溶菌活性を示した。しかし、pentaglycine や β -casein などを含む広い基質特異性を持つ他の溶菌酵素 LasA や LasD [35,54] と違い、これらの酵素は β -casein、elastin、pentaglycine を基質として認識しなかった。

S. capitis EPK1 の ale-1 遺伝子は N 末端にシグナル配列を持ち、その下流に 13 個のアミノ酸からなる 6 回の繰り返し構造を持つ、分子量 39,306 Da の前駆体酵素をコードしていた。成熟型 ALE-1 の推定分子量は 35.6 kDa であるが、SDS-PAGE で 48 kDa の位置に検出されるのは、N 末端側の glutamic acid に富んだ繰り返し配列があるために SDS との結合が弱まり、SDS-PAGE での泳動度が小さくなるためと考えられた。このことは、N 末端繰り返し配列を欠失した ALE-1 が SDS-PAGE で 28 kDa の位置に検出され、これはアミノ酸配列から推定される分子量 26.7 kDa と一致する事からも支持された。

成熟型 ALE-1 の構造は lysostaphin の前駆体と非常に類似していた (図 1-7)。どちらも N 末端側に繰り返し構造を持ち、C 末端側で活性部位につながる。lysostaphin と異なり、ALE-1 は培地中で N 末端繰り返し構造のプロセッシングを受けず、ALE-1 と prolysostaphin の N 末端繰り返し構造は繰り返しの回数が異なっているが、図 1-9 に示したように、どちらの 2 次元構造も 13 個のアミノ酸からなる α -helix 構造をとっており、その構造を形成している極性と非極性アミノ酸は、非常によく似た周期的な極性アミノ酸のクラスターを作っていることが明らかとなった。本研究では ALE-1 が産生株の細胞表層にあり、また 3 M LiCl 処理で抽出することができる事を発見した。この事から、ALE-1 は産生株の細胞表層とイオン結合していると示唆された。また、ALE-1 と

prolysostaphin の N 末端繰り返し領域は細胞表層のリガンドとの結合に関与し、酵素が分泌された後、細菌の細胞表層に貯留するために必要である可能性が考えられた（データ示さず）。

ALE-1 と lysostaphin の活性がともに diethylpyrocarbonate あるいは iodoacetic acid で阻害されたことから、lysostaphin 同様、ALE-1 の溶菌活性に histidine が重要な役割を果たしていると考えられた。lysostaphin とのアミノ酸配列の比較から、124、150、194、200、231、233 そして 327 位の 7 つの histidine 残基が保存されている事が明らかとなった。124、194、200、231 そして 233 位の histidine は lysostaphin の推定される活性領域に存在しており [94]、さらに 200 と 233 位の histidine は 16 個のタンパク質の 38 アミノ酸からなる高く保存された領域にあり、すべてのタンパク質で保存されていた（図 1-8）。様々なタンパク質中の histidine 残基は亜鉛の結合部位であり、溶菌活性に重要であると報告されている [11, 27, 92]。高く保存された 38 アミノ酸領域を持つタンパク質の中で ALE-1、lysostaphin [32, 93] および LasA [35] は endopeptidase であり、溶菌活性を示す。lysostaphin は 1 分子中に 1 つの亜鉛原子を含有する事が報告されている [91]。原子吸光光度計で測定した結果、ALE-1 も亜鉛原子を含有する事が示唆された。LasA は metalloenzyme であると言われている [54]。高く保存されている 38 アミノ酸領域を持つ 16 個のタンパク質のうち、7 個がグラム陰性細菌の NlpD/LppB 領域に含まれている。しかし、これら NlpD/LppB の生理学的機能は明らかになっていない。大腸菌内で NlpD を過剰発現させると大腸菌の形態が樽型になり最終的に溶菌を起こすことから、NlpD も細胞壁溶解機能を有するかもしれないと考えられた [41]。これらのことから、保存されたモチーフ Tyr-X-His-X₁₁-Val-X₁₂₂₀-Gly-X_{5,6}-His を持つタンパク質は新規の細菌亜鉛プロテアーゼファミリーを作っていることが示唆された。

小括

1. *Staphylococcus capitis* EPK1 の上清から *S. aureus* を選択的に溶解する溶菌酵素 ALE-1 を精製した。
2. SDS-PAGE における泳動度から ALE-1 は 48 kDa のタンパク質で、等電点は 9.0、至適 pH は 7-9 であった。
3. *S. aureus* ペプチドグリカン加水分解産物の分析から、ALE-1 は glycylglycine endopeptidase であることが明らかとなった。
4. ALE-1 に対する抗血清は lysostaphin を認識した。
5. ALE-1 の溶菌活性には histidine 残基が重要であることが明らかとなった。
6. DNA 塩基配列の決定より ALE-1 は 362 個のアミノ酸残基からなり、39.3 kDa の前駆体として合成され 35 位の alanine の後ろでプロセスされ、35.6 kDa の成熟型 ALE-1 として産生されることが明らかとなった。

7. ALE-1 は N 末端側に 13 個のアミノ酸からなる 6 回の繰り返し構造を持っており、C 末端側で活性ドメインと結合している、構造的、機能的に lysostaphin に類似した酵素である事が明らかとなった。
8. *ale-1* 遺伝子は *S. capitis* EPK1 の持つプラスミド上に存在することが示唆された。

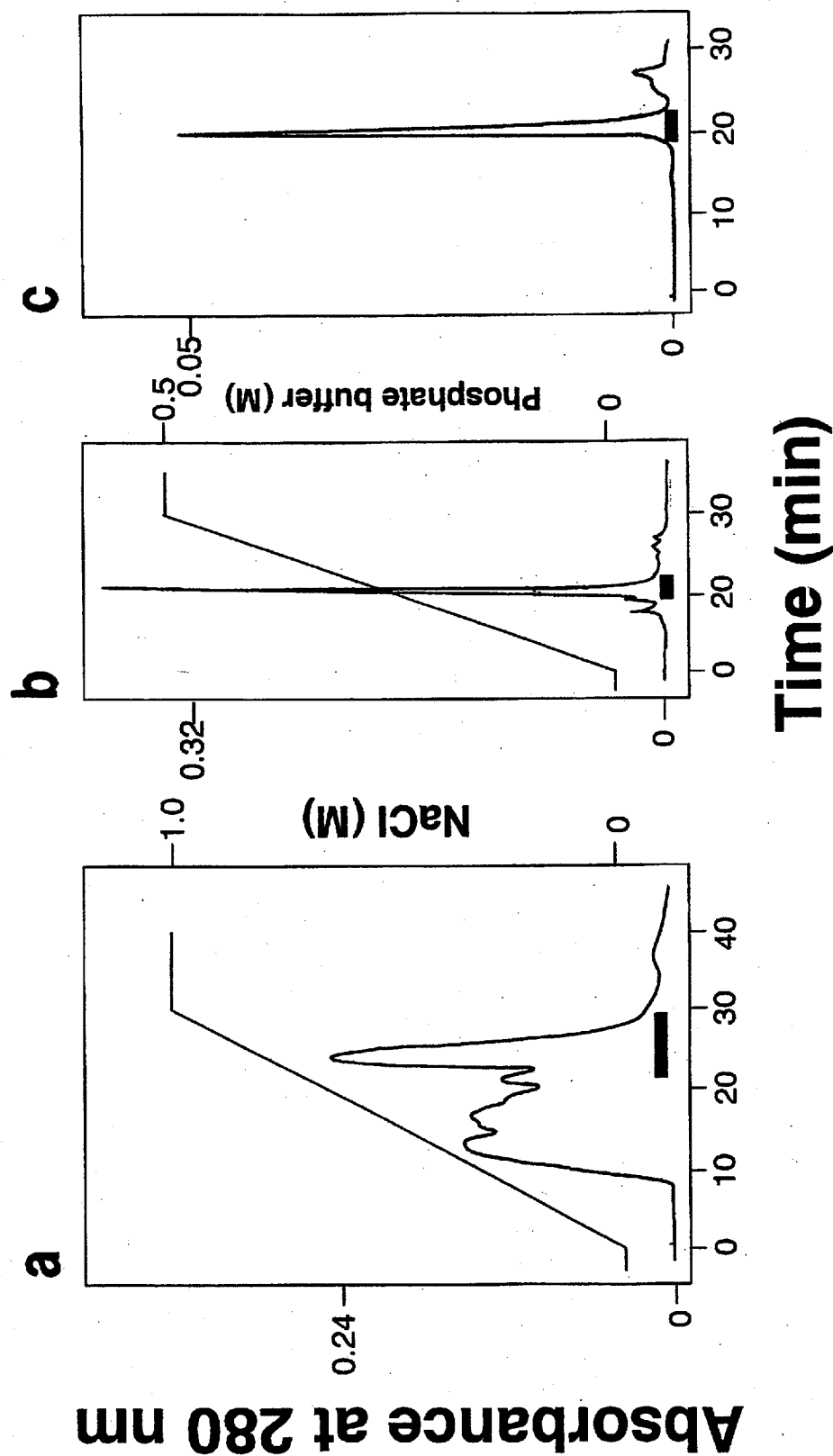


図 1-1 トリアジン系色素親和性 HPLC、ハイドロキシアパタイト HPLC、ゲル濾過HPLCによる溶菌酵素の精製

(a) 濃縮上清画分 (CCF画分) をCibacron blue affinity カラムに通し溶出を行った。(室温で60 ml/hでTSKgel Blue-5PWに通した)。A液は0.01 M リン酸バッファ (pH 7.0) をB液は1 M NaCl含有0.01 M リン酸バッファ (pH 7.0) を用い、0分から30分でB液 0 %から100 %のグラデーションで溶出を行った。(b) TSKgel Blue-5PWから得られた活性画分を、ハイドロキシアパタイトカラムに通し溶出を行った。(室温で60 ml/hでTSKgel HA1000に通した)。A液は0.01 M リン酸バッファ (pH 7.0) を、B液は0.5 M リン酸バッファ (pH 7.0) を用い、0分から30分でB液 0 %から100 %のグラデーションで溶出を行った。(c) TSKgel HA1000から得られた活性画分をゲル濾過HPLCカラムに通した (室温で30 ml/hでTSKgel G3000SW_{XL}に通した)。0.1 M NaCl含有0.1 M リン酸バッファ (pH 7.0) を用いた。下線は溶菌活性を持つピークを表す。

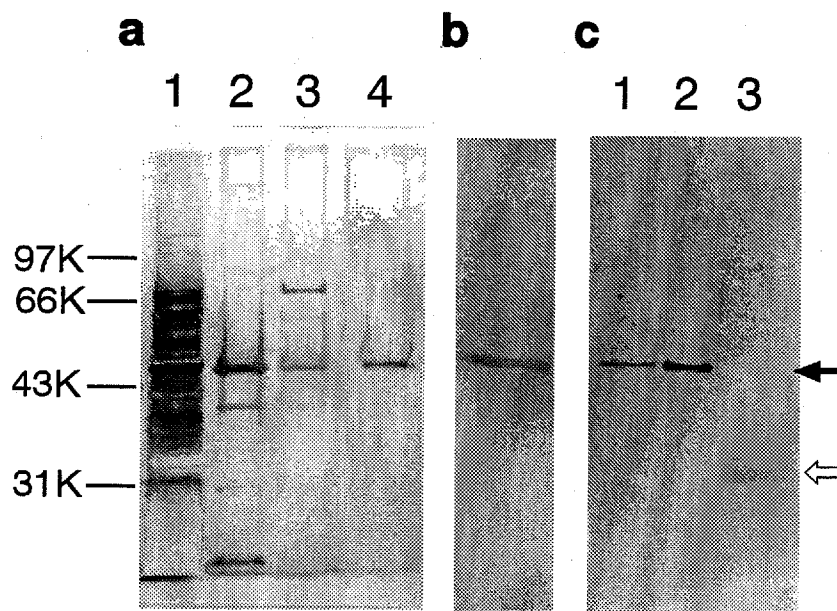


図 1-2 溶菌酵素の銀染色、Zymography、ウエスタンブロットによる検討

(a) 様々な精製過程における活性画分について10%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGE後、銀染色した。レーン: 1, *S. capitis* EPK1のCCF画分; 2, TSKgel Blue-5PWの溶出画分; 3, TSKgel HA1000から溶出した活性画分; 4, TSKgel G3000SW_{XL}から溶出した精製酵素。(b) *S. aureus* FDA209P 加熱処理菌体を封入した12%ポリアクリルアミドゲルを用いた Zymographyにて、精製酵素の溶菌活性を検出した。(c) CCF画分、精製酵素、lysostaphinを精製酵素に対する抗ALE-1血清を用い、ウエスタンブロットを行った。レーン: 1, *S. capitis* EPK1のCCF画分; 2, 精製酵素 (0.9 μ g) ; 3, lysostaphin (5 μ g) ; \blackleftarrow , 精製酵素、 \blackleftarrow , lysostaphin

表 1-1 溶菌酵素の精製効率

Sample	Protein (μ g)	Sp activity (U / μ g)	Purification (fold)	Yield (%)
CCF	153,120	0.001	1	100
Blue-5PW	496	0.25	250	75.1
HA1000	172	0.32	320	32.8
G3000SW _{XL}	156	0.35	350	32.7

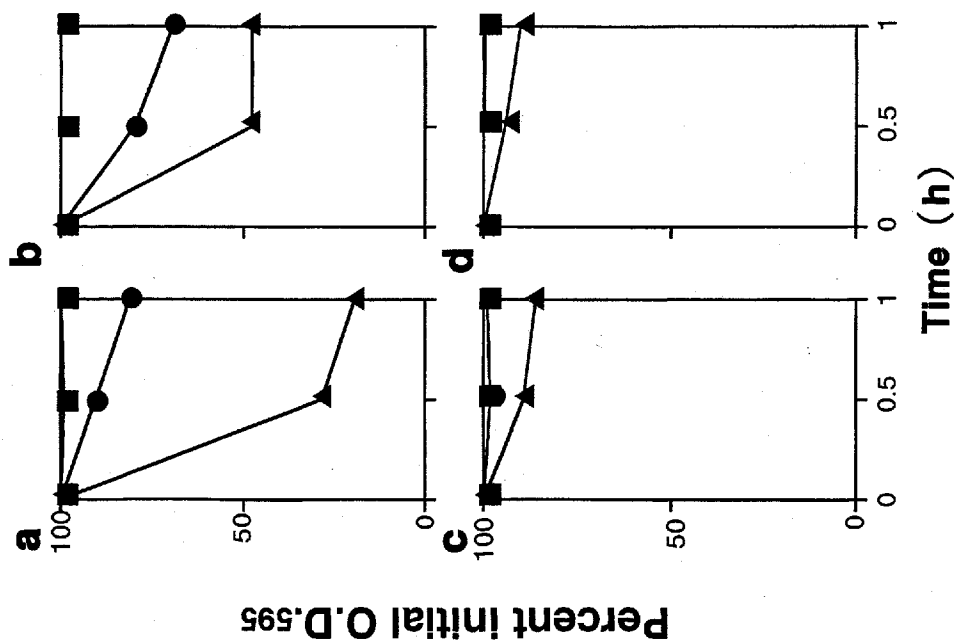


図 1-3 精製ALE-1の溶菌活性

濁度の減少によりそれぞれの菌体に対する精製ALE-1の溶菌活性を測定した。*S. aureus* FDA209P の (a) 生菌 (b) 加熱処理菌、*S. capitis* EPK1 の (c) 生菌 (d) 加熱処理菌を使用し、精製したALE-1と共に2 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 中でインキュベートした。精製ALE-1濃度: ■, 100 µg/ml; ●, 10 µg/ml; ▲, 1 µg/ml

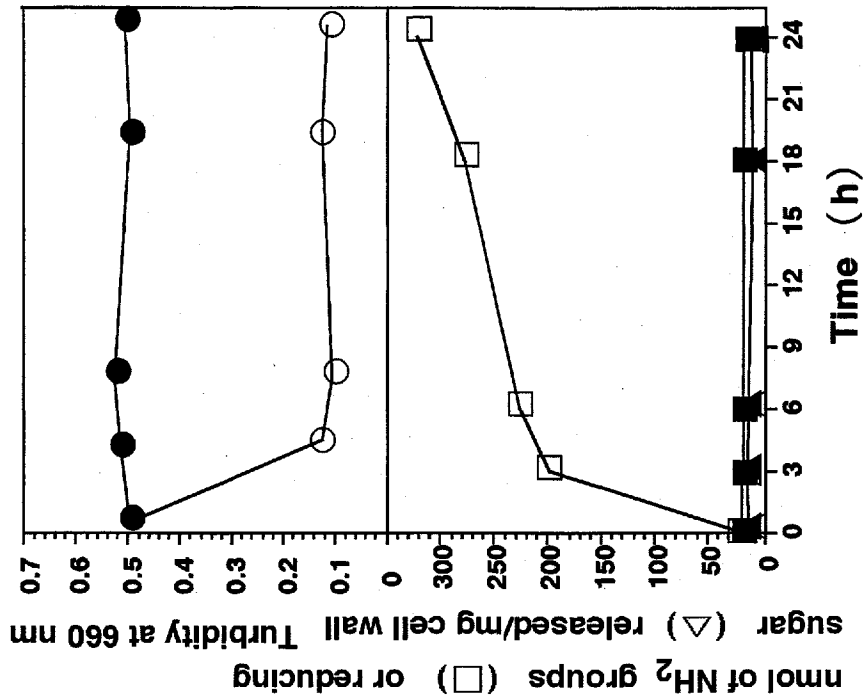


図 1-4 *S. aureus* FDA209P 細胞壁の精製ALE-1による溶解

精製 *S. aureus* 細胞壁 (5 mg/ml) の0.1 Mリン酸バッファー (pH 7.0) 懸濁液に精製ALE-1を190 µg添加、全量を3.5 mlとし、37°Cでインキュベートしたときの濁度と遊離アミノ酸および還元糖の変化を経時的に計測した。○, 濁度; □, 遊離アミノ酸量; △, 還元糖。●, 100 µg/ml, ▲, ALE-1非添加

表 1-2 ALE-1および lysostaphinの溶菌活性に及ぼす様々な因子の影響

Modulator	Concn (mM)	Remaining staphylolytic activity (%)	
		ALE-1	lysostaphin
None	10	100	100
1,10-phenanthroline	10	6.3	17.2
EDTA	0.02	94.2	100.9
Phosphoramidon	1	117	105
Phenylmethanesulfonylfluoride	12.8	99.1	103.4
Benzamidine	10	91	90.3
Dithiothreitol	10	81.2	96.6
Iodoacetic acid	0.1	0	2.8
Diethylpyrocarbonate	5	4.5	0
Mg ²⁺	10	93.3	87
Mn ²⁺	10	110.8	77
Cu ²⁺	10	0	38.8
Fe ²⁺	10	113.3	8.2
Na ⁺	10	150.8	108.4
NH ₄ ⁺	10	153.3	103.3
Ca ²⁺	10	85.6	82.4

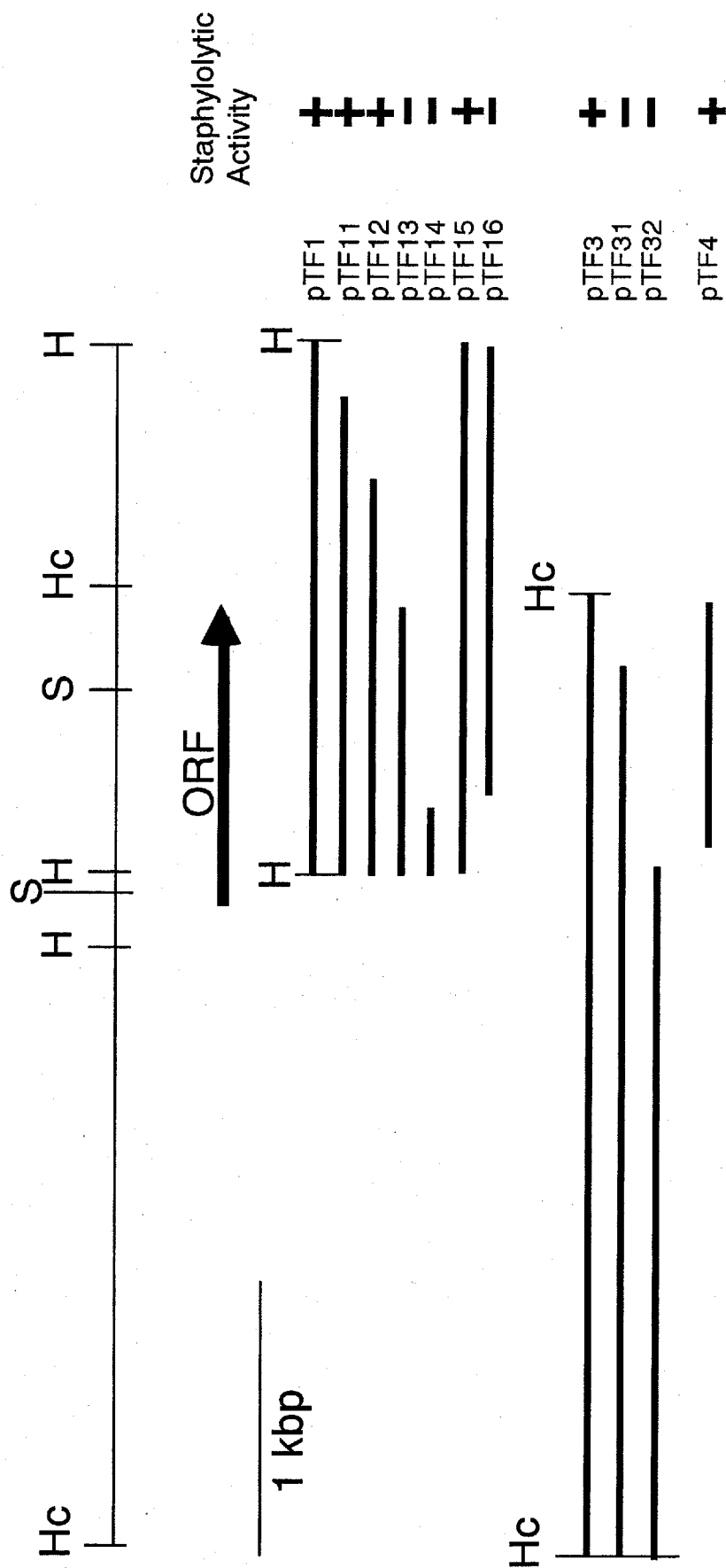
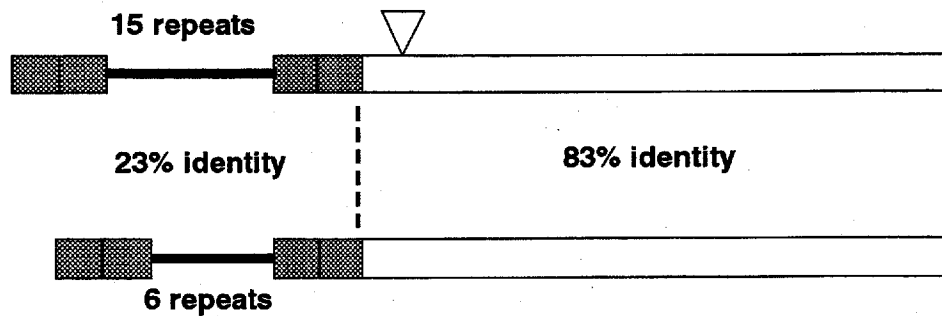


図 1-5 *ale-1* 遺伝子構成と組み換えプラスミド保有株抽出画分の溶菌酵素活性

太い矢印がORFとその転写の方向を示す。H, *HincII*; Hc, *HincII*; S, *Sau3AI*。それぞれの組み換えプラスミドを持つ *E. coli* XL1-Blueの抽出画分についてZymographyで溶菌活性を調べた。+, 溶菌バンドあり; -, 溶菌バンドなし

Lysostaphin *S. simulans* bv *staphylolyticus*



ALE-1 *S. capitis* EPK1

prepolysostaphin	LKKTNNYYT TRPHTCSTT AASIVYGGT QETHASENS NMDVSKKVAE	50
preALE	MDTNRKFTLV KSEITLCTT EVGSLFLT NEIASASTL	38
prepolysostaphin	VETSKPPVEN TAEVETSKAP VENTAEEVETS KAPVENTAEV ETSKAPVENT	100
preALE	-----	38
prepolysostaphin	AEVETSKAPV ENTAEVETSK APVENTAEVE TSKAPVENTA EVETSKAPVE	150
preALE	-----	47
prepolysostaphin	NTAEVETSKA PVENTAEVET SAPVENTAE VETSKAPVEN TAEVETSKAP	200
preALE	APAKADAPV ECAAPAKADA PVECAAPAK VCAAPVECA PAKVAPVE	97
prepolysostaphin	VENTAEVETS KAPVENTAEV ETSKALVQNR TALRAATHEE SAQWNNYKH	250
preALE	CAAPAKADAP K-----V EQKRTFIRE- AAQSN SASWNNYKH	134
prepolysostaphin	GYGCGPYPLK INGG EYGVDFEYNGGTPYK AITSQKIVEA GSNYGGSHQ	300
preALE	GYGCGPYPLK INGG EYGVDFEYNGGTPYR AITSQKIVEA GSNYGGSHQ	184
prepolysostaphin	EKLLENDGVH RQYMHLSKY NVKYCDYKA GQITCWSGGT GYSTAPHEH	350
preALE	EKLLENDGVH RQYMHLSKF NVKYCDYKA GQITCWSGGT GYSTAPHEH	234
prepolysostaphin	QRMNLSFSS TAQDPNPELK SAGYKAGGT VTPTPATQW INKYGTLYKS	400
preALE	QRMNLSFSS TAQDPNPELK SAGYS--SNS TSSSNANGV INKYGTLYKS	282
prepolysostaphin	ESASTTATID TITP TQPER SMQSGVLRK QETHHYDEVM KQSGVWYGY	450
preALE	ESASTTATID TITP TQPER SMQSGVLRK QETHHYDEVM KQSGVWYGY	332
prepolysostaphin	TQNSQDREYS PVRTWNSIN TEGVFWGTIK	480
preALE	NTNSQDREYS PVRTWNSIG EGVFWGTIK	362

図 1-7 ALE-1とlysostaphinのアミノ酸配列の相同性

ALE-1とlysostaphinは13個のアミノ酸からなる繰り返し配列の数が違うが、それ以外は非常に類似したアミノ酸配列をとっていた。■, 同一アミノ酸; ■, 類似アミノ酸; ▽, prepolysostaphinのシグナルペプチド切断部位; △, ALE-1のシグナルペプチド切断部位; ▼, polysostaphinのプロセッシングの切断部位; ●, 保存されたhistidine残基

A.1. protease	VGGAHTNTGS	GNYPMSLDM	SRGGGWSNQ	NGNWSASAA	-GSFKRHSSC	261
L. e. metalloprotease	VGGAHTNTGS	GNYPMSLDM	SRGGG--SNQ	NGNWSASAA	GGSFKRHSSC	548
lasA	PNGAHFEHGS	GYPYSSFDA	SY--DWPRWG	SATYSVVAAH	AGTVRVLSRC	301
prepolysostaphin	-YGVDFFMNI	GTPVKAISS	GK-----IVE	AGWSNYGG--	GNOI-----	301
preALE	-YGVDFFMNV	GTPVRAISD	GK-----IVE	AGWTNYGG--	GNEI-----	185
E. c. orfU	-RGVDFAMPQ	GTPVLSVGD	GE-----V-V	VAKRSGAA--	-GY-----	199
H10409	-KGVDFSVSQ	GTPVIAPAD	GT-----VEK	VAYQAGGA--	-GRY-----	382
tagE	-HGIDFPAAI	GTPIYSPAD	GV-----VEA	IRVSTQGS--	-GNF-----	199
E. coli Nlpd	-KGIDIAGSK	GQAIITAD	GR-----VVY	AGNALRGY--	-GNL-----	313
H. influenza Nlpd	-KGIDISGR	GQAVKAAAA	GR-----IVY	AGNALRGY--	-GNL-----	339
S. typhi Nlpd	-KGIDIAGSK	GQAVATAD	GR-----VVY	AGNALRGY--	-GNL-----	53
H. somnus lppB	-KGIDISGR	GQAVNAAAA	GR-----VVY	AGDALRGY--	-GNL-----	279
Y. enterocolitica Nlpd	----DIAGSR	GQPIFATAN	GR-----VVY	AGNALGGY--	-GNL-----	31
P. aeruginosa Nlpd	-KGIDIAQGL	GQPVLAASG	GT-----VVY	AGSGLRGY--	-GEL-----	231
P. putida Nlpd	-KGIDIAQDL	GQPVFAASD	GA-----VVY	AGSGLRGY--	-GEL-----	41
S. e. orf1	-RGLDYAGPK	GSAVVAAQR	GR-----VAL	VGRESQGLI	HGNT-----	215
Consensus	--G.D....	G.PV.A...	G-----VV.	AG....G--	-G.....	550
A.1. protease	FAEIVHTGGW	STTYHLMNI	QYNTGANISM	NTAIANPANT	QAQALCNCQD	311
L. e metalloprotease	FAEIVHTGGW	STTYHLMNI	QYNTGANISM	NTAIANAPNT	QAQALCNCQD	598
lasA	QVRVTHPSGW	ATNYHMDQI	QVSNQGVSA	DTKLGVYAGN	INTALCEGSS	351
prepolysostaphin	-GLIENDGVH	RQWYHLSKY	NVKVGDYKA	GQIIGWSGST	-----GY	342
preALE	-GLVENDGVH	RQWYHLSKF	NVKVGDYKA	GQIIGWSGST	-----GY	226
E. c. orfU	-VAIRHGRSY	TTRYHRLKI	LVKPGQYKR	GDRIALSGNT	-----GR	240
H10409	-VMLRHGREY	QTVYHLSKS	LVKAGQYKK	GERIALSGNT	-----GI	423
tagE	-MRLQHTYGF	SSSYHLSKF	SVKEGDFYK	GELIAYSGNT	-----GL	240
E. coli Nlpd	-IIIKHNDDY	LSAYHNDTM	LVREQQYKA	GQKIATMGST	-----GT	354
H. influenza Nlpd	-IIIKHNDDF	LSAYHNDKI	LVADQQYKA	GQDIAMGSS	-----GT	380
S. typhi Nlpd	-IIIKHNDDY	LSAYHNDTM	LVREQQYKA	GQKIATMGST	-----GT	94
H. somnus lppB	-IIIKHNDSY	LSAYHNSI	LVKDQQYKA	GQQIAKMSS	-----GT	320
Y. enterocolitica Nlpd	-IIIKHNDDY	LSAYHNDTM	LVREQQYKA	GQKIATMGST	-----GT	72
P. aeruginosa Nlpd	-VIKHNETY	VSAYHNRRL	LVREGQYKV	GQSIAEMSG	-----GT	272
P. putida Nlpd	-IIIKHSDTY	VSAYHNRRL	LVREGQYKA	GQSILKW-VY	-----GT	81
S. e. orf1	-VGIDHGQGV	LTIIYHLDQI	RVQEQYVEA	GEVIGTVGNT	-----GA	256
Consensus	---I.H....	---Y.H....	LV..GQ..KA	GQ..IA..G.T	-----G..	600
A.1. protease	STGPHLHNSL	K-----	-----	-----Q	---NG---	325
L. e metalloprotease	STGPHLHNSL	K-----	-----	-----Q	---NG---	612
lasA	STGPHLHNSL	L-----	-----	-----Y	---NG---	365
prepolysostaphin	STAPHLHFOR	MVNSFSNSTA	QDMPFLKSA	GYGKAGGTVT	PTPNTGWKTN	392
preALE	STAPHLHFOR	MTNSFSNNTA	QDMPFLKSA	GYG--SNSTS	SSNNNGYKTN	274
E. c. orfU	STGPHLHYEV	WINQ-----	---QAVNPL	T-AK-----L	PRT-EG---	269
H10409	STGPHLHYEF	HING-----	---RAVNPL	T-VK-----L	PCTSSG---	453
tagE	SSGPHLHYEI	RFLG-----	---KSLDPH	PFIKWNYDNF	SEITNK---	276
E. coli Nlpd	SS-TRLHFEI	R-----	-----	-----Y	---KG---	367
H. influenza Nlpd	NT-VKLHFEI	R-----	-----	-----Y	---KG---	393
S. typhi Nlpd	SS-TRLHFEI	R-----	-----	-----Y	---KG---	107
H. somnus lppB	NT-IKLHFXI	R-----	-----	-----Y	---FG---	333
Y. enterocolitica Nlpd	SS-VRLHFEI	R-----	-----	-----Y	---KG---	85
P. aeruginosa Nlpd	DR-VKLHFEI	R-----	-----	-----R	---QG---	285
P. putida Nlpd	DR-VKLHFEI	R-----	-----	-----RQETR	---RS---	98
S. e. orf1	ATGPHLHNSL	YV-----	-----	-----	---NG---	270
Consensus	ST.PHLHFE.	-----	-----	-----	---G---	650
S. aureus amidase			ESSASSNTVK	PVASAWKRNK	YGLYMEESA	1000
prepolysostaphin			---AGGTVTP	TPNTGWKTNK	YGLYKSESA	403
preALE			---SNSTSS	SNNNGYKTNK	YGLYKSESA	285
Consensus			---AS..T..	..N.GWKTNK	YGLYKSESA	1000
S. aureus amidase	RITNGNQPT	VRKVSPEIT	SCFVGYQFQFG	YCDYTEVMLQ	DGHVWVGTYW	1050
prepolysostaphin	SFTPTNDIIT	RTITPEPESM	PQSGVLKAGD	TIHYDEVMLQ	DGHVWVGTYG	452
preALE	SFTPTNDIIT	RLTGTPESM	PQSGVLKAGD	TIHYDEVMLQ	DGHVWVGTYT	334
Consensus	SFTPTNDIIT	R.TGTPESM	PQSGVL..G	TI..DEVMLQ	DGHVWVGTYT	1050
S. aureus amidase	EGQRYLYLPI	RTWNCSAPPN	QILQDWEGET			1079
prepolysostaphin	NSGQRYLYLPV	RTWNKST---	NTLEGVWGTET	K		480
preALE	NSGKRYLYLPV	RTWNKST---	GELEGVWGTET	K		362
Consensus	NSG.R.YLYLPV	RTWNKST---	..LG..WGTET	K		1081

図 1-8 ALE-1 アミノ酸配列の他のタンパク質との相同性

ALE-1 の一部分は他のタンパク質と相同性を示した。□, 保存されたアミノ酸 略語: A. 1. protease, β -lytic metalloprotease from *A. lyticus*; L. e. metalloprotease, β -lytic metalloprotease from *L. enzymogenes*; lasA, LasA from *P. aeruginosa*; prepolysostaphin, lysostaphin precursor: H10409, *H. influenzae* hypothetical protein; E. c. orfU, *E. coli* orfU; tagE, *V. cholerae* ToxR-activated gene, tagE; Nlpd of *E. coli*, *H. influenzae*, *S. typhi*, *H. somnus*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *P. putida*; S. e. orf1, *S. elongatus* orf1, *S. aureus* amidase, *S. aureus* N-acethylmuramyl-L-alanine amidase encoded in *lytA*

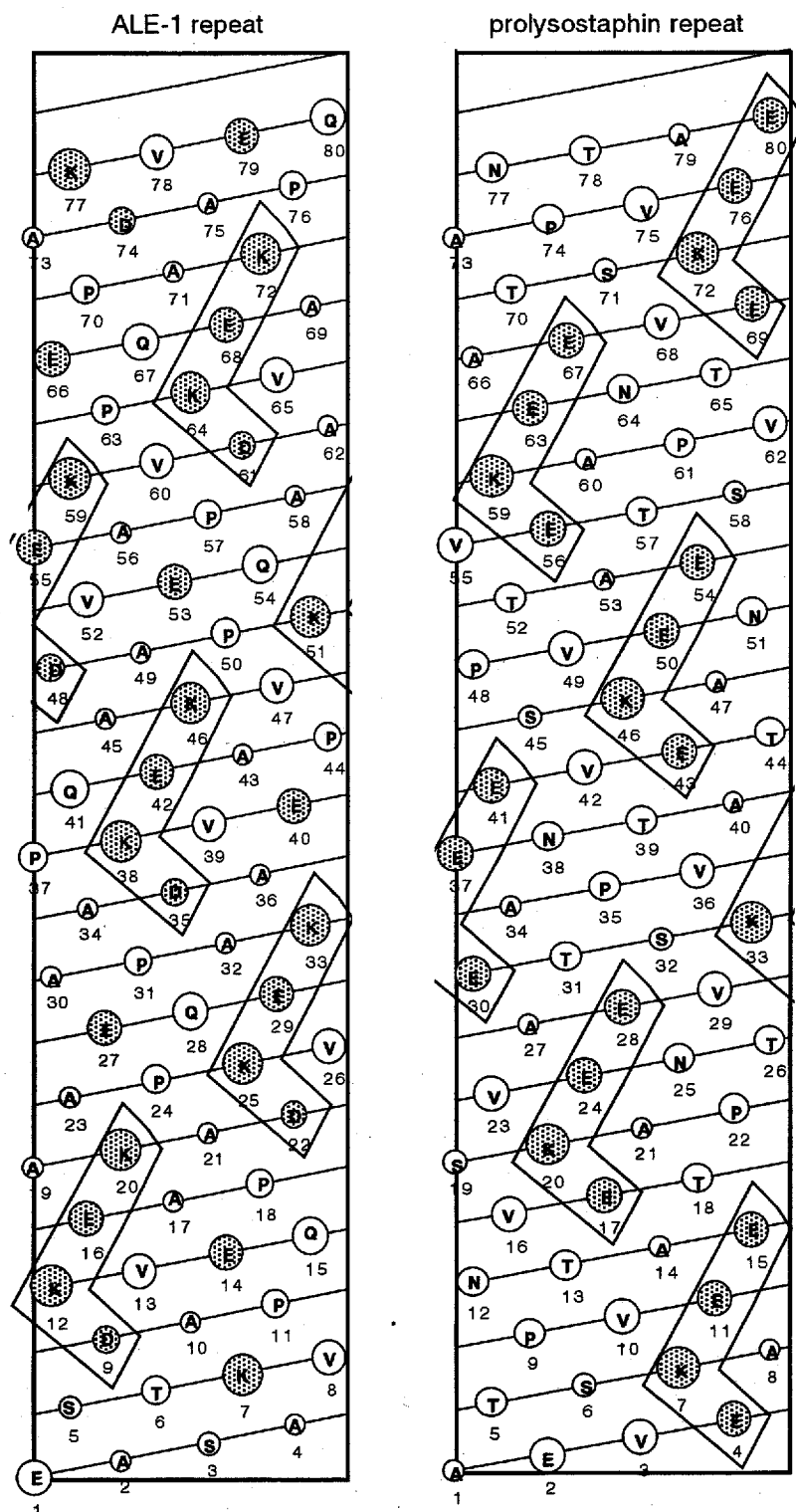


図 1-9 ALE-1とpolysostaphinの繰り返し配列の2次元 α -helical 構造

ALE-1 (32位から111位) とpolysostaphin (40位から130位) の80アミノ酸からなる繰り返し構造の α -helixをとる2次元構造を示した。対角の線は右側と左側を繋ぎ、 α -helixの360°の回転を表す(100°/1残基)。アミノ酸の円の大きさは疎水性に基づいて示してある。●, 極性アミノ酸; ◇, 極性アミノ酸のクラスター

第 2 章 ALE-1 の機能解析

第 1 節 概要

第 1 章で精製した溶菌酵素 ALE-1 を構成する各部位の機能について検討を行った。

ALE-1 は N 末端側に 13 個のアミノ酸からなる 6 回の繰り返し構造を、C 末端側に活性ドメインを持っている (図 2-1A)。両者に挟まれた活性部位を含む領域に亜鉛プロテアーゼを含む 18 個のタンパク質でよく保存された 38 アミノ酸配列が存在する。中でも Tyr-X-His-X11-Val-X12/20-Gly-X5-6-His 配列は 18 個のタンパク質に共通したモチーフとして存在する (図 2-1B)。ALE-1 の溶菌活性は diethyl pyrocarbonate、iodoacetic acid によって阻害されることから histidine 及び tyrosine が活性に関与すると考えられる。N 末端繰り返し配列を除いた ALE-1 分子 (Δ N-term ALE-1) 中には、亜鉛の結合サイトになり得るアミノ酸である histidine が 7 個、tyrosine が 1 個存在する。そこで、どの histidine あるいは tyrosine が活性に関与するのかを明らかにするため PCR-Mutagenesis 法を用い、これらのアミノ酸を一つずつ alanine に置き換え、変異酵素を作製した。これらの His-tag 融合タンパク質を大腸菌で発現、精製した後、Zymography、濁度法による溶菌活性測定、*S. aureus* 菌体への結合能、CD スペクトルを測定した。その結果 38 アミノ酸配列に存在する 150、200、231、233 位の histidine を alanine に置換したものの溶菌活性が消失した。しかしどの変異酵素も *S. aureus* 菌体への結合能には変化がなく、CD スペクトルにも大きな変化が見られなかった。これらのことから、150、200、231、233 位の histidine が ALE-1 の溶菌活性に重要であることが明らかとなった。

ALE-1 は N 末端繰り返し領域、中心部分の活性領域及び C 末端 92 アミノ酸配列の大きく 3 つの領域に分けられる (図 2-1A)。C 末端 92 残基のアミノ酸配列 (92AA) は lysostaphin や amidase の C 末端に存在する細胞壁選択的結合部位と相同性の高い、基質細胞への標的ドメインと考えられた。また、ALE-1 の N 末端繰り返し構造は lysostaphin [23, 58] のそれと、予想される 2 次元構造も類似しており、細胞表層のリガンドとの結合に関与している可能性が考えられた。これら各領域の機能について検討するため、His-tag をつけた様々な組み換え ALE-1 を作製した。これらのタンパク質を大腸菌で発現、精製し、菌体への結合能、溶菌活性、CD スペクトルを測定した。その結果 92AA を欠いた ALE-1 は N 末端の繰り返し配列の有無に関わらず、溶菌活性は著しく減少したが完全に消失はしなかった。また、92AA の欠失に伴う CD スペクトルの大きな変化は認められなかった。以上のことから、ALE-1 が作用する時には 92AA は必要条件ではないが、より効率良く溶菌活性を発揮するのに必要であることが示唆された。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株および培養条件

菌株は *S. aureus* FDA209P、*E. coli* XL1-Blue [7]、*E. coli* M15 (pREP4) (QIAGEN, Tokyo, Japan) を使用した (表 2-1)。*S. aureus* は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems) を用いて、*E. coli* は Luria-Bertani (LB) broth (yeast extract 5 g, polypeptone 10 g, NaCl 10 g per liter (pH 7.2)) を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要に応じて ampicillin (100 µg/ml)、kanamycin (25 µg/ml) を添加した培地で培養を行った。

第2項 *ale-1* 遺伝子の PCR-Mutagenesis

ALE-1 の N 末端繰り返し配列を除いた *ale-1* 遺伝子 (Δ N-term ALE-1) を含む DNA 断片を *S. capitis* EPK1 の DNA を鋳型として Expand™ High Fidelity PCR System (Roche) を用いた PCR 反応により増幅、pGEM-T Easy Vector System (Promega Co., Madison, WI, USA) を用いて TA クローニングを行った。プライマーとして ALEU と ALER を用いた。使用したプライマーの配列は表 2-2 に示す。pGEM-T Easy vector にクローニングした DNA 断片を、プライマーに組み込んだ配列を認識する制限酵素で消化し、Gene-clean III Kit (BIO 101) を用いて切り出し、pQE30 expression vector (QIAGEN) の His-Tag 配列の下流に読み枠を合わせて組み込んだ。PCR-Mutagenesis [31] は、それぞれの histidine あるいは tyrosine をコードする DNA 配列に alanine の配列をもったプライマーを重複してアニールさせる方法で変異を導入した (図 2-2)。まず、それぞれの変異 DNA 断片を作製するために、 Δ N-term ALE-1 が組み込まれた pQE30 プラスミドを鋳型に 2 回の PCR 反応を行った。即ち一方のプライマーセットは鋳型プラスミドの *ale-1* 遺伝子上流のベクター部分の相補鎖にアニールする pQE-UV (プライマー 1) と変異部分の reverse プライマー (プライマー 2) を、他方のプライマーセットは *ale-1* 遺伝子下流のベクター部分にアニールする pQE-RV (プライマー 4) と変異部分の reverse プライマーと相補的な universe プライマー (プライマー 3) をそれぞれ用いた。その後、得られた変異を含んだ部分的な *ale-1* 遺伝子断片を Gene-clean III Kit (BIO 101) を用いてアガロースゲルから切り出し、次の PCR 反応の鋳型として用いた。2 回目の PCR 反応はプライマー pQE-UV と pQE-RV 存在下で行った。2 つの変異を含んだ部分的な *ale-1* 遺伝子断片が重複する領域でアニールし、それぞれが最初のプライマーとして働き、完全な変異 *ale-1* 遺伝子ができ、次にそれを鋳型として pQE-UV と pQE-RV で増幅した。得られた変異 *ale-1* 遺伝子断片は野生型の

ale-1 遺伝子断片と同様にして pQE30 に組み込んだ。それぞれの変異 *ale-1* 遺伝子は第 1 章、第 2 節、第 13 項に準じて Thermo sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit (Amersham pharmacia biotech) を用い、Cy5 標識 pQE-UV、pQE-RV プライマーで、その塩基配列を確認した。また、得られたプラスミドは第 1 章、第 2 節、第 13 項の方法により、*E. coli* M15 (pREP4) に形質転換した。

第 3 項 各部位を含んだ組み換え ALE-1 の作製

シグナル配列を除くすべての領域を含んだ ALE-1 (full ALE-1)、C 末端 92 アミノ酸配列を除いた ALE-1 (Δ C-term ALE-1)、N 末端繰り返し配列を除いた ALE-1 (Δ N-term ALE-1)、N 末端、C 末端両方の領域を除いた ALE-1 (Δ N,C-term ALE-1)、C 末端 92 アミノ酸のみ (92AA)、それぞれの His-Tag 融合タンパク質を作製するために、表 2-2 に示したプライマーを用いて第 2 項の方法によりそれぞれの大きさの *ale-1* 遺伝子を PCR 反応で増幅、pQE30 に組み込み、*E. coli* M15 (pREP4) に形質転換した。

第 4 項 His-tag 組み換えタンパク質の精製法

それぞれのプラスミドを形質転換した *E. coli* M15(pREP4)を LB broth 500 ml で 37°C で $OD_{600}=0.5$ になるまで振とう培養し His-tag 組み換えタンパク質を発現させるために IPTG を 1 mM になるように添加し、4 時間培養した。その後遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、菌体を溶解バッファー B (8 M 尿素, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) 10 ml で懸濁、室温で 30 分間振とうした後、Ultrasonic disruptor (TOMY SEIKO, Tokyo) で菌体を破碎した。遠心 (25,000 x g, 40 min, 4°C) 後、上清に Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を加え、室温で 30 分間振とうして結合させた後、Ni-NTA Agarose を 5 倍量の洗浄バッファー C (8 M 尿素, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3) で洗浄した。結合した His-tag 組み換えタンパク質の溶出は溶出バッファー E (8 M 尿素, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-HCl, pH 4.5) で行った。得られた溶出画分は 4 M 尿素含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で透析し、その後段階的に尿素的濃度を落としていった 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で透析し、最終的に尿素を除いて実験に用いた。

第 5 項 溶菌酵素活性の測定

得られた Δ N-term ALE-1、または様々な変異型 ALE-1 の溶菌活性を Zymography [52] と濁度法によって測定した。Zymography は第 1 章、第 2 節、第 4 項に準じて行った。濁度法は基質として

S. aureus FDA209P cell の SDS 加熱処理菌体を用いて、第 1 章、第 2 節、第 5 項に準じて行った。

第 6 項 結合能の測定

基質として SDS 加熱処理菌体を用いた。*S. aureus* FDA209P を 4 % SDS で 100℃、1 時間処理し、その後菌体を PBS で 6 回洗浄した。得られた SDS 加熱処理菌体を 0.1 M iodoacetic acid 含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で $OD_{595}=1.0$ になるように懸濁し、その 100 μ l に組み換えタンパク質を加え、4℃で 1 時間インキュベートした。その後、菌体を 0.1 M iodoacetic acid 含有 0.1 M リン酸バッファーで 3 回洗浄し、4 % SDS で菌体に結合した組み換えタンパク質を溶出、15 % ポリアクリルアミドゲルに添加後 SDS-PAGE を行い、クーマシーブルー染色した。結合した組み換えタンパク質の定量はイメージスキャナーを用いてコンピューターにゲルの像を取り込み、NIH image 1.52 で数値化した。

第 7 項 トリプシン消化に対する感受性

それぞれの組み換えタンパク質を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で 0.05 μ g のトリプシン (Nakarai tesque, Kyoto, Japan) と 37℃で 30 分間インキュベートした。その後 12 %ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離した。

第 8 項 CD スペクトロメトリー

第 4 項の方法で精製した組み換えタンパク質の CD スペクトルを円偏光二色性分散計 J-600 (Nihonbunko, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

第 9 項 亜鉛およびマグネシウム含量の測定

第 4 項の方法で精製した組み換えタンパク質を硝酸および硫酸で加熱分解した後、希硝酸で溶解して定量用とした。その溶液についてシーケンシャル型 ICP 発光分光分析装置 SPS4000 (Seiko Instruments, Tokyo, Japan) で ICP 発光分光分析法を用い亜鉛およびマグネシウムを測定し、試料中の含有量 (μ g/ml) および 1 分子当たりの金属イオンの数を求めた。

第 3 節 結果

第1項 ΔN-term ALE-1 の過剰発現

前駆体 lysostaphin は培養上清中に分泌される時、N 末端繰り返し領域がプロセッシングを受け、成熟型 lysostaphin となる [23, 51, 58, 88]。前駆体 lysostaphin の N 末端繰り返し領域は溶菌活性には必須ではないと報告されている [23]。lysostaphin と異なり、ALE-1 は培養上清中でプロセッシングを受けない。しかしながら、精製した ALE-1 を 4°C で 3 日間保存しておく、タンパク質のプロセッシングが起こり、SDS-PAGE でラダーなタンパク質バンドが観察された (図 2-3)。Zymogram による解析より、27 kDa のタンパク質バンドが強い溶菌活性を持つ事が明らかとなった。このバンドを Trans-Blot 膜に転写後切り出し、Gas Phase Protein Sequencer で N 末端アミノ酸配列を決定した。アミノ酸シーケンスは F-V-R-E-A-A-Q-S で、ALE-1 の 115 位の phenylalanine (F) からの配列と一致した。N 末端アミノ酸配列と推定分子量から、27 kDa のタンパク質は ALE-1 の N 末端繰り返し領域がプロセスされたものだということが分かった。このプロセッシングがオートプロセッシングなのか、混在した他の酵素の働きなのかは依然明らかではないが、ALE-1 の N 末端繰り返し領域は溶菌活性には必須ではない事が分かった。

そこで N 末端繰り返し配列を除いた ALE-1 (F115-K362) をコードする DNA 断片を PCR 反応で増幅、pQE30 ベクターの 6xHis-tag 配列の下流に読み枠を合わせてクローニングした。IPTG で誘導後、分子量約 30 kDa の溶菌酵素を発現、Ni-NTA Agarose で精製し、ΔN-term ALE-1 とした。

第2項 ΔN-term ALE-1 の PCR-Mutagenesis

ALE-1 は 124、150、195、200、231、233、327 位に lysostaphin にも保存されている 7 つの histidine を持っている (図 2-1B) [23, 58]。さらに 200、233 位の histidine、198 位の tyrosine は ALE-1 の推定活性領域に存在し、相同性の高い 38 アミノ酸配列を含む 18 個のタンパク質でも保存されていた (図 2-1B)。そこでこれらのうち、どのアミノ酸が溶菌活性に重要であるのかを検討するために、ΔN-term ALE-1 の 124、150、195、200、231、233、327 位の histidine、198 位の tyrosine を PCR-Mutagenesis によってそれぞれ alanine に置き換えた変異酵素を作製した。図 2-1B に示したように、ALE-1 の 150 位の histidine は *P. aeruginosa* の LasA では glutamine、いくつかの菌種の NlpD では asparagine となっていた。また、ALE-1 の 231 位の histidine はいくつかの菌種の NlpD では lysine あるいは arginine であった。このことから、ΔN-term ALE-1 の 150 位の histidine は glutamine あるいは asparagine、231 位の histidine は lysine あるいは arginine にも変換した。

第3項 様々な大きさの ALE-1 の His-tag 組み換えタンパク質

ALE-1 や lysostaphin の C 末端領域は *S. aureus* の amidase LytA と相同性がある [94]。この領域は細胞壁結合領域と考えられている [94]。Schneewind ら [3] はこの配列が lysostaphin の *S. aureus* への選択的結合に関与すると報告している。また、ALE-1 の N 末端繰り返し構造は、lysostaphin のそれとは回数が異なっているが、どちらの繰り返し配列も α -helix 構造をとる 13 個のアミノ酸からなっており、細胞表層のリガンドとの結合に関与し、酵素が分泌された後、細菌の細胞表層に貯留するために必要であると考えらる。そこで、シグナルペプチドを除いたすべての領域の full ALE-1 と、ALE-1 から C 末端領域を欠損させた Δ C-term ALE-1、ALE-1 から N 末端繰り返し領域を欠損した Δ N-term ALE-1、 Δ N-term ALE-1 から C 末端領域を欠損させた Δ N,C-term ALE-1、そして ALE-1 の C 末端領域の 92 残基のアミノ酸からなる 92AA、それぞれの His-tag 組み換えタンパク質を作製した。

第 4 項 野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 のトリプシン消化

Δ N-term ALE-1 の histidine や tyrosine の alanine への変換が構造に変化を与えるかどうかを検討するために、野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 をトリプシンで 37°C 30 分間処理した。野生型 Δ N-term ALE-1 と変異型 Δ N-term ALE-1 では、その消化パターンに変化は見られなかった（データ示さず）。

第 5 項 野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の溶菌活性

Δ N-term ALE-1 のアミノ酸置換による溶菌活性への影響を見るために、野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 について Zymography と濁度法により検討した。その結果、150、200、231、233 位の histidine を alanine に置換したものの溶菌活性が消失した（図 2-4）。150 位を glutamine あるいは asparagine、231 位を lysine あるいは arginine に置換したのも同様の結果を示した（データ示さず）。

第 6 項 野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の *S. aureus* 菌体への結合能

Δ N-term ALE-1 の histidine や tyrosine の変換が酵素の *S. aureus* 菌体への親和性に影響を及ぼすか否かを決定するために、野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の *S. aureus* FDA209P 菌体への結合能を検討した（図 2-5）。湿重量 2 mg *S. aureus* FDA209P SDS 加熱処理菌体と飽和しない量 (25×10^{-11} mol) のそれぞれのタンパク質をインキュベートした。その結果、ど

の変異酵素も *S. aureus* SDS 加熱処理菌体への結合能には変化は見られなかった。

第7項 野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の CD スペクトロメトリー

Δ N-term ALE-1 のアミノ酸置換により、いくつかの変異酵素はその活性を消失した。この活性への影響がそれぞれ一つの histidine あるいは tyrosine を変換した事による 3 次元構造の変化によるものなのか否かを検討するため、野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の円偏光二色性を測定した。どの CD スペクトルも同様の結果となり、 Δ N-term ALE-1 のアミノ酸置換による 3 次元構造の変化は起こらないと考えられた (図 2-6)。

第8項 野生型 Δ N-term ALE-1 と様々な変異型 Δ N-term ALE-1 の亜鉛およびマグネシウム含量

lysostaphin は 1 分子中に 1 mol の亜鉛原子を含有する zinc enzyme として報告されている。ALE-1 についても亜鉛を含有する事が明らかとなっている。そこで、 Δ N-term ALE-1 の含有する重金属 (Zn, Mn, Fe, Co, Mg, Cd, Ni, Cu) の元素定量分析を行った。その結果、野生型 Δ N-term ALE-1 で亜鉛およびマグネシウムを合計 1 mol 含有している事が明らかとなった。亜鉛の結合サイトと考えられている histidine、tyrosine をそれぞれ alanine に変換した様々な変異型 Δ N-term ALE-1 についてもこれらの金属イオンの含量を測定したところ、変異型 Δ N-term ALE-1 では必ずしも亜鉛とマグネシウムの合計は 1 mol にはなっておらず、その溶菌活性と亜鉛、マグネシウムの含量には関連性は見られなかった (表 2-3)。

第9項 様々な組み換え ALE-1 の *S. aureus* 菌体への結合飽和曲線

ALE-1 が活性を発揮するために *S. aureus* 菌体を認識し、結合するのに、ALE-1 の各領域がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、full ALE-1、 Δ C-term ALE-1、 Δ N-term ALE-1、 Δ N,C-term ALE-1、そして 92AA、それぞれのタンパク質について湿重量 1 mg の *S. aureus* SDS 加熱処理菌体に対する結合実験を行い、その飽和曲線を求めた (図 2-7)。full ALE-1 は 18×10^{-11} mol で、 Δ C-term ALE-1 は 10×10^{-11} mol で、 Δ N-term ALE-1 は 25×10^{-11} mol で湿重量 1 mg の *S. aureus* SDS 加熱処理菌体に対する結合が飽和する事が明らかとなった。 Δ N,C-term ALE-1 についてはその飽和曲線から 2 種類の結合様式がある事が考えられ、最終的に約 43×10^{-11} mol で飽和した。92AA では他の組み換えタンパク質とは比較にならない位結合能は高く、 85×10^{-11} mol で飽和した。

第10項 様々な組み換え ALE-1 の *S. aureus* 菌体への結合能

さらに *S. aureus* 菌体への ALE-1 の結合様式を解析するため、湿重量 1 mg の *S. aureus* SDS 加熱処理菌体に対して 20×10^{-6} M のそれぞれの組み換えタンパク質を用いて結合能を比較した (図 2-8)。N 末端繰り返し配列を欠失した Δ N-term ALE-1 の方が full ALE-1 より、 Δ N,C-term ALE-1 の方が Δ C-term ALE-1 より結合能が高く、また、C 末端 92 アミノ酸がある full ALE-1 の方が Δ C-term ALE-1 より、 Δ N-term ALE-1 の方が Δ N,C-term ALE-1 より結合能が高い事が明らかとなった。92AA のみでは他の組み換えタンパク質よりもかなり結合能が高かった。

第 11 項 様々な組み換え ALE-1 の CD スペクトロメトリー

様々な組み換え ALE-1 の *S. aureus* 菌体へ結合能の違いが 3 次元構造の違いによるものか否かを検討するために、それぞれの組み換えタンパク質について円偏光二色性を測定した。その結果、C 末端 92AA の有無は ALE-1 の 3 次元構造に影響を与えない事が明らかとなった (図 2-9)。

第 12 項 様々な組み換え ALE-1 の溶菌活性

N 末端あるいは C 末端を欠失した組み換え ALE-1 の *S. aureus* 菌体への結合能の違いが、その溶菌活性に与える影響を検討するため、full ALE-1、 Δ C-term ALE-1、 Δ N-term ALE-1 そして Δ N,C-term ALE-1 の 92AA を前処理した *S. aureus* SDS 加熱処理菌体あるいは 92AA を前処理していない *S. aureus* SDS 加熱処理菌体を基質とした時の溶菌活性を測定した (図 2-10)。92AA を前処理していない *S. aureus* SDS 加熱処理菌体を基質とした場合、full ALE-1 と Δ N-term ALE-1 は同等の溶菌活性を示した。また、 Δ C-term ALE-1 と Δ N,C-term ALE-1 は C 末端 92AA を持つ組み換え ALE-1 の約 20 % の溶菌活性しか示さなかった。さらに 92AA を前処理した *S. aureus* SDS 加熱処理菌体を基質とした場合、 Δ C-term ALE-1 と Δ N,C-term ALE-1 の溶菌活性は阻害されなかったが、full ALE-1 と Δ N-term ALE-1 の溶菌活性は約 30-60 % まで阻害された。

第 4 節 考察ならびに小括

H150A、H200A、H231A、H233A の変異型 Δ N-term ALE-1 は Zymography と濁度法の両溶菌活性測定方法で溶菌活性の消失を認めた (図 2-4)。この結果から Δ N-term ALE-1 に存在する 7 つの histidine のうち 150、200、231、233 位の histidine が溶菌活性に必須であることが明らかとなった。しかしながらこれらの変異型 Δ N-term ALE-1 の基質細胞への結合能は野生型 Δ N-term ALE-1 と同

様であった (図 2-5)。200、231、233 位の histidine は図 1-8 に示す 18 個のタンパク質で高く保存されている 38 アミノ酸配列に含まれる (図 2-1B)。18 個のタンパク質に属する LasA、lysostaphin、ALE-1 は endopeptidase であり溶菌活性を発揮する [32, 35, 93]。LytM は 38 アミノ酸配列を持った新規溶菌酵素である [57]。また、2 個の metalloprotease も含まれている [44]。一方、18 個のタンパク質に属する 7 個は NlpD/LppB のリポタンパク質ファミリーに属していた。NlpD/LppB において、231 位の histidine に相当するアミノ酸は arginine あるいは lysine であった (図 2-1B)。231 位の histidine を他のプラスに帯電したアミノ酸、arginine あるいは lysine に変換した変異型 Δ N-term ALE-1 も溶菌活性を失っており、ALE-1 の 231 位には histidine が必須であることが示唆された。一方、ALE-1 の 150 位の histidine は LasA では glutamine、NlpD/LppB では asparagine であった (図 2-1B)。150 位の histidine を、alanine あるいは他の極性アミノ酸 glutamine あるいは asparagine に変換した変異型 Δ N-term ALE-1 の溶菌活性が消失したことから、ALE-1 の活性には 150 位の histidine もまた重要である事が示唆された。124、194、327 位の histidine は ALE-1 の溶菌活性には必須ではなかった。つまり、 Δ N-term ALE-1 の 150、200、231 そして 233 位の histidine が溶菌活性に重要で、そのうち 200、231、233 位の histidine は保存された 38 アミノ酸配列に位置しており、3 個の endopeptidase、ALE-1、lysostaphin [32, 93]、LasA [35] と *A. lyticus* と *L. enzymogenes* の 2 つの metalloprotease [44, 96] のすべてで保存されていた。このことからこれらのアミノ酸はこれらのタンパク質の活性に重要な役割を果たしていると考えられた。また、これら変異型 Δ N-term ALE-1 の CD スペクトルは野生型 Δ N-term ALE-1 と同様のスペクトルを示したことから (図 2-6)、変異型 Δ N-term ALE-1 の溶菌活性の変化は 3 次元構造の変化によるものではない事が示唆された。さらに、野生型 Δ N-term ALE-1 と変異型 Δ N-term ALE-1 の亜鉛およびマグネシウム含量を検討したところ、野生型 Δ N-term ALE-1 では 1 mol あたり亜鉛とマグネシウムの合計が約 1 mol になっていたが、どの変異型 Δ N-term ALE-1 も 1 mol あたり亜鉛とマグネシウムの合計は 1 mol よりも低く、また、溶菌活性の有無とは全く相関のない結果となった (表 2-3)。このことから ALE-1 1 mol には亜鉛あるいはマグネシウムが 1 mol 結合しているが、溶菌活性にはこれらの金属イオンは必須ではない事が示唆された。

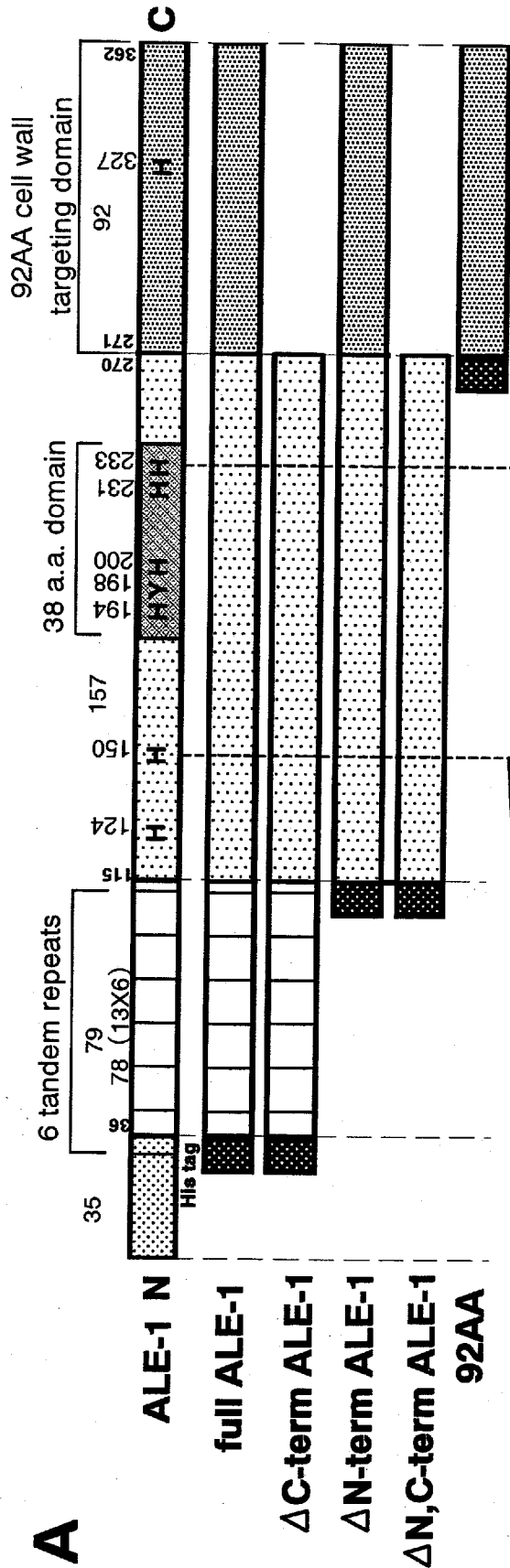
Schneewind らは lysostaphin の C 末端 92 アミノ酸配列が細胞基質への特異的結合に働いていると報告している [3]。この領域は ALE-1、lysostaphin、LytA N-acetylmuramyl-L-alanine amidase に保存されている (図 1-8)。LasA や *L. enzymogenes* や *A. lyticus* の産生する β -lytic metalloprotease は保存された 38 アミノ酸配列を持つタンパク質ファミリーに属し、高い溶菌酵素活性を持つが、これらは C 末端に 92 アミノ酸配列を持たない [35, 44, 69, 96]。これらの酵素は β -casein や elastin、pentaglycine のような glycine に富んだペプチド [35]、そして他のグラム陽性細菌にも活性を持ち [44]、広い基質特異性を持つ。一方、ALE-1 や lysostaphin は *S. aureus* 菌体の pentaglycine からなる架橋構造を特異的に認識する。92 アミノ酸配列は酵素が *S. aureus* の細胞壁を認識するのに重

要ではあるが、溶菌活性自体には重要ではないと考えられる。様々な領域を持った組み換え ALE-1 の *S. aureus* 菌体に対する結合飽和曲線および結合親和性の検討から、92AA 領域を持つものは持たないものに比べ、より *S. aureus* 菌体へ結合しており、逆に N 末端繰り返し配列を持つものは持たないものに比べ、*S. aureus* 菌体への結合能は減少している事が明らかとなった (図 2-7, 8)。92AA を前処理した *S. aureus* SDS 加熱処理菌体を基質とした場合、92AA を持たない組み換え ALE-1 の溶菌活性は阻害されなかったが、92AA を持つ組み換え ALE-1 の溶菌活性は阻害された (図 2-10)。これは 92AA を持った組み換え ALE-1 による活性のうち、92AA を介して菌体に結合して発揮される活性が、その結合部位をマスクされる事によって結合できなくなり活性を発揮できなかったためと考えられる。一方、92AA を持たない組み換え ALE-1 は 92AA でその結合部位をマスクされても、これらの酵素の菌体への結合には影響しないと考えられた。また、菌体の 92AA の結合部位をマスクすると、 Δ N-term ALE-1 は中心領域のみで菌体に結合し活性を発揮するが、full ALE-1 は N 末端繰り返し配列を持つために中心領域での菌体への結合が弱まるため、full ALE-1の方が Δ N-term ALE-1よりもより強く 92AA 結合部位のマスクによる阻害を受けたと考えられた。以上の事から、ALE-1 が活性を発揮するためには 92AA 配列が ALE-1 の分子内に存在することが必要ではあるが、92AA を介した菌体への結合が必ずしも必要ではないことが示唆された。

小括

1. ALE-1 の溶菌活性には 150、200、231 そして 233 位の histidine が重要で、そのうち 200、231、233 位の histidine が高く保存された 38 アミノ酸配列に位置していた。
2. 変異型 Δ N-term ALE-1 の活性の消失は、その 3 次元構造の変化や金属イオンの含量の変化によるものではないことが示唆された。
3. ALE-1 の N 末端繰り返し配列は酵素の *S. aureus* の細胞壁への結合を弱めていた。
4. ALE-1 の C 末端 92 アミノ酸配列は酵素が *S. aureus* の細胞壁を認識するのに重要ではあるが、溶菌活性自体には必須ではないと考えられた。
5. ALE-1 が *S. aureus* 菌体を溶解する時には 92 アミノ酸配列は必要条件ではないが、より効率良く溶菌活性を発揮するのに必要であることが示唆された。

A



B

A.1. protease	PPFPRGASMEYGGAAHTNTGSGNYPSSLDMSRGGGWSNGNWNVSASAA..GSPKRRHSCFAEIVHTGGWSTTYHLMNIQYNTGANVSMNTAIANPANTQAALCNGCGOSTGTPHNSL
L.e. metalloprotease	PPFPRGASMEYGGAAHTNTGSGNYPSSLDMSRGGG..SNONGNWNVSASAAAGGSPKRRHSCFAEIVHTGGWSTTYHLMNIQYNTGANVSMNTAIANPANTQAALCNGCGOSTGTPHNSL
LasA	LPWRQGYSWPNGAHEHSGG..YPYSSFDASY..DWPWRGATYSVVAHAAGTAVLSRCQVRHPSGWATYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
Prepolysostaphin	.PLGINGGGIHYGVDFPFMNIIG.TPVKAISSEK....IVAGWSNYGG...GNQI....GLIENDGVTYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
PreALE-1	.PLGINGGGNH.YGVDFPFMNIIG.TPVKAISSEK....IVAGWSNYGG...GNQI....GLIENDGVTYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
LytM	.H....GGGAH.YGVDFYAMPEN.SPVYSLTDTGVVO....AGWSNYGG...GNQI....GLIENDGVTYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
S.z.800A	P.....GH.VGVDFYAMPEN.SPVYSLTDTGVVO....AGWSNYGG...GNQI....GLIENDGVTYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
E.c.OrfU	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
H10409	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
TagE	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
S.e.Orf1	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
H.i.NlpD	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
E.c.NlpD	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
S.t.NlpD	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
H.s.LppB	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
Y.e.NlpD	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
P.a.NlpD	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL
P.p.NlpD	HPVTGRVAPRH.KGVDFPAMPQG.TPVLISVGDGE....V.VVAKRSGAA....GVY....VAIRHGRSYTTRYHLMNDQIQVSNQVSDATKLGVIYAGNINTALCEGSGSTGPHHNSL

図 2-1 ALE-1の1次元構造

(A) ALE-1のN末端繰り返し領域、高く保存された38アミノ酸領域として92アミノ酸細胞壁結合領域を示す。略語: A. 1. protease, β -lytic metalloprotease from *Achromobacter lyticus*; L. e. metalloprotease, β -lytic metalloprotease from *Lysobacter enzymogenus*; LasA, LasA from *Pseudomonas aeruginosa*; Prepolysostaphin, lysostaphin precursor; preALE-1, ALE-1 precursor; LytM, *S. aureus* autolysin; S. z. ZooA, ZooA from *Streptococcus zooepidemicus*; E. c. orfU, *Escherichia coli* orfU; H10409, *Haemophilus influenzae* hypothetical protein; tagE, *Vibrio cholerae* ToxR activated gene, tagE; S. e. orf1, *Synechococcus elongatus* orf1; H. i. NlpD, NlpD of *H. influenzae*; E. c. NlpD, NlpD of *E. coli*; S. t. NlpD, NlpD of *Salmonella typhi*; H. s. LppB, LppB of *H. somnus*; Y. e. NlpD, NlpD of *Yersinia enterocolitica*; P. a. NlpD, NlpD of *Pseudomonas aeruginosa*; P. p. NlpD, NlpD of *Pseudomonas putida*.

表 2-1 使用した菌株およびプラスミド

Strain	Relevant characteristics		Source or reference
<i>S. aureus</i>			
FDA209P	ATCC 6538		
<i>E. coli</i>			
XL1-Blue	<i>rec1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> λ ZM15 Tn10 (Tet)]		Bullock et al.
M-15 pREP4	<i>Nal^r, Str^r, Rif^r, Thi^r, Lac^r, Ara⁺, Gal⁺, Mtl^r, F^r, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺</i>		QIAGEN
TF578	M-15 pTF570		This study
TF605	M-15 pTF595		This study
TF606	M-15 pTF596		This study
TF608	M-15 pTF598		This study
TF607	M-15 pTF597		This study
TF583	M-15 pTF575		This study
TF609	M-15 pTF600		This study
TF585	M-15 pTF577		This study
TF584	M-15 pTF559		This study
TF565	M-15 pTF560		This study
TF566	M-15 pTF561		This study
TF567	M-15 pTF562		This study
TF568	M-15 pTF563		This study

Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Promega
pQE-30			<i>E. coli</i> expression vector	QIAGEN
pTF570	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	0.8kbp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment containing H124A Δ N-term ALE-1	This study
pTF595	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	0.9kbp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment containing H150A Δ N-term ALE-1	This study
pTF596	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	0.9kbp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment containing H194A Δ N-term ALE-1	This study
pTF598	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	0.9kbp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment containing Y198A Δ N-term ALE-1	This study
pTF597	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	0.9kbp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment containing H200A Δ N-term ALE-1	This study
pTF575	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	0.8kbp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment containing H231A Δ N-term ALE-1	This study
pTF600	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	0.9kbp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment containing H233A Δ N-term ALE-1	This study
pTF577	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	0.8kbp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment containing H327A Δ N-term ALE-1	This study
pTF559	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	1.1kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing full ALE-1	This study
pTF560	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	0.7kbp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment containing Δ C-term ALE-1	This study
pTF561	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.9kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing Δ N-term ALE-1	This study
pTF562	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	0.48kbp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment containing Δ N,C-term ALE-1	This study
pTF563	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.42kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing 92AA	This study

表 2-2 使用したプライマー

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Positions
	ALEU	AGGGATCCTTTGTAAGAGAAG	577-597
	ALER	GGGAATTCATGGGTAGTGATA	1352-1372
	pQEUV	CGGATAACAATTTACACAG	
	pQERV	GTTCTGAGGTCATTACTGG	
H124A	ALEMH1-UV	CTCAATCTAATGCTTCGGCTAGTTGGTTAA	600-630
	ALEMH1-RV	CAACTAGCCGAAGCATTAGATTGAG	600-625
H150A	ALEMH2-UV	TGGCGGAAATGCTTATGGCGTTGATTTCTT	679-709
	ALEMH2-RV	ACGCCATAAGCATTTCCGCCATTAA	676-700
H150N	ALEMH2N-UV	TGGCGGAAATAACTATGGCGTTGATTTCTT	679-709
	ALEMH2N-RV	ACGCCATAGTTATTTCCGCCATTAA	676-700
H150Q	ALEMH2Q-UV	TGGCGGAAATCAATATGGCGTTGATTTCTT	679-709
	ALEMH2Q-RV	ACGCCATATTGATTTCCGCCATTAA	676-700
H194A	ALEMH3-UV	TGATGGTGTTGCTAGACAATGGTATATG	812-839
	ALEMH3-RV	ACCATTGTCTAGCAACACCATCATT	810-834
Y198A	ALEMY8-UV	AGACAATGGGCTATGCATTTAAGTAA	825-850
	ALEMY8-RV	ATGCATAGCCCATTGTCTA	824-842
H200A	ALEMH4-UV	ATGGTATATGGCTTTAAGTAAATTCAATGT	830-859
	ALEMH4-RV	TACTTAAAGCCATATACCATTGTCT	825-849
H231A	ALEMH5-UV	CTACAGCACCGGCTTTACATTTTCAAA	922-948
	ALEMH5-RV	GAAAATGTAAAGCCGGTGCTGTAGC	921-945
H231K	ALEMH5K-UV	CTACAGCACCGAAATTACATTTTCAAA	922-948
	ALEMH5K-RV	GAAAATGTAATTTCCGGTGCTGTAGAATATC	916-945
H231R	ALEMH5R-UV	CTACAGCACCGCGTTTACATTTTCAAA	922-948
	ALEMH5R-RV	GAAAATGTAAACGCGGTGCTGTAGAATATC	916-945
H233A	ALEMH6-UV	ACCGCATTTAGCTTTTCAAAGAATGACC	929-956
	ALEMH6-RV	TTGAAAAGCTAAATGCGGTGCTGTA	923-947
H327A	ALEMH7-UV	AAACAAGATGGTGCTGTATGGGTTGGTTATA	1209-1239
	ALEMH7-RV	ACCCATACAGCACCATCTTGTTTCA	1207-1231
full ALE-1	ALEU3	AGCTTCTGGATCCACAAAAG	339-359
	ALEL4	TTCTGCAGTATGGGTAGTGATA	1452-1474
△C-term ALE-1	ALEU3	AGCTTCTGGATCCACAAAAG	339-359
	ALELY	AAGCTTCTAATAACCATTATTATTTGAT	1036-1064
△N-term ALE-1	ALEU4	CGCCTCGAGTTTGTAAGAGAAGCT	575-599
	ALEL4	TTCTGCAGTATGGGTAGTGATA	1452-1474
△N,C-term ALE-1	ALEU4	CGCCTCGAGTTTGTAAGAGAAGCT	575-599
	ALELY	AAGCTTCTAATAACCATTATTATTTGAT	1036-1064
92AA	ALEU5	ATGGATCCTATAAACTAATAAA	1037-1060
	ALEL4	TTCTGCAGTATGGGTAGTGATA	1452-1474

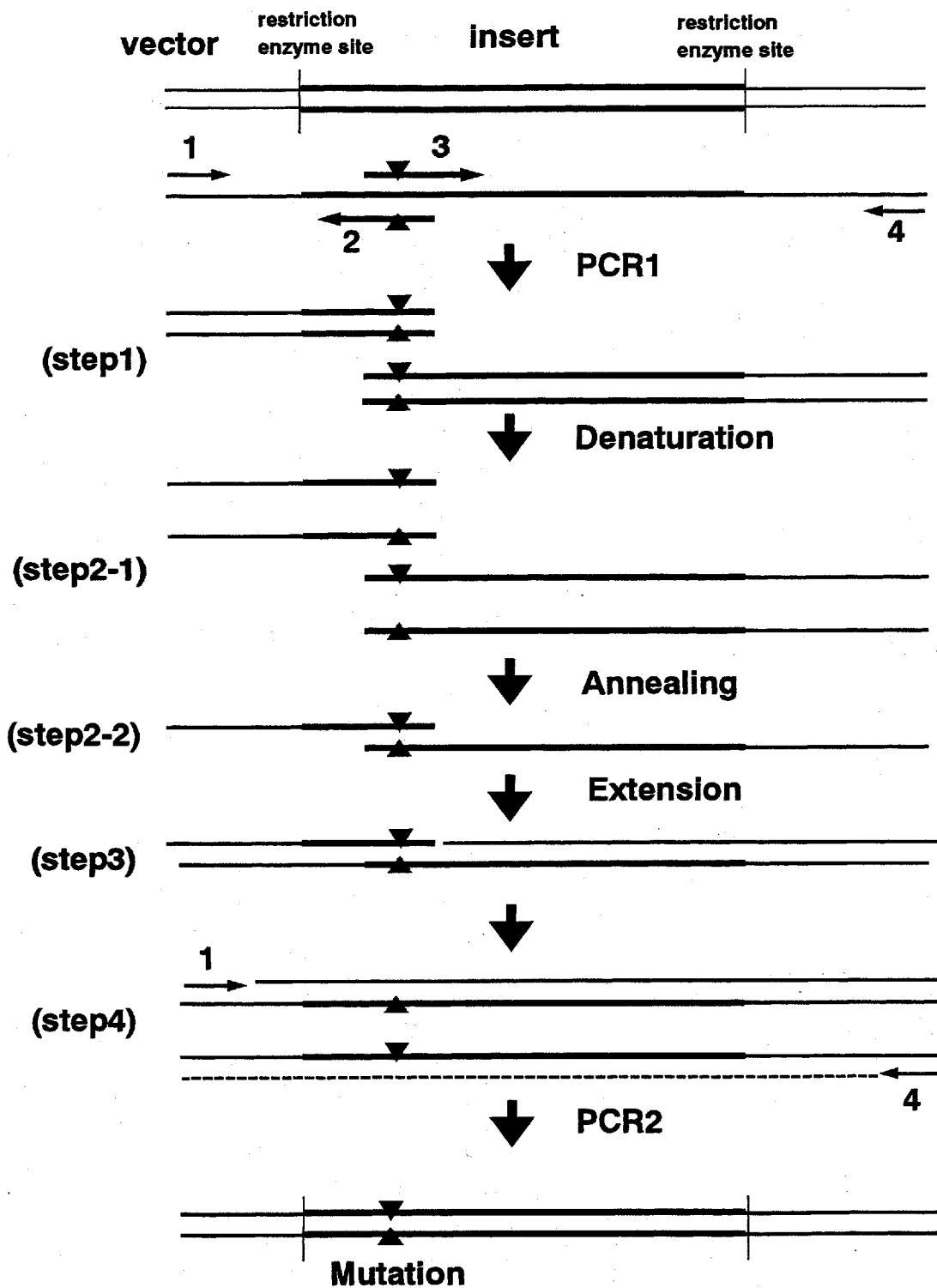


図 2-2 PCR-Mutagenesis

▼▲, 変異部位を示す。変異部分のプライマーとベクターのプライマーを用いて行った。

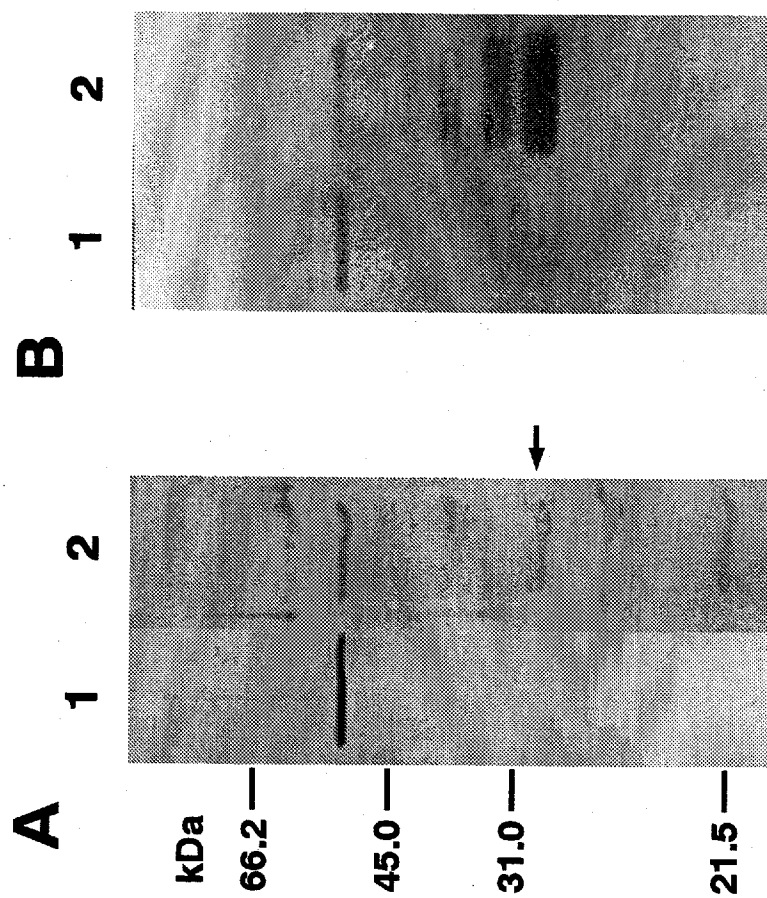
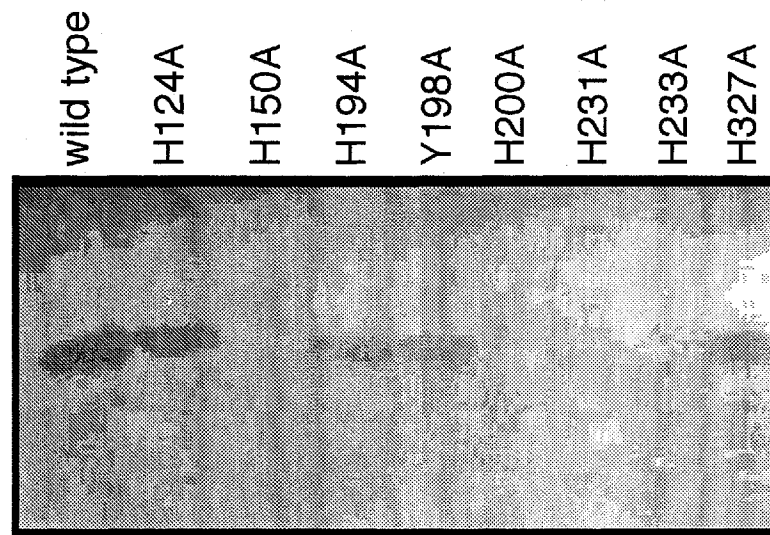


図 2-3 精製ALE-1のプロセッシング

レーン1, 精製直後のALE-1、レーン2, 精製後3日間 4°C保存後のALE-1をサンプルとした。(A) 12 % ポリアクリルアミドゲルにて SDS-PAGE 後、銀染色した。(B) *S. aureus* FDA209Pを封入した12 % ポリアクリルアミドゲルにて Zymographyを行った。←, 27 kDa

A



B

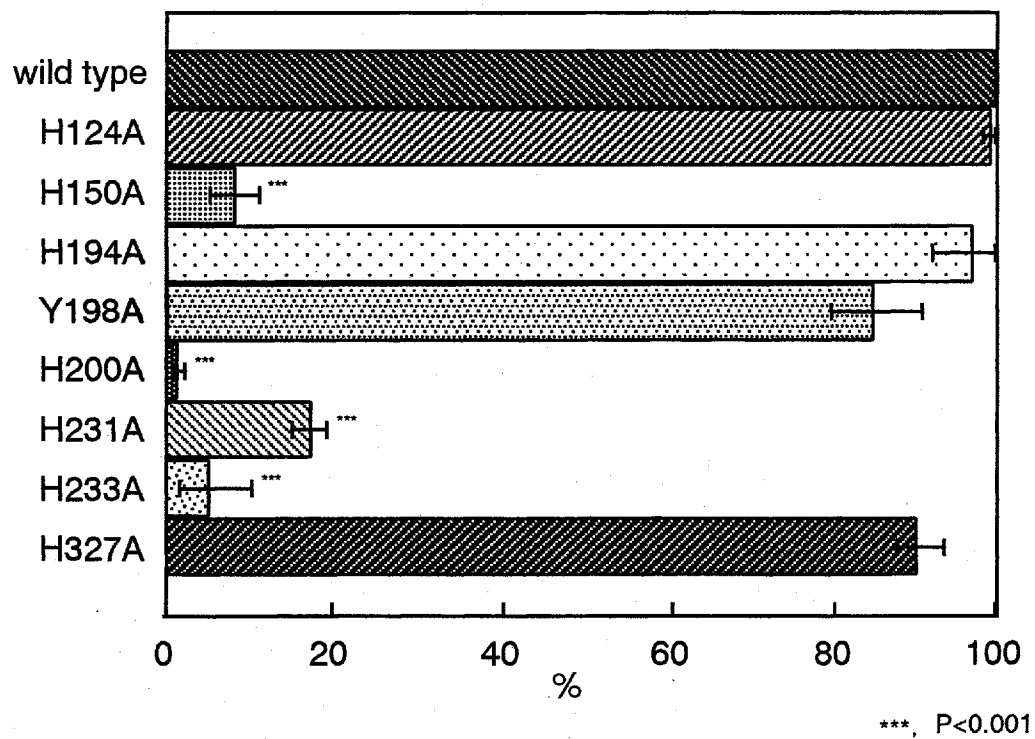


図 2-4 変異型 Δ N-term ALE-1 の溶菌活性

それぞれの変異型 Δ N-term ALE-1 について、*S. aureus* FDA209P を封入した 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた Zymography (A) と濁度法 (B) で野生型の溶菌活性と比較した。

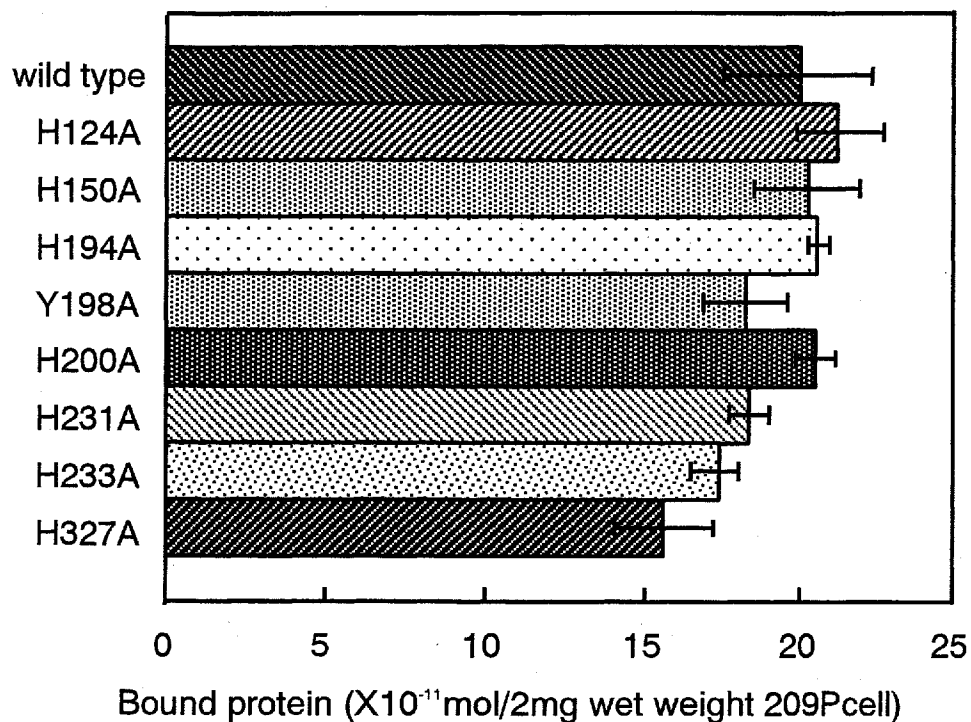


図 2-5 変異型 Δ N-term ALE-1 の結合能

それぞれの変異型 Δ N-term ALE-1 について、*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を用いて結合実験を行い、野生型の結合能と比較した。*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を 0.1 M iodoacetic acid 含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁し、精製したそれぞれの組み換え ALE-1 を 25×10^{-11} mol 加えて 4°C で 1 時間インキュベートし、4 % SDS による溶出画分を数値化した。

表 2-3 野生型 Δ N-term ALE-1 と変異型 Δ N-term ALE-1 の亜鉛およびマグネシウム含量

		metal ion content in 1mol ALE (mol)	
	activity	Zn *	Mg *
wild type	+	0.37	0.64
H124A	+	0.35	0.28
H150A	—	0.05	0.15
H194A	+	0.14	0.14
Y198A	+	0.12	0.11
H200A	—	0.11	0.11
H231A	—	0.11	0.12
H233A	—	0.06	0.17
H327A	+	0.10	0.13

*それぞれの野生型、変異型 Δ N-term ALE-1 について、精製組み換え ALE-1 の亜鉛とマグネシウムの元素定量分析を行った。

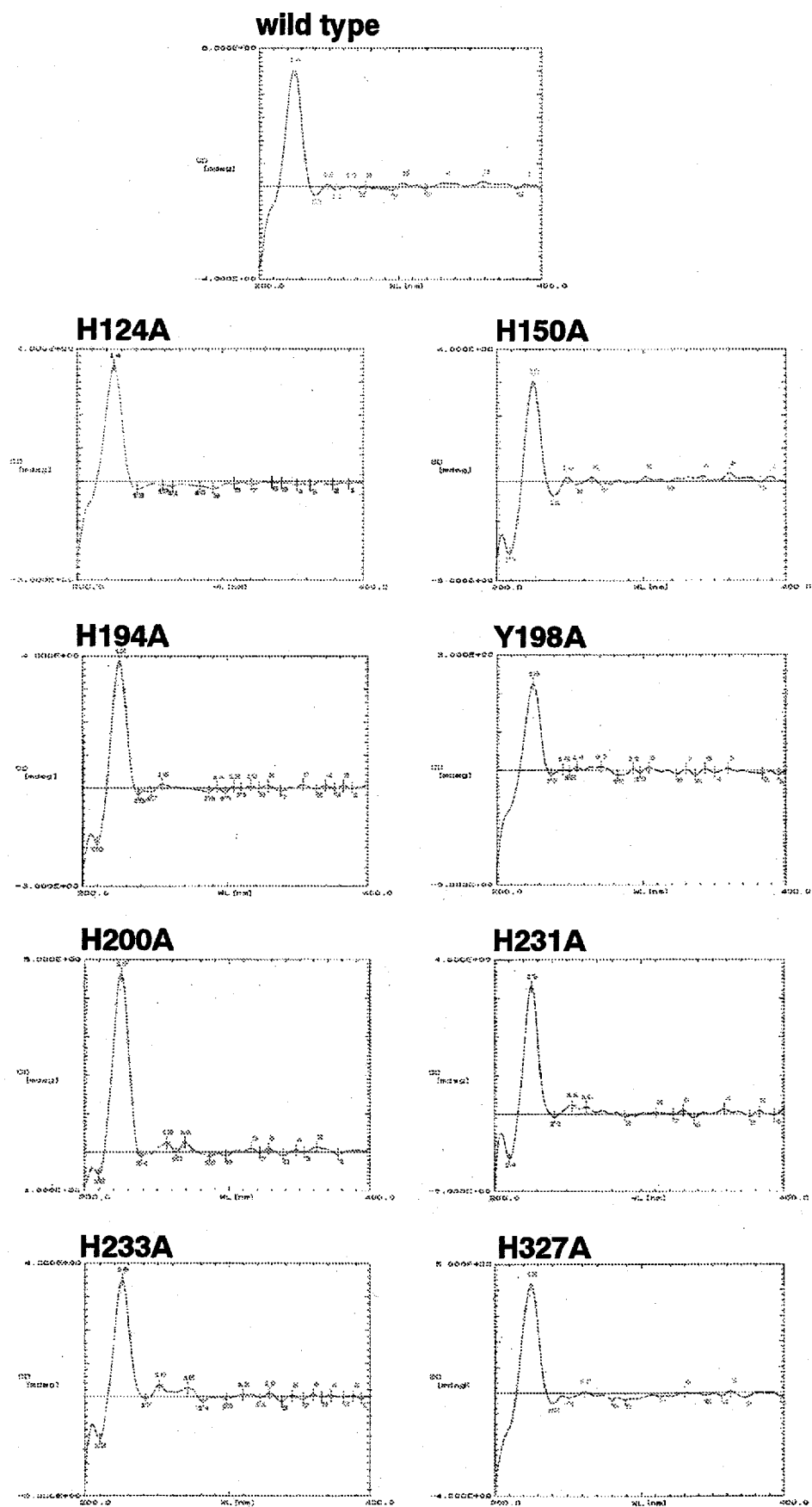


図 2-6 変異型 Δ N-term ALE-1 の CD スペクトル

それぞれの変異型 Δ N-term ALE-1 について、精製タンパク質を用いて CD スペクトルを測定した。

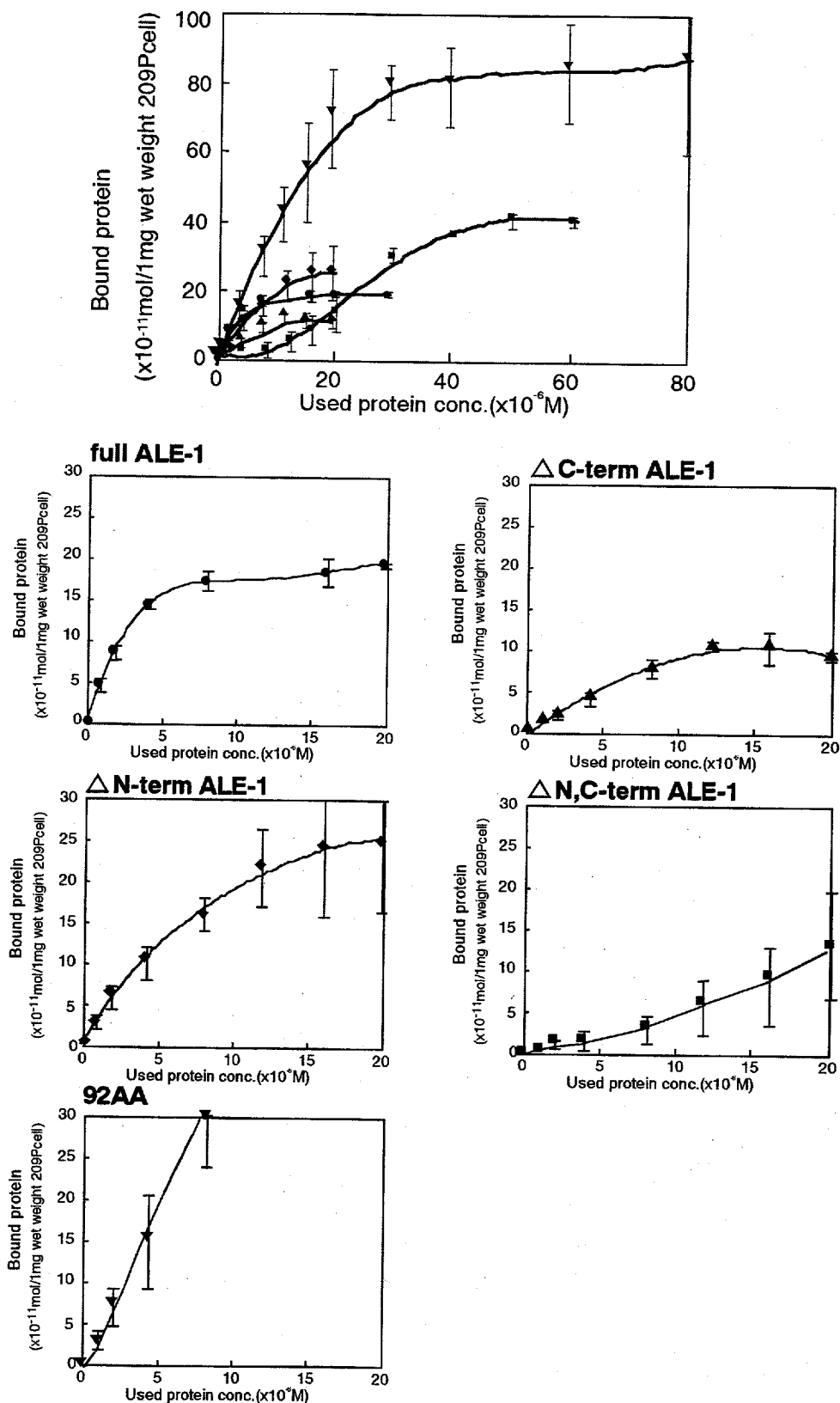


図 2-7 様々な組み換えALE-1の*S. aureus* 菌体への結合飽和曲線

様々な領域を含んだ 組み換えALE-1について、*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を用いて結合実験を行い、その飽和曲線を決定した。*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を0.1M ヨード酢酸含有 0.1 M リン酸バッファー (pH6.8) に懸濁し、精製したそれぞれの組み換えALE-1を各量加えて4℃で1時間インキュベートし、4 % SDSによる溶出画分を数値化した。●, full ALE-1; ▲, ΔC-term ALE-1; ◆, ΔN-term ALE-1; ■, ΔN,C-term ALE-1; ▼, 92AA

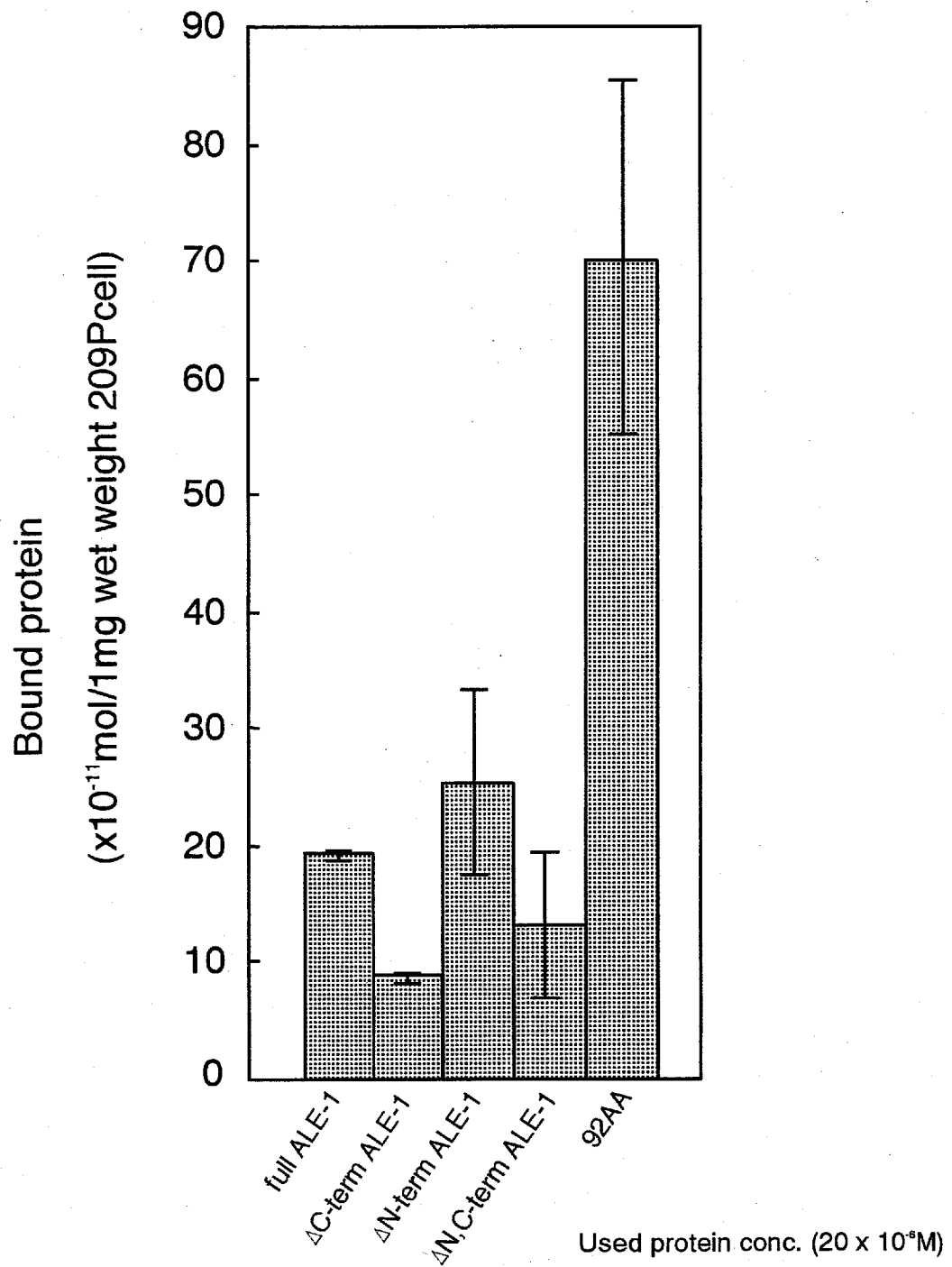


図 2-8 様々な組み換えALE-1の*S. aureus* 菌体への結合能

様々な領域を含んだ組み換えALE-1について、*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を用いて結合実験を行い、結合能を検討した。*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を0.1M ヨード酢酸含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁し、精製したそれぞれの組み換えALE-1を20 x 10⁻⁶Mになるよう加えて4℃で1時間インキュベートし、4 % SDSによる溶出画分を数値化した。

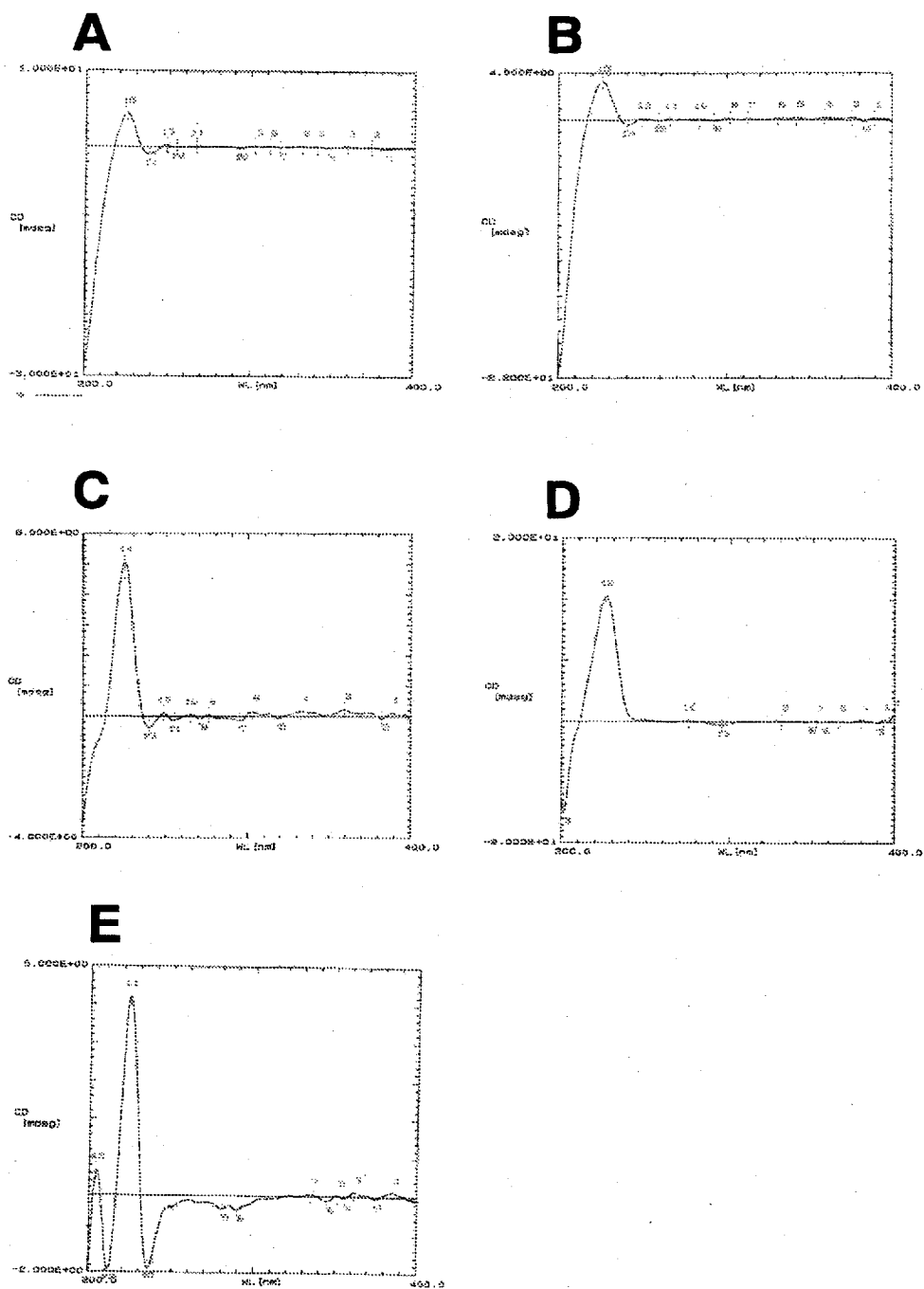


図 2-9 様々な組み換えALE-1のCDスペクトル

様々な領域を含んだ組み換えALE-1について、精製タンパク質を用いてCDスペクトルを測定した。(A), full ALE-1; (B), Δ C-term ALE-1; (C), Δ N-term ALE-1; (D), Δ N,C-term ALE-1; (E), 92AA

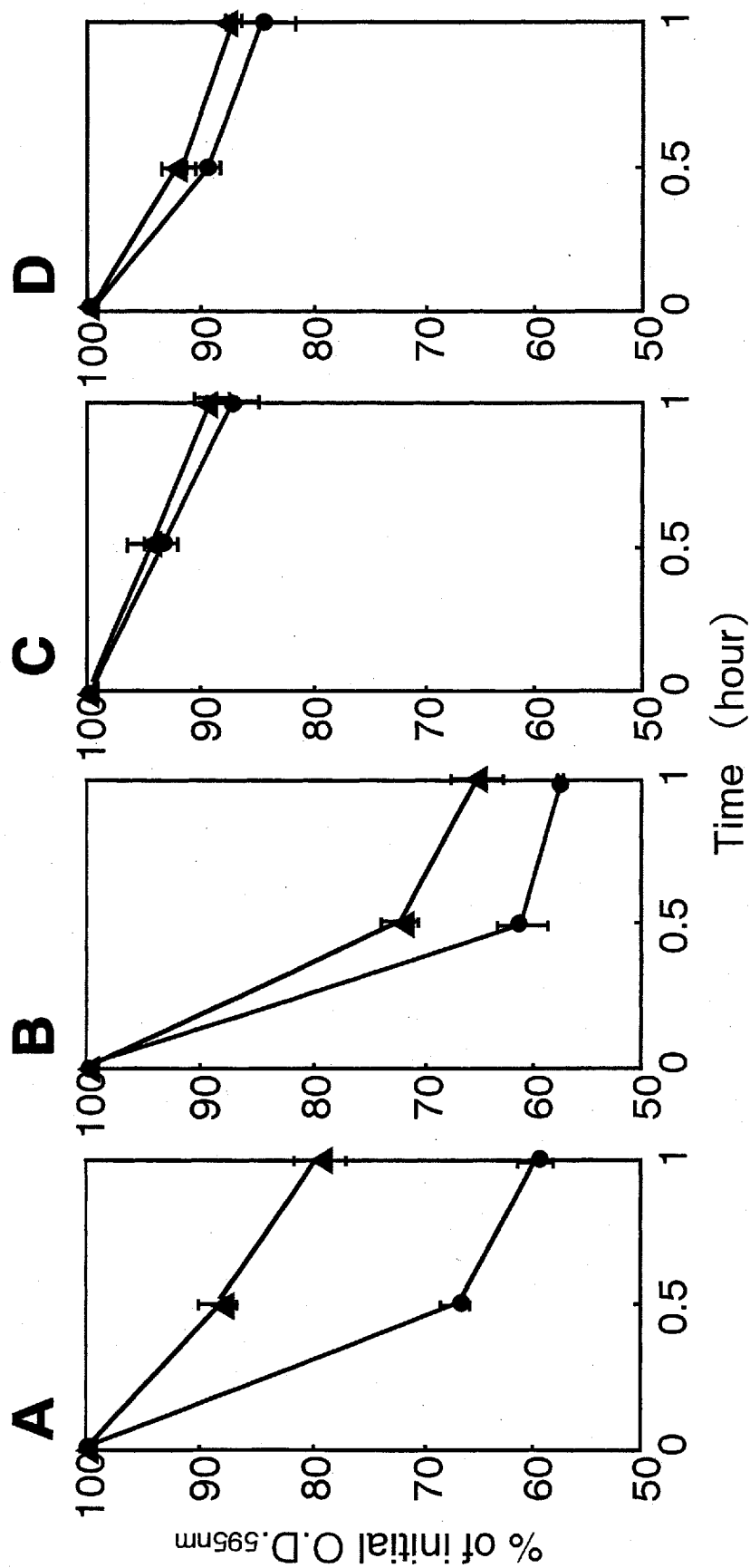


図 2-10 様々な組み換え ALE-1 の溶菌活性

様々な領域を含んだ組み換え ALE-1 について、*S. aureus* FDA209P SDS 加熱処理菌体に対する溶菌活性を濁度法にて検討した。
 ●, 92AA 非処理菌体 (コントロール); ▲, 92AA 前処理菌体を基質としたとき、(A), full ALE-1 (0.05×10^{-6} M); (B), Δ C-term ALE-1 (0.05×10^{-6} M); (C), Δ N-term ALE-1 (0.4×10^{-6} M); (D), Δ N, C-term ALE-1 (0.4×10^{-6} M) での溶菌活性を示した。

第 3 章 ALE-1 の細胞壁選択的結合部位の機能と構造

第 1 節 概要

第 2 章で述べたように ALE-1 の C 末端 92 残基のアミノ酸配列 (92AA) は細胞壁選択的結合部位と考えられている。92AA は lysostaphin の C 末端領域の 92 アミノ酸と 84 % の相同性がある (図 3-1) [3, 32, 47, 75]。この 92AA の機能についてさらに詳しく検討するため、92AA を用い様々な菌体への結合実験を行った。その結果、92AA は *Bacillus subtilis*、*Micrococcus luteus*、*Streptococcus mutans* 等の菌体には結合せず、*S. aureus* 菌体に特異的に結合することが分かった。また、*S. aureus* ペプチドグリカンの架橋構造の 5 つの glycine のうち 2 つを serine に置換しても 92AA の結合に変化はなかった。さらに架橋構造のアミノ酸の数が減少した変異株では結合は大きく減少した。これらのことより、92AA は *Staphylococcus* 属のペプチドグリカンの特異的に認識し、強固に結合することが明らかとなり、その結合には架橋構造に関わる 5 つのアミノ酸の存在が重要であると考えられた。そこで、さらに 92AA の *S. aureus* ペプチドグリカンへの分子レベルでの結合様式ならびに基質特異性を解明するために、FLAG-Tag をつけた 92AA を作製、大腸菌で発現、精製し、結晶構造解析を行った。その結果、92AA は Src-homology 3 (SH3) subdomains [95] の構造と似ていることが明らかとなった。また、SH3 domain に高く保存されているアミノ酸を変異させた His-tag 92AA 変異タンパク質を大腸菌で発現、精製し、*S. aureus* 菌体への結合実験を行った。その結果、変異タンパク質の結合能に変化は見られなかった。このことから 92AA には SH3 domain とは違った基質特異性があることが示唆された。さらに *S. aureus* の精製ペプチドグリカンを用いた HPLC を用いたペプチドグリカン分析法の 92AA 結合性の検討から、92AA の結合基質は一定の長さのあるグリカン鎖に 5 つのアミノ酸からなる架橋構造が必要であることが示唆された。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 使用菌株および培養条件

実験に用いた菌株およびプラスミドは表 3-1 に示した。その他に *S. mutans*、*B. subtilis*、*M. luteus*、*Bacillus megaterium*、*Lactobacillus plantarium*、*Micrococcus lysodeikticus* を使用した。*S. capitis*、

S. aureus は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems) を用いて、*E. coli* は Luria-Bertani (LB) broth、あるいは M9 medium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.6 g, KH_2PO_4 3 g, NH_4Cl 1 g, NaCl 0.5 g, 1 M glucose 22 ml, 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 ml, 0.5 % thiamine 0.1 ml per liter) を用いて、その他の菌株は Brain heart infusion broth (BHI, Becton and Dickinson) を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要に応じて ampicillin (100 µg/ml)、chloramphenicol (30 µg/ml)、kanamycin (25 µg/ml)、erythromycin (30 µg/ml)、tetracycline (3 µg/ml) を添加した培地で培養を行った。

第2項 *S. aureus* FDA209P 菌体への 92AA の結合実験

92AA の結合実験の基質として 4 種類の処理をした *S. aureus* FDA209P 菌体を用いた。生菌は培養した *S. aureus* FDA209P を 3 回精製水で洗浄後用いた。加熱処理菌体は *S. aureus* FDA209P を PBS で 100°C、1 時間処理後、3 回精製水で洗浄後用いた。SDS 加熱処理菌体は *S. aureus* FDA209P を 4 % SDS で 100°C、1 時間処理し、その後菌体を精製水で 6 回洗浄後用いた。トリプシン処理菌体は SDS 加熱処理菌体をトリプシン 100 µg/ml、10 mM CaCl_2 、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) の条件下で 37°C 一晩処理後、3 回 0.5 mM PMSF 含有精製水で洗浄後用いた。菌体を 0.1 M リン酸バッファ (pH 6.8) で $\text{OD}_{595}=1.0$ になるように懸濁し、その 100 µl に 92AA を加え、4°C で 1 時間インキュベートした。その後、0.1 M リン酸バッファで 3 回洗浄し、4 % SDS で菌体に結合した 92AA を溶出、15 % ポリアクリルアミドゲルに添加後 SDS-PAGE を行い、クーマシーブルー染色した。結合した 92AA の計量はイメージスキャナーを用いてコンピューターにゲルの像を取り込み、NIH image 1.52 で数値化した。

第3項 様々な菌体への 92AA の結合実験

92AA の結合実験の基質として *S. aureus*、*S. capitis*、*B. megaterium*、*L. plantarium*、*M. lysodeikticus* のペプチドグリカン、あるいは *S. aureus*、*S. capitis*、*S. mutans*、*B. subtilis*、*M. luteus* の SDS 加熱処理菌体を用いた。ペプチドグリカンは第 1 章、第 2 節、第 6 項に準じて精製した。SDS 加熱処理菌体、および結合実験は第 2 項の方法で行った。

第4項 92AA の *S. aureus* FDA209P 菌体からの解離実験

S. aureus FDA209P の SDS 加熱処理菌体を 0.1 M リン酸バッファ (pH 6.8) で $\text{OD}_{595}=1.0$ になるように懸濁し、その 100 µl に 92AA を加え、4°C で 1 時間インキュベートした。8 M 塩酸グアニジン、8 M 尿素、3 M LiCl あるいは 1 % トリトン X-100 で 3 回洗浄後、0.1 M リン酸バッファ

一で3回洗浄し、4 % SDS で菌体に結合した組み換えタンパク質を溶出、15 % ポリアクリルアミドゲルに添加後 SDS-PAGE を行い、クーマシーブルー染色した。結合した組み換えタンパク質の計量はイメージスキャナーを用いてコンピューターにゲルの像を取り込み、NIH image 1.52 で数値化した。

第5項 92AA の *S. aureus* FDA209P 菌体への結合に及ぼす様々な物質の影響

92AA の結合能に及ぼす物質の影響を検討するために、それぞれの物質存在下で結合実験を第2項の方法に準じて行った。それぞれの物質およびその最終濃度は、1 mM pentaglycine、1 mM tetraglycine、1 % glucose、1 % N-acetylglucosamine (GlcNAc)、1 % N-acetylmuramic acid (MurNAc)、1 % ツイーン 80、1 % トリトン X-100、1 % ノニデット P-40、1 % ツイーン 20、0.1 % SDS、1 M NaCl、5 M NaCl、4 M 尿素、5 M 尿素、7 M 尿素、4 M 塩酸グアニジン (Gdn-HCl)、6 M Gdn-HCl、90 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、50 mM EDTA、1 % mercaptoethanol、精製水である。

また 92AA の結合能に及ぼす pH の影響を検討するために種々のバッファー (0.1 M Tris-maleate (pH 4.74)、0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.025 M diethanolamine-HCl (pH 9.5)、0.025 M diethanolamin-HCl (pH 10.5)) を用いて菌体とインキュベートし、第2項の方法に準じて行った。

第6項 GST-pentaglycine と 92AA の結合実験

92AA が pentaglycine のみを認識するのか否かを検討するため、pentaglycine の glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質を作製、精製し、92AA との結合実験に用いた。pentaglycine は Expand™ High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) を用いた PCR 反応により増幅、pGEM-T Easy Vector System (Promega Co.) を用いて TA クローニングを行った。使用したプライマーの配列は表 3-1 に示す。pGEM-T Easy vector にクローニングされた DNA 断片を、プライマーに組み込んだ配列を認識する制限酵素で消化し、Gene-clean III Kit (BIO 101) を用いて切り出し、pGEX 4T-3 GST fusion vector (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) の GST 配列の下流に読み枠を合わせて組み込んだ。得られたプラスミドは第1章、第2節、第13項の方法により、*E. coli* BL21 に形質転換した。GST-pentaglycine は GST Gene Fusion System (Pharmacia Biotech) のプロトコールに準じて glutathione sepharose 4B に吸着させ、還元型 glutathione で溶出、精製を行った。

結合実験として PBS 中で GST-pentaglycine と 92AA を 4℃、1 時間インキュベートした後、その混合液を glutathione sepharose 4B に通し、素通り画分と 10 mM 還元型 glutathione での溶出画分について 15 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 後、クーマシーブルー染色で結合量を

検討した。また、あらかじめ glutathione sepharose 4B に結合させた GST-pentaglycine に 92AA を加え、PBS 中で 4℃、1 時間インキュベートした後、同様の方法で検討を行った。コントロールとして、GST のみを用いた。

第 7 項 92AA 結合部位の RP-HPLC 解析

第 1 章、第 2 節、第 6 項で精製したペプチドグリカン (1.3 mg) を 4 mM MgCl₂ 含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) 300 µl に懸濁し、最終濃度が mutanolysin 1.4 mg/ml、あるいは精製した His-tag ΔN-term ALE-1 140 µg/ml になるように添加し、37℃で一晩振とうし可溶化した。その後 His-tag 92AA を添加、4℃ 1 時間インキュベートし、Ni-NTA Agarose を加え、素通り画分を回収した。素通り画分を 20 %リン酸で pH 4.0 に調整後、95℃で 5 分加熱して酵素を失活させ、1.5 M ホウ酸ナトリウムバッファー (pH 9.0) で pH 7.5 に調整後、水素化ホウ酸ナトリウム 10 mg を添加し、室温で 15 分間反応させた。さらに過剰の還元剤を中和するために 20 %リン酸を加え pH 4.0 に調整後、4 N NaOH で pH 12.0 に調整し、37℃で 1.5 時間反応させた。その後 4 N HCl で pH 2.5 に調整し、遠心 (10,000 x g, 5 min, 4℃) し上清をフィルター (0.22 µm) で濾過し、サンプルとした。

調整したサンプルを逆相カラム (Hypersil ODS 5 µm, 4.6 x 250 mm, Supelco Inc., Sigma, USA) を用いて 5 % (vol/vol) メタノール含有 50 mM リン酸バッファー (pH 2.5) から 30 % (vol/vol) メタノール含有 50 mM リン酸バッファー (pH 2.8) になるように、210 分間のリニアグラディエントを行い、UV_{206nm} でモニタリングした。カラムの温度は 45℃で流速は 0.5 ml/min で行った。

第 8 項 FLAG-tag 92AA の作製、精製

92AA の結晶化を行うため、92AA の FLAG 融合タンパク質を作製、精製した。

プライマー ALEU6 と ALEL2 を用い、92AA を *S. capitis* EPK1 の DNA を鋳型として 第 6 項の方法に準じて PCR 反応により増幅、pGEM-T Easy vector にクローニング後、HindIII、EcoRI で DNA 断片を単離し、pFLAG MAC expression vector (Sigma) の FLAG-Tag 配列の下流に読み枠を合わせて組み込んだ。得られたプラスミドは第 1 章、第 2 節、第 13 項の方法により、*E. coli* BL21 に形質転換した。

E. coli BL21 の形質転換株を M9 medium 3 l で 37℃で OD₆₀₀=0.5 になるまで振とう培養し selenomethionine FLAG-tag 組み換えタンパク質を発現させるために、seleno-(L)-methionine (Se-Met) 150 mg、lysine hydrochloride 300 mg、threonine 300 mg、phenylalanine 300 mg、leucine 150 mg、isoleucine 150 mg、valine 150 mg を加え 37℃で 15 分間振とう後、IPTG を 1 mM になるように添加し、13 時間培養した。その後遠心 (9,000 x g, 10 min, 4℃) し、菌体を抽出用バッファー A (50 mM Tris-HCl (pH 8.0),

5 mM EDTA, 50 µg/ml sodium azide) 30 ml と抽出用バッファーC (0.1 M CaCl₂, 0.1 M MgCl₂, 1 mM PMSF, 20 mM DTT) で懸濁、Ultrasonic disruptor (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan) で菌体を破碎した。遠心 (25,000 x g, 40 min, 4°C) 後、上清に *S. aureus* FDA209P SDS 加熱処理菌体を加え、4°C で 1 時間インキュベートした後、0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で 6 回洗浄した。結合した FLAG-tag 92AA の溶出は 8 M 尿素含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で行った。得られた溶出画分は 4 M 尿素含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で透析し、その後段階的に尿素的濃度を落としていった 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で透析し、最終的に尿素を除いて結晶化に用いた。

第 9 項 FLAG-tag 92AA の結晶化

FLAG-tag 92AA は蒸気拡散法で結晶化した。結晶構造は Se-Met 誘導体を用いた多波長異常分散法および Native タンパク質を用いた分子置換法で決定した。

第 10 項 *S. aureus* FDA209P 菌体への変異型 92AA の結合実験

第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて His-tag 92AA の PCR-Mutagenesis を行った。PCR 反応の鋳型として 92AA をコードした DNA 断片を組み込んだ pQE30 プラスミドを用い、使用したプライマーは表 3-1 に示す。得られたプラスミドは第 1 章、第 2 節、第 13 項の方法により、*E. coli* M15 (pREP4) に形質転換した。

それぞれの変異型 92AA は第 2 章、第 2 節、第 4 項の方法で精製した。得られた変異型 92AA と *S. aureus* SDS 加熱処理菌体を用いて第 2 項の方法で結合実験を行った。

第 3 節 結果

第 1 項 様々な処理菌体への 92AA の結合能

His-tag 組み換え 92AA の様々な処理をした *S. aureus* FDA209P 菌体への結合能を検討した (図 3-2)。92AA の結合能は、SDS 加熱処理した菌体より、トリプシン処理した菌体への方がわずかに高い結合能を示し、加熱処理しただけの菌体へは SDS 加熱処理菌体より結合能は低かった。また、92AA は生菌には SDS 加熱処理した菌体の約 20 % しか結合しなかった。

第 2 項 様々なペプチドグリカンへの 92AA の結合能

様々な菌株のペプチドグリカンを経製し、それを基質として 92AA の結合能を検討した (図 3-3)。92AA は *S. aureus* 209P、*S. aureus* RN4220 の Epr の形質転換株 TF5311 (第 4 章参照)、コントロールとして pGC2 のみを保持した RN4220 株 TF5303、*S. capitis* EPK1、EPK2 (EPK1 プラスミド脱落株、第 4 章参照) のペプチドグリカンへは同等の結合能が見られた。一方、*B. megaterium*、*L. plantarum*、*M. lysodeikticus* のペプチドグリカンには結合しなかった。

第 3 項 92AA の *S. aureus* FDA209P 菌体への結合強度

92AA の *S. aureus* 菌体への結合様式の強度について検討するため、chaotropic agent や塩、界面活性剤等を用いて解離実験を行った (表 3-2)。1 % トリトン X-100 では 4 % SDS によって解離する 92AA の 16.2 % しか解離しなかった。一方、8 M 塩酸グアニジン、8 M 尿素、3 M LiCl ではそれぞれ 4 % SDS での解離する 92AA の 85.7 %、77.9 %、60.7 % が解離した。

第 4 項 92AA の *S. aureus* FDA209P 菌体への結合に及ぼす様々な物質の影響

92AA と *S. aureus* 菌体を様々な条件下でインキュベートし、結合能について調べた (表 3-3)。92AA の *S. aureus* 菌体への結合は 1 mM の pentaglycine や tetraglycine では全く阻害されなかった。また、1 % の糖類や界面活性剤でも結合は阻害されなかった。一方、NaCl は結合能には影響しないが、尿素、塩酸グアニジンともに 4 M から結合を阻害した。pH の影響を見たところ、pH 10.5 の条件下でもっとも強く結合した。

第 5 項 様々な SDS 加熱処理菌体への 92AA の結合能

92AA および Δ N-term ALE-1 の結合親和性を様々な SDS 加熱処理菌体を用いて検討した (図 3-4)。92AA は *S. aureus* 菌体に比べ、*S. mutans*、*B. subtilis*、*M. luteus* 菌体にはわずしか結合しなかった。Epr (第 4 章参照) を発現する株 *S. capitis* EPK1 および TF5311 と、Epr を発現しない株 *S. capitis* EPK2 および TF5303 には 92AA は同等に結合した。また、*femAB* 遺伝子を欠失した株 BB1221 [47] はその親株 BB270 に比べ、92AA の結合は減少していた。*femA* 遺伝子欠失株 BB742 [4] はその親株 BB705 と同等の 92AA の結合を示したが、*femB* 遺伝子欠失株 BB841 [25] はその親株に比べ 92AA の結合親和性は減少していた。 Δ N-term ALE-1 についても 92AA と同様の結果が得られた。

第6項 *S. aureus* FDA209P 菌体あるいは BB1221 菌体に対する Δ N-term ALE-1 と Δ N,C-term ALE-1 の結合能

C 末端 92AA が欠失している事で、*S. aureus* FDA209P 菌体あるいは BB1221 [47] 菌体に対する ALE-1 の結合にどのような影響を与えるかを、それぞれの SDS 加熱処理菌体を用いて検討した (図 3-5)。209P 菌体では Δ N-term ALE-1 の結合に比べ、 Δ N,C-term ALE-1 の結合能は減少していた。また、BB1221 菌体では Δ N-term ALE-1 の結合能は 209P 菌体でのそれより小さく、 Δ N,C-term ALE-1 と同程度の結合能しか示さなかった。

第7項 GST-pentaglycine への 92AA の結合能

92AA は *S. aureus* 菌体を特異的に認識し結合するため、*S. aureus* のペプチドグリカンに特徴的な構造である pentaglycine からなる架橋構造のみを認識しているのか否かを検討するために、glutathione S-transferase (GST) をつけた pentaglycine を作製、大腸菌で発現精製し、GST のみをコントロールとして、92AA との結合実験を行った (データ示さず)。精製 GST-pentaglycine と 92AA をインキュベートした後、glutathione sepharose 4B に通した素通り画分に加えた全ての 92AA が検出され、溶出画分には検出されなかったことから、GST-pentaglycine に 92AA は結合しないことが明らかとなった。

第8項 92AA 結合部位の RP-HPLC 解析

S. aureus 209P ペプチドグリカンを mutanolysin あるいは lysostaphin で消化後、可溶化画分に His-tag 92AA を加えインキュベートし、その後 Ni-NTA Agarose に通した素通りを RP-HPLC で解析し、His-tag 92AA を加えないコントロールとの溶出プロファイルの違いを見た。ペプチドグリカンを mutanolysin で消化した後の産物は pentaglycine で架橋された MurNAc と GlcNAc が一つの単位となる様々な長さを持った mucopeptide の混在したものになる。また、lysostaphin で消化した後の産物はグリカン鎖が連なり、pentaglycine の架橋部分で切断された mucopeptide の混在したものになる。これらに His-tag 92AA を加え、インキュベート後、Ni-NTA Agarose を通した素通りの RP-HPLC 溶出プロファイルはコントロールとの間に違いが見られなかった (データ示さず)。

第9項 FLAG-tag 92AA Se-Met 誘導体の結晶化

92AA のペプチドグリカンへの分子レベルでの結合様式ならびに基質特異性を解明するため、

92AA の X 線結晶構造解析を行った。FLAG-tag を付けた 92AA を大腸菌で seleno methionine 存在下で発現させ、FLAG-tag 92AA Se-Met 誘導体を精製、結晶化に用いた。多波長異常分散法での分解能は 1.75 Å であり、空間群 I432、格子定数 $a=b=c=105\text{ Å}$ の結晶を得た (図 3-6)。また、分子置換法での分解能は 1.80 Å であり、空間群 P212121、格子定数 $a=45.119\text{ Å}$ 、 $b=58.512\text{ Å}$ 、 $c=85.081\text{ Å}$ の 2 つの偽対称な結晶を得た。2 量体での結晶は一つの 92AA 分子の FLAG-tag 部分がもう一つの 92AA 分子の溝になった部分に結合しており、またその 92AA 分子の tag が次の 92AA 分子の溝に結合していた。また、構造解析の結果、92AA は 8 つの β -strand といくつかの loop からなる小さい球形タンパク質の一つの domain であった。7 つの β -strand とそれらの間に隣接する loop が構造的に Src-homology 3 (SH3) subdomains [50, 95] と似た domain を形作っていることが明らかとなった。また、2 つの β sheet が急なカーブを描き、全体の構造は open β -barrel をとっていた。92AA はアミノ酸配列レベルでは SH3 ファミリーと 20 % の相同性しかないが、全体の 3 次元構造から相同性検索すると、様々な機能を持った多くの異なるタンパク質の SH3 subdomain と高い相同性があることが明らかとなった。

第 10 項 *S. aureus* FDA209P 菌体への変異型 92AA の結合能

92AA アミノ酸配列の中で *S. aureus* 菌体への結合に重要なアミノ酸を見出す事で、細胞壁との結合部位を特定することができるのではないかと考えられた。そこで 92AA 領域を持つペプチドグリカン加水分解酵素ファミリーと SH3 domain で高く保存されている、ペプチドとの結合部位に存在するアミノ酸である 343 位の proline と 358 位の tryptophan をそれぞれ alanine に置き換えた His-tag 変異型 92AA を作製、精製し、*S. aureus* FDA209P SDS 加熱処理菌体との結合実験を行った (図 3-7A)。どちらの変異型 92AA も野生型と同様の結合能を示した。

92AA とペプチドグリカンの結合様式が 92AA の FLAG-tag 部分での結合様式に似ているとの仮説の下で、92AA 配列内の FLAG-tag と結合しているアミノ酸の mutagenesis を行った。2 量体の接着面では、FLAG-tag 部分と、294 位の isoleucine および 292 位の asparagine の主鎖、同様に 296 位の arginine の側鎖とで 3 つの水素結合が存在している。このうち 296 位の arginine を asparagine や alaine に置き換えると、その結合は大きく変わると考えられた。また、292 位の asparagine、293 位の isoleucine、294 位の isoleucine を長い側鎖を持つアミノ酸 (tryptophan、phenylalanine、tyrosine) に置き換えると、溝を作っている構造が変化し、92AA のペプチドへの結合能に影響を与えるだろうと考えられたので、92AA の 292 位の asparagine、293 位の isoleucine、294 位の isoleucine をそれぞれ tryptophan に、296 位の arginine を alaine に置き換えた変異型 92AA を作製、精製し、*S. aureus* FDA209P SDS 加熱処理菌体との結合実験を行った (図 3-7B)。どの変異型 92AA も野生型と同様の結合能を示し、アミノ酸を置き換えた事による結合能の変化は見られなかった。

第4節 考察ならびに小括

ALE-1 の C 末端領域には lysostaphin の C 末端に存在する細胞壁選択的結合部位 [3, 75] と相同性の高い 92 残基からなるアミノ酸配列が存在する (図 3-1)。この 92 残基のアミノ酸配列 (92AA) の機能について詳しく検討するため、His-tag をつけた 92AA を大腸菌で発現、精製し、*S. aureus* 菌体への結合実験を行った。*S. aureus* 209P 菌体を基質としたところ、生菌にはほとんど結合せず、加熱死菌や SDS 加熱処理菌体、あるいは SDS 加熱処理菌をトリプシン処理したものには強固に結合した (図 3-2)。様々な処理の段階を重ねる程、92AA の結合能が増加していくのは、細胞壁に結合している lipoteichoic acid [5, 10, 16, 26, 28] や teichoic acid [19, 90] 等の様々な構造物等がそれぞれの処理により除かれ、92AA が結合しやすくなるためと考えられた。つまり、92AA は *S. aureus* 209P のペプチドグリカンを認識していると考えられた。また、*S. aureus* RN4220 にプラスミドで Epr (第 4 章参照) を形質転換することで架橋構造の glycine の含量が減少し、serine の含量が増加した株 TF5311、コントロールとして pGC2 のみを保持した RN4220 株 TF5303、そして *S. capitis* EPK1 と、EPK1 から *ale-1*、*epr* 遺伝子をコードするプラスミドを脱落させた株 EPK2 のそれぞれのペプチドグリカンおよび SDS 加熱処理菌体に対して 92AA は *S. aureus* 209P に対するのと同等の結合能を示した (図 3-3, 4)。つまり *S. aureus* のペプチドグリカンの架橋構造の 5 つの glycine のうち 2 つを serine に置換しても、92AA の結合に変化はないことが示された。一方、92AA は *B. megaterium*、*L. plantarum*、*M. lysodeikticus* のペプチドグリカンには結合せず、また、*B. subtilis*、*M. luteus*、*S. mutans* の SDS 加熱処理菌体にも結合しなかった。さらに *S. aureus* の FemA mutant (架橋構造の 2,3 番目の glycine 欠失株) [4] には親株と同程度に結合したが、FemB mutant (架橋構造の 4,5 番目の glycine 欠失株) [25] ではわずかに結合が減少し、FemAB mutant (架橋構造の 2,3,4,5 番目の glycine 欠失株) [74] では結合は大きく減少した (図 3-4)。これらのことより、92AA は *Staphylococcus* 属のペプチドグリカンの特異的に認識し強固に結合することが明らかとなり、その結合には 5 つのアミノ酸からなる架橋構造を含む領域が重要であると考えられた。様々な SDS 加熱処理菌体への結合親和性について、92AA と Δ N-term ALE-1 は同じ挙動を示したことから、 Δ N-term ALE-1 の菌体への結合は 92AA に依存していると考えられた。

また、92AA が glycine のみを認識するか否かを明らかにするため、GST-pentaglycine を基質に用い結合実験を行ったが 92AA は pentaglycine には結合しなかった。また、*S. aureus* 菌体への結合も pentaglycine では阻害を受けなかった。このことより、92AA は pentaglycine のみは認識しないことが明らかとなった。*S. aureus* FDA209P 菌体あるいは BB1221 (*femAB* 遺伝子変異株) 菌体に対する Δ N-term ALE-1 と Δ N,C-term ALE-1 の結合実験を行ったところ (図 3-5)、209P 菌体ではこの

2つの組み換え ALE-1 の結合能の差に、92AA が欠失している分だけ Δ N,C-term ALE-1 の結合能が減少している結果が見られたが、BB1221 菌体では pentaglycine の架橋構造が著しく失われているので、92AA による結合が起こらず、92AA の有無ではそれぞれの結合能に差は見られず、209P 菌体で Δ N,C-term ALE-1 が示した結合能と同程度の結合能を Δ N-term ALE-1 も示した。この事からも 92AA が結合するためには glycine とは限らないが、5つのアミノ酸からなる架橋構造が大切だと考えられた。また、ここでは示していないが、92AA で *S. aureus* 菌体を飽和させた後、full ALE-1 あるいは Δ N-term ALE-1 を加えても結合した 92AA の置き換わりは起こらなかった。92AA の結合は不可逆的で ALE-1 の他の領域でも細胞に結合する事ができると考えられた。

SH3 subdomain は約 60 のアミノ酸からなる一つのタンパク質 domain で、調節因子として働く細胞内の様々なタンパク質に広く存在する [50, 95]。SH3 subdomain はシグナル伝達経路や膜と細胞骨格の構造の中で、中心部の保存された結合モチーフである PXXP 配列を持つ proline に富んだりガンド [55] を認識する事によって、タンパク質-タンパク質の相互作用を引き起こす。92AA の X 線結晶構造解析の結果、92AA は Src-homology 3 (SH3) subdomains と高い相同性があることが明らかとなった。また、様々な変異型 92AA を用いて結合実験を行ったが、どの変異型 92AA も野生型と同様の結合能を示し、343 位の proline、358 位の tryptophan、292 位の asparagine、293 位の isoleucine、294 位の isoleucine そして 296 位の arginine の一つずつのアミノ酸の変異では、92AA の結合能の変化は見られなかった (図 3-7A, B)。92AA と *S. aureus* 菌体の結合は全体としての結合能が強いと考えられ、一アミノ酸の置換ではその結合能の低下をきたさず、そのため特定の部位のアミノ酸の結合に及ぼす影響が評価できなかったと考えらる。

92AA による *S. aureus* ペプチドグリカンの結合部位の RP-HPLC 解析の結果、*S. aureus* 209P ペプチドグリカンの mutanolysin による消化産物も、lysostaphin による消化産物についても、92AA を結合させる事によるピークの消失が見られなかったため、pentaglycine の架橋構造があったとしても MurNAc と GlcNAc からなる一つのユニットで、長いグリカン鎖がないものには 92AA は結合せず、また架橋構造を持たないグリカン鎖にも 92AA は結合する事ができないと考えられた。以上のことから、92AA の *S. aureus* ペプチドグリカンへの結合には一定の長さのグリカン鎖を含んだ 5つのアミノ酸からなる架橋を持った構造が必要である事が示唆された。

小括

1. ALE-1 の細胞壁選択的結合部位 92AA は *Staphylococcus* 属のペプチドグリカンの特異的に認識し強固に結合することが明らかとなった。
2. 92AA の結合には 5つのアミノ酸からなる架橋を含むグリカン鎖を持った構造が重要であると考えられた。

3. 92AA の X 線結晶構造解析より、ALE-1 の細胞壁選択的結合部位は Src-homology 3 (SH3) subdomains と構造が類似している事が明らかとなった。

表 3-1 使用した菌株、プラスミドおよびプライマー

Strain		Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. aureus</i>			
FDA209P			
<i>E. coli</i>			
XL1-Blue		<i>rec1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lac I</i> ^q ZM15 Tn10 (Tet)]	Bullock et al.
BL21 (DE3)		<i>F ompT hsdS_B (r_B M_B) gal dem met</i> (DE3)	Novagen
M-15 pREP4		<i>Nal^r, Str^r, Rif^r, Thi^r, Lac^r, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁺, F⁺, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺</i>	QIAGEN
TF481		BL21 (DE3) pTF479	This study
TF670		BL21 (DE3) pTF668	This study
TF568		M-15 pTF563	This study
TF675		M-15 pTF673	This study
TF676		M-15 pTF674	This study
TF681		M-15 pTF681	This study
TF682		M-15 pTF682	This study
TF683		M-15 pTF683	This study
TF684		M-15 pTF684	This study

Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Promega
pFLAG MAC			<i>E. coli</i> expression vector	SIGMA
pGEX4T-3			<i>E. coli</i> expression vector	Pharmacia Biotech
pQE-30			<i>E. coli</i> expression vector	QIAGEN
pTF479	pFLAG MAC	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI fragment containing 92AA	This study
pTF668	pGEX4T-3	<i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	0.35kbp <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI fragment containing pentaglycine	This study
pTF563	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.42kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing 92AA	This study
pTF673	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing P343A 92AA	This study
pTF674	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing W358A 92AA	This study
pTF681	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing D292W 92AA	This study
pTF682	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing I293W 92AA	This study
pTF683	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing I294W 92AA	This study
pTF684	pQE-30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	0.33kbp <i>Bam</i> HI- <i>Sac</i> I fragment containing R296A 92AA	This study

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Positions
FLAG -tag 92AA	pQEUV	CGGATAACAATTTACACAG	
	pQERV	GTTCTGAGGTCATTACTGG	
	ALEU6	ATAAGCTTTATAAACTAATAA	1047-1069
pentaglycine	ALEL2	GGGAATTCATGGGTAGTGATA	1352-1373
	pGEX-Gly5-ALE	GGGGATCCGGAGGAGGAGGAGGATGATTATACATAA	
	ALEL6	GGGAATTCGTGATGGGGAAGTTATTCTA	
92AA	ALEU5	ATGGATCCTATAAACTAATAAA	1037-1060
	ALEL4	TTCTGCAGTAGGGTAGTGATA	1452-1474
P343A	ALE P343A-u	GTATATTTAGCAGTTAGAAGTTGGAAT	1260-1287
	ALE P343A-r	AGTTCTAACTGCTAAATATACTCTTTT	1254-1281
W358A	ALE W358A-u	ACCATTAGCGGGAACAATCAAG	1307-1329
	ALE W358A-r	GATTGTTCCCGCTAATGGTCCTAATTC	1299-1326
D292W	ALE D292W-u	AGCTAACACATGGATTATTACAAGATTA	1160-1188
	ALE D292W-r	TTGTAATAATCCATGTGTTAGCTGTAAA	1101-1129
I293W	ALE I293W-u	TAACACAGATTGGATTACAAGATTAACA	1109-1137
	ALE I293W-r	ATCTTGTAATCCAATCTGTGTTAGCTGT	1104-1132
I294W	ALE I294W-u	CACAGATATTTGGACAAGATTAACAGG	1112-1139
	ALE I294W-r	TTAATCTTGTCCAAATATCTGTGTTAGC	1107-1135
R296A	ALE R296A-u	TATTATTACAGCATTAACAGGACCATTT	1118-1146
	ALE R296A-r	GGTCCTGTTAATGCTGTAATAATATCTGT	1113-1142

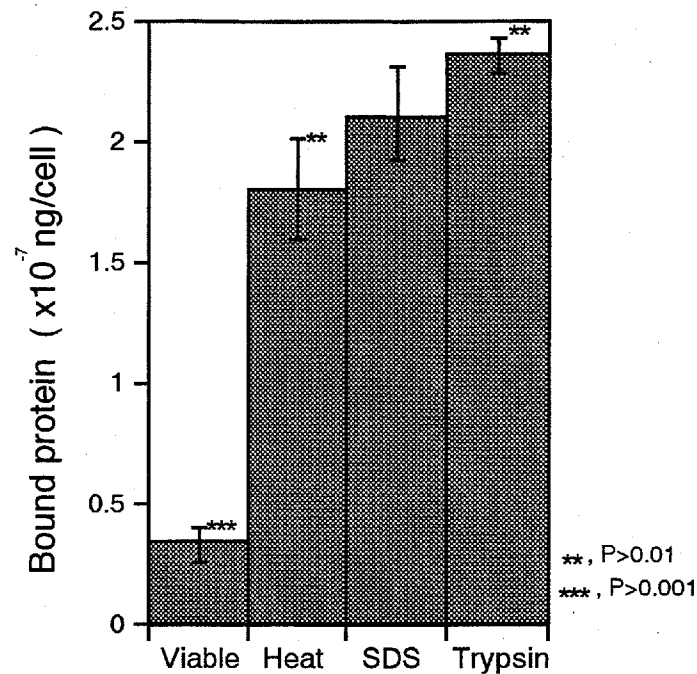


図 3-2 *S. aureus* 菌体への92AAの結合能

様々な処理をした*S. aureus* FDA209P菌体を用いて結合実験を行い、92AAの結合親和性を検討した。*S. aureus* FDA209P菌体を0.1 M リン酸バッファ (pH 6.8) に懸濁し、92AAを加えて4°Cで1時間インキュベートし、4% SDSによる溶出画分を数値化した。Viable, viable cell; Heat, heat treated cell; SDS, SDS-heat treated cell; Trypsin, trypsin treated SDS cell

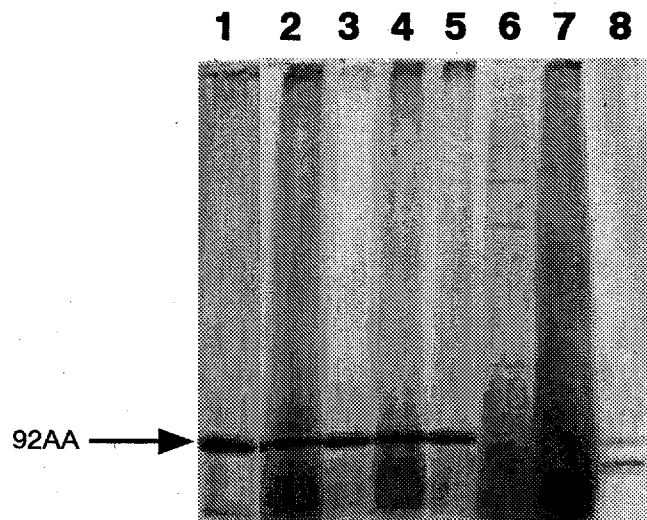


図 3-3 様々な菌体への92AAの結合能

様々な菌体の精製ペプチドグリカンを用いて92AAの結合実験を行い、その結合親和性を検討した。ペプチドグリカンを0.1 M リン酸バッファ (pH6.8) に懸濁し、92AAを加えて4°Cで1時間インキュベート後、4% SDSによる溶出画分をSDS-PAGE後、クーマシー染色した。レーン: 1, *S. aureus* FDA209P; 2, TF5303 (*S. aureus* RN4220 (pGC2)); 3, TF5311 (*S. aureus* RN4220 (epr)); 4, *S. capitis* EPK1; 5, *S. capitis* EPK2 (cured of the plasmid carrying epr gene) ; 6, *B. megaterium*; 7, *L. plantarum*; 8, *M. lysodeikticus*

表 3-2 *S. aureus* FDA209P菌体への92AAの結合親和性

Supplement	% of released 92AA bound to 209Pcell
Control (4% SDS)	100
8M Guanidine Hydrochloride	85.7 (± 11.3)
8M Urea	77.9 (± 7.6)
3M LiCl	60.7 (± 17.3)
1% Triton X-100	16.2 (± 17.6)

表 3-3 92AAの*S. aureus*菌体への結合に及ぼす影響^{*}

Supplement or adjustment in pH	% of 92AA bound to 209Pcell
Control	100
Peptides	
1mM Pentaglycine	107
1mM Tetraglycine	105
Carbohydrates	
1% glucose	97
1% GlcNAc	102
1% MurNAc	91
Detergents	
1% Tween 80	97
1% Triton X-100	93
1% Nonidet P-40	101
1% Tween 20	98
0.1% SDS	100
Chaotropic agents or salts	
1M NaCl	95
5M NaCl	99
4M urea	82
5M urea	79
7M urea	59
4M Gdn-HCl	59
6M Gdn-HCl	56
90% (NH ₄) ₂ SO ₄	105
Other supplements	
50mM EDTA	100
1% β -mercaptoethanol	93
Distilled water	100
Adjustment to pH:	
10.5	122
9.5	112
8.5	110
7	97
4.74	100

* 様々な条件下にて、*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体と92AAの結合実験を行い、92AAの菌体への結合に及ぼす影響を検討した。*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を様々な物質を加えた0.1 M リン酸バッファー (pH6.8) に懸濁し、92AAを加えて4°Cで1時間インキュベートし、4 % SDSによる溶出画分を数値化し、0.1 M リン酸バッファー (pH6.8) のみで結合したタンパク質量を100 %としたときの割合を求めた。

Gdn-HCl, 塩酸グアニジン

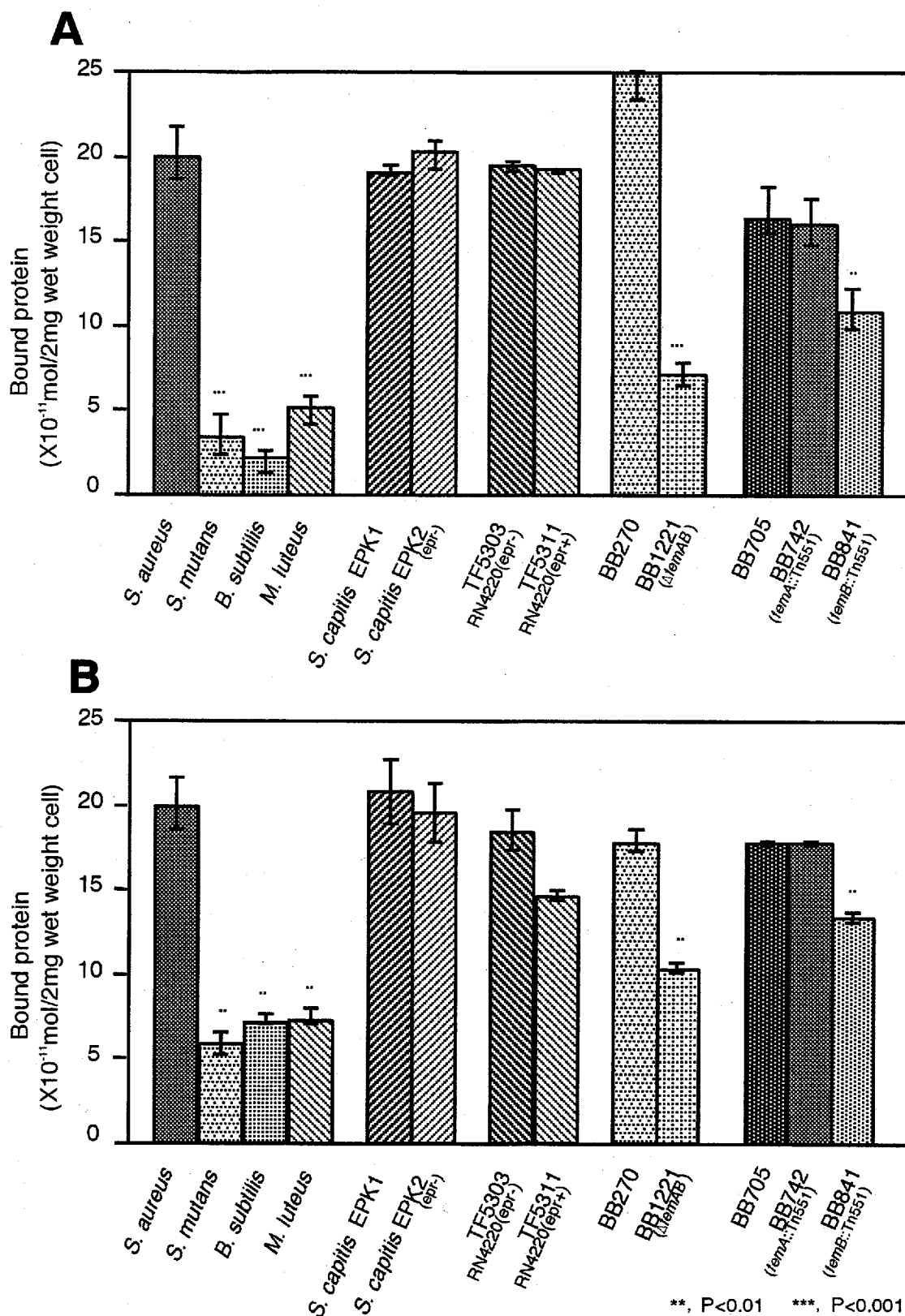


図 3-4 様々な菌体に対する92AAおよびALE-1の結合能

様々な菌のSDS加熱処理菌体を基質として92AAおよび Δ N-term ALE-1の結合能を検討した。SDS加熱処理菌体を 0.1 M ヨード酢酸含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁し、精製したそれぞれの変異型ALE-1を加えて4°Cで1時間インキュベートし、4 % SDSによる溶出画分を数値化した。(A) , 92AA; (B) , Δ N-term ALE-1

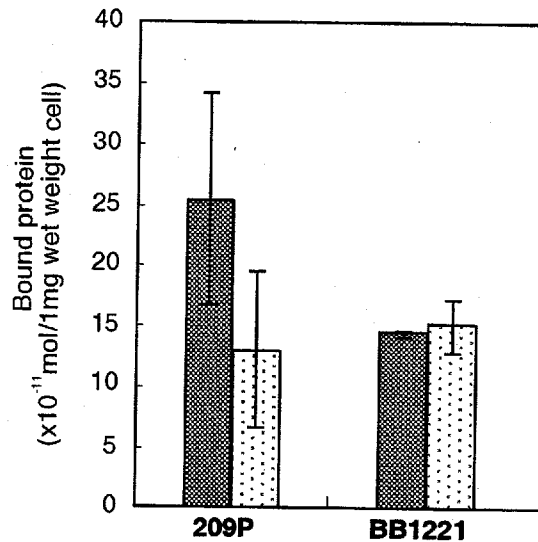


図 3-5 ALE-1の菌体への結合を担う92AAの役割

S. aureus FDA209菌体とBB1221 ($\Delta femAB$) 菌体のSDS加熱処理菌体を基質として Δ N-term ALE-1および Δ N,C-term ALE-1の結合能を比較する事で、92AAの結合について検討を行った。それぞれのSDS加熱処理菌体を 0.1 M ヨード酢酸含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁し、精製したそれぞれの変異型ALE-1を加えて4°Cで1時間インキュベートし、4 % SDSによる溶出画分を数値化した。■, Δ N-term ALE-1; □, Δ N,C-term ALE-1

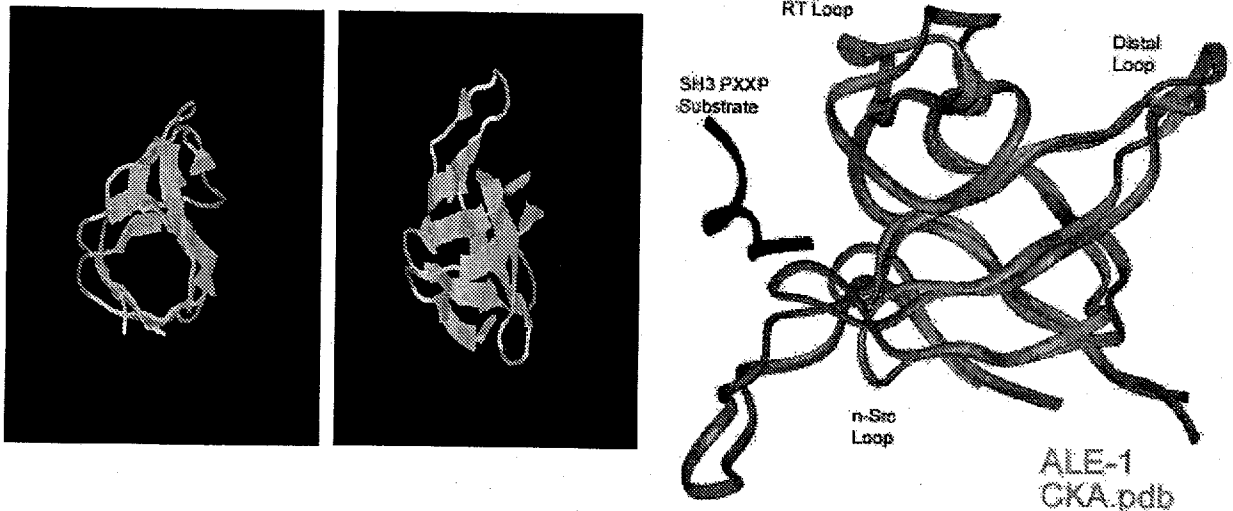
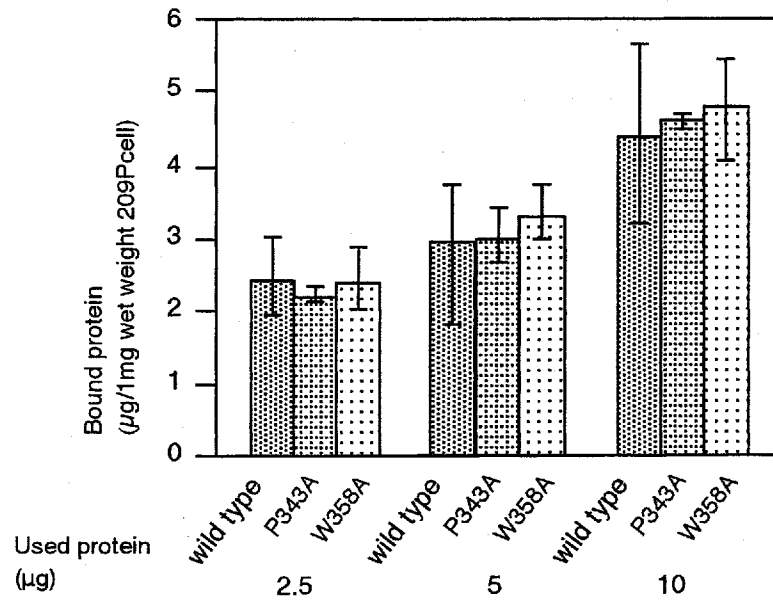


図 3-6 92AAの3次元構造

92AAの結晶化を行った。 β -barrel構造を持ち、哺乳類の多くのタンパク質内に存在するSH3 (Src-homology 3) subdomainと相同性が見られた。

A



B

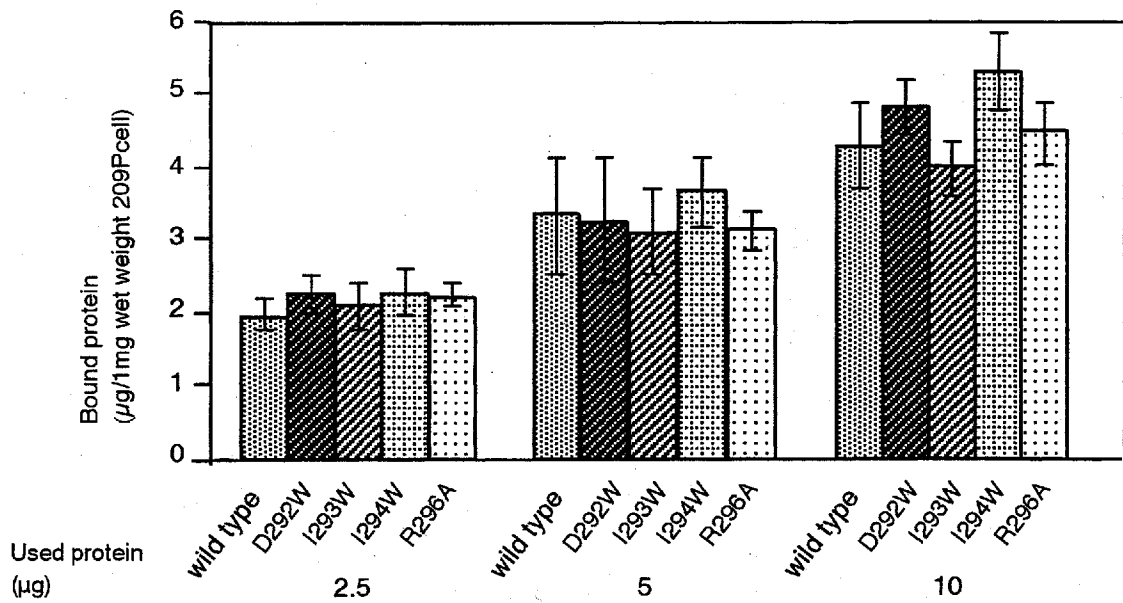


図 3-7 変異型92AAの結合能

それぞれの変異型92AAについて、*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を用いて結合実験を行い、野生型の結合能と比較した。*S. aureus* FDA209P SDS加熱処理菌体を0.1M リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁し、精製したそれぞれの変異型92AAを2.5, 5, 10 μg加えて4℃で1時間インキュベートし、4 % SDSによる溶出画分を数値化した。

第4章 ALE-1 に対する耐性を担う *epr* 遺伝子のクローニング、塩基配列の決定および Epr の機能解析

第1節 概要

第1章で述べたように、*Staphylococcus capitis* EPK1 は菌体外に glycylglycine endopeptidase ALE-1 を産生する。ALE-1 は *S. simulans* bv. *Staphylolyticus* の産生する lysostaphin [65] と非常に類似していた。また、lysostaphin をコードする遺伝子 *lss* と同様、*ale-1* 遺伝子も *S. capitis* EPK1 の大プラスミド上にコードされていた。*S. simulans* bv. *staphylolyticus* は自身が産生する lysostaphin による溶菌に対して耐性を示し[60]、その耐性は細胞壁ペプチドグリカン架橋部分のアミノ酸の glycine 含量を減少させ、serine 含量を増加させることによることが報告されている [14, 60]。このペプチドグリカンの修飾を担う遺伝子は *lif* と呼ばれ、*lss* 遺伝子と共に大プラスミド pACK1 上にコードされる [21, 22]。しかし *lif* 遺伝子の詳細についてはまだよく分かっていない。*S. capitis* EPK1 は lysostaphin、ALE-1 による溶菌に対して耐性を示すことを見出している。そこで本研究では *S. capitis* EPK1 も *S. simulans* bv. *staphylolyticus* と同様の方法で、自身の産生する ALE-1 に対して耐性を示しているのか否かを調べた。

S. capitis EPK1 は ALE-1 に対する耐性遺伝子 *epr* (endopeptidase resistance) を発現することを明らかにし、その遺伝子を同定した。*epr* 遺伝子は ALE-1 構造遺伝子 *ale-1* の 322 bp 上流に位置し、逆方向に転写されていた。また、その DNA 塩基配列より、*epr* 遺伝子は 413 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、推定分子量は 48,990 Da、予想される等電点は 9.93 であった。相同性検索より、Epr はペプチドグリカンの pentaglycine よりなる架橋形成における Gly-tRNA から glycine の転移に関わる *femA* 遺伝子および *femB* 遺伝子の産物 FemA (36 %)、FemB (33 %) と相同性が認められた。*epr* 遺伝子のみを持つプラスミドのブドウ球菌形質転換株は lysostaphin に耐性を示し、この株のペプチドグリカンアミノ酸組成分析の結果、ペプチドグリカンはモル比で glycine が低下し、serine が増加していた。同様に *S. capitis* EPK1 でもペプチドグリカンアミノ酸組成中に serine が存在した。これらのことから、Epr の過剰発現によりペプチドグリカンの glycine 5 量体よりなる架橋構造から glycine が 1~2 分子欠落し、代わりに serine が挿入されたと考えられた。すなわち Epr は架橋形成における Ser-tRNA の転移に関わる FemA/B 様の因子 [13, 25, 38, 47, 74] と考えられた。*S. capitis* EPK1 は自らが産生する glycylglycine endopeptidase から身を守るため、Epr を発現させて架橋に serine を入れていることが強く示唆された。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株および培養条件

実験に用いた菌株およびプラスミドは表 4-1、4-2 に示した。その他に *Staphylococcus hominis* CCM27327、*Staphylococcus delphini* DSM207717、*Staphylococcus kloosii* DSM206767、*Staphylococcus schleiferi* N880033、*Staphylococcus caprae* CCM35737、*Staphylococcus arlettae* DSM206727、*Staphylococcus chromogenes* CCM33877、*Staphylococcus hycus* CCM23687 および *Staphylococcus equorum* DSM206747 (Jean Frenecy)、*Staphylococcus capitis* ATCC29663、*Staphylococcus cohnii* ATCC29994、*Staphylococcus haemolyticus* ATCC29970、*Staphylococcus intermedius* ATCC29663、*Staphylococcus saccharolyticus* ATCC14953、*Staphylococcus simulans* ATCC27848、*Staphylococcus warneri* ATCC27836、*Staphylococcus xylosus* ATCC27971、*Staphylococcus lugdenensis* ATCC438097 および *Staphylococcus felis* ATCC491687 (American Type Culture Collection) を使用した。*Staphylococcus* 属は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems) を用いて、*E. coli* [7] は Luria-Bertani (LB) broth (yeast extract 5 g, polypeptone 10 g, NaCl 10 per liter (pH 7.2)) を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要に応じて ampicillin (50 µg/ml)、chloramphenicol (30 µg/ml) を添加した培地で培養を行った。

第2項 *S. capitis* EPK1 からの大プラスミド脱落方法

TSB で一晚培養した *S. capitis* EPK1 を 10 µM ethidium bromide を含む TSB に接種し 42°C で 24 時間培養後、TSB 寒天培地にまき、37°C で一晚培養後、得られたコロニーを *S. aureus* FDA209P 加熱処理菌体 (0.5 mg/ml)、リゾチーム (4 mg/ml)、IPTG (1 mM) 含有 1.5 % TSB 寒天培地にまいた。37°C で二晩培養後、コロニーの周囲に透明な溶菌斑ができていないものを選択した。

第3項 エンドペプチダーゼに対する耐性度の測定

被験菌のエンドペプチダーゼに対する耐性度を決定するために、microtiter plate (Becton Dickinson and Co.) を用い、500 µg/ml から 0.05 µg/ml 濃度の 2 倍系列希釈の ALE-1 あるいは lysostaphin を加えた TSB (150 µl) に、対数増殖期まで TSB で培養した被験菌を最終濃度 10^6 cells/ml となるように接種し、37°C で 16 時間静置培養後に増殖が完全に阻害された最低濃度を最少発育阻止濃度

MIC (minimum inhibitory concentration) とした [37]。

第4項 メチシリン、バンコマイシン感受性試験

被験菌のメチシリン、バンコマイシンに対する感受性について検討するため、微量液体希釈法を用いて MIC を測定した。microtiter plate (Becton Dickinson and Co.) を用い、1,024 $\mu\text{g/ml}$ 濃度より 2 倍系列希釈のメチシリンあるいはバンコマイシンを加えた TSB (150 μl) に、対数増殖期まで TSB で培養した被験菌を最終濃度 10^6 cells/ml となるように接種し、37°C で 24 時間静置培養後に増殖が完全に阻害された最低濃度を MIC とした。また、より正確に感受性レベルを検討するために、ポピュレーション解析を行った。種々の濃度 (0.5 から 1,024 $\mu\text{g/ml}$) のメチシリンを含む TSB 寒天培地に、TSB で一晚培養した被験菌を 10^9 個接種し、37°C で 48 時間培養後、コロニー数を測定した。

第5項 *epr* 遺伝子の塩基配列の決定

第1章、第2節、第14項に準じて部分欠失変異株を作製、塩基配列の決定を行った。

第6項 コアグララーゼ陰性ブドウ球菌属での *epr* 遺伝子の検出

コアグララーゼ陰性ブドウ球菌属の DNA は第1章、第2節、第12項に準じて調整した。その際、細胞を溶解するために lysostaphin のみでなく、lysostaphin (120 $\mu\text{g/ml}$) と共に mutanolysin (60 $\mu\text{g/ml}$) を用いた。サザンハイブリダイゼーションは第1章、第2節、第13項に準じて行い、プローブの標識とハイブリダイゼーションは ECL nucleic acid labelling and detection system (Amersham Life Science) を用い、化学発色によりバンドを検出した。検出には Fuji RX-U film (Fuji Film Co.) を使用した。プローブとして *Epr* のみが含まれた DNA 断片を Expand™ High Fidelity PCR System (Roche) を用いた PCR 反応により増幅、精製して用いた。プライマーとして、5'-TCCAATTATCCAAACTGA-3' と 5'-TTTTGTAAATAAACCCCTCTAA-3' を用いた。

第7項 *epr* 遺伝子の形質転換および形質導入

Epr の形質を *S. aureus* で検討するため、推定プロモーター領域を含んだ *epr* 遺伝子全体を含む DNA 領域を Expand™ High Fidelity PCR System (Roche) を用いた PCR 反応で増幅し、Original TA Cloning kit (Invitrogen Co., San Diego, Calif., USA) を用いて pCR2.1 ベクターに組み込んだ。プラ

イマーとして 5'-AAATTAAACCTCCTAATA-3' と 5'-GCCAGCTTGTGGGATACTC-3' を用いた。クローン化された DNA 断片を塩基配列の決定法によって確認後、*EcoRI* で消化後切り出し、シャトルベクター pGC2 [70] にクローン化した。

epr 遺伝子をコードした pTFS6 を *S. aureus* RN4220 に形質転換した。0.1 µg のプラスミド DNA と *S. aureus* RN4220 のコンピテントセル 40 µl を混合し、25 µF、2.2 kV の条件で Electro cell manipulator 600 (BTX Electroporation system, BTX Inc., San Diego, Calif., USA) を用いてエレクトロトランスフォーメーションを行った。直後に 1.1 M スクロース含有 TSB を加え 1 時間 37°C で静置し、その後 chloramphenicol (30 µg/ml) 含有 TSB 寒天培地にまき、一晚 37°C で培養後得られたコロニーを選択した。

epr 遺伝子をコードした pTFS6 を形質導入により *S. aureus* RN4220 から *S. aureus* COL、BB270、BB308 および UT-34-2 に移した [2]。*S. aureus* RN4220 の得られた形質転換株を chloramphenicol 30 µg/ml 含有 TSB で一晚培養し、培養液 10 ml を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) した後、1 ml の TSB で懸濁した。その菌液 100 µl、bacteriophage 80α [73] 50 µl と phage top agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, agar 5.0 g per liter) を混合し、あらかじめ作製しておいた phage bottom agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, agar 15.0 g per liter) 上に播き、37°C で 24 時間培養した。その後 phage top agar のみをかきとり、2 ml の phage buffer (0.1 M MgSO₄ 10.0 ml, 0.4 M CaCl₂ 10.0 ml, 2.5 M Tris-HCl (pH 7.8) 20.0 ml, NaCl 5.9 g, gelatin 1.0 g per liter) を加え 1 時間 4°C で静置後遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、上清を 0.2 µm のセルロースメンブレンで濾過した溶液を phage lysate とした。TSB で一晚培養した *S. aureus* COL、BB270、BB308 および UT-34-2 の培養液をそれぞれ 10 ml 遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) した後、1 ml の TSB で懸濁し、その菌液 100 µl と作製した phage lysate 60 µl と phage buffer 100 µl を混合し、37°C で 20 分間振とうさせた後、0.3 GL top agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, 60 % sodium lactate 3.3 ml, glycerol 2.0 ml, trisodium citrate dihydrate 0.5 g, agar 7.5 g per liter) 3 ml を加え、あらかじめ作製しておいた 0.3 GL bottom agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, 60 % sodium lactate 3.3 ml, glycerol 2.0 ml, trisodium citrate dihydrate 0.5 g, agar 15.0 g per liter) (下層に chloramphenicol 30 µg/ml 含有 0.3 GL bottom agar 10 ml、上層に薬剤非含有 0.3 GL bottom agar 20 ml) に播き、37°C で 48 時間培養した。得られたコロニーを chloramphenicol 30 µg/ml 含有 TSB 寒天培地に播き、生えてきたコロニーを採取した。

第 8 項 溶菌酵素感受性試験

被験菌の溶菌酵素に対する感受性を菌体懸濁液の濁度の減少と、Zymography を用いて測定した。

濁度の減少は、第 1 章、第 2 節、第 5 項の方法に準じて、被験菌のエンドペプチダーゼに対す

る感受性を測定した。

Zymography [36, 52]には溶菌酵素として lysostaphin、51 kDa GL (endo- β -N-acetylglucosaminidase)、62 kDa AM (N-acetylmuramyl-L-alanine amidase) を用いた。これらの溶菌酵素を 2 倍系列希釈したサンプルに等量の 2x lysing バッファー (1.5 M Tris-HCl バッファー (pH 6.8) 1.25 ml, 10 % SDS 2 ml, 2-mercaptoethanol 0.5 ml, glycerol 2 ml, H₂O 3.25 ml, 0.1 % bromophenol blue 1 ml) を加えたものを SDS-PAGE 用サンプルとし、分離ゲル中に加熱処理した菌体を 0.5 mg/ml で含むポリアクリルアミドゲルを作製し、サンプルを添加、SDS-PAGE を行った。lysostaphin、62 kDa AM の活性の検出には 15 %ポリアクリルアミドゲルを、51 kDa GL の活性の検出には 7.5 %ポリアクリルアミドゲルを使用した。泳動後、ゲルを十分量の精製水で室温で 30 分間緩やかに振とうして SDS を除去し、0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で 37°C、12 時間緩やかに振とうした。溶菌活性は immunoviewer MU で透明なバンドとして検出でき、検出することのできる最少の溶菌酵素量を Minimal Bacteriolytic enzyme Dose (MBD) [52] として判定した。

第 9 項 *epr* 遺伝子の試験管内転写、翻訳

epr 遺伝子がのったプラスミド DNA を鋳型に試験管内データンパク質を合成させるために、EXPRE³⁵S³⁵S protein labelling mix (Amersham Life Science) と共に Linked T7 transcription-translation system (Amersham Life Science) を使用し、そのプロトコールにそって行った。

第 10 項 ペプチドグリカンのアミノ酸分析

被験菌のペプチドグリカン第 1 章、第 2 節、第 6 項に準じて精製した。得られたペプチドグリカン第 6 N HCl で 100°C 15 時間、加水分解したペプチドグリカンサンプルを L-8500 amino acid analyzer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) を用い、ニンヒドリン法で計測した。

第 3 節 結果

第 1 項 *epr* 遺伝子のクローニング

S. simulans bv. *staphylolyticus* は lysostaphin による溶菌に対して耐性であり、その耐性を担う *lif* 遺伝子は lysostaphin をコードする *lss* 遺伝子の非常に近傍にあり、どちらも 8.4 kbp のプラスミド pACK1 上にコードされている事が報告されている [14]。 *S. capitis* EPK1 と EPK1 からプラスミ

ドを脱落させた株 EPK2 で ALE-1 による溶菌に対する感受性を見たところ、EPK1 は、ALE-1 による溶菌に対して耐性を示したが、EPK2 は ALE-1 によって溶菌した (図 4-1)。 *S. capitis* EPK1 も *S. simulans* と類似した遺伝子の構造を持つことで自らの産物である ALE-1 から自身を守っているのではないかと考えられた。*S. capitis* EPK1 より得た *ale-1* 遺伝子を含む 3.5 kbp の *HincII* 断片を pUC19 にクローニングした pTF3 を用い、この DNA 断片に *epr* 遺伝子が含まれていないか否かを検討した。まず pTF3 の 3.5 kbp の *HincII* 断片をシャトルベクターである pGC2 の *HincII* サイトにクローニングし pTFS3 とした。pTFS3 を *S. aureus* RN4220 に形質転換し、chloramphenicol 耐性の形質転換株を選択し TF2 とした。コントロールとして同様に pGC2 を保持する RN4220 株を得、TF1 とした。微量液体希釈法を用い、TF1、TF2 の lysostaphin の MIC を測定した。表 4-1 に示したように、TF2 の MIC は 50 $\mu\text{g/ml}$ と、TF1 の 0.2 $\mu\text{g/ml}$ よりも lysostaphin に対してより耐性になっていた。TF2 を *S. aureus* FDA209P 加熱処理菌体を含む寒天平板上で 37°C、24 時間培養すると、TF2 は *S. aureus* を溶解するためにコロニー周囲に溶菌斑を呈した。一方、TF1 には溶菌斑はみられなかった。このことから、TF2 は ALE-1 を産生し、菌体外に分泌していることが示された。また、pGC2 に *ale-1* 遺伝子のみをクローニングし、*S. aureus* に形質転換し ALE-1 を発現させようと試みたが不可能だった。この結果は TF2 が glycylglycine endopeptidase に耐性になっている事を示唆している。図 4-2 に 3.5 kbp *HincII* 断片の制限酵素地図を示した。エンドペプチダーゼに耐性化するのに必要な最小の DNA 配列を決定するために、3.5 kbp *HincII* 断片からサブクローニングした DNA 断片を同様に RN4220 に形質転換した。3.5 kbp *HincII* 断片を部分欠失変異させた、3.2、2.5、2.3 kbp の *HincII-EcoRI* 断片、2.2 kbp の *HincII-HindIII* 断片を pGC2 にクローニングして、それぞれ pTFS31、pTFS32、pTFS33、pTFS34 とした。これらプラスミドを RN4220 に形質転換し、得られた株をそれぞれ TF3、TF4、TF5、TF6 とした。TF3 と TF4 は lysostaphin の MIC からエンドペプチダーゼ耐性になっている事が明らかとなったが、TF5 と TF6 は耐性にはなっていなかった (表 4-1、図 4-2)。エンドペプチダーゼ耐性を発現する DNA 断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列から、同じ方向ではあるが、読み枠の違う 2 つの open reading frame (ORF)、*orf1* と *orf2* の存在が明らかとなった。*ale-1* ORF は *orf1* と逆方向にあった。これらの事から、2.2 kbp *HindIII-HincII* DNA 断片がエンドペプチダーゼ耐性の表現形に必要で、*orf2* は必要でない事が示唆された。pTF32 の挿入断片からの 1.7 kbp *EcoRI-NheI* 断片を pGC2 にサブクローニングしたものを pTFS5 とした。pTFS5 を RN4220 に形質転換して得られた株を TF7 とした。lysostaphin の MIC を測定したところ、TF7 はエンドペプチダーゼに対して高度耐性を示した (表 4-1)。そこで *orf1* 全体と、その推定プロモーター領域の上流の DNA 領域を含む DNA 断片を増幅するためのプライマーセットを合成し、PCR 反応を行い、得られた DNA 断片を *E. coli* XL1-Blue で pCR2.1 にクローニング、その後 pGC2 にサブクローニングし、得られたプラスミドを pTFS6 とした。pTFS6 を RN4220 に形質転換した株を TF8 とした。TF8 の lysostaphin に対する MIC を測定したところ、TF8

は ALE-1 同様、lysostaphin に対して高度耐性を示した (表 4-1)。そこで、この *orf1* を *epr* (endopeptidase resistance) と名付けた。

第2項 *epr* 遺伝子の塩基配列

図 4-3 に pTFS32 の 2.5 kbp DNA 断片の塩基配列を示した。*epr* 遺伝子は ALE-1 構造遺伝子 *ale-1* の 322 bp 上流に位置し、逆方向に転写される事が明らかとなった。また、*epr* 遺伝子は 426 位の ATG コドンから始まり、1665 位の TGA コドンで終わっていた。Shine-Dalgarno 配列 (AAAGTCG) が推定開始コドンの 8 塩基上流にみられた。推定されるプロモーター配列が *epr* ORF の上流に存在し、TTTCACA (194 から 199 位) と TATTATT (217 から 223 位) がそれぞれ -35 と -10 のプロモーター領域と考えられた。*epr* 遺伝子と *ale-1* 遺伝子の間の領域には 2 つの回転対称配列が存在していた。*epr* 遺伝子領域の下流にはチミンに富んだループ構造があり、rho 非依存性ターミネーション領域と考えられた。*epr* 遺伝子は 413 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、推定分子量は 48,990 で、予想される等電点は 9.93 であった。試験管内での pTFS6 を用いた発現実験では、コントロールとしての pGC2 では観察されなかった分子量 46,000 のタンパク質が合成された。これは *epr* にコードされているタンパク質の分子量と一致した (データ示さず)。

epr の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST および FASTA network search service (DDBJ) を用いた相同性検索より、Epr は *S. simulans* の glycylglycine endopeptidase 耐性化を担う遺伝子産物である Lif と 70 % の高い相同性があり、また、ペプチドグリカンの pentaglycine からなる架橋形成において Gly-tRNA の転移に関わる *femA* 遺伝子および *femB* 遺伝子の産物である *S. aureus* の FemA と 36 %、FemB と 33 % の相同性が認められた (表 4-3)。

第3項 *epr* 発現、非発現時の細胞壁のアミノ酸組成

epr 遺伝子が発現する事によって、ペプチドグリカンの構造に変化をもたらすかどうかを明らかにするために、*S. capitis* EPK1、*ale-1* 遺伝子がコードされているプラスミド脱落株 *S. capitis* EPK2、*S. aureus* TF1、*S. aureus* TF8 のペプチドグリカンを精製し、アミノ酸組成の分析を行った。その結果、図 4-4 に示すように、EPK1 に比して EPK2 ではモル比で serine が減少し、glycine が増加していた。また、TF8 は TF1 に比べ glycine が少なく serine が多く存在していた。

第4項 *epr* 発現による溶菌酵素感受性の影響

TF8 における lysostaphin 耐性の表現形や、ペプチドグリカンのアミノ酸組成の変化から、*epr* が

発現する事によって *S. aureus* のペプチドグリカンの架橋部分のアミノ酸組成がかわるのではないかと示唆された。*epr* の過剰発現がペプチドグリカンに及ぼす影響を明らかにするために、加熱処理した被験菌を基質とした Zymography [52] によって、lysostaphin、62 kDa amidase、51 kDa glucosaminidase に対する感受性を測定する事で、さらに細胞壁の構造を解析した。これらの酵素はそれぞれ、*S. aureus* のペプチドグリカンの glycine と glycine の間 [33]、GlcNAc と MurNAc の間 [78]、MurNAc と alanine の間 [79] の結合を切断する。分析の結果、TF8 を Zymography の基質として用いた時、lysostaphin の MBD 値は TF1 を基質とした時の 8 倍と高くなっていた (表 4-4)。一方、TF8 の 62 kDa AM、51 kDa GL に対する MBD 値は TF1 のそれと同じであった (表 4-4)。

第 5 項 *epr* 遺伝子の検出

epr 遺伝子の相同性検索より *S. capitis* EPK1 は *femA/B* 遺伝子と密接に関係した遺伝子を持つ事が明らかとなった。*femA* 遺伝子、あるいは *femB* 遺伝子を不活化した *S. aureus* は lysostaphin 耐性を示し、架橋部分の glycine 含量の減少がみられた [4, 25, 38, 74]。一方、*S. capitis* EPK1 および *epr* 遺伝子を含んだプラスミドを持つ *S. aureus* は glycine 含量が減少し、serine 含量が増加していた。この結果から、*epr* 遺伝子と *femA/B* 遺伝子は同じ遺伝子ファミリーに属するが、機能としては異なる事が示唆された。lysostaphin 耐性の表現形はコアグララーゼ陰性ブドウ球菌属 [101] に広くみられ、それはペプチドグリカンの架橋構造の glycine 残基の serine への置き換わりによるものである事が示唆されていた [67, 100]。そこで、本研究では *S. aureus* とコアグララーゼ陰性ブドウ球菌属を含む様々の *Staphylococcus* 属からの DNA をサザンハイブリダイゼーションでスクリーニングした。プローブとして、*epr* 遺伝子の一部を含んだ DNA 断片を PCR 反応で増幅して使用した。図 4-5 に示すように、プローブは *S. capitis* EPK1 の 8.3 kbp *EcoRI* 断片と、他のコアグララーゼ陰性ブドウ球菌属の同じ大きさの断片に反応した。いくつかの株で反応する DNA 断片の大きさの多様性が見られた。*ale-1* 遺伝子と *epr* 遺伝子のコードされたプラスミドを脱落させた *S. capitis* EPK2 では 8.3 kbp *EcoRI* のバンドは消失している事から、*epr* 遺伝子はプラスミド上のみにコードされている事が示唆された。興味深いことに、プローブは *femA/B* 遺伝子領域を含んだ DNA 断片にはハイブリダイズしなかったにも関わらず、*S. aureus* で *S. capitis* EPK1 の 8.3 kbp *EcoRI* 断片と同じ大きさのバンドが認められた。

第 6 項 *S. aureus* のメチシリン、バンコマイシンの感受性に及ぼす Epr の過剰発現の影響

femA 遺伝子および *femB* 遺伝子はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のメチシリン耐性に必須の遺伝子である [4]。トランスポゾンによる *femA* あるいは *femB* 遺伝子の変異株はメチシ

リン感受性 *S. aureus* (methicillin-sensitive *S. aureus* : MSSA) および MRSA のメチシリンに対する感受性を増加させる [4, 25, 47]。これら変異株は lysostaphin に対して耐性化し、ペプチドグリカン架橋構造の glycine 含量が減少し、わずかに serine 含量が増加した [25, 47]。一方、グリコペプチド系抗生剤への耐性が増加した *S. haemolyticus* はペプチドグリカンの側鎖の glycine の代わりに serine が付加されていたことが報告されている [6]。*epr* 遺伝子は *S. aureus* のペプチドグリカンのアミノ酸組成に同様の変化をもたらすことから、*epr* 遺伝子が *S. aureus* のメチシリン、バンコマイシンへの感受性に影響を与えるのではないかと考えられた。そこで MRSA である COL[39]に pGC2、pTFS6 を形質導入し、得られた株を TF9、TF10 とし、これらの株と MSSA (TF1 および TF8) についてメチシリンとバンコマイシンの感受性を測定した。*epr* 遺伝子保有株と非保有株の間でメチシリンとバンコマイシンの感受性には違いが見られなかった (表 4-1)。また、*epr* 遺伝子が FemA、FemB を不活化させた MRSA 変異株のメチシリン耐性の形質を戻すことができるか否かを検討した。MRSA 株である BB270、その *femA* および *femB* 遺伝子の変異株である BB308 と UT-34-2 に pGC2 あるいは pTFS6 を導入した。これらの形質導入株について lysostaphin とメチシリンの感受性を測定した (表 4-1)。*femA* 遺伝子と *femB* 遺伝子変異株は、親株である BB270 より lysostaphin に対してより耐性になっていたが、その耐性レベルは多数複製するプラスミドである pGC2 にコードされた *epr* 遺伝子を持つ *S. aureus* の耐性レベルよりもかなり低かった。*epr* 遺伝子を持った *femA* 遺伝子変異株は lysostaphin に対して高度に耐性になり、TF13 にくらべメチシリンに対する耐性は一部回復していた。この影響が 48 時間インキュベート後にみられたのは、形質導入株の発育速度が比較的遅いからであろうと考えられた。一方、*epr* 遺伝子を持った *femB* 遺伝子変異株は lysostaphin に対して高度耐性になったが、メチシリンには感受性であった。

第 4 節 考察ならびに小括

細胞壁ペプチドグリカンがペプチドグリカン加水分解酵素に対して耐性を示すのにはいくつかの機能が考えられてきた。例として、ペプチドグリカンのアミノ糖の O-アセチル化や脱アセチル化があり、そのことで細胞はリゾチームや他のペプチドグリカン加水分解酵素に耐性になる [1, 8, 15, 20, 46, 62, 83]。また、lipoteichoic acid [5, 10, 16, 26, 28] や teichoic acid [19, 90]、teichuronic acid [61] はペプチドグリカン加水分解酵素と相互作用することによりペプチドグリカンを加水分解酵素から守る阻害剤の役割をしていると考えられている。*S. simulans* bv. *staphylolyticus* ではペプチドグリカンの架橋部分のアミノ酸組成を変える事により、自身の産生する lysostaphin に耐性になっており [14, 60]、それは *lif* 遺伝子によるものだということが分かっている [14]。本研究では *S. capitis* EPK1 もペプチドグリカンの架橋部分のアミノ酸組成を変える事により、自身の産生する

ALE-1 に耐性になっていることを示した。ALE-1 とは異なるペプチドグリカン上の結合部位を切断する溶菌酵素に対する細胞の感受性は *epr* 遺伝子の存在により影響を受けなかったことから、この耐性機構は glycylglycine endopeptidase に特異的である事が明らかとなった (表 4-4)。

S. capitis EPK1 の *epr* 遺伝子の推定アミノ酸配列のタンパク質相同性検索の結果、*S. aureus* の *femA/B* 遺伝子と相同性があることが分かった。アミノ酸配列で相同性があっても、その機能は逆であった。多数複製するプラスミドにコードされた *epr* 遺伝子を持った *Staphylococcus* 株はそのペプチドグリカン架橋構造の serine 含量が増加し、glycine 含量が減少していた。一方、*femA*、*femB* 遺伝子を不活化した *S. aureus* 株ではペプチドグリカン架橋構造の glycine 含量が減少していた [4, 25, 38, 47, 74]。 *S. aureus* では pentaglycine 側鎖は Gly-tRNA が直接 lipid-linked pentapeptide の L-lysine の ϵ -アミノグループに結合して glycine が付加され形成され则认为られている [33, 49, 87]。この過程はリボソームを必要とせず、C 末端にアミノ酸が付加されていく通常のタンパク質合成とは区別される。 *S. epidermidis* では架橋構造に glycine と L-serine を含んでおり、最初に L-lysine の ϵ -アミノグループに結合するのは glycine である [89]。2 つはそれぞれ Gly-tRNA と Ser-tRNA から転位する [55, 89]。 *femA* 遺伝子変異株のペプチドグリカン構造の分析から、一つの glycine に置き換わったムロペプチドの蓄積と、架橋構造の 2 番目あるいは 4 番目が serine に置き換わったムロペプチドの蓄積が見られた [13]。このことから、*femA* 遺伝子変異株では架橋構造の最初の glycine 残基が付加された後、合成の阻害が起こっている事が示唆された。さらなる研究で、ペプチドグリカン前駆体の pentaglycine からなる架橋構造において、*femA* 遺伝子は 2、3 番目の glycine の付加、*femB* 遺伝子は 4、5 番目の glycine の付加を担っていることが示唆された [38, 74]。本研究の結果から、*femA/B* 遺伝子と *epr* 遺伝子の遺伝子産物はペプチドグリカン前駆体にアミノ酸を付加するタンパク質ファミリーに属し、また、*epr* 遺伝子は pentapeptide に serine を付加することが示唆された (図 4-6)。

サザンハイブリダイゼーションの結果より、調べたほとんどのコアグララーゼ陰性ブドウ球菌属が *epr* 遺伝子配列、あるいはそれによく似た遺伝子配列を持つ事が明らかとなった。また、*S. aureus* も *epr* 遺伝子とハイブリダイズする DNA 断片を持っていた。同じ条件下で *epr* 遺伝子は *femA/B* 遺伝子を含む DNA 断片とハイブリダイズしなかったので、*S. aureus* でハイブリダイズした DNA 断片には *femA/B* 遺伝子は含まれない (図 4-5)。 *femA* 遺伝子のトランスポゾン変異株は架橋構造において glycine 含量が減少すると共に、わずかに serine 含量が増加する [13]。いくつかの *S. aureus* では架橋構造に serine が存在している事が報告されている [68]。 *S. aureus* は *epr* 様の遺伝子を持っており、その発現は通常の発育条件下では抑制されていると考えられた。

MRSA の *femA*、*femB* 遺伝子変異株とは違い、*epr* 遺伝子を持った MRSA のメチシリンに対する耐性は低くならなかった (表 4-1)。また、*epr* 遺伝子を持った *S. aureus* RN4220 もバンコマイシンの MIC に影響を及ぼさなかった。このことから、アミノ酸組成の変化はメチシリン、バンコマイ

シンに対する *S. aureus* の感受性の変化には直接影響を与えないことが示唆された。*femA* および *femB* 遺伝子変異株の glycine および serine 含量の合計は親株のそれよりかなり少なかった[13, 25, 38, 47, 74]。一方、Epr 発現 *S. aureus* の glycine および serine の合計含量は一定で、glutamic acid 1 mol あたり約 5 mol あった (図 4-4)。この結果から、架橋構造が短くなる事が MRSA のメチシリンに対する感受性の低下に重要な因子であり、ペプチドグリカンの架橋率および細胞壁の代謝に影響を及ぼすと考えられる。*femA* および *femB* 遺伝子変異株に Epr の形質を移した結果から、*epr* 遺伝子はメチシリン耐性において、*femA* 遺伝子と機能的に関連があると示唆された (表 4-1)。

小括

1. *S. capitis* EPK1 が持つ glycylglycine endopeptidase 耐性遺伝子 *epr* は ALE-1 構造遺伝子 *ale-1* の 322 bp 上流に位置し、逆方向に転写される 413 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、そのタンパク質の推定分子量は 48,990、予想される等電点は 9.93 であった。
2. 相同性検索の結果、Epr はペプチドグリカンの pentaglycine よりなる架橋形成において glycine の転移に関わる *femA* 遺伝子および *femB* 遺伝子の産物 FemA (36 %)、FemB (33 %) と相同性が認められた。
3. Epr は架橋形成における Ser-tRNA の転移に関わる FemA/B 様の因子と考えられた。
4. *S. capitis* EPK1 は自らが産生する glycylglycine endopeptidase ALE-1 から身を守るため、Epr を発現させて架橋に serine 残基を入れていることが強く示唆された。
5. *epr* 遺伝子は *S. capitis* EPK1 の保有する *ale-1* 遺伝子をコードするプラスミド上にのみ存在していた。
6. *epr* 遺伝子はメチシリン耐性において、*femA* 遺伝子と機能的に関連があると示唆された。
7. コアグララーゼ陰性ブドウ球菌属の多くに *epr* 遺伝子配列、あるいはそれによく似た遺伝子配列が存在することが明らかとなった。
8. MRSA に Epr を過剰発現させたとき、メチシリンとバンコマイシンに対する感受性に変化はみられず、ペプチドグリカンの架橋構造のアミノ酸組成の変化は、*S. aureus* のメチシリンあるいはバンコマイシンに対する感受性の変化には直接関与していないと考えられた。

表 4-1 使用した菌株

Strain	Relevant characteristics	Source or reference	MIC (μg/ml)			
			ALE-1	lysostaphin	DMPPC	VCM
<i>S. aureus</i>						
RN4220	8325-4 r ⁻	R. Novick	100	0.2	<0.5	0.5
COL	COL <i>mec</i>	A. Tomasz	—	0.1	1,024	1
BB270	NCTC8325 <i>mec</i>	B. Berger-Bächi	—	0.8	512 (512)	—
BB308	NCTC8325 <i>mec</i> (<i>femA</i> ::Tn551)	B. Berger-Bächi	—	3.2	4 (32)	—
UT-34-2	NCTC8325 <i>mec</i> (<i>femB</i> ::Tn551)	B. Berger-Bächi	—	6.4	4 (16)	—
TF1	RN4220 pGC2	This study	100	0.2	1	1
TF2	RN4220 pTFS3	This study	—	50	—	—
TF3	RN4220 pTFS31	This study	—	100	—	—
TF4	RN4220 pTFS32	This study	—	100	—	—
TF5	RN4220 pTFS33	This study	—	0.4	—	—
TF6	RN4220 pTFS34	This study	—	0.2	—	—
TF7	RN4220 pTFS5	This study	—	>500	—	—
TF8	RN4220 pTFS6	This study	>500	>500	0.5	1
TF9	COL pGC2	This study	—	0.8	512	1
TF10	COL pTFS6	This study	—	100	512	1
TF11	NCTC8325 <i>mec</i> pGC2	This study	—	0.4	512 (1,024)	1
TF12	NCTC8325 <i>mec</i> pTFS6	This study	—	100	512 (1,024)	1
TF13	NCTC8325 <i>mec</i> (<i>femA</i> ::Tn551) pGC2	This study	—	3.2	4 (32)	1
TF14	NCTC8325 <i>mec</i> (<i>femA</i> ::Tn551) pTFS6	This study	—	100	16 (512)	1
TF15	NCTC8325 <i>mec</i> (<i>femB</i> ::Tn551) pGC2	This study	—	0.8	4 (16)	1
TF16	NCTC8325 <i>mec</i> (<i>femB</i> ::Tn551) pTFS6	This study	—	100	4 (4)	1
<i>S. capitis</i>						
EPK1	<i>ale-1</i>	H. Suginaka	>500	100	—	—
EPK2	Cured of <i>ale-1</i> -encoding plasmid	This study	100	0.4	—	—
<i>E. coli</i>						
XL1-Blue	<i>rec1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac f'ZM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Bullock et al.				

DMPPC, メチシリン; VCM, バンコマイシン; —, 検討していない
() の MIC は 48 時間 インキュベーション 後に求めた。

表 4-2 使用したプラスミド

Plasmid	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pUC19			<i>E. coli</i> cloning vector	J. Messing
pCR2.1			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Invitrogen
pGC2			<i>S. aureus</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector	P. R. Stewart
pTF3	pUC19	<i>HincII</i>	3.5kbp <i>HincII</i> fragment of EPK1 DNA containing <i>ale-1</i>	This study
pTFS3	pGC2	<i>HincII</i>	3.5kbp <i>HincII</i> fragment of pTF3	This study
pTFS31	pGC2	<i>HincII</i> / <i>EcoRI</i>	3.2kbp <i>HincII</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pTF31 (3' deletion fragment of pTF3 <i>HincII</i> insert)	This study
pTFS32	pGC2	<i>HincII</i> / <i>EcoRI</i>	2.5kbp <i>HincII</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pTF32 (3' deletion fragment of pTF3 <i>HincII</i> insert)	This study
pTFS33	pGC2	<i>HincII</i> / <i>EcoRI</i>	2.3kbp <i>HincII</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pTF33 (3' deletion fragment of pTF3 <i>HincII</i> insert)	This study
pTFS34	pGC2	<i>HincII</i> / <i>HindIII</i>	2.2kbp <i>HincII</i> - <i>HindIII</i> fragment of pTF3 insert	This study
pTFS5	pGC2	<i>NheI</i> / <i>EcoRI</i>	1.7kbp <i>NheI</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pTF32 insert	This study
pTFS6	pGC2	<i>EcoRI</i>	1.65kbp PCR product	This study
pBBB	pSP64	<i>PstI</i>	10.5kbp <i>PstI</i> fragment of BB270 chromosome containing <i>femAB</i>	B. Berger-Bächi

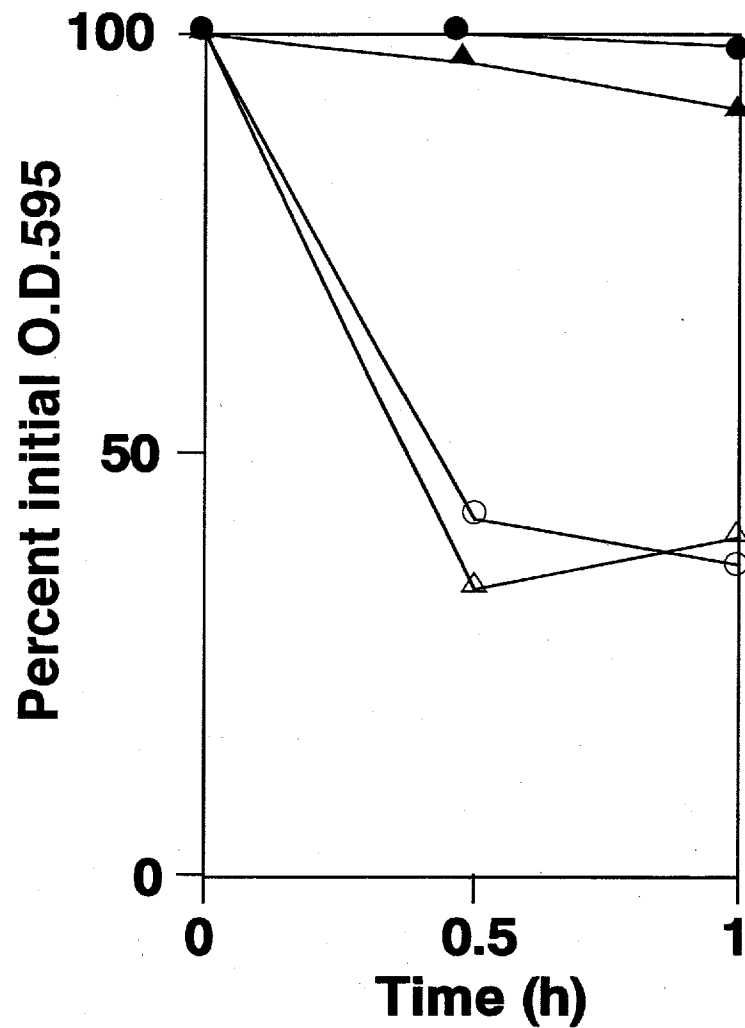


図 4-1 *S. capitis* EPK1およびEPK2のALE-1への感受性

濁度の減少によりそれぞれの菌体に対する精製ALE-1の溶菌活性を測定した。●, *S. capitis* EPK1の対数増殖期; ▲, *S. capitis* EPK1の定常期; ○, EPK1からのプラスミド脱落株 *S. capitis* EPK2 の対数増殖期; △, *S. capitis* EPK2の定常期の加熱処理菌体を使用し、精製したALE-1と共に2 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 中でインキュベートした。

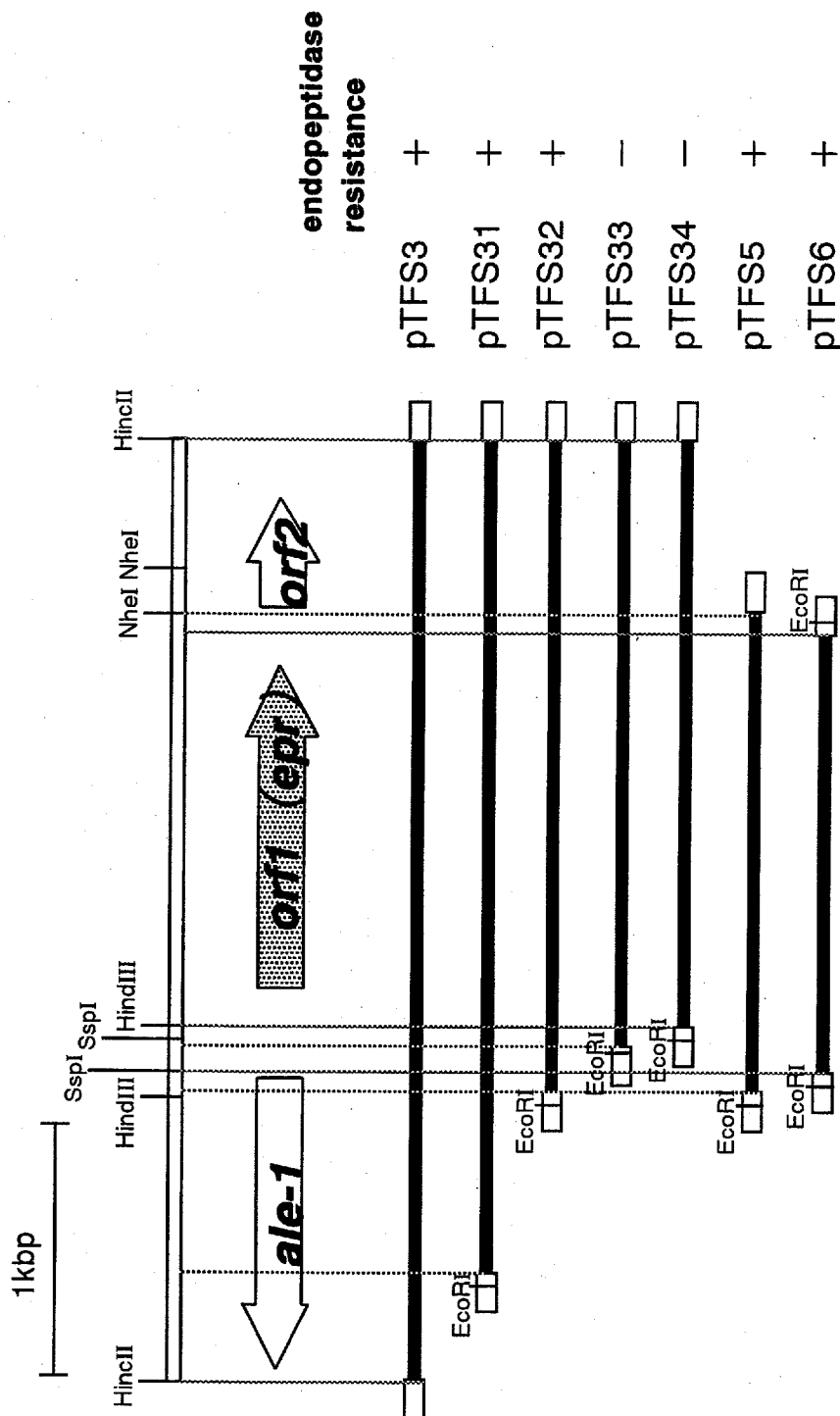


図 4-2 *epr*, *orf2*, *ale-1* の遺伝子構成と組み換えプラスミドの表現系

太い矢印がORFとその転写の方向を示す。それぞれの組み換えプラスミドを持つ *E. coli* XL1-Blue を様々な濃度の lysostaphin 存在下で 37°C 48 時間培養し、MIC を求める事でエンドペプチダーゼに対する耐性を決定した。■, *S. capitis* EPK1 DNA; □, ペクター DNA; -, lysostaphin MIC 1 µg/ml 未満; +, lysostaphin MIC 1 µg/ml 以上

HindIII
CAGAACTTTCATCATTACGGTTAAAAACTGATCCAACTAAAAAGTTCCTAATCCAATTGACAAAGATTTTACTAAAGTGAATTTTC 90
S A E D N V T L F V S G V L F T G L G I S L S K V L T F K
TATTGTATCCATAAATTTAACTCCTAATATTTAAAAATACATTAGTTATAATAACATATACTAATATGTATAATTTATTTTGAAA 180
R N T D M ←**ale-1**→
TATCAACAAAATCTTTACATTTTATTAAGATAAGATATTTATTTTATAGTAATTAATATTGGAGGGATACCCAACTCTGGTTTAAGGGA 270
HindIII
AATTAATACTATGTATTAATTAGAACTTATGCTTGGCGATTGGTTCAAACTCCTTCTCCCTCCGCTGTAACTTCATTATTAACCAAGC 360
ATTAATAATGCTTGGTCTTTTCTGCATATGTTGCTATATTATTCCTCTTAG**AAAGTCG**GTGCTCTATGAAATTTGTCCAATTATCCAAAA 450
orf-1(epr) M K F V Q L S K T
CTGAATTTCAAAATTTTGTAAACAGTCATTTTCTCACTATACTCAATCAAACTCAACATTTTCGATTATCGAAATAAATTTCAAAATGACG 540
E F Q N F V N S E F S H Y T Q S N Q H F D Y R N K F Q N D V
TTCATTTAGTTGGCGTTAAAGATAATGTAGGAACAGTCATTGCGAGCATGTTTATTAACAGAAGCCCAAGCTCTAAAAGTTTAAATACT 630
E L V G V K D N V G T V I A A C L L T E A Q A L K V F K Y F
TTTACTCATCGTGGCCCTGTTTGTAGACTTTAAAACTTTGAATTAGTGAGATTTTATATAAAAAATTAACATAGATATCTTAAAAAAA 720
Y T H R G P V L D F K N P E L V R F P Y K N L T R Y L K K N
ATCGTGGTTTATTTTAAACAGATCCTTATCTTTAGAAAATATAAGAAATGCACAAGGTGAGATATTAACAAAGCTATGATAATAGAC 810
R G L F V L T D P Y T L E N I R N A Q G E I L T S Y D N R P
CTCTGATTAAAACTTTGAAAAATATAGGGTATAAACATCAAGGTTATTCCATAGGTTATTCTCAAACGAGTCAAACTCAGATGGCTGTCTG 900
L I K T L K N I G Y K H Q G Y S I G Y S Q T S Q I R W L S V
TCTTGATTTTAAATTAATAAATACAGATATGCTTTTATCCGAAATGGATTATCAACAAGAAGAAATATTAAACAACTATGATAATAGAC 990
L D L N N K N T D M L L S E M D Y Q T R R N I K K T Y E M N
ATGTTCAAGTGAGAACTTTATCTATTGAAGAAACATCTAGATTTTTCAAATTTTAAATGGCAGAAGAAAACATGGATTTAAATTTA 1080
V Q V R T L S I E E T S R F F K L F K M A E E K H G F K F R
GAAATCAAGATTTTGAAAAAATGCAAAAAATATATAATGACAATAGTATGTTAAACTCGCATATATCAATTTATCCGATTTATTAG 1170
N Q D Y F E K M Q K I Y N D N S M L K L A Y I N L S D L L E
AAAAACAAAATAATAAATACTCAATTAACAAACAATACGAAGAAATAATAACGCATTAAAGCAAAATCCTAATTCGAAAAAATA 1260
K Q N N K I T Q L N K Q Y E E I I N A L K A N P N S K K N K
AAAATAAGGCTAATCAAATTAATCAACAATTAGTGCACAAAACAGAAAAATAATGAACAAAAGAAATTAATCAAACAGATGGCAAAA 1350
N K A N Q Q I N Q Q I S A Q N R K I N E T K E L I K T D G K I
TAATTGATTTAGCTGCAGCTTTCTATATATATAACAATGACGAAGTTTATTATCTTTCAAGTGGATCAAATCCCAATACAAATGCTTATA 1440
I D L A A A F Y I Y N N D E V Y Y L S S G S N P K Y N A Y M
TGGGAGCCTATCGTTTACAGTGGGAAATGATTAAATTTGCTAAACAGAATAACATTCCTAGATATAATTTTATGGTATTACTGGAGATT 1530
G A Y R L Q W E M I K F A Q K N N I P R Y N F Y G I T D G D F
TTAGTGAACAGCCGAAGATTATGGTGTTCAGGATTAAAGAAGGATTAAATGCTTATGTTGAAGAATATATAGGAGATTTTATTAAC 1620
S E T A E D Y G V Q R F K E G F N A Y V E E Y I G D F I K P
CTCTTAGACCCCTTTATTACAAAATATACACTCTACTAAAAAGATGATTTTTTATATAGTGGCTATCAATTAGCCACTATTTTTTCGCCA 1710
L R P F F I Y K I Y T L L K R **NheI**
GAAAAAATACATAAGGGGCTTGGGGAGTATCCCAACAAGCTGGCACGTCTGCCACGTGAGTGGCTTGCAAAGCCAATGCTTGGCAAAACCA 1800
CTTAACGACTTGATGAATTTTATCTTTATCTATAAAGTAAATGTAAAGAAAGGCGTTATCTTTGCAAGAAAGCGTGGTGGGAATAATGAG 1890
orf-2 M S
CGAACAAAACACATTTGTGGCTAGCGACGAAACTGTTGGGCGAAACCATAAACCCCAACCGTAAGGAGCCAAAACAAATCAGTTTTCGTGT 1980
E Q N T F V A S D E T V G R N H K P N R K E P K Q I S F R V
GAGCGAATCCGAATATTAAAGTTGAACAATCAGCTGAAACTTTAAATATGAGTGTGCTGCTGCTCGTTAAGAAAAAAGCACAAAGCGGC 2070
S E S E Y L K L K Q S A E T L N M S V P A F V K K K A Q G A
CCGATTGGTGCACCCAAATTTGATCAAGCAACGCGACAATCGGTAGCGAAAGATTGAGTATGTTGGGCGCAATGCCAATCAGATTGC 2160
R L V A P K L D Q A T R Q S V A K D L S M L G A N A N Q I A
GAAATATTGCAACCAACATCAACACGAAGCACCAGACTATGAAGCATTAGAAGCAATATCAGTGAATTACGTGAAAGGCTTGATGAGGT 2250
K Y C N Q H Q H E A P N Y E A L E R N I S E L R E R L D E V
ATGGAACCACTAAAGGAACAATGATTGTAAGTCAATATTATTAGTTGTTTGTGTTAGCAATTGCCAGTTTTTAAATTTTCCATGAACAA 2340
W K T L K E Q
CAAATTTTCCAAAGTTTGATTTTTTATAGGATTAGCTTTTATTGATGGCACTAAATTTTATTTGCTTATCAAAAAATGAAGAAGCTGAT 2430
CATCATGGCGACAATAAATTAAGTGCACCAATCAACGTCACGTGCCATTAATTATGCTGAAAAACGTGCGGTTGAAAAAGTGGTTT 2520
AAATTGTGATGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCG 2558

図 4-3 *S. capitis* EPK1 *epr* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列

下線、-35と-10の推定プロモーター領域; □, Shine-Dalgarno配列 (推定リボソーム結合部位);
→←, ループ構造をとる配列。

表 4-3 Epr の Lif、FemA、FemB との相同性

	Similarity	
	Epr	
<i>S. simulans</i> Lif	70%	(291aa)
<i>S. aureus</i> FemA	36%	(162aa)
<i>S. aureus</i> FemB	33%	(149aa)
<i>S. simulans</i> FemA	38%	(161aa)
<i>S. simulans</i> FemB	33%	(149aa)
<i>S. epidermidis</i> FemA	39%	(164aa)
<i>S. epidermidis</i> FemB	35%	(153aa)

表 4-4 加熱処理菌体のさまざまな溶菌酵素に対する感受性

	Minimal Bacteriolytic Dose (MBD) (ng)		
	lysostaphin	62 kDa AM	51 kDa GL
COL	0.1	2.5	25
TF1	0.1	2.5	25
TF8	0.8	2.5	25

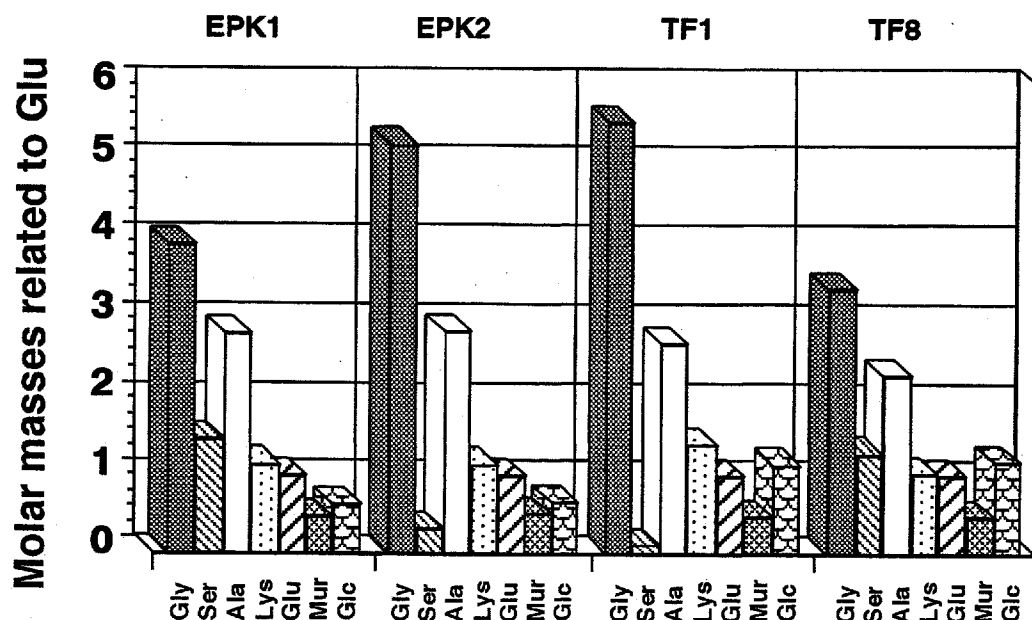


図 4-4 ペプチドグリカンのアミノ酸組成

S. capitis EPK1 (EPK1)、EPK1の*epr*プラスミド脱落株 (EPK2)、*S. aureus* RN4220 (TF1)、*S. aureus* RN4220の*epr*プラスミド保有株 (TF8) のそれぞれのペプチドグリカンのアミノ酸組成を測定した。glutamic acid (Glu) を1とした時のモル比で含有量を表した。Gly, glycine; Ser, serine; Ala, alanine; Lys, lysine; Glu, glutamic acid; Mur, muramic acid; Glc, glucosamine

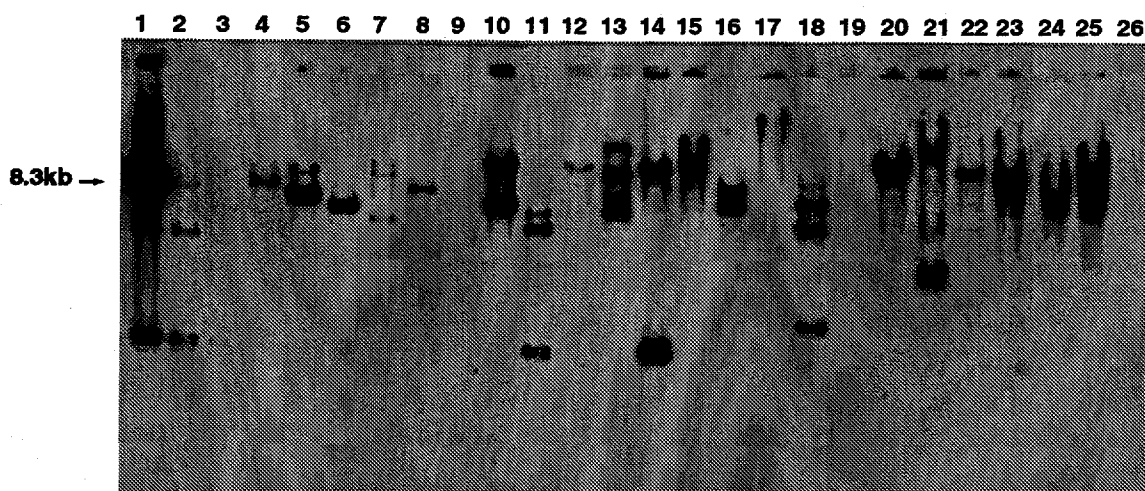


図 4-5 様々なStaphylococcus属のDNAへの*epr*断片のサザンハイブリダイゼーション解析

Eco RIで消化した染色体DNAあるいは*Pst* Iで消化したプラスミドを0.7 % アガロースゲルで分離後、サザンプロットを行った。レーン: 1, *S. capitis* EPK1; 2, *S. capitis* EPK2; 3, *S. epidermidis* M-5-1; 4, *S. saprophyticus* BCL1; 5, *S. capitis* ATCC 27840; 6, *S. cohnii* ATCC 29994; 7, *S. haemolyticus* ATCC 29970; 8, *S. intermedius* ATCC 29663; 9, *S. saccharolyticus* ATCC 14953; 10, *S. simulans* ATCC 27848; 11, *S. warneri* ATCC 27836; 12, *S. xyloso* ATCC 27971; 13, *S. hominis* CCM 27327; 14, *S. lugdenensis* ATCC 438097; 15, *S. delphini* DSM 207717; 16, *S. kloosii* DSM 206767; 17, *S. schleiferi* N 880033; 18, *S. caprae* CCN 35737; 19, *S. arlettae* DSM 206727; 20, *S. chromogenes* CCM 33877; 21, *S. hycus* CCM 23687; 22, *S. equorum* DSM 206747; 23, *S. felis* ATCC 491687; 24, *S. aureus* FDA209P; 25, *S. aureus* RN4220; 26, plasmid pBBB13 containing *femAB*

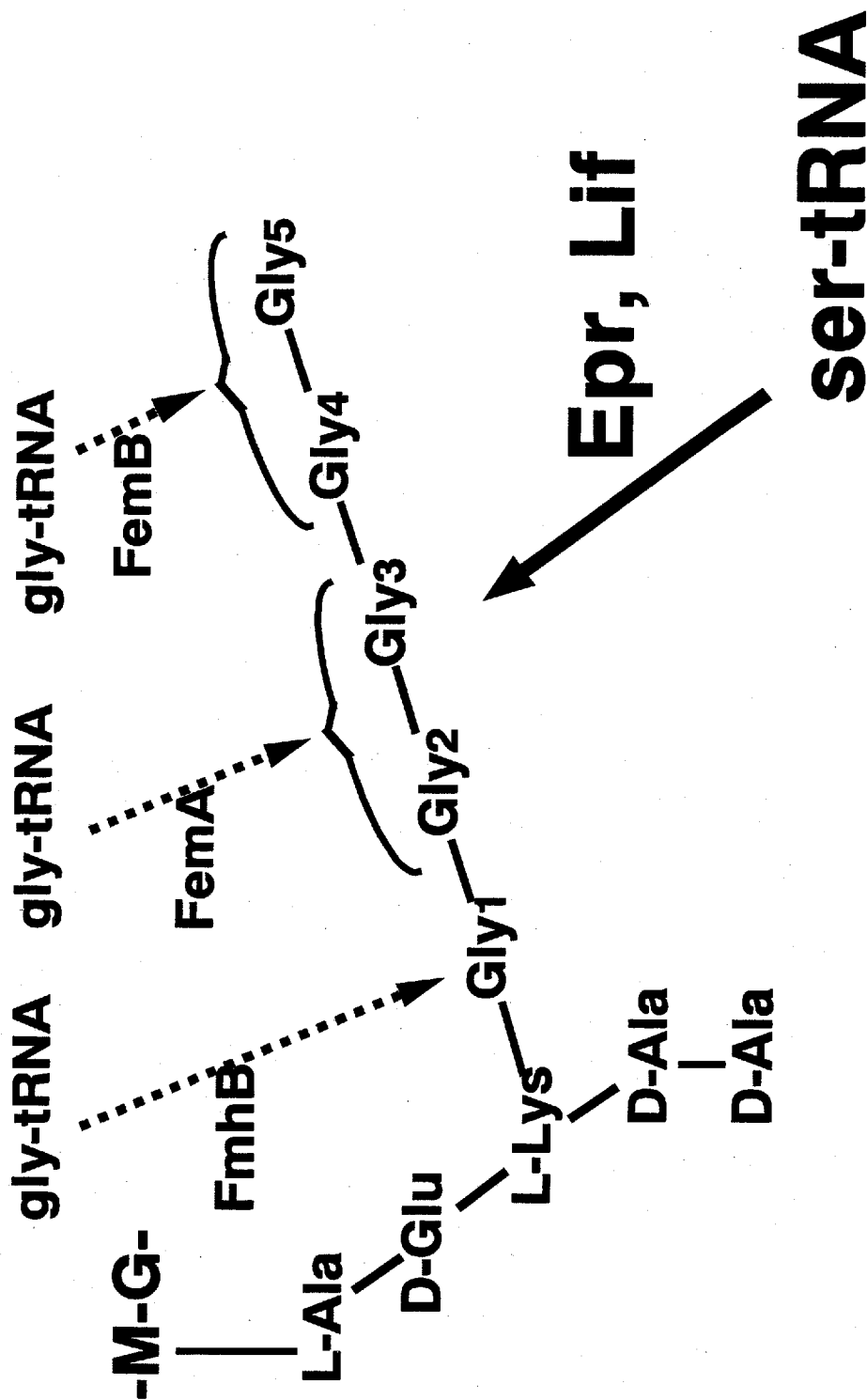


図 4-6 Eprの作用機序

ペプチドグリカン前駆体のpentaglycineからなる架橋構造において、*fmhB*遺伝子は1番目のglycineの付加、*femA*遺伝子は2、3番目のglycineの付加、*femB*遺伝子は4、5番目のglycineの付加を担っている。本研究の結果から、*epr*遺伝子は*ijf*遺伝子同様、pentapeptide ペプチドグリカン前駆体にserineを付加することが示唆された。

第5章 *S. aureus* の *epr* 遺伝子と相同性のある *eprh* 遺伝子のクローニング、塩基配列の決定および機能解析

第1節 概要

第4章で述べたように、Epr をコードする DNA 断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果より、*S. aureus* [4, 25, 47] も *epr* 遺伝子とハイブリダイズする DNA 断片を持っていることを見出した。同じ条件下で *epr* 遺伝子は *femA/B* 遺伝子を含む DNA 断片とハイブリダイズしなかったため、*S. aureus* でハイブリダイズした DNA 断片には *femA/B* 遺伝子は含まれない (図 4-5)。そこで *S. aureus* RN450 の染色体 DNA ライブラリーから *epr/lif* 遺伝子と相同性のある遺伝子をクローニングし、*eprh* と名付けた。*epr/lif* 遺伝子の解析から、*eprh* 遺伝子も細胞壁ペプチドグリカンの架橋構造へ glycine 以外の serine あるいは他のアミノ酸を転移するのに関わると思われるが、*S. aureus* で *eprh* 遺伝子を過剰発現させても lysostaphin への耐性は増加しなかった。また、*eprh* 遺伝子の Campbell 型挿入変異も lysostaphin の感受性に影響を及ぼさなかった。これらのことから、*eprh* 遺伝子は *S. aureus* の増殖には必須ではない遺伝子である事が示唆された。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株および培養条件

実験に用いた菌株およびプラスミドは表 5-1 に示した。Staphylococcus 属は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems) を用いて、*E. coli* は Luria-Bertani (LB) broth (yeast extract 5 g, polypeptone 10 g, NaCl 10 g per liter (pH 7.2)) を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要に応じて ampicillin (50 µg/ml)、chloramphenicol (30 µg/ml)、tetracycline (3 µg/ml)、spectinomycin (50 µg/ml) を添加した培地で培養を行った。

第2項 エンドペプチダーゼに対する耐性度の測定

被験菌のエンドペプチダーゼに対する耐性度のレベルを決定するために、第4章、第2節、第

3 項に準じて MIC を測定した。

第3項 *eprh* 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

第1章、第2節、第13、14項に準じて、*epr* 遺伝子断片をプローブに用い、*eprh* をコードした遺伝子断片をクローニング、部分欠失変異株を作製、プラスミドを抽出し、塩基配列決定を行った。

第4項 *eprh* 遺伝子の試験管内転写、翻訳

eprh 遺伝子がコードされたプラスミド DNA を鋳型に試験管内でタンパク質を合成させるために、第4章、第2節、第9項に準じて試験管内転写、翻訳を行った。

第5項 ノーザンブロッティング

第6章、第2節、第3項に準じて *eprh* DNA 断片をプローブとし、ノーザンブロッティングを行った。

第6項 *eprh* 遺伝子の形質転換

Eprh の過剰発現を *S. aureus* で検討するため、クローン化された *eprh* DNA 断片をシャトルベクター pGC2 [25] にクローン化した。

S. aureus への形質転換は第4章、第2節、第7項に準じて行った。

第7項 Campbell 型挿入変異

eprh 遺伝子の欠失のために *eprh* 遺伝子を鋳型に作製した 488 bp の PCR 産物を pCL52.1 [45] の *EcoRI* サイトに組み込み、Campbell 型挿入変異を行った。pCL52.1 にクローニングしたプラスミド pTF393 を *S. aureus* RN4220 に形質転換し、30°C で tetracycline (3 µg/ml) 含有 TSA 寒天培地で得られた株を TF5331 とした。30°C で一晚培養した形質転換株を tetracycline (3 µg/ml) 含有 TSB 液体培地に移し、42°C で 16 時間培養した。プラスミドの複製は 42°C で阻害されるため、目的遺伝子領域に Campbell 型挿入変異したものだけが選択される。42°C で培養後の培養液を tetracycline (3 µg/ml) 含有 TSA 寒天培地に播き、得られたコロニーを選択した。このクローンについて、目

的遺伝子がプラスミドの挿入によって破壊されているかどうかをサザンハイブリダイゼーションによって確認した。得られた *eprh* 遺伝子欠失株を TF5333 とした。

第8項 *epr-eprh* キメラ遺伝子の作製

eprh 遺伝子のプロモーター領域を *S. capitis* EPK1 の *epr* 遺伝子のプロモーター領域に置き換えるため、2 回の PCR 反応 (PCR1、PCR2) を行った。まず、1 回目の PCR 反応は 2 つのプライマーセットを用いた。1 つは forward プライマーとして *S. capitis epr* 遺伝子上流の配列の nonsense 側の DNA 配列の相補鎖である EPR-PU2 (5'-AAATTTAAACCTCCTAATA-3') と、reverse プライマーとして Epr の MKF の 3 つの N 末端アミノ酸をコードする配列の相補鎖である EPR-PL4 (5'-CTTAAAGTTGAAAATTTTCATAGGACACCGA-3') のプライマーセットで、もう 1 つは forward プライマーとして EPR-PL4 の相補鎖である OEPRU-04 (5'-ATGAAATTTTCAACTTTAAGTG-3') と、reverse プライマーとして *S. aureus eprh* 遺伝子下流の sense 側の DNA 配列の相補鎖である OEPRL-03 (5'-gtgtgccagataacttaa-3') のプライマーセットで PCR 反応を行った。PCR1 後、プロモーター領域と最初の 3 アミノ酸をコードする配列を含む *S. capitis epr* 遺伝子の一部分と、*S. aureus eprh* 遺伝子の一部分を単離し、2 回目の PCR 反応の鋳型とした。2 回目の PCR 反応はプライマーとして EPR-PU2 と OEPRL-03 を加えた。2 つの部分的な DNA 断片は重複する配列でアニールし、最初のプライマーとして働き、断片を完全な長さの 2 本鎖 DNA とする。その断片を鋳型とし、EPR-PU2 と OEPRL-03 によって完全なキメラの DNA 断片が増幅された。増幅された DNA 断片は pGEM-TEasy にクローン化し、塩基配列でキメラ遺伝子ができている事を確認した。

第9項 ペプチドグリカンのアミノ酸分析

被験菌のペプチドグリカンを経第 1 章、第 2 節、第 5 項に準じて精製した。得られたペプチドグリカンに 6 N HCl で 100°C 15 時間、加水分解したペプチドグリカンサンプルを L-8500 amino acid analyzer (Hitachi) を用い、ニンヒドリン法で計測した。

第3節 結果

第1項 *S. aureus eprh* 遺伝子のクローニング

S. capitis EPK1 の *epr* 遺伝子領域に特異的な配列のプライマーを作製し、*S. aureus* RN450 の DNA

を鋳型として PCR 反応を行った。SF1 (5'-CATGTTTATTAACAGAAGCCC-3') と SR1 (5'-AAATCCATGTTTTTCTTCTGCC-3') をプライマーとして用い、PCR 反応を行ったところ、予想された大きさ (488 bp) と同等の約 0.5 kb の断片のみを得た。得られた DNA 断片を PGEM-T Easy にクローニングしシーケンスしたところ、*eprh*-homologous gene (*eprh*) が増幅される事が明らかとなった。そこでクローニングした DNA 断片を単離し、プローブとして用い、いくつかの制限酵素で消化した *S. aureus* RN450 の DNA 断片についてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、約 4.2 kb の *HincII* 断片が認識されたため、これを pUC18 にクローニングし pTF398 とした。

第2項 *eprh* 遺伝子の塩基配列

4.2 kb DNA 断片の塩基配列の決定をした結果、4 つの open reading frame (ORF) があり、ひとつは不完全である事が明らかとなった (図 5-1, 5-2)。Eprh をコードする領域は 1,735 番目の ATG コドンからスタートし、2,979 番目の TAA コドンで終わっている事が分かった。Eprh は 414 アミノ酸からなる分子量 49 kDa のタンパク質であることが示唆された。AGGCAGG の Shine-Dalgarno (SD) 配列が開始コドンの 11 塩基上流に見られた。Eprh の推定アミノ酸配列を BLAST や FASTA network search service (DDBJ) で相同性検索を行ったところ、*S. capitis* EPK1 の Epr や *S. simulans* bv. *staphyloolyticus* の Lif のアミノ酸配列と高い相同性 (>50 % identities) があり、いくつかの *Staphylococcus* 属の FemA や FemB のアミノ酸配列とも 30 から 40 %の相同性がある事が明らかとなった (表 5-2)。ORF2 は Eprh のすぐ上流に位置し、556 番目の ATG コドンから始まり、1,707 番目の TAA コドンで終わっていた。SD 配列は開始コドンの 10 bp 上流に見られ、推定プロモーター領域は -35、-10 がそれぞれ AAGACA (471-4786)、TACAAT (496-501) の配列と考えられた。また、ORF2 は 383 アミノ酸から成る 43.1 kDa のタンパク質と推定された。アミノ酸相同性検索から *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase LytA と相同性が見られ、その組み換えタンパク質は溶菌活性を示したため (データ示さず)、LytN と名付けた。LytN 遺伝子の上流には不完全な ORF があり、部分的な 120 アミノ酸配列は *E. coli* *sucD* 遺伝子産物である succinyl-CoA synthetase alpha chain と相同性があったため、*orf1* を *suc* と名付けた。さらに *eprh* の下流にある *orf4* は 801 bp からなり、267 アミノ酸をコードし、推定分子量は 31 kDa と示唆された。アミノ酸配列は *Haemophilus influenzae* の DNA processing chain A (*dprA*) と相同性が見られた。

第3項 *eprh* 遺伝子の転写活性

eprh 遺伝子産物を認識するために、in-vitro transcription-translation 実験を DNA 断片がクローン

化されている pTF398、pTF441 を用いて行った。*eprh* 遺伝子の開始コドンから上流、約 250 bp を含んだ DNA 断片を PCR 反応で作製し、pGEM-T Easy に組み込んだ。43 kDa の *eprh* 遺伝子によって発現されたタンパク質が確認された（データ示さず）。さらに、ノーザンブロット解析を行った。*S. aureus* RN450 から抽出した total RNA に *eprh* 遺伝子の相補鎖オリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーション実験を行ったが、ハイブリダイズするバンドは検出されなかった（データ示さず）。

第4項 エンドペプチダーゼに対する耐性

eprh 遺伝子が過剰に発現する事によって、エンドペプチダーゼに対して耐性化するか否かを明らかにするために、4.2 kb *HincII* 断片を pGC2 にサブクローン化（pTF445）後、そのプラスミドを *S. aureus* RN4220 に形質転換した株 TF5336 を作製した。TF5336 と TF1（pGC2 のみを保有した RN4220）の lysostaphin の MIC はそれぞれ 0.4 と 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であった（表 5-1）。さらに *eprh* DNA 断片を PCR 反応で増幅し、pGC2 にサブクローン化し pTF447 を作製した。pTF447 を RN4220 に形質転換した株を TF5338 とした。TF5338 の lysostaphin の MIC は 0.8 $\mu\text{g/ml}$ であった（表 5-1）。これらのことから、*eprh* 遺伝子は非常に弱いエンドペプチダーゼ耐性を発現する事を示した。TF1 と TF5338 のペプチドグリカンを経験し、アミノ酸組成の分析を行った。その結果、TF1 と TF5338 にはそのアミノ酸組成に違いは見られなかった（データ示さず）。第 4 章で示したように、*epr* 遺伝子をコードする pTFS6 を保有する *S. aureus* はエンドペプチダーゼに高い耐性を示した（MIC>100 $\mu\text{g/ml}$ ）。そこで *S. aureus* で *eprh* 遺伝子を *epr* 遺伝子のプロモーターを用いて発現を試みた。Epr と Eph の最初の 3 アミノ酸は保存されていたため、Epr のプロモーター領域から 3 つの N 末端アミノ酸 MKF までの DNA 配列の下流に 1,735 番目の alanine から読み枠を合わせ、*eprh* 遺伝子をつけたキメラ DNA 断片を pGC2 に組み込み pTF459 を作製した。このプラスミドの RN4220 の形質転換株を TF5341 とした。この TF5341 の lysostaphin の MIC は 0.8 $\mu\text{g/ml}$ であった（表 5-1）。

第4節 考察ならびに小括

本章では *S. aureus* が *epr/lif* 様の遺伝子 *eprh* を持っている事を明らかにした。*eprh* 遺伝子のコードする推定アミノ酸配列の相同性検索より、Eph は FemA, B (30~40 %) よりも Epr、Lif (>50 %) に相同性があった（表 5-2）。*epr/lif* 遺伝子の解析より *eprh* 遺伝子もペプチドグリカンの架橋部分に glycine 以外の serine あるいは他のアミノ酸を転移するのに関与していると考えられた。しかし、*eprh* 遺伝子を含むプラスミドを保有した *S. aureus* 株は lysostaphin の消化による溶解に耐性化しな

かった。*S. capitis* EPK1 *epr* 遺伝子のプロモーターのコントロール下に *eprh* 遺伝子において過剰発現をさせても同様の結果が得られた。これららの結果から、Eprh の細菌内での過剰発現はペプチドグリカンの架橋部分の glycine 含量には影響しない事が示唆された。*eprh* 遺伝子変異株の解析から、この遺伝子は *S. aureus* の成長には必須ではない事が示された。ノーザンブロット解析からも、*eprh* 遺伝子は通常の培養条件下での *S. aureus* では機能していない事が示唆された。*eprh* 遺伝子は *femA/B* 遺伝子の機能を補う補足的な機能を果たしている可能性も考えられた。

小括

1. *S. aureus* が *epr/lif* 様の遺伝子を持っている事を明らかにした。
2. *S. aureus* の *epr/lif* 様の遺伝子 *eprh* をクローニング、塩基配列を決定し、その遺伝子産物 Eprh は 414 アミノ酸からなる分子量 49 kDa のタンパク質であることが示唆された。
3. 相同性検索の結果、Eprh は *S. capitis* EPK1 の Epr や *S. simulans* bv. *staphylolyticus* の Lif と 50 % 以上の高い相同性があり、いくつかの *Staphylococcus* 属の FemA や FemB のアミノ酸配列とも 30 から 40 % の相同性がある事が明らかとなった。
4. *S. aureus* での Eprh の過剰発現株、遺伝子変異株の解析およびノーザンブロット解析より、Eprh の発現は通常の発育条件下では抑制されていることが示唆された。

表 5-1 使用した菌株、プラスミド

Strain	Relevant characteristics	Source or reference	MIC to lysostaphin (μg/ml)
<i>S. aureus</i>			
RN4220	NTCT8315-4 r	R. Novick	0.2
TF5336	RN4220 pTF445	This study	0.4
TF5338	RN4220 pTF447	This study	0.8
TF5341	RN4220 pTF459	This study	0.8
TF5333	RN4220 <i>ephr::pTF393</i>	This study	0.4
TF1	RN4220 pGC2	This study	0.2
TF8	RN4220 pTFS6	This study	>500
<i>E. coli</i>			
XL1-Blue	<i>rec1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> λ ^r ZM15 Tn10 (Tet ^r)]	Bullock et al.	
TF398	XL1-Blue pTF398	This study	

Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pUC18			<i>E. coli</i> cloning vector	Yanisch-Perron et al.
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Promega
pGC2			<i>S. aureus</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector	S. Skinner
pCL52.1			<i>S. aureus</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector	C. Lee
pTF393	pCL52.1	<i>EcoRI</i>	0.49kbp PCR product containing internal fragment of <i>ephr</i>	This study
pTF398	pUC18	<i>HincII</i>	4.2kbp <i>HincII</i> fragment	This study
pTF441	pGEM-T Easy	<i>EcoRI</i>	1.8kbp PCR product containing <i>ephr</i>	This study
pTF445	pGC2	<i>HincII</i>	4.2kbp <i>HincII</i> fragment	This study
pTF447	pGC2	<i>EcoRI</i>	1.8kbp <i>EcoRI</i> fragment of pTF441	This study
pTF459	pGC2	<i>EcoRI</i>	1.8kbp <i>EcoRI</i> fragment containing chimera gene of <i>epr</i> and <i>ephr</i>	This study
pTFS6	pGC2	<i>EcoRI</i>	1.65kbp PCR product containing <i>epr</i>	This study

表 5-2 Eprhの Epr様遺伝子産物との相同性

Percent identity									
	Epr	Lif Ss	FemA Sa	FemB Se	FemA Se	FemB Ss	FemA Ssa	FemA Sh	FemA
Eprh	58	56	31	37	34	36	35	34	30

Ss, *S. simulans* bv. *staphylohyticus*; Sa, *S. aureus* BB270; Se, *S. epidermidis*; Ssa, *S. saprophyticus*; Sh, *S. hominis*

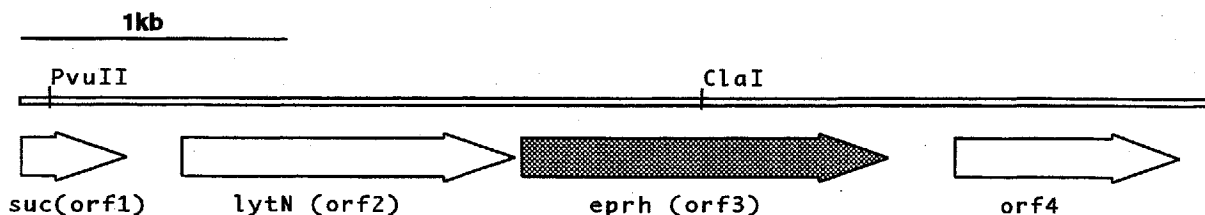


図 5-1 *orf1*、*lytN*、*eprh*、*orf4* の遺伝子構成

矢印がそれぞれのORFとその転写の方向を示す。

GTCAACGGAAACAACTTTATTGATGTTTAAAGCATTCAATGAAGATGACGAACGAA	60	TTTATCTTGTGATCCATATTTAATAGAGATTTAAGAGATGCAATGCTAGGATAATA	2100
GCAGTGTGTTGATGTTGGAATCGGTGCTAGCGCTGAAGAAGACAGCTGATGGATT	120	FILVDPYLIENLRDANGRII	122
<i>suc (orf1)</i> MIGEIGGTAE EEA AEWI	17	AAGAATTATAAATTCAGTGTAGTAAAGATGCTAGGAGAAATGGGTCTCTCATCAA	2168
AAAGCGAATATGACAAAACAGTGTAGGCTTTATCGGTGACAAACAGCACCTCTCGGA	180	KHYNNSSVIVRM LKGI GYLHQ	142
KANMTKPVVVGFI GGTAPP G	37	GGTTATACACAGGATTTCAATAAAGTCAAATAGGTGATTTCTGATTGGATTJA	2228
AAACGTATGGACATGCTGGTCAATTCAGGTGCTAAGGTACTGCTGAAGAGAAA	240	G Y T T G Y S M K S Q I R W I S V L D L	162
KRMGHAGAIISGGKGTAE EK	57	AAAGATAAAGATGAGAAATCAACTTTTAAAGAAATGGAATACCAACTAGAACAAATATA	2280
ATTAACCATTAATAGTTCTGGTGTGAAGACGCGGCAACCTCTGAGAAATGGTTCA	300	KDKDENQLLKE MEYQTRRN I	182
IKTLNSCGVKTAAATPSEIGS	77	AAAAAGACTATTGAGATGGTGAAGGTGAAGATTATCTATTTGAAGAACAAATCGA	2340
ACATTAAATGAAGTCTGAAGAACAGGATTTATGAATCATTTAACTGTTAATAAA	360	KRTIEIGVKVEDLSIEETNR	202
T L I E A A K E A G I Y E S L L T V N K	97	TTTTATAATTTGTTTCAATGGCTGAAGAAAACATGGTTTTCATTGATGAAGAT	2400
TAAAGTTAAAGATGATATAAGTCTATAGCCATTCATCATCTTTATAAAGTATCGAA	420	FYKLFQMAEEKHGFHF MNED	222
ATGGGCTATTGCTGCGATGAATTTAGTACACTTTTCATATTTTGGAAAGCAAGTT	480	TATTTTAAACGAATGCAAGAAATATATAAGATAGGGCAATGTTAAGATAGCTGTATA	2460
AATTAATTTACCTCCTACATAGCTTTATAAACAAGAAATTTAATTAATATATA	540	YFKRMQEIYKDKAMLR IAC I	242
GGCAGTATGTTATAATGTTTATATTTGTAAGGATGTTTCATCATGAATAACAA	600	AATCTTAATGAATCAAGATAAATTAATAATACAATTTGAAAATCGAAATGAATG	2520
<i>lytN (orf2)</i> NFVYYCKECFIMNKQ	15	N L N E Y Q D K L K I Q L L K I E N E M	262
CAAGTAAAGTACGCTATTCAATTGAGAAAGTAGTATTGGAATTTGCTCAATTCATA	660	ATGACTGTGAACAGACATTAATGAAATCAAATCTAAATAAATAAATCAAATTA	2580
QSKRVYSIRKVSIGILSIS I	35	M T V N R A L N E N P N S K R K S K L	282
GGTATGTTTGGCATTTGGTATGTCGAAAGCATATGACGATGAATTTGATCAATCT	720	AATCAGTTAAATATGCAATTATCTAGTATTAAATAGAAATAGTAAACCGAAGACTA	2640
G M F L A L G M S N K A Y A D E I D K S	55	N Q L N M Q L S S I N N R I S K T E E L	302
AAAGATTATACAAAGGATGAGCAAAATGATTGCGAAATCAGAGTTAAATGCTAAT	780	ATATTTGAAATGGACCTGTTGGGATTTGCTGCTGCTTTATATGATGCTGATGAT	2700
K D F T R G Y E Q N V F A K S E L N A N	75	I F E D G P V L D L A A A L F I C T D D	322
AAATAACGACAAAGACAAATTAATAATGAGGTCTGTTAAACATCGACACAAAT	840	GAGTTTATTATCTATCAAGTGGATCAATCCGAAATATAATCAGTATGGGTGATAT	2760
K N T T K D K I K N E G A V K T S D T S	95	E V Y Y L S S G S N P K Y N Q Y N G A Y	342
TTAAAGTTAGACACAAATCAGCAATTTCAACGGAATGAAATTAATCAAGATATAAG	900	CATCTCAATGCGATATGATAAATATGCAAAATCACAATATTAATAGGATAAATTT	2820
L K L D N R S A I S N G N E I N Q D I K	115	H L Q W H M I K Y A K S H N I R Y N F	362
ATTTCAATATCTCGCAAAATCTCAAGCAGAGTAAACATCTAGTTATTAATAACATGAA	960	TATGGAATAACAGGCGCTCTTAGTAAATGAGGCGGATGATTTGCTGTTCAACAAATTTAA	2880
I S N T P K N S S Q G N H L V I N N N E	135	Y G I T G V F S N E A D D F G V Q Q F K	382
CTTACTAAGAAATTTAAATTTGCAACTGGAAGTCTCAAAATCTCAATCAGAAAGAACG	1020	AAGGTTTAAATGACATGTTGANGAATTAATGGTGAATTCATCAACAGTAAAGCA	2940
L T K E I K I A N L E A Q N S N Q K K T	155	K G F N A H V E E L I G D F I K P V R P	402
AATAAGTACTAATAATCTTGGTACTACAGCTTTAGAGAAGCTCAAAAACACAA	1080	ATTCATATAAATTTGCAAACTTATTTAAGGTTAATTAATTAAGATATGTTGGAAT	3000
N K V T N N Y F G Y V S F R E A P K T Q	175	I L Y K F A K L I Y K V	3060
ATCTATATCTGAAAAAGGACGACACCTTAGTCTATAGCATTAATAACAAATACACA	1140	GAAATTTAAATTCITTECAACATCTTTCACTTTTAAAGTCAGTATTTTACTCTTA	3120
I Y T V K R G D T L S A I A L K Y K T T	195	TTTGTATGATTACAAAAAGGAGTGATTIATGATTAAACTATTTTCTTAAGTTATA	3180
GTTTCAATATTTCAAAATACAAATATAGCAAACTCAATTAATTAATTTATGCTCAA	1200	CTGGGCACACTTTCGACTAAACAAATTCATCAATTTTAAAGGCAATCTCAATGAT	3240
V S N I Q N T N N I A N P N L I F I G Q	215	<i>orf4</i> H A Y P N V I	7
AAATTAAGATGCGCAATGACCATAGTAGAAGC CAAACCAAAACAGTGTCTTCAAT	1260	TAAAGAGGAGGGAAGAAAAAGATAGTATTTATGTAAGTGGTGAATGAGGAGAAAA	3300
K L K P V P M T P L V E P K P R T V S S N	235	K E E G R K K D S Y L C F E W V N R E E N	27
AATAAAGTAAATAGTAAAGTACGATTAATTAATTTGAAACATTAAGAGATAGAGGA	1320	TGTTCAATTTATGCTAAATACTATGCTTTTATAAACTTGATCATACGATATTTAA	3360
N K S N S N S S T L N Y L K T L E N R G	255	V H L L R K Y Y A F I K L D H N D I I K	47
TGGGATTTTCAGGATGATTGAGTGGCAATGTTGATTAGTTAGTTATGATATGGAAT	1380	AGAAGTGCAGAAATTAAGTAAAGTACATTACATATGATTGATTCGAATCCGAGTCT	3420
W D F D G S Y G W Q C F D L V N V Y W N	275	E L Q K L K V S Y I T Y M D S E Y P V L	67
CATCTTATGCTGATGAGTAAAGGATGAGCTAAGAGATATACCATGTCGAATTAAT	1440	ATTAAGAGAAATATCAATTTCCATTACTCTTTTCTATAGAGGGAACATCAATTAAT	3480
H L Y G H G L K G Y G A K D I P Y A N N	295	L K E I Y Q F P L L L F Y R G N I K L I	87
TTTAATAGTGAAGCTAAATTTTATACACACACCAACTTTCAAGCTGAACCTGGGAC	1500	AAATAATATGCATCTTTGGCAGTAGTAGTGGAGAGGATTTACAGATTATACCAACA	3540
F N S E A K I Y H N T P T F K A E P G D	315	N N M H H L A V V G A R D S T S Y T Q R	107
TTAGTGGTTTATGTTGAAGATTTTGGGAGGATATGTCATACAGCTATTGCTTAAAT	1560	GCYTTAGATTTTATATCAATGATAAAGCAAAATTAATTAACATTTGTTCCGGCT	3600
L V V F S G R F G G G Y G H T A I V L N	335	S L E F L L S N D R S K Y L I V S G L	127
GGTGAATTTGAGGAAATTAATGAAGTTCCAAAGTTAGATCAAACTGGAATATGGT	1620	TGCTCAAGGAGCTGATGCAATGGCACTCAAAATGCTTAAATACATCTCCCTAGCAAT	3660
G D Y D G K L M K F Q S L D Q N W N N G	355	A Q G A D A M A H Q I A L K Y N L P T I	147
GGATGGCGTAAAGCAGAGTTGCACATAAAGTTGTTCAATATTAAGAAATGATATGATT	1680	TGCAGTTTATGCTTTGGCCATCAACACATTATCCCAAGATACATTAGCATTAAGAAA	3720
G W R K A E V A H K V V H V H Y E N D M I	375	A V L A F G H Q T H Y P K S T L A L R N	167
TTTATAGACATTTAAAGGACATAATTTAAATCGAAGCAGGACATTGAATATGAAA	1740	TAAATAGAGAAAAAGGTTTATGATATCTGAATATCACACATACCAATCGCTAA	3780
F I R P P F K R A	2	K I E E K G L V I S E Y P P H T P I A K	187
<i>eprh (orf3)</i> N K		ATATAGATTTCTGAGCGCAATAGAAATATCAGCGGTTTGTCAAAAGGGGTTTAATAC	3840
TTTTCACTTTAAGTGAAGAGAAATTTACCAACTACACAAAAGCACTTCAACATTAT	1880	Y R F P E R N R I S G L S K G V L I T	207
F S T L S E E E F T N Y T K K H F K H Y	22	TGAGGCTAAGGAAACAAAGTGGCAGTCACATCAGCATGAGTTTTCATTAGAGCAAAATAG	3900
ACGAGCTCATAGAAATTAATAATATAGAAATAAATAAATCATGAAGCACATATTGTC	1860	E A K E Q S G S H I T I D F A L E Q N R	227
T Q S I E L Y N Y R N K I N H E A H I V	42	AAATGTTTATGTTTACCTGATCTGTTTAACTATGCTATGCTATGCAAAAGGATTTATACG	3960
GGAGTGAAGATGATAAATGAAGTATAGCTGCATGTTTATTAACAGAGGCAACAAAT	1920	N V Y V L P G S M F N P N T K G N L L R	247
G V K N D K N E V I A A C L L T E A R I	62	TATCAAGAGAGGCTGAGGTAGTATTAAGCTCAATGATATTTGAGAGCACTATAT	4020
TTTAAATCTACAAATTTCTACTCTCATAGAGTCTCTTACTTGAATTTTCTGATCT	1980	I Q E G A K R V L N A N D I F E D Y I	267
F K F Y K Y F S H R G P L L D Y F D A	82	TTAAACCTAAAAATACAGAGTGTCTTATATTCTTTTGTGCTCTTGTATTTATTTT	4080
AAATAGTTTGTACTTTTAAAGATATCTAAATCATTTATAAATAGAGGAGTA	2040		
K L V C Y F F K E L S K F I Y K N R G V	102	TTAATAAATCTATAAAAAATAGACAGGAAAAATGATTGTTTATAGATATAAAGCTTGAC	4140

図 5-2 *S. aureus* RN450 *eprh* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列

第 6 章 *ale-1* 遺伝子と *epr* 遺伝子のプロモーター解析

第 1 節 概要

これまでに *Staphylococcus capitis* EPK1 は菌体外に黄色ブドウ球菌ペプチドグリカンの pentaglycine 架橋を切断する glycylglycine endopeptidase ALE-1 を産生し、EPK1 自身は ALE-1 に対する耐性遺伝子 *epr* (endopeptidase resistance) を発現し、ペプチドグリカンの glycine 5 量体に 1 ~2 分子 serine を置換することで ALE-1 に耐性になることを明らかにした。*epr* 遺伝子は *ale-1* 遺伝子の 322 bp 上流に位置し、*ale-1* 遺伝子と逆方向に転写され、両方のプロモーター領域は非常に近接していると考えられる (図 6-1)。そこで本研究では *epr* 遺伝子と *ale-1* 遺伝子の転写活性とプロモーター領域の解析を行った。最初にプライマーエクステンションを行い、それぞれの転写開始点を決定した。*S. capitis* EPK1 の各増殖期より RNA を抽出、泳動後、ノーザンブロッティングを行い、それぞれ *epr* 遺伝子断片、*ale-1* 遺伝子断片をプローブとして検出した。また、プロモーターと推定される領域をプロモーターの欠失した *xylE* 遺伝子上流にクローニングし、XylE 活性を指標として転写活性を測定した。これらの結果、*ale-1* 遺伝子の転写活性は定常期において最も強く、それ以降は減少していた。しかし、*epr* 遺伝子については初期対数増殖期から定常期にかけてほぼ同程度に転写されており、*ale-1* 遺伝子と比較するとかなり転写活性は弱かった。このことから、ALE-1 は初期対数増殖期から産生され、定常期に入るにつれて産生量が増加するが、Epr は増殖期には関係なく、常に一定して発現していることが明らかとなった。また、両方のプロモーター領域に含まれる回転対称構造 CAAAATC 配列を欠失した領域をクローニングしたものでは、*ale-1* 遺伝子、*epr* 遺伝子の両方向で XylE 活性が消失していたことから、*ale-1* 遺伝子と *epr* 遺伝子のプロモーター活性には CAAAATC 配列の回転対称構造が必須であることが明らかとなった。

第 1 節 材料および方法

第 1 項 使用菌株および培養方法

実験に用いた菌株、プラスミドおよびプライマーは表 6-1 に示した。*S. aureus* は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems) を用いて、*E. coli* は Luria-Bertani (LB) broth

を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要に応じて ampicillin (100 µg/ml)、chloramphenicol (10 µg/ml) を添加した培地で培養を行った。

第2項 プライマーエクステンション

ale-1、*epr* 遺伝子のそれぞれの転写開始点を決定するため、AMV reverse transcriptase primer extension system (Promega, Madison, WI, USA) に従ってプライマーエクステンション法を行った。

プライマーの RI 標識

表 6-1 に示すオリゴヌクレオチドプライマー PPRMEX-EPR、PPRMEX-ALE を作製し、プライマー (10 pmol) 2 µl、T4 PNK 10 x buffer 1 µl、[γ-³²P] ATP (3000 Ci/mmol) 3 µl、T4 polynucleotide kinase (10 U/ml) 1 µl を混合し、nuclease free water を加え、全量を 10 µl とし、37°C で 10 分間反応後、90°C で 2 分間処理し酵素を失活させ 90 µl の nuclease free water を加えた。

プライマーエクステンション

S. capitis EPK1 を OD₆₆₀=1.0 になるまで振とう培養後、遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、Fast RNA kit (BIO 101) を用いて RNA を抽出した。RNA 5 µl (100 ng) に [γ-³²P] ATP 標識プライマー 1 µl (100 fmol)、2 x AMV primer extension buffer 5 µl 加え、58°C で 20 分間反応させアニーリングを行った。10 分間室温で静置した後、9 µl のアニーリング反応液と 9 µl の reverse transcriptase extension mix buffer (2 x AMV primer extension buffer 5 µl, 40 mM sodium pyrophosphate 1.4 µl, AMV 逆転者酵素 1 µl, nuclease free water 3.2 µl) を混合し、42°C で 30 分間反応させ、20 µl の loading dye を加えサンプルとした。

塩基配列決定

RI 標識した dCTP を用いて pTF311 を鋳型とし、[γ-³²P] ATP 標識プライマーを用いて塩基配列決定を行った。プラスミド pTF311 10 µg/100 µl nuclease free water に 1/10 量の 2 M NaOH と 2 mM EDTA を加え、37°C、30 分間で変性させ、その後エタノール沈澱し、得られた沈澱を 70 %エタノールで洗浄した。乾燥後、DNA を 7 µl の nuclease free water で溶解した。反応は Sequenase Version 2.0 labelled dCTP kit (Amersham Life Science) に従って行った。変性させた DNA 7 µl に reaction buffer 2 µl、プライマー (100 pmol/µl) 1 µl を加え、65°C 2 分間でアニーリングし、室温で静置、35°C 以下に戻した。遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) 後、沈澱に 0.1 M DTT 1 µl、5 倍希釈した labelling mix 2 µl、[α-³⁵S] dCTP (1,250 Ci/mmol) 0.5 µl、5 倍希釈した sequenase polymerase 2 µl、MM buffer 1 µl を加えて labelling reaction 溶液を作製、その 3.5 µl に 2.5 µl の termination mixture (A,C,G,T) を混

合し、37°C 5 分間でターミネーション反応を行い、4 µl の stop solution を加えた。

電気泳動とオートラジオグラフィー

RNA サンプルは 90°C で 10 分間、塩基配列決定用のサンプルは 75°C で 2 分間処理後、8 % ポリアクリルアミドゲルにそれぞれ 5 µl、3 µl 添加し、1,500 V で 2 時間から 2 時間 30 分間電気泳動した。泳動後、ゲル浸漬溶液（酢酸 100 ml、メタノール 100 ml per liter）中でゲルをガラス板よりはらずし濾紙に移し、乾燥後、Fuji imaging plate (Fuji Film) に感光し、BAS2000 (Fuji Film) でバンドの検出を行った。

第3項 ノーザンブロッティング

S. capitis EPK1 の対数増殖期初期から定常期までの各増殖期まで培養した菌体から Fast RNA kit (BIO101) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA 10 µg/4.5 µl DEPC water (diethyl pyrocarbonate (Sigma) 1 ml per liter) に 5 x GRUB (10 x gel running buffer (10 x GRUB): 0.1 M MOPS, 40 mM sodium acetate, 5 mM EDTA (pH 8.0)) 2 µl, formaldehyde 3.5 µl, 80 % formamide (DEPC water dilution) 10 µl と 5 x dye (50 % glycerol, 1 mM EDTA, 0.4 % bromophenol blue, 0.4 % xylene cyanol) 2 µl を混合し、65°C で 15 分間処理して RNA を変性させた後、1 % アガロース-ホルムアルデヒドゲル (agarose gel 0.3 g, DEPC water 22 ml, 10 x GRUB 3 ml, formaldehyde 5 ml) に添加し、45 V で 3 時間電気泳動した。その後、ゲルを変性バッファー (NaCl 175.5 g, NaOH 16 g per liter) で 30 分間 2 回振とうし、転写バッファー (NaCl 175.5 g, NaOH 0.32 g, sarkosyl 0.63 g per liter) で 15 分間振とうした。Turbo Blotter (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) を用いてニトロセルロース膜に転写し、膜を 0.2 M リン酸バッファー (pH 6.8) で 5 分間洗浄後、80°C で 90 分間ベーキングした。ハイブリダイゼーションはプローブとしてそれぞれ *ale-1*、*epr* 領域の PCR 断片を用いて ECL nucleic acid labelling and detection system (Amersham Life Science) により蛍光標識法でバンドを検出した。

第4項 プロモーター転写活性の測定

xyle 遺伝子は catechol を分解し、発色させる酵素である catechol 2,3-dioxygenase をコードしている。Zukowski らの方法に従い、プロモーター欠失 *xyle* 遺伝子をコードするベクター pSL24 を用いて catechol 2,3-dioxygenase assay によるプロモーター活性の測定を行った [99]。

ale-1 遺伝子方向、*epr* 遺伝子方向のそれぞれの推定プロモーター領域を鋳型としてプラスミド pTF311 を用いて PCR 反応により増幅、第 2 章、第 2 節、第 3 項に準じて pSL24 のプロモーター欠失 *xyle* 遺伝子の上流にあるマルチクローニングサイトに組み込んだ。使用したプライマーの

配列は表 6-1 に示す。両方のプロモーター領域に含まれる回転対称構造 CAAAATC 配列を欠失した DNA 断片は第 2 章、第 2 節、第 2 項の PCR-Mutagenesis の方法を応用して作製、pSL24 に組み込んだ。これらの得られたプラスミドを第 4 章、第 2 節、第 7 項の方法で *S. aureus* RN4220 に形質転換した。

25 ml の TSB で OD₆₆₀=1.0 まで培養した RN4220 形質転換株を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、5 ml の 20 mM KPO₄ バッファー (pH 7.5) (100 mM KPO₄ バッファー : K₂HPO₄ 1.2 g, KH₂PO₄ 0.45 g per 100 ml) で洗浄後、菌体を 1 ml の APEL バッファー (pH 7.5) (100 mM KPO₄ バッファー (pH 7.5), 20 mM EDTA, 10 % アセトン, 30 µg/ml lysostaphin) に懸濁し、37°C で 20 分インキュベートした。その後遠心 (12,000 x g, 20 min, 4°C) し、得られた上清をサンプルとして用いた。2.75 ml の 100 mM KPO₄ バッファーに 0.25 ml のサンプルを加え、1.2 µl の catechol を添加後 37°C でインキュベート、1 分間隔で経時的に吸光光度計で OD_{375nm} の呈色を測定した。1 分間に 12 OD_{375nm} の増加を示すプロモーター活性を 1 ユニットとした。

第 3 節 結果

第 1 項 *ale-1*、*epr* 遺伝子の転写開始点

ale-1 遺伝子と *epr* 遺伝子の翻訳開始点は 322 bp しか離れておらず、お互い逆方向に転写されており、両方のプロモーター領域は非常に近接していると考えられる。そこでプライマーエクステンション解析を行い、それぞれの転写開始点を決定した (図 6-2)。*ale-1* 遺伝子の転写開始点はスタートコドンの 29 bp 上流のグアニンで、*epr* 遺伝子の転写開始点はスタートコドンの 182 bp 上流のグアニンである事が明らかとなった。

第 2 項 *ale-1*、*epr* 遺伝子の各増殖期の転写量

ale-1、*epr* 遺伝子の各増殖期の転写量について検討するため、*S. capitis* EPK1 の対数増殖期初期から定常期後期にかけて、各増殖期より RNA を抽出し、一定量を電気泳動後、ノーザンブロットィングを行い、それぞれ *ale-1*、*epr* 遺伝子を含む DNA 断片をプローブとして検出した (図 6-3)。その結果、*ale-1* 遺伝子の mRNA 量は定常期において最も多く、それ以降は減少していた。一方、*epr* 遺伝子の mRNA 量は対数増殖期初期から定常期にかけて量の変化はなく、*ale-1* 遺伝子と比較すると非常に少ない事が明らかとなった。このことから、ALE-1 は対数増殖期初期から産生され、定常期に入るにつれ産生量が増加するが、Epr は増殖期には関係なく、常に一定して発現してい

ることが明らかとなった。

第3項 *ale-1*、*epr* 遺伝子のプロモーター転写活性

図 6-4 に *ale-1* 遺伝子と *epr* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を示した。それぞれの矢印が翻訳される方向を表す。それぞれの開始コドンの 7 残基上流に SD 配列が見られる。両方の推定プロモーター配列は非常に近接しており、その領域にそれぞれ隣接して回転対称構造を形成する配列が存在した。*ale-1*、*epr* 遺伝子のプロモーター転写活性を測定するため、プロモーターの欠失した *xylE* 遺伝子をコードしたベクター pSL24 を用い、*xylE* 遺伝子の上流にプロモーターと推定される領域をクローニングし、XylE 活性を指標として転写活性を測定した。

ale-1、*epr* 遺伝子のそれぞれの開始コドンに挟まれた広い領域を含む DNA 断片 (*ale-1* : *ale-1 xyl-a*, *epr* : *epr xyl-c*) (図 6-5) をクローニングし、培養温度と培地中に加える NaCl の濃度を変化させて XylE 活性を検討した (図 6-6)。その結果、30°C で 0.75 M NaCl 存在下で培養した時がもっとも強い XylE 活性が得られたため、この条件下で以下の実験を行った。*S. aureus* 形質転換株の各増殖期での *ale-1 xyl-a*、*epr xyl-c* DNA 断片を組み込んだ時の *ale-1*、*epr* 遺伝子のプロモーター転写活性を検討した (図 6-7)。*ale-1* 遺伝子と *epr* 遺伝子では活性の強さは異なっていたが、どちらも対数増殖期での XylE の活性の傾きが最も大きくなっていることが分かった。また、*ale-1 xyl-a*、*epr xyl-c* DNA 断片、さらにそれぞれ自身の推定プロモーター配列と上流の回転対称構造の中央の配列を含んだ領域 (*ale-1* : *ale-1 xyl-b*, *epr* : *epr xyl-d*)、*ale-1 xyl-a* あるいは *epr xyl-c* の領域から回転対称構造の中央の CAAAATC 配列を欠失した領域 (*ale-1* : *ale-1 xyl-a'*, *epr* : *epr xyl-c'*) をそれぞれクローニングした時の XylE 活性を測定した (図 6-5)。プロモーター領域の広い範囲を組み込んだものより、そのもののプロモーター領域のみを含んだものの活性が若干強くなっており、回転対称構造の中央の配列の欠失したものは *ale-1* 遺伝子では 3.245 mU/mg から 0.730 mU/mg に、*epr* 遺伝子では 2.055 mU/mg から 0.181 mU/mg までかなり活性が落ちていた。

第4節 考察ならびに小括

ALE-1 と lysostaphin はそれぞれ *S. capitis* EPK1 と *S. simulans* が産生する pentaglycine 架橋構造を消化する glycyglycine endopeptidase であり、これらの産生株はペプチドグリカンの glycine 5 量体架橋に 1~2 分子 serine を置換する事で、自らが産生する glycyglycine endopeptidase によるペプチドグリカンの自己消化を防いでいることが明らかにされている [14, 22, 65, 66]。*S. capitis* EPK1 では Epr が ALE-1 に対する耐性化を担うことが明らかとなっている。この耐性遺伝子 *epr* は *ale-1*

遺伝子の 322 bp 上流に逆方向にコードされていることが明らかとなっており、*S. simulans* も同様に lysostaphin に対する耐性遺伝子 *lif* が *lss* とは逆方向にコードされていることが報告されている [14, 22]。また *epr* は *lif* と 70 % の相同性を持っている (図 6-1)。このように ALE-1 と Epr は近接した領域に逆方向でコードされていることから、これらの発現にはなんらかの制御機構があるのではないかと考えられた。そこで ALE-1 と Epr の発現の相互関係を明らかにするためにこれらのプロモーター解析を行った。その結果、*ale-1* 遺伝子の転写活性は定常期において最も強く、それ以降は減少していた。しかし、*epr* 遺伝子については初期対数増殖期から定常期にかけてほぼ同程度に転写されており *ale-1* 遺伝子と比較するとかなり転写活性は弱かった。このことから、Epr が増殖期には関係なく常に一定して発現しており、耐性化しながら ALE-1 が初期対数増殖期から産生され、定常期に入るにつれて産生量が増加することが明らかとなった。また、両方のプロモーター領域に含まれる回転対称構造 CAAAATC 配列を欠失した領域を pSL24 にクローニングしたものでは、*ale-1*、*epr* 遺伝子の両方向で XyleE 活性が消失していたことから、*ale-1*、*epr* 遺伝子のプロモーター活性には CAAAATC 配列の回転対称構造が必須であることが明らかとなった。このことから ALE-1 と Epr の発現は同じモチーフを必要としていることが示唆された。

小括

1. *ale-1* 遺伝子の転写活性は定常期において最も強く、以降は減少していた。
2. *epr* 遺伝子是对数増殖期初期から定常期にかけてほぼ同程度に転写されており、*ale-1* 遺伝子と比較するとかなり転写活性は弱かった。
3. Epr は増殖期には関係なく常に一定して発現しており、耐性化しながら ALE-1 が対数増殖期初期から産生され、定常期に増加することが明らかとなった。
4. *ale-1*、*epr* 遺伝子の両方のプロモーター領域に含まれる回転対称構造 CAAAATC 配列が両方向のプロモーター活性に必須である事が明らかとなり、ALE-1 と Epr の発現は同じモチーフを必要としていることが示唆された。

表 6-1 使用した菌株、プラスミドおよびプライマー

Strain	Relevant characteristics			Source or reference
<i>S. aureus</i>				
FDA209P	ATCC 6538			
RN4220	NTCT8315-4 r			R. Novick
TF5342	RN4220 pTF466			This study
TF5343	RN4220 pTF467			This study
TF5346	RN4220 pTF474			This study
TF5347	RN4220 pTF472			This study
TF5348	RN4220 pTF475			This study
TF5349	RN4220 pTF476			This study
<i>E. coli</i>				
XL1-Blue	<i>rec1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> / ^r ZM15 Tn10 (Tet ^r)]			Bullock et al.
Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pSL24			<i>S. aureus</i> - <i>E. coli</i> promoterless <i>xylE</i> expression vector	C. Lee
pUC19			<i>E. coli</i> cloning vector	Yanisch-Perron et al.
pTF311	pUC19	<i>Hinc</i> II	3.5kbp <i>Hinc</i> II fragment containing <i>ale-1</i> and <i>epr</i> gene	This study
pTF466	pSL24	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	0.34kbp <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I fragment containing <i>ale-1 xyl-a</i>	This study
pTF467	pSL24	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	0.34kbp <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I fragment containing <i>epr xyl-c</i>	This study
pTF472	pSL24	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	0.27kbp <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I fragment containing <i>epr xyl-d</i>	This study
pTF474	pSL24	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	0.13kbp <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I fragment containing <i>ale-1 xyl-b</i>	This study
pTF475	pSL24	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	0.34kbp <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I fragment containing <i>ale-1 xyl-a'</i>	This study
pTF476	pSL24	<i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I	0.34kbp <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I fragment containing <i>epr xyl-c'</i>	This study
Gene	Primer	Sequence (5' to 3')		Positions
	PPRMEX-ALE	GTGAATTTTCTATTTGTATCCATAA		29-52
	PPRMEX-EPR	AGCTTCTAATTAATACATAGTATTA		221-245
<i>ale-1 xyl-a</i>	<i>ale-xyl-1</i>	ATTTCTAGACATAAAATTTAAACCTC		39-63
	<i>ale-xyl-3</i>	GACGAATTCCATAGGACACCGACTT		358-383
<i>epr xyl-c</i>	<i>epr-xyl-2</i>	GACTCTAGACATAGGACACCCGACTT		358-384
	<i>epr-xyl-4</i>	ATTGAATTCCATAAAATTTAAACCTC		39-63
<i>ale-1 xyl-b</i>	<i>ale-xyl-1</i>	ATTTCTAGACATAAAATTTAAACCTC		39-63
	<i>ale-xyl-5</i>	TCTTATCTTGAATTCAATGTAAAG		140-164
<i>epr xyl-d</i>	<i>epr-xyl-2</i>	GACTCTAGACATAGGACACCCGACTT		358-384
	<i>epr-xyl-6</i>	TTAGAATTCGAAATATCAACAAAAT		115-140
deletion	<i>Xyl-7</i>	ATAAAATGTAAATTGATATTTCAAAATATAAAT		
	<i>Xyl-8</i>	TATCAATTTACATTTTATTTAAGATAAGAT		

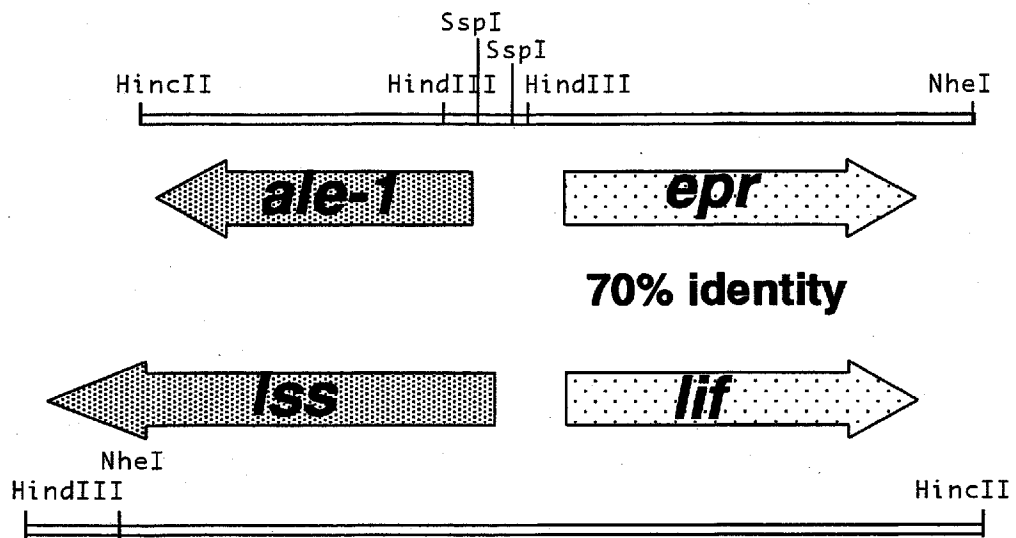


図 6-1 *ale-1*と*epr*の遺伝子構成

矢印がそれぞれのORFとその転写の方向を示す。*S. capitis* の *epr* と *S. simulans* の *lif* は70 %の相同性があった。

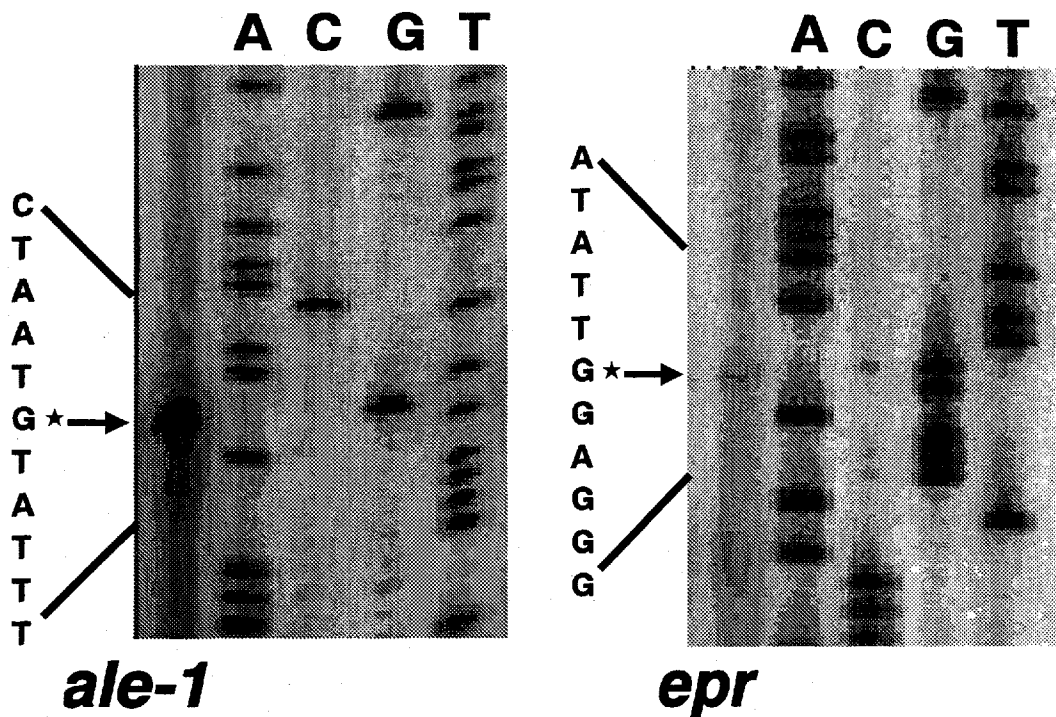


図 6-2 *ale-1*と*epr*の転写開始点

ale-1、*epr*の転写開始点を決定するため、プライマーエクステンションを行った。
★が転写開始点の塩基を示す。

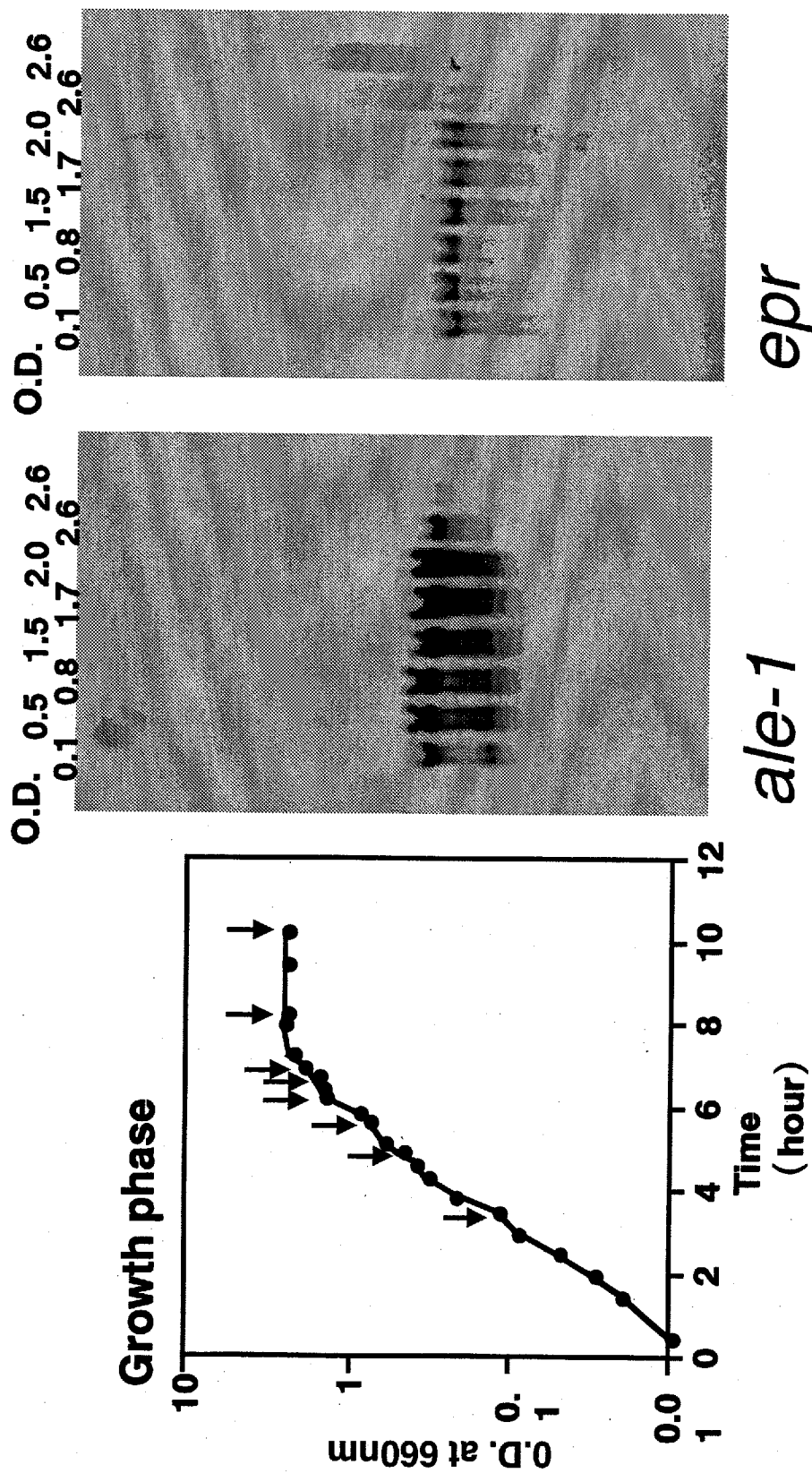


図 6-3 *ale-1*、*epr*のRNA転写量の解析

S. capitis EPK1の対数増殖期初期から定常期までの各増殖期まで培養した菌体からRNAを抽出、プローブとしてそれぞれ*ale-1*、*epr*領域のPCR断片を用いてノーザンブロッティングを行った。↓, サンプルリングした時間を表す。右2つのパネル上段にはO.D._{660nm}の値を示す。

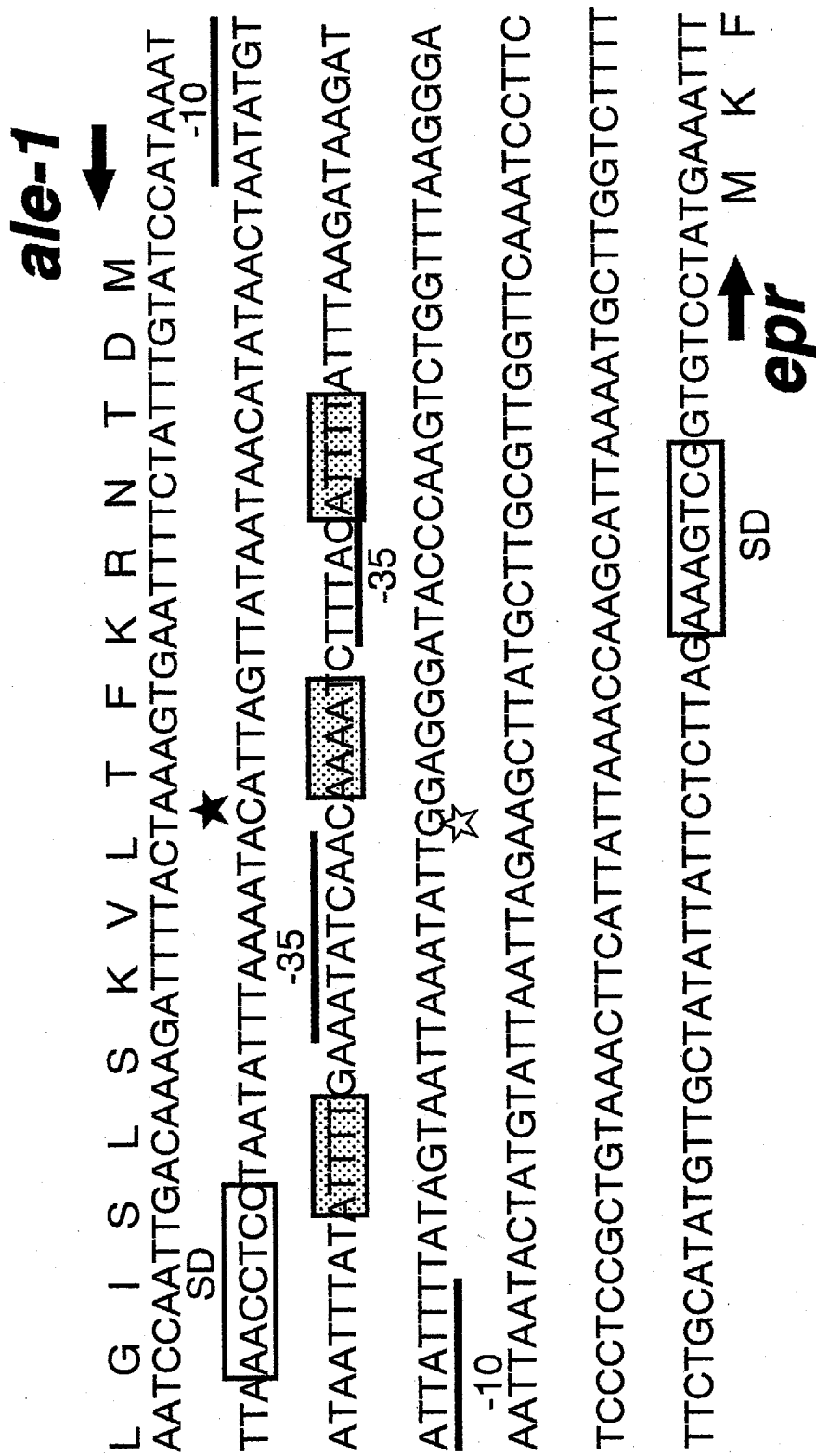


図 6-4 *ale-1*、*epr*のプロモーター領域DNA配列

*ale-1*と*epr*のプロモーター領域の塩基配列を示した。矢印が翻訳される方向を表す。□, SD配列; —, -10, -35の推定プロモーター配列; ★, ☆, 転写開始点; ■, 回転対称構造

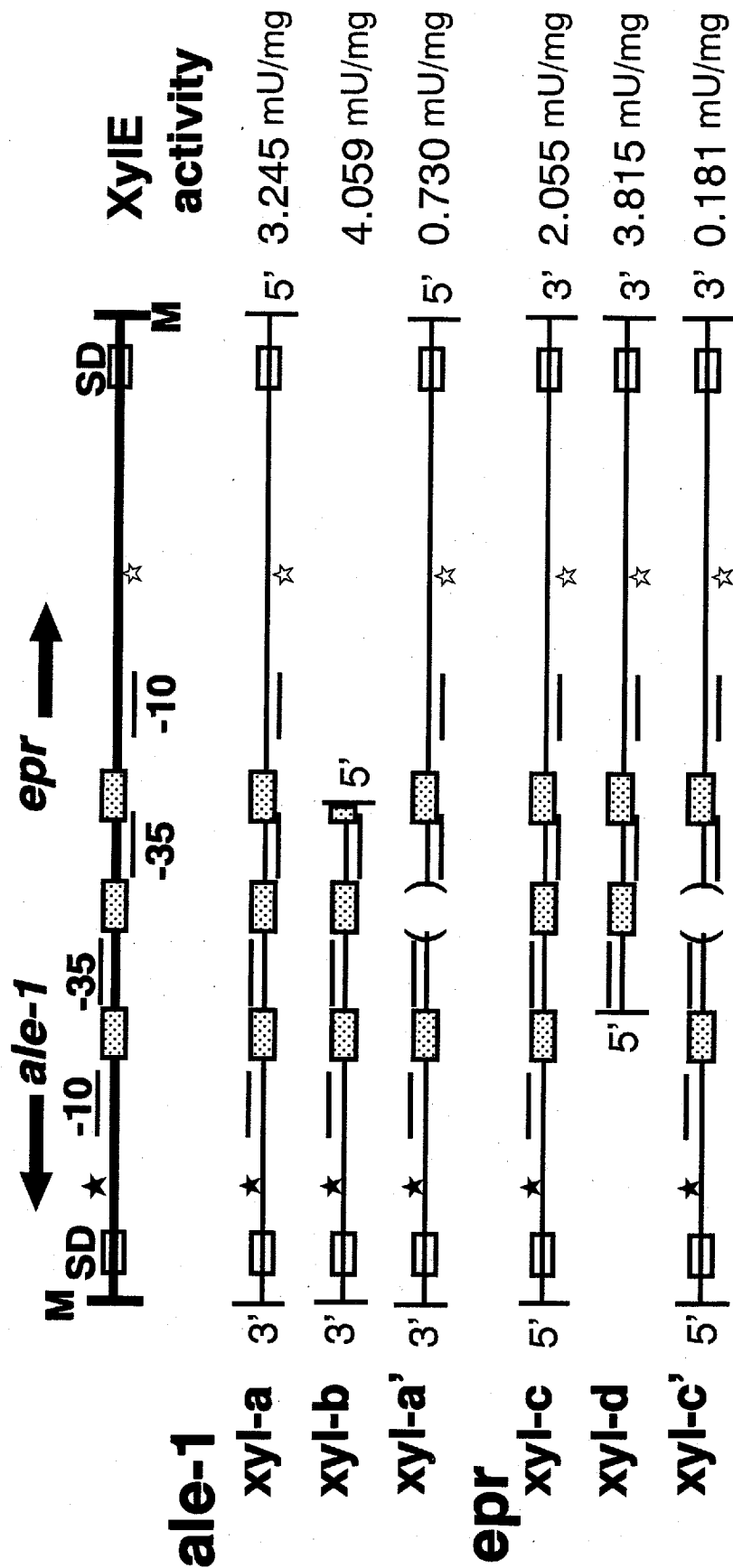


図 6-5 ale-1、epr のプロモーター活性

クローニングした ale-1 と epr のプロモーター領域を示した。それぞれの矢印が翻訳される方向を表す。□, それぞれの SD 配列; —, ale-1, epr それぞれの -10, -35 の推定プロモーター配列; ★, ☆, ale-1, epr それぞれの転写開始点; ▨, 回転対称構造。それぞれの断片での Xylem 活性を左に示した。

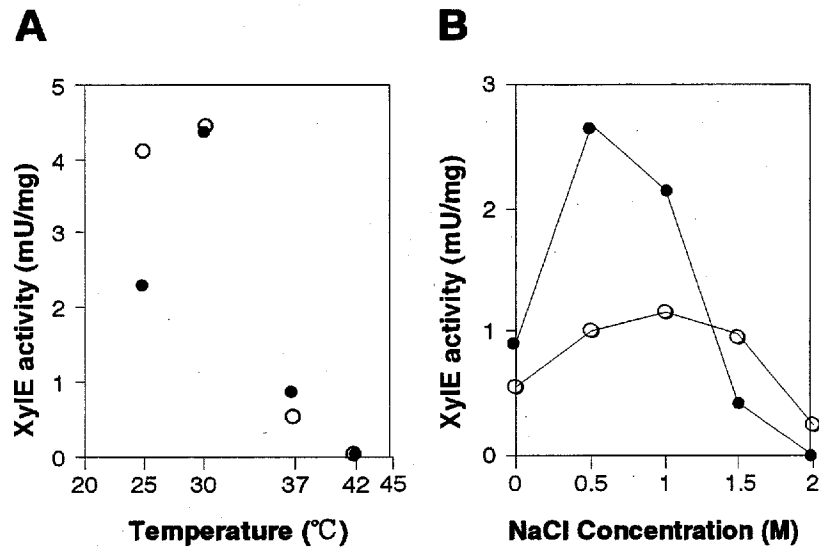


図 6-6 *ale-1*、*epr* のプロモーター転写活性に及ぼす温度と塩濃度の影響
ale-1、*epr* のプロモーター転写活性を測定するため、プロモーターの欠失した *xylE* 遺伝子をコードしたベクター-pSL24 を用い、XylE 活性を指標として転写活性を測定した。*ale-1*、*epr* 遺伝子のそれぞれの推定プロモーター領域を含む DNA 断片 (*ale-1* : *ale-1* xyl-a, *epr* : *epr* xyl-c) をクローニングし、培養温度 (A) と培地中に加える NaCl の濃度 (B) を変化させて XylE 活性を検討した。●, *ale-1* xyl-a; ○, *epr* xyl-c

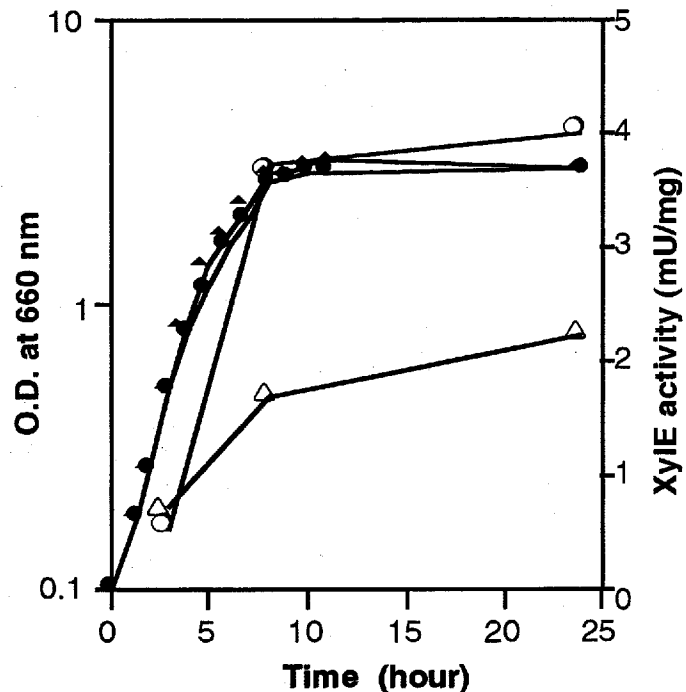


図 6-7 各増殖期における *ale-1* と *epr* の転写活性

各増殖期での *ale-1*、*epr* のプロモーター転写活性の変化を検討するために、それぞれの XylE 活性を 30°C、0.75 M NaCl 存在下の培養条件で測定した。●, *ale-1* xyl-a OD₆₆₀; ▲, *epr* xyl-c OD₆₆₀; ○, *ale-1* xyl-a XylE activity; △, *epr* xyl-c XylE activity

総括

本研究では *Staphylococcus capitis* EPK1 の産生する溶菌酵素 ALE-1 を精製し、その性状、機能について解析を行った。また ALE-1 に対して耐性を担う因子を同定し、その耐性機序について解析を行った。

S. capitis EPK1 の培養上清から精製した ALE-1 は glycylglycine endopeptidase であることが明らかとなった。ALE-1 をコードする遺伝子 *ale-1* の解析結果から、ALE-1 は 362 個のアミノ酸残基からなり、39.3 kDa の前駆体として合成された後、35 位の alanine の後ろでプロセスされ 35.6 kDa の成熟型 ALE-1 として産生されることが明らかとなった。また、ALE-1 は N 末端に 13 個のアミノ酸からなる 6 回の繰り返し構造を持ち、C 末端で活性ドメインと結合しており、構造的、機能的に lysostaphin と非常に類似していた。ALE-1 はその性状から金属プロテアーゼと考えられ、その酵素活性には亜鉛の結合部位と考えられる 150、200、231 そして 233 位の histidine が重要であった。しかしながら、これらアミノ酸の変異による活性の消失はタンパク自体の 3 次元構造の変化や亜鉛含量の変化によるものではない事が示唆された。このことから ALE-1 は金属プロテアーゼと考えられるが、その溶菌活性には亜鉛は必須ではないと示唆された。さらに ALE-1 の C 末端に存在する細胞壁選択的結合部位 92 アミノ酸配列 (92AA) は *Staphylococcus* 属のペプチドグリカンの特異的に認識し強固に結合することから、酵素が *S. aureus* の細胞壁を認識する基質特異性に重要な役割を果たしていると示唆された。92AA の結合には 5 つのアミノ酸からなる架橋を含むグリカン鎖を持った構造が重要であると考えられ、その X 線結晶構造解析より、Src-homology 3 (SH3) subdomains の構造と類似している事が明らかとなった。92AA の基質特異性は一般的な SH3 domain とは異なる事が分かっており、92AA が特異的に認識する標的構造の決定にはさらなる研究が必要と考えられる。

S. capitis EPK1 が持つ glycylglycine endopeptidase 耐性遺伝子 *epr* は ALE-1 構造遺伝子 *ale-1* の 322 bp 上流に位置し、逆方向に転写される 413 アミノ酸からなるタンパクをコードしており、*ale-1* 遺伝子と共に *S. capitis* EPK1 の持つプラスミド上に存在することが明らかとなった。アミノ酸配列の相同性検索の結果、Epr はペプチドグリカンの pentaglycine からなる架橋形成において Gly-tRNA から glycine の転移に関わる遺伝子 *femA* および *femB* の産物 FemA (36%)、FemB (33%) と相同性が認められた。Epr は架橋形成における Ser-tRNA の転移に関わる FemA/B 様の因子と考えられ、*S. capitis* EPK1 は自らが産生する glycylglycine endopeptidase ALE-1 から身を守るため、Epr を発現させて架橋に serine を入れていることが強く示唆された (図 B)。また、MRSA に Epr を過剰発現させたとき、メチシリンとバンコマイシンに対する感受性に変化はみられず、ペプチドグリカンの架橋構造のアミノ酸組成の変化は、*S. aureus* のメチシリンあるいはバンコマイシンに対する感受性の変化には直接関与していないと考えられた。

さらに *S. aureus* が *epr/lif* 様の遺伝子 *eprh* を持っている事を明らかにした。相同性検索の結果より、*eprh* 遺伝子のコードする推定アミノ酸配列は FemA,B (30~40%) よりも Epr、Lif (>50%) に相同性があった。*epr/lif* 遺伝子の解析より *eprh* 遺伝子もペプチドグリカンの架橋部分に glycine 以外の serine あるいは他のアミノ酸を転移するのに関与していると考えられたが、*eprh* 遺伝子をコードしたプラスミドを保有した *S. aureus* RN4220 株は lysostaphin に耐性化せず、ペプチドグリカンのアミノ酸組成にも変化は見られなかった。また、*eprh* 遺伝子変異株の解析およびノーザンブロット解析から、*eprh* 遺伝子の発現は通常の発育条件下では抑制されており、機能していない事が示唆された。

ale-1 遺伝子、*epr* 遺伝子のプロモーター解析から、ALE-1 は対数増殖期初期から産生され、定常期に産生量は増加するが、Epr は増殖期には関係なく常に一定して発現していることが明らかとなった。*ale-1*、*epr* 遺伝子の両方のプロモーター領域に含まれる回転対称構造 CAAAATC 配列が両方向のプロモーター活性に必須であり、この構造を共有していたことから、ALE-1 と Epr の発現は同じモチーフを必要としていることが示唆された。

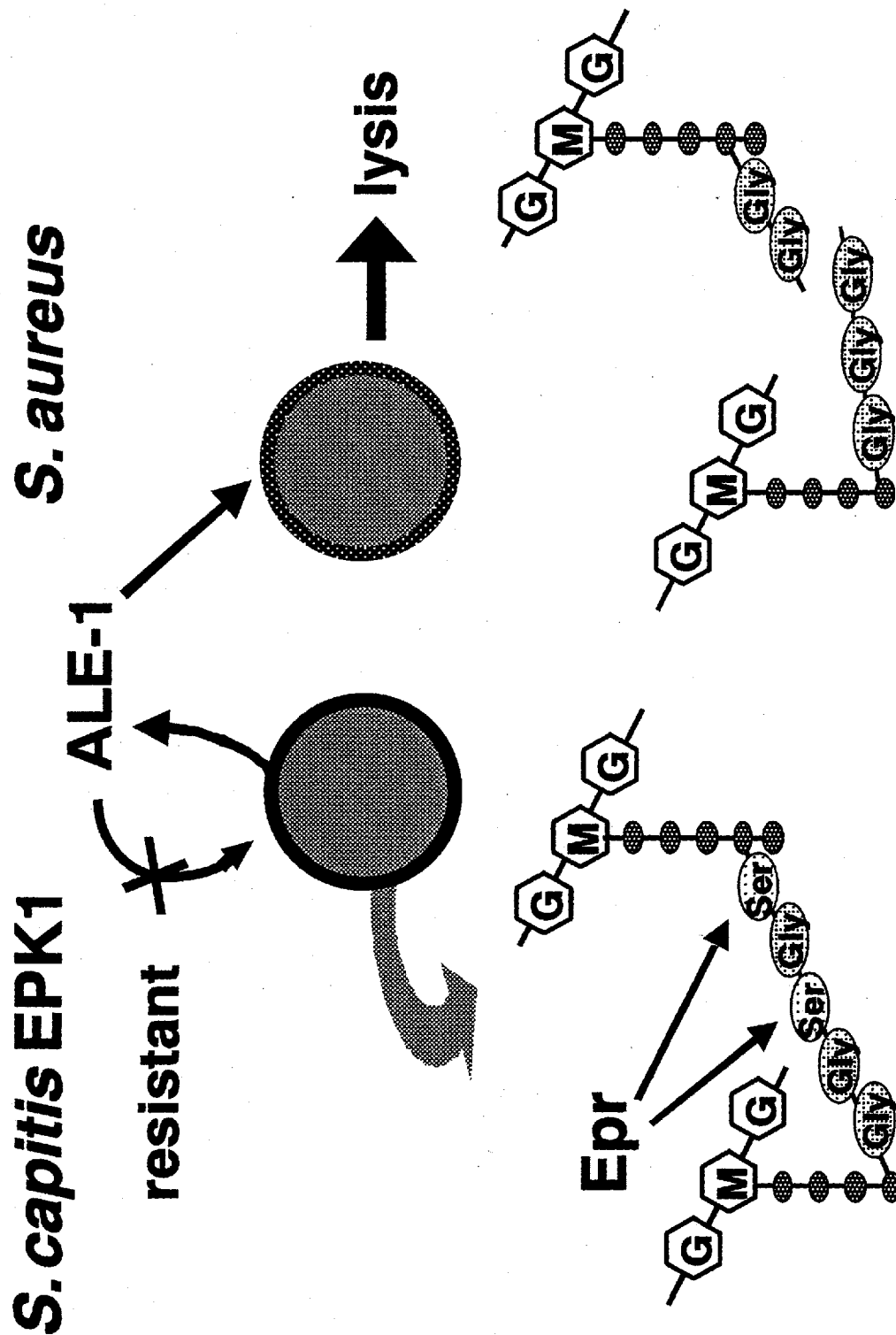


図 B *S. capitis* EPK1の産生する glycyglycine endopeptidase ALE-1とその耐性を担う因子Epr

参考文献

1. Araki, Y., T. Nakatani, K. Wakayama and E. Ito. 1972. Occurrence of *N*-nonsubstituted glucosamine residues in peptidoglycan of lysozyme-resistant cell walls of *Bacillus cereus*. J. Biol. Chem. 247:6312-6322.
2. Asheshov, E.H. 1966. *Staphylococcus aureus* strains in the "52, 52A, 80, 81 complex". Nature (London). 209:638-639.
3. Baba, T. and O. Schneewind. 1996. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. EMBO J. 15:4789-4797.
4. Berger-Bächi, B., L. Barberis-Maino, A. Strässle and F.H. Kayser. 1989. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. Mol. Gen. Genet. 219:263-269.
5. Bierbaum, G. and H.-G. Sahl. 1987. Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. J. Bacteriol. 169:5452-5458.
6. Billot-klein, D., L. Gutmann, D. Bryant, D. Bell, J. van Heijenoort, J. Grewal and D.M. Shlaes. 1996. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. J. Bacteriol. 178:4696-4703.
7. Bullock, W.O., J.M. Fernandez and J.M. Short. 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. BioTechniques. 5:376-379.
8. Clarke, A.J. 1993. Extent of peptidoglycan O acetylation in the tribe *Proteeae*. J. Bacteriol. 175:4550-4553.
9. Chatterjee, A.N., W. Wong, F.E. Young and R.W. Gilpin. 1976. Isolation and characterization of a mutant of *Staphylococcus aureus* deficient in autolytic activity. J. Bacteriol. 125:961 - 967.
10. Cleveland, R.F., J.V. Holtje, A.J. Wicken, A. Tomasz, L. Daneo-Moore and G.D. Shockman. 1975. Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67(3):1128-35.
11. Coleman, J.E. 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annu. Rev. Biochem. 61:897-946.
12. de Jonge, B.L., Y.S. Chang, D. Gage and A. Tomasz. 1992. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein

- 2A. J. Biol. Chem. 267(16):11248-54.
13. de Jonge, B.L., T. Sidow, Y.S. Chang, H. Labischinski, B. Berger-Bachi, D.A. Gage and A. Tomasz. 1993. Altered mucopeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. J. Bacteriol. 175(9):2779-82.
14. Dehart, H.P., H.E. Heath, L.S. Heath, P.A. Leblanc and G.L. Sloan. 1995. The lysostaphin endopeptidase resistance gene (*epr*) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 61:1475-1479.
15. Dupont, C. and A.J. Clarke. 1991. Dependence of lysozyme-catalyzed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of *o*-acetylation. Eur. J. Biochem. 195:763-769.
16. Fischer, W., P. Rosel and H.U. Koch. 1981. Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 146(2):467-75.
17. Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, R.A. Clayton, E.F. Kirkness, A.R. Kerlavage, C.J. Bult, J.-F. Tomb, B.A. Dougherty, J.M. Merrick, K. McKenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C.A. Fields, J.D. Gocayne, J.D. Scott, R. Shirley, L.-I. Liu, A. Glodek, J.M. Kelley, J.F. Weidman, C.A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M.D. Cotton, T.R. Utterback, M.C. Hanna, D.T. Nguyen, D.M. Saudek, R.C. Brandon, L.D. Fine, J.L. Fritchman, J.L. Fuhrmann, N.S.M. Geoghagen, C.L. Gnehm, L.A. McDonald, K.V. Small, C.M. Fraser, H.O. Smith and J.C. Venter. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science. 269:496-512.
18. Ghuysen, J.-M., D.J. Tipper and J.L. Strominger. 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. Methods Enzymol. 8:685-699.
19. Guidicelli, S. and A. Tomasz. 1984. Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation. J. Bacteriol. 158:1188-1190.
20. Hayashi, H., Y. Araki and E. Ito. 1973. Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme. J. Bacteriol. 113:592-598.
21. Heath, H.E., L.S. Heath, J.D. Nitterauer, K.E. Rose and G.L. Sloan. 1989. Plasmid-encoded lysostaphin endopeptidase resistance of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1106-1109.
22. Heath, L.S., H.E. Heath and G.L. Sloan. 1987. Plasmid-encoded lysostaphin endopeptidase gene of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. FEMS Microbiol. Lett.. 44:129-133.
23. Heinrich, P., R. Rosenstein, M. Böhmer, P. Sonner and F. Götz. 1987. The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem. Mol. Gen. Genet. 209:563-569.

24. Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*. 28:351-359.
25. Henze, U., T. Sidow, J. Wecke, H. Labischinski and B. Berger-Bachi. 1993. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 175:1612-1620.
26. Herbold, D. R., and L. Glaser. 1975. Interaction of N-acetylmuramic acid L-alanine amidase with cell wall polymers. *J. Biol. Chem.* 250:7231-7283.
27. Häse, C.C. and R.A. Finkelstein. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* 57:823-837.
28. Höltje, J.V. and A. Tomasz. 1975. Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72:1690-1694.
29. Ichikawa, J.K., C. Li, J. Fu and S. Clarke. 1994. A gene at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome encodes a lipoprotein with unusual amino acid repeat sequences. *J. Bacteriol.* 176:1630-1638.
30. Iriarte, M., I. Stainier and G.R. Cornelis. 1995. The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect. Immun.* 63:1840-1847.
31. Ito, W., H. Ishiguro and Y. Kurosawa. 1991. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene*. 102:67-70.
32. Iversen, O. and A. Grov. 1973. Studies on lysostaphin. Separation and characterization of three enzymes. *Eur. J. Biochem.* 38:293-300.
33. Kamiryo, T. and M. Matsushashi. 1972. The biosynthesis of the cross-linking peptides in the cell wall peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247:6306-6311.
34. Karow, M. and C. Georgopoulos. 1992. Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *msbB* gene, a multicopy suppressor of null mutations in the high-temperature requirement gene *htrB*. *J. Bacteriol.* 174:702-710.
35. Kessler, E., M. Safrin, J.C. Olson and D.E. Ohman. 1993. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J. Biol. Chem.* 268:7503-7508.
36. Komatsuzawa, H., M. Sugai, C. Shirai, J. Suzuki, K. Hiramatsu and H. Suginaka. 1995. Triton X-100 alters the resistance level of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *FEMS Microbiol. Lett.* 134:209-212.
37. Komatsuzawa, H., J. Suzuki, M. Sugai, Y. Miyake and H. Suginaka. 1994. The effect of Triton X-100 on the in-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:885-897.

38. Kopp, U., M. Roos, J. Wecke and H. Labischinski. 1996. Staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge biosynthesis: a novel antistaphylococcal target? *Microb. Drug Res.* 2:29-41.
39. Kornblum, J., B.J. Hartman, R.P. Novick and A. Tomasz. 1986. Conversion of a homogenously methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* to heterogenous resistance by Tn551-mediated insertional inactivation. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5:714-718.
40. Kovach, M.E., K.J. Hughes, K.D. Everiss and K.M. Peterson. 1994. Identification of a ToxR-activated gene, *tagE*, that lies within the accessory colonization factor gene cluster of *Vibrio cholerae* O395. *Gene.* 148:91-95.
41. Lange, R. and R. Hengge-Aronis. 1994. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* 13:733-743.
42. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 227:680-685.
43. LeClerc, D. and A. Asselin. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 35:749-753.
44. Li, S.L., S. Norioka and F. Sakiyama. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of the β -lytic protease gene from *Achromobacter liticus*. *J. Bacteriol.* 172:6506-6511.
45. Lin, W.S., T. CCunneen and C.Y. Lee. 1994. Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176:7005-7016.
46. Losardt, I.M. and H.Y. Neujahr. 1975. Lysis of modified walls from *Lactobacillus fermentum*. *J. Bacteriol.* 124:73-77.
47. Maidhof, H., B. Reinicke, P. Blümel, B. Berger-Bächi and H. Labischinski. 1991. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 173:3507-3513.
48. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene membranes. *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038.
49. Matsushashi, M., C.P. Dietrich and J.L. Strominger. 1967. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 242:3191-3206.
50. Mayer, B.J. 2002. SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of Cell Science.* 114:1253-1263.
51. Neumann, V.C., H.E. Heath, P.A. LeBlanc and G.L. Sloan. 1993. Extracellular proteolytic

- activation of bacteriolytic peptidoglycan hydrolases of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. FEMS Microbiol. Lett.. 110(2):205-11.
52. Ohta, K., H. Komatsuzawa, M. Sugai, and H. Suginaka. 1998. Zymographic characterization of *Staphylococcus aureus* Cell. Microbiol. Immunol. 42(3):231-235.
 53. Park, P.W., R.M. Senior, G.L. Griffin, T.J. Broekelmann, M.S. Mudd and R.P. Mecham. 1995. Binding and degradation of elastin by the staphylolytic enzyme lysostaphin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27:139-146.
 54. Park, S. and D.R. Galloway. 1995. Purification and characterization of LasD: second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol.. 16:263-270.
 55. Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. Nature. 373(6515):573-580.
 56. Petit, J.F., J.L. Strominger and D. Söll. 1968. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation of serine and glycine into interpeptide bridges in *Staphylococcus epidermidis*. J. Biol. Chem. 243:757-767.
 57. Ramadurai, L. and R.K. Jayaswal. 1997. Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 179:3625-3631.
 58. Recsei, P.A., A.D. Gruss and R.P. Novick. 1987. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:1127-1131.
 59. Robbe-Saule, V., C. Coynault and F. Norel. 1995. The live oral typhoid vaccine Ty21a is a *rpoS* mutant and is susceptible to various environmental stresses. FEMS Microbiol. Lett.. 126:171-176.
 60. Robinson, J.M., J.K. Hardman and G.L. Sloan. 1979. Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in *Staphylococcus staphylolyticus*. J. Bacteriol. 137(3):1158-64.
 61. Robson, R.L. and J. Baddiley. 1977. Role of teichuronic acid in *Bacillus licheniformis*: defective autolysis due to deficiency of teichuronic acid in a novobiocin-resistant mutant. J. Bacteriol. 129:1051-1058.
 62. Rosenthal, R.S., J.K. Blundell and H.R. Perkins. 1982. Strain-related differences in lysozyme sensitivity and extent of *O*-acetylation of gonococcal peptidoglycan. Infect.Immun. 37:826-829.
 63. Sambrook, J., T. Maniatis and E.F. Fritsch. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
 64. Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.
 65. Schindler, C.A. and V.T. Schuhardt. 1964. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51:414-421.

66. Schindler, C.A. and V.T. Schuhardt. 1965. Purification and properties of lysostaphin - a lytic agent for *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Acta. 97:242-250.
67. Schleifer, K.H. 1986. Gram-positive cocci, in Bergey's manual of systematic bacteriology, P.H.A. Sneath, N.S. Mair, and J.G. Holt, Editors., Williams & Wilkins: Baltimore. 1022-1023.
68. Schleifer, K.H. and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications., in Bacteriol. Rev. 1407-477.
69. Shad, P.A. and B.H. Iglewski. 1988. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa lasA* gene. J. Bacteriol. 170:2784-2789.
70. Skinner, S., B. Inglis, P.R. Matthews and P.R. Stewart. 1988. Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbial.. 2:289-297.
71. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Geoke, B.J. Olson and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150:76-85.
72. Smith, T.J. and S.J. Foster. 1995. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. 177(13):3855-62.
73. Stewart, P.R., H.G. Waldron, J.S. Lee and P.R. Matthews. 1985. Molecular relationships among serogroup B bacteriophages of *Staphylococcus aureus*. J. Virol. 55:111-116.
74. Strandén, A. M., K. Ehlert, H. Labischinski, and B. Berger- Bächli. 1997. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 179:9-16.
75. Sugai, M. 1997. Peptidoglycan Hydrolase of the Staphylococci. J. Infect. Chemother. 3:113-127.
76. Sugai, M., T. Akiyama, H. Komatsuzawa, Y. Miyake and H. Suginaka. 1990. Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriol. 172:6494-6498.
77. Sugai, M., T. Akiyama, Y. Miyake, E. Ishida and H. Suginaka. 1990. Rapid purification method of lysostaphin for analysis of cell-wall proteins. J. Microbiol. Methods. 12:133-138.
78. Sugai, M., H. Koike, Y.-M. Hong, Y. Miyake, R. Nogami and H. Suginaka. 1989. Purification of a 51 kDa endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett.. 61:267-272.
79. Sugai, M., H. Komatsuzawa, T. Akiyama, Y.-M. Hong, T. Oshida, Y. Miyake, T. Yamaguchi and H. Suginaka. 1995. Identification of endo- β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-

- alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 177:1491 - 1496.
80. Sugai, M., H. Komatsuzawa, K. Ooku-Inomata, Y. Miyake, E. Ishida and H. Suginaka. 1994. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* mutants which form altered cell clusters. Microbiol. Immunol. 38:995-999.
 81. Sugai, M., H. Komatsuzawa, S. Tomita, T. Akiyama, Y. Miyake and H. Suginaka. 1991. Detection of a staphylococcal endo- β -N-acetylglucosaminidase using polyacrylamide gels. J. Microbiol. Methods. 13:11-16.
 82. Suginaka, H., S. Kashiba, T. Amano, S. Kotani and T. Imanishi. 1967. Purification and properties of a staphylolytic factor produced by a strain of *Staphylococcus epidermidis*. Biken J. 10:109-120.
 83. Swim, S.C., M.A. Gfell, C.E.I. Wilde and R.S. Rosenthal. 1983. Strain distribution in extents of lysozyme resistance and o-acetylation of gonococcal peptidoglycan determined by high-performance liquid chromatography. Infect.Immun. 42:446-452.
 84. Tanaka, K. and H. Takahashi. 1994. Cloning, analysis and expression of an rpoS homologue gene from *Pseudomonas aeruginosa*. Gene. 150:81-85.
 85. Theisen, M., C.R. Rioux and A.A. Potter. 1993. Molecular cloning, nucleotide sequence, and characterization of *lppB*, encoding an antigenic 40-kilodalton lipoprotein of *Haemophilus somnus*. Infect.Immun. 61:1793-1798.
 86. Thompson, J.S. and G.D. Shockman. 1969. A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials: its application to bacterial cell wall. Anal. Biochem. 22:260-268.
 87. Thorndike, J. and J.T. Park. 1969. A method for demonstrating the stepwise addition of glycine from transfer RNA into the murein precursor of *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys. Res. Commun. 34:642-647.
 88. Thumm, G. and G. Götz. 1997. Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Mol. Microbiol. 23:1251-1265.
 89. Tipper. 1969. Structures of the cell wall peptidoglycans of *Staphylococcus epidermidis* Texas 26 and *Staphylococcus aureus* Copenhagen. II. Structure of neutral and basic peptides from hydrolysis with the Myxobacter al-1 peptidase. Biochemistry. 8:2192-2202.
 90. Tomasz, A., M. Westphal, E.B. Briles and P. Fletcher. 1975. On the physiological functions of teichoic acids. J. Supramol. Struct. 3(1):1-16.

91. Trayer, H.R. and C.E. Buckley III. 1970. Molecular properties of lysostaphin, a bacteriolytic agent specific for *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 245:4842-4846.
92. Vallee, B.L. and D.S. Auld. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry. 29:5647-5659.
93. Wadström, T. and O. Vesterberg. 1971. Studies on endo-beta-N-acetylglucosaminidase, staphylolytic peptidase, and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in lysostaphin and from *Staphylococcus aureus*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B79:248-264.
94. Wang, X., B.J. Wilkinson and R.K. Jayaswal. 1991. Sequence analysis of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. Gene. 102:105-109.
95. Whisstock, J.C. and A.M. Lesk. 1999. SH3 domains in prokaryotes. Trends Biochem Sci. 24(4):132-133.
96. Whitaker, D.R. 1965. Lytic enzymes of *Sorangium sp.*, a comparison of proteolytic properties of the alpha-lytic and beta-lytic proteases. Can. J. Biochem. 43:1935-1954.
97. Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vector and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33:103-119.
98. Young, R. and U. Blasi. 1995. Holins: form and function in bacteriophage lysis. FEMS Microbiol. Rev. 17:191-205.
99. Zukowski, M. M., D. F. Gaffney D. Speck, M. Kauffmann, A. Findeli, A. Wisecup, and J.P. Lecocq. 1983. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:1101-1105
100. Zygmunt, W. and P.A. Tavormina. 1972. Lysostaphin: model for a specific enzymatic approach to infectious disease. Prog. Drug Res. 16:309-333.
101. Zygmunt, W.A., H.P. Browder and P.A. Tavormina. 1968. Susceptibility of coagulase-negative staphylococci to lysostaphin and other antibiotics. Appl. Microbiol. 16:1168-1173.