

# 論文内容の要旨

論文題目 *Bacillus cereus* group 内の種間差異に関する研究

- *Bacillus anthracis* 特異的溶解酵素 PlyG の解析を中心に -

氏名 杉本 (吉川) ひとみ

## 1. 研究の背景と目的

*Bacillus cereus* group はグラム陽性有芽胞桿菌の 1 グループであり、土壌をはじめとする環境中に広く生息する。このグループ内での細菌はもとは 1 種であるともいわれており、互いに極めて近縁でその識別は困難である。そのうちヒトに病原性をもつものとして *B. anthracis* (炭疽菌) と *B. cereus* (セレウス菌) が挙げられ、前者は炭疽、後者は食中毒の原因となる。

$\gamma$ phage は *B. anthracis* 特異的に感染する phage であり、その溶菌酵素 lysin (PlyG) も *B. anthracis* へのみ溶菌活性を示すことが報告されている。これまでに近縁種に感染する他の phage lysin との相同性が低い PlyG の C 末 79 アミノ酸残基 (PlyGB) が *B. anthracis* への特異的な結合に関わることを明らかにされているが、触媒部位の解析あるいは詳細な結合部位の研究は行われていない (Fig. 1)。そこで本研究では、PlyG の N 末の触媒ドメインの変異体を用いた分析及び PlyGB と *B. anthracis* の結合の詳細な解析を行うことにより、PlyG の *B. anthracis* 特異的溶菌メカニズムを解明することを目的とした。

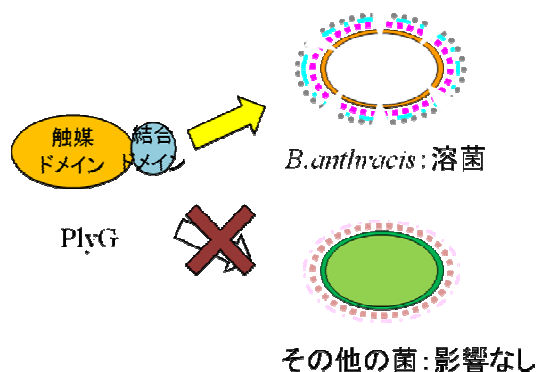


Fig. 1 PlyG の溶菌活性特異性

さらに、*B. cereus* の動物への感染ルートのひとつとして、土壌由来のものによる汚染が挙げられ、環境中の *B. cereus* の動態を知ることは感染のコントロールに役立つ可能性がある。しかし、*Bacillus cereus* group の環境由来株の解析は世界的にもあまり行われておらず、日本ではこれまで報告がない。そこで、土壌から *B. cereus* 野生株を単離し、食中毒原因細菌の多型解析に用いられる Variable number tandem repeat (VNTR)により分析した。

## 2. $\gamma$ phage 由来 *B. anthracis* 細胞壁特異的溶解酵素 PlyG の解析

### 2.1. PlyG 触媒ドメインの解析

PlyG の C 末 78 アミノ酸残基 (PlyGB) が、*B. anthracis* への特異的な結合に関わることが報告されているため、PlyG の触媒活性に関わる部位は、PlyGB 以外の領域で他の lysin との相同性が高い N 末側 155 アミノ酸残基に存在していることが予想される。本研究では、PlyG の触媒ドメインの解析を行った。

PlyG の触媒ドメインは T7 lysozyme の触媒ドメインと相同性が高い。T7 lysozyme では 5 残基が活性に関わると予想されており、うち 3 残基について部位特異的変異体を用いた解析がなされている。また、PlyG の触媒ドメインと 90% のホモロジーを持つ *B. anthracis* prophage 由来 endolysin PlyL について既に構造が決定されており、T7 lysozyme の構造との比較から、PlyG において H29、E90、H129、K135、C137 に相当するアミノ酸残基が活性に関与すると予想されている。今回は、T7 lysozyme での解析と同様に H29、E90、K135 について部位特異的変異体を用いた解析を行った。

変異体の *B. anthracis* 溶菌活性は、コロニーフォーミング法により解析した。その結果、K135A は Wild type の PlyG と同様の溶菌活性を示したのに対して、変異体 H29N、E90A は *B. anthracis* に対する溶菌活性を失っていた。T7 lysozyme や他の触媒ドメイン類似 lysin において H29、E90 相当残基の部位特異的変異によって活性が失われたという報告があり、PlyG においても、他のホモロジーの高い lysin と同様の部位が活性に関与していることが示唆された (Fig. 2)。

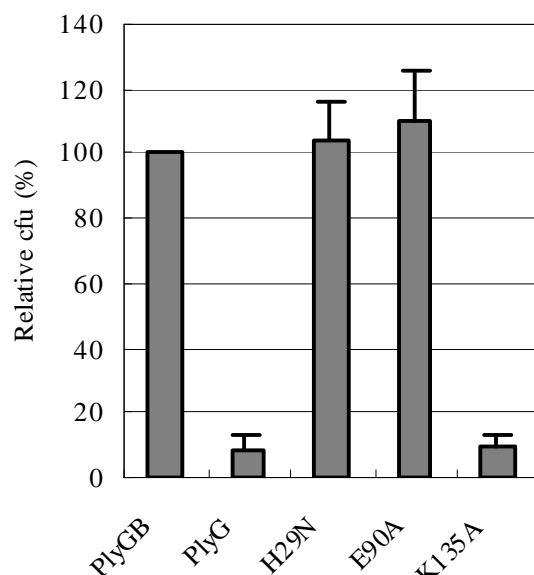


Fig. 2 変異体の溶菌活性

多くの lysin は細胞壁結合ドメインの存在が酵素活性に必須であるといわれている。しかし、PlyL は C 末の細胞壁結合ドメインを欠いても溶菌活性を保持すると報告されており、PlyG も PlyL と同様の性質を示すことが予想される。そこで PlyG の C 末欠失変異体を作製し、その溶菌活性について上記と同様に測定したところ、PlyG の C 末欠失変異体は溶菌活性が見られなかった。PlyG は PlyL とは異なり C 末の細胞壁結合ドメインが溶菌活性に必要なことが示された。

## 2.2. PlyG 結合ドメイン、PlyGB の詳細な解析

近縁種に感染する他の phage lysin との相同性が低い PlyG の C 末 79 アミノ酸残基(PlyGB)が、*B. anthracis* への特異的な結合に関わることが既に報告されている。そこで本研究では更に詳細に PlyGB の結合部位の解析を行った。

まず、PlyGB のアミノ酸配列から立体構造の特徴を予測し、5 つの領域に分類した。これら 5 つの領域を様々な組み合わせで欠失させた 7 種類の PlyGB の変異体をリコンビナント蛋白質として調製した。*B. anthracis* と変異体との結合は、ドットプロット法により解析を行った。その結果、PlyGB のほぼ中央部 10 残基を欠失した変異体のみ *B. anthracis* との結合が検出できなかった (Fig. 3)。

更に、その 10 残基のうち、近縁種に感染する他の phage との相同性が低い 3 残基 (L190、D195、Q199) に注目した。3 残基すべて A に置換した変異体 (L190A/D195A/Q199A)、2 残基を A に置換した変異体 (L190A/D195A、D195A/Q199A、L190A/Q199A)、1 残基を A に置換した変異体 (L190A、D195A、Q199A) を作製し、ドットプロット法および ELISA 法で *B. anthracis* との結合の有無を解析した。その結果、3 残基置換した変異体 (L190A/D195A/Q199A)、2 残基を置換した変異体 (L190A/D195A、D195A/Q199A、L190A/Q199A)、L190、Q199 のみ置換した変異体 (L190A、Q199A) で *B. anthracis* への結合の低下が見られた。これらの結果から、L190 及び Q199 が *B. anthracis* への特異的な結合に関与していることが示唆された (Fig. 4)。

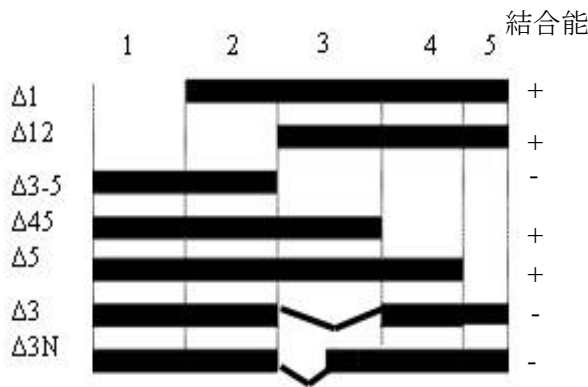


Fig. 3 欠失変異体の *B. anthracis* 結合能

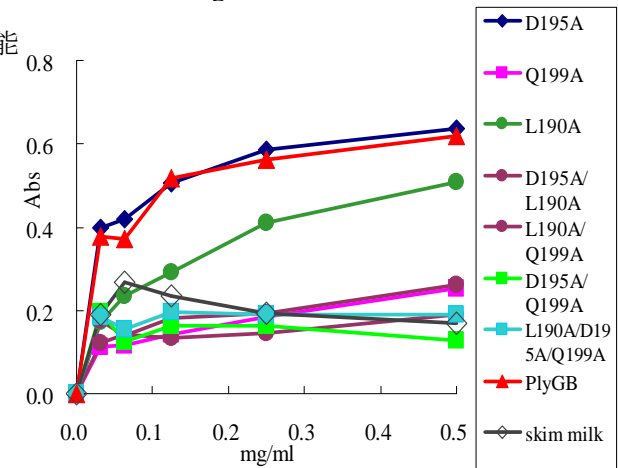


Fig. 4 部位特異的変異体の *B. anthracis* 結合能

PlyG のリガンドに対する研究はこれまで行われていない。*Listeria* の lysin、Ply118 と Ply500 の結合ドメインに関する研究では、熱、溶媒抽出、界面活性剤による抽出、蛋白質分解酵素による処理で蛋白、脂質および膜結合化合物を除去してもリガンドに対する結合に影響はみられなかったため、多糖がリガンドであると述べている。

そこで、加熱、界面活性剤、蛋白質分解酵素、溶媒、強酸処理により処理した菌体にも PlyG が結合するか否かについて検討したところ、処理後の細胞壁であっても結合することが確認された。先に述べた Ply118、500 と同様の処理を行った細胞壁に PlyGB も反応するため、リガンドが糖であることが示唆された。

*B. anthracis* の細胞壁の糖成分は Rib、Gal、Glu、Mur、GlcN、ManN であることが発表されている。そこで、競合 ELISA 法を用いて、これらの糖が PlyGB と菌体の結合に対して影響を与えるか否かについて検証した。Mur、GlcN、ManN は PlyGB と菌体の結合を競合阻害し、これらが結合に関与すると考えられた。

### 3. 土壌由来 *B. cereus* の多型解析

*B. group* の環境由来株の解析をするために、関東由来の土壌試料から *B. cereus* の分離を行い、VNTR 5 領域について解析した。

その結果、同一地点由来株の VNTR 型は類似している傾向が見られたものの様々な VNTR 型が見られ、同一地点由来のコロニー間に多様性があることが確認された (Table 1.)。

Table 1. 同一試料から得られた異なる VNTR パターン

| The number of motifs obtained for each |       |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|-------|
| vrrA                                   | Bcm08 | Bcm17 | Bcm18 | Bcm20 |
| 5                                      | 27    | 8     | 10    | 12    |
| 6                                      | 27    | 8     | 10    | 13    |
| 8                                      | 28    | 9     | 10    | 15    |
| 5                                      | 27    | 8     | 10    | 13    |
| 5                                      | 27    | 8     | 7     | 7     |
| 5                                      | 26    | 9     | 9     | 7     |
| 5                                      | 26    | 8     | 10    | 13    |
| 6                                      | 26    | 8     | 10    | 13    |
| 6                                      | 27    | 8     | 10    | 12    |
| 6                                      | 28    | 9     | 9     | 13    |
| 9                                      | 27    | 8     | 10    | 13    |

増幅断片長は、これまでに報告されているものと異なる増幅断片が得られたのはわずか2株のみであり、ほとんどの単離株でこれまでと同様の増幅断片が得られた。vrrA、Bcm08 および Bcm18 座位について *B. anthracis* で報告されている増幅断片長を持つ株は見られなかった。また、Bcm17 位は、*B. anthracis* および *B. anthracis* に近縁の *B. cereus* では報告されているが、本研究で環境中から得られた株にはこの増幅断片長を示すものはみられなかった。*B. anthracis* で報告されている増幅断片長と同じものが見られたのは Bcm18 のみであった。以上の結果は環境中 *B. cereus* と *B. anthracis* との相違を示すものである。

### 4. 結論と展望

本研究では、まず、*B. anthracis* のみに溶菌作用を示し、非常に近縁の他の *Bacillus cereus group* には作用しない細胞壁溶解酵素 PlyG の解析を行った。N 末側触媒ドメインは、ホモロジーの高い他の酵素と類似したアミノ酸残基が PlyG の酵素活性に重要であり、*B. anthracis* に対して溶菌を示すためには結合ドメインを必要とすることが明らかとなった。主要な細胞壁結合モチーフと高いホモロジーを示さない C 末側結合ドメインについては、その中央部 10 残基に存在する 2 残基が結合特異性に重要であった。また、PlyG との結合に関わる *B. anthracis* の細胞壁の成分として、Mur、GlcN、ManN が関わりと考えられた。今後さらに PlyG の解析を進めることにより、*B. anthracis* の特異的検出法の開発や治療法の開発に寄与すると考えられる。将来的には、*B. anthracis* と他の *Bacillus cereus group* との相違についての知見が得られることが期待される。今後は構造についての知見を深めていく予定である。

次に、環境中に生息する *Bacillus cereus group* として *B. cereus* を単離し、その多型解析を行った。その結果、一地点から得られた単離株からも多くの多型が確認された。得られた増幅断片の多型については、*B. anthracis* で報告されているものと相違点が多く、環境中の *B. cereus* が *B. anthracis* と比較的異なることが示唆された。本研究において、諸外国で報告されているのと同様に、日本の土壌においても *B. cereus* は多様に富むことが明らかになった。今回用いた解析法は、環境由来菌のみならず臨床単離株の多型解析にも有用であることが期待される。