

## 2002年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2003年 3月 14日

財団法人 日中医学協会  
理事長 殿

研究者氏名 王 興民   
所属機関名 金沢大学医学系研究科  
指導責任者氏名 中村 信一  
職 名 教授  
所 在 地 〒920-8640 金沢市宝町13-1  
電 話 076-265-2202 内線 ダイヤルイン

### 1. 研究テーマ

クロストリジウム属菌の産生するレシチナーゼの構造と機能に関する研究

### 2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表  有  無 (学会名・演題)

1. 前側恒男, 王興民, 唐澤忠宏, 尾崎栄二郎, 中村信一. *Clostridium sordellii*レシチナーゼの遺伝子クローニングと組換えタンパクの性状解析. 第75回日本細菌学会総会 (4/5発表)
2. 尾崎栄二郎, 唐澤忠宏, 前側恒男, 王興民, 中村信一. *Clostridium difficile*の消化管定着の多様性. 第39回日本細菌学会中部支部総会 (10/25発表)

(2) 学会誌等に発表した論文  有  無 (雑誌名・論文名)

1. Maegawa T, Wang X, Karasawa T, Zuka M, Kita H, Nakamura S. Intraperitoneal fluid accumulation induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin (phospholipase C). *Acta Microbiol. Pol.* 2002;51:387-389.
2. Tsukamoto K, Mukamoto M, Kohda T, Ihara H, Wang X, Maegawa T, Nakamura S, Karasawa T, Kozaki S. Characterization of *Clostridium butyricum* neurotoxin associated with food-borne botulism. *Microb Pathog.* 2002;33:177-184.
3. Maegawa T, Karasawa T, Ohta T, Wang X, Kato H, Hayashi H, Nakamura S. Linkage between toxin production and purine biosynthesis in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2002;51:34-41.

## クロストリジウム属菌の産生するレシチナーゼの構造と機能に関する研究

研究者氏名	王 興民
中国所属機関	衛生部蘭州生物製品研究所第五研究室 副研究員
日本研究機関	金沢大学医学系研究科細菌感染症制御学分野
指導責任者	教授 中村 信一
共同研究者名	唐澤忠宏, 前側恒男, 尾崎栄二郎

### 要旨

クロストリジウム属にはレシチナーゼ産生菌が多数存在する。特に *Clostridium perfringens* レシチナーゼ (Cpa:  $\alpha$ トキシン) は同菌の主要病原因子でもある。クロストリジウム属レシチナーゼで一次構造が明らかなのは *C. perfringens* (Cpa) の他は *C. bifermentans* (Cbp) と *C. novyi* (Cnp) の計3菌種のみである。そこで本研究では種々のクロストリジウム属菌からレシチナーゼ遺伝子のクローニングを行った。さらに *C. sordellii* レシチナーゼ (Csp) については既知のクロストリジウム属レシチナーゼとの構造および酵素活性, 生物活性の比較を行った。その結果, csp 遺伝子は 1197 ヌクレオチド, 399 アミノ酸残基から成っており, 成熟タンパクは 371 残基で, 28 残基のシグナルペプチドを有していることが明かとなった。Csp と, Cbp, Cnp, Cpa とのアミノ酸配列同一性は各々 77.4%, 56.7%, 53.4%で特に Cbp との間に高い相同性を有していた。Cpa の活性を 1 とした場合, Csp は, 卵黄レシチン水解活性 0.38, p-ニトロフェニルフォスフォルコリン水解活性 0.08, 溶血活性<0.01, マウス致死活性<0.1 であり, 溶血, マウス致死活性が弱い点は Cbp に類似していた。クロストリジウム属菌によって引き起されるガス壊疽に対する, 効果的な治療法や予防法を確立するためには, さらに様々なレシチナーゼの比較解析が必要であると考えられた。

**Key Words :** ガス壊疽, クロストリジウム属菌, 病原性, レシチナーゼ, 遺伝子クローニング

### 緒言 :

*Clostridium perfringens* は  $\alpha$ トキシン (Cpa) と呼ばれるレシチナーゼを産生する。これはクロストリジウム属菌のレシチナーゼ中では最も詳しく研究されており<sup>16,17</sup>, 酵素学的にはホスホリパーゼ C に属する<sup>17</sup>。Cpa は動物に対して毒性を持ち, *C. perfringens* の最も重要な病原因子の一つである<sup>16,17</sup>。*C. perfringens* 以外のクロストリジウム属菌にもレシチナーゼ産生菌が多数存在するが, その性状や病原性についてはほとんど解っていない<sup>16,17</sup>。クロストリジウム属レシチナーゼで一次構造が明らかなのは Cpa<sup>6,13,18</sup> の他は *C. bifermentans* のホスホリパーゼ C (Cbp)<sup>18</sup> と *C. novyi* のタイプ A ホスホリパーゼ C (Cnp)<sup>19</sup> の計3種類だけである。

*C. bifermentans* と *C. sordellii* は生物学的な性状は似ているが, 遺伝学的には別々の菌種である。そして, *C. sordellii* のレシチナーゼはその分子性状が解析されていないクロストリジウム属レシチナーゼの一つでもある。そこで本研究では, *C. sordellii* のレシチナーゼ (Csp) を中心に種々のクロストリジウム属レシチナーゼ遺伝子をクローニングし, 特に Csp については既知のクロストリジウム属レシチナーゼとの構造および酵素活性, 生物活性の比較を行った。

### 材料と方法 :

**使用菌株** レシチナーゼ遺伝子のクローニングには *C. sordellii* NCIB10717 (ATCC 9714), *C.*

*perfringens* KZ 221, *C. bifermentans* KZ 1012 (SJ2) を主に用いた。その他, *C. absonum*, *C. sardiniense* についても金沢大学医学系研究科細菌感染症制御学分野保存株を用いてレシチナーゼ遺伝子のクローニングを試みた。

**PCR** 2種類のプライマー, KAG209 (5' TGGGATGGAAAAGATTGATGGAACAGG 3') および KAG210 (5' TTTCTCTTTTCTTATCCACATATTCTTGATATC 3') は Cbp, Cnp および Cpa の高度保存領域からデザインした。プライマー mF2 (5' GAGCTCGTAAAGTGGCCAAATCTAACGT 3') は pKF3 プラスミド上の配列に相当する。KAG211 (5' CTGCAGTAGATAGTCCAGGTCATGT 3'), KAG212 (5' CCTGTATCTGGGTCAAAGAAATGGTC 3') および KAG213 (5' CTGCAGACAATGAATATGCAGGAA C 3') は各々 *csp* 遺伝子のヌクレオチド 768-792, 545-570 および 1134-1158 の配列に相当する。PCR 反応は, 予備加熱 94°C 1 分後に, 94°C 20 秒-60°C 15 秒-72°C 30 秒を 30 サイクルの条件で行った。

**His-tag 付加レシチナーゼとタンパク精製** His-tag Csp をコードするプラスミドを構築するために, プライマー KAG243 (5' GAGAGGGCCCGCACAAAGGGCTTTTAAGGTATT 3'; 下線はヌクレオチド 220-242 に相当) および KAG244 (5' GAGAGGTACCTAATTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTGTTTATAT CATAAACTTGATTACCTGAAAATAC 3'; 下線はヌクレオチド 1424-1459 に相当) を用いた PCR 増幅産物を, プラスミド pCRII-TOPO の *ApaI*-*KpnI* 部位にライゲーションした。His-tag Cpa と His-tag Cbp をコードするプラスミドは, プライマー KAG245 (5' GAGAGGGCCCAATTAACGGGGGATATAAAAA TGAAAAGAAAGA 3'; 下線は accession No. D32124 のヌクレオチド 147-180 に相当) および KAG246 (5' GAGAGGTACCTAATTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTTATATTATAAGTTGAATTTCTGAAAT CCA 3'; 下線はヌクレオチド 1329-1361 に相当) を用い, *C. perfringens* KZ 221 から増幅した DNA 断片と, プライマー KAG241 (5' GAGAGGGCCCGCAATGCAAGATTAGAGGATATTAG 3'; 下線は accession No. AB061869 のヌクレオチド 1-25 に相当) および KAG242 (5' GAGAGGTACCTAATTAGT GATGGTGATGGTGATGTTTATTTATGTAATAAGTTTCGTTACCTGT 3'; 下線はヌクレオチド 1202-1231 に相当) を用い, *C. bifermentans* KZ1012 から増幅した DNA 断片をそれぞれプラスミド pCRII-TOPO に挿入して作製した。各 His-tag タンパクは, HisTrap カラムおよび Mono Q カラム (アマシャムファルマシア) を用いて精製した。

**酵素的, 生物的活性測定** 卵黄レシチン水解活性測定は, 適宜希釈したサンプルに同量の 10%卵黄溶液を加えて 37°C 3 時間保温した後, 620 nm における濁度 ( $OD_{620}$ ) を測定することにより行った。 $OD_{620}$  値の 1.0 の上昇を, 1 卵黄レシチン水解活性単位とした。溶血活性測定は, 希釈したサンプルに同量の 1% マウス全血 PBS 溶液を加え (終濃度 0.5%) 37°C で 1 時間保温後遠心し, 上清の 540 nm における吸光度 ( $A_{540}$ ) を測定することにより, 0.5%マウス血液を 50%溶血させるレシチナーゼ量を求めた。p-ニトロフェニルフォスホリルコリン (NPPC) 水解活性の測定は既報<sup>5</sup>に従い, サンプルを 1 mL の反応溶液 (20 mM NPPC, 0.25 M Tris-Cl [pH 7.2], 60% glycerol) 中で 35°C 2 時間保温後, 410 nm における吸光度 ( $A_{410}$ ) を測定した。モル吸光係数を  $1.51 \times 10^4$  として生成した p-ニトロフェノール量を計算した。

**ELISA** 免疫したマウスの抗体価は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。ブランクの 2 倍以上の吸光度を示した最大希釈倍数をもって血清サンプルの抗体価とした。

**マウスの免疫** 4 週齢の雄 ddY マウスの皮下に 3 回 (0, 14, 28 日目), 精製レシチナーゼ (2  $\mu$ g/100  $\mu$ L His-tag Csp, 2  $\mu$ g/100  $\mu$ L His-tag Cbp または 0.5  $\mu$ g/100  $\mu$ L His-tag Cpa) を 20  $\mu$ L のアジュバント (キアゲン) とともに接種した。血清サンプルを 7, 14, 21, 28, 31 日目に採取し, ELISA 法で血中抗体価を測定した。35 日目に His-tag Cpa のチャレンジを行った。

**結果:**

**レシチナーゼ遺伝子のクローニング** まず最初に Cbp, Cnp および Cpa のアミノ酸配列を比較し, 保存性の高い領域に PCR プライマー KAG209 および KAG210 を設計した (FIG. 1, 2)。このプライマーセッ

トはレシチナーゼ遺伝子中の約 1 kb の領域を増幅する。さらに open reading frame の全長をクローニングするために、single specific primer PCR<sup>14</sup>を行った (FIG. 1)。FIG. 1 は、*C. sordellii* を代表例として示してある。*C. sordellii* の他、*C. absonum*, *C. sardiniense* についてもレシチナーゼ遺伝子全長のクローニングに成功した。

**一次構造の比較解析** *csp* 遺伝子は 1,197 塩基から成り、399 アミノ酸残基をコードしていた (FIG. 2)。他のクロストリジウム属レシチナーゼとの比較から<sup>3,18</sup>、シグナルペプチドと成熟タンパクは各々 28 残基および 371 残基と推定された。他のレシチナーゼとの比較解析の結果 (FIG. 2, TABLE 1)、アミノ酸配列全体において、Csp は Cpa (53.4%同一性) や Cnp (56.7%) よりも Cbp (77.4%) と特に類似していることが判明した。Csp と Cbp 間の比較では、N 末端側領域と、C 末端側領域の同一性は各々 81.7%および 71.8%であった。4 種類のクロストリジウム属レシチナーゼ間の比較では、N 末端側領域が C 末端側領域よりも相同性が高かった。

**酵素活性および溶血活性** FIG. 3 に精製した His-tag レシチナーゼタンパクの SDS-PAGE 像を示す。また TABLE 2 には、各 His-tag レシチナーゼタンパクの、卵黄レシチン水解活性、溶血活性および NPPC 水解活性を示す。His-tag Cpa は全ての実験において、His-tag Csp または His-tag Cbp よりも高い活性を示した。His-tag Csp および His-tag Cbp の卵黄レシチン水解活性は、各々 His-tag Cpa の 38.2% および 6.1%であった。同様に NPPC 水解活性において、His-tag Csp および His-tag Cbp の活性は His-tag Cpa の各々 7.6%および 2.5%であった。His-tag Cpa は 29.8 ng で 50%溶血活性を示したが、His-tag Csp と His-tag Cbp は 3  $\mu$ g でも 10%以下の溶血活性しか示さなかった。このことは、His-tag Cpa が、His-tag Csp や His-tag Cbp の 100 倍以上の溶血活性を持つことを示していた。

**His-tag レシチナーゼの免疫と His-tag Cpa チャレンジ** His-tag レシチナーゼを免疫したマウスの 31 日目の血中抗体価を FIG. 4 に示す。抗 His-tag Cpa 抗体価と、免疫したタンパク (His-tag Csp または His-tag Cbp) に対する抗体価の間には、特別な関係は認められなかった。免疫したマウスに His-tag Cpa によるチャレンジ (5  $\mu$ g, ip) を行った結果 (FIG. 4)、His-tag Cbp を免疫したマウスの内 5 匹 (n=31) と、His-tag Csp を免疫したマウスの内 2 匹 (n=31) は生き残ったが、統計的な有意差は見られなかった。一方、His-tag Cpa を免疫したマウス (n=6) は全て生存し、何も免疫しなかったコントロールマウス (n=10) は全て死亡した。

#### 考察：

本研究では、Csp は構造的、機能的に、Cpa や Cnp よりも Cbp により類似していることが明らかとなった。Nagahama ら<sup>7-10</sup>および Guillouard ら<sup>2</sup>は Cpa のアミノ酸残基について、W1, H68, H126, H136, H148, E152 が亜鉛分子との結合に、D56 と T74 が酵素活性に、D130 と T272 が構造維持にそれぞれ必須であると報告したが、これらのアミノ酸残基は全て Cbp, Cnp, Csp にも保存されていた (FIG. 2)。このことは、これらのアミノ酸残基がクロストリジウム属レシチナーゼの基本構造や機能の維持において、重要な役割を持っていることを示している。

Cpa の強力な毒性 (溶血毒性や致死毒性) の分子メカニズムを解明するには、有毒および無毒クロストリジウム属レシチナーゼの、構造や機能の比較解析が重要である。結晶解析により、Cpa は柔軟なペプチドリンカーを介する 2 ドメイン構造を持っていることが明らかとなった<sup>11</sup>。N 末端側ドメインは、ホスホリパーゼ C の活性を持っており、C 末端側ドメインは、カルシウム依存性にリン脂質に結合すると考えられている<sup>11,12</sup>。C 末端側ドメインは、スフィンゴミエリナーゼ、溶血、致死活性に必須である<sup>15</sup>。Jepson ら<sup>3</sup>は、Cbp の N 末端側ドメインと、Cpa の C 末端側ドメインからなるハイブリッド毒素を作製した。そのハイブリッド毒素は、Cbp よりも高い溶血、致死活性を有していたが、Cpa ほどではなかった。Cpa のアミノ酸残基、D293, D305, K330 は、細胞膜のリン脂質を認識することで、溶血活性、細胞毒性、筋肉毒性の発現に関与していると考えられていた<sup>20</sup>が、本研究の結果、それらのアミノ酸残基は Csp や

Cbp にも保存されていたため、Cpa の強力な活性には、さらに別のアミノ酸残基が必要であると考えられた。

Alape-Giron ら<sup>1</sup>は Cpa のアミノ酸残基、D269, Y275, Y307, Y331, D336 が毒性に必要であると報告した。また Jepson ら<sup>4</sup>は、Y331 と F334 が必須であると報告している。これら 6 個のアミノ酸残基の中で、Y307 と D336 に相当する残基は Csp, Cbp ともに保存されていた。しかし、D269, Y275, Y331, F334 に相当するアミノ酸残基は、Csp では各々 Y, N, R, I に、Cbp では各々 Y, N, Y, I に置換されていた。また、Cpa の C 末端側ドメインには 3 箇所のカルシウム結合部位が見い出されており、各々 Ca1 (E32, D269, E271, D336, A337), Ca2 (D293, N294, G296, D298), Ca3 (T272, D273, N297, D298) と呼ばれている<sup>12</sup>。本研究の結果、これら 3 つのカルシウム結合部位およびその近傍のアミノ酸残基は、基本的には Csp, Cbp, Cnp ともに保存されており、毒性の違いが、カルシウムを介したリン脂質の認識の違いに起因しているのではないことが示された。

Williamson と Titball<sup>21</sup>は、ペプチド Cpa247-370 (Cpa の C 末端側ドメイン) で免疫したマウスは、LD<sub>100</sub> の 10 倍量以上の精製 Cpa チャレンジや、*C. perfringens* の生菌感染に抵抗することを示した。本研究では、His-tag Cbp や His-tag Csp で免疫したマウスは、His-tag Cpa の毒性を防御することができなかった。これらのことは、Csp や Cbp と、Cpa の C 末端側領域の構造的な違いが、Cpa の致死活性の防御に重要であることを示している。

以上のことから、様々なクロストリジウム属レシチナーゼの比較解析を行うことが、Cpa に致死活性を与えている要因を明らかにし、*C. perfringens* によるガス壊疽に対する、効果的なコンポーネントワクチンを開発するために必須であると考えられた。また、*C. perfringens* 以外のクロストリジウム属菌によって引き起されるガス壊疽の治療法開発にも寄与することができると考えられた。

#### 参考文献：

1. Alape-Giron, A. et al. 2000. Eur. J. Biochem. 267:5191-5197.
2. Guillouard, I., T. Garnier, and S. T. Cole. 1996. Infect. Immun. 64:2440-2444.
3. Jepson M. et al. 1999. Infect. Immun. 67:3297-3301.
4. Jepson M. et al. 2001. FEBS Lett. 495:172-177.
5. Kurioka, S., and M. Matsuda. 1976. Anal. Biochem. 75:281-289.
6. Leslie, D. et al. 1989. Mol. Microbiol. 3:383-392.
7. Nagahama, M. et al. 1995. J. Bacteriol. 177:1179-1185.
8. Nagahama, M., and J. Sakurai. 1996. Immunol. 40:189-193.
9. Nagahama, M. et al. 1997. Infect. Immun. 65:3489-3492.
10. Nagahama, M. et al. 2000. Microbiol. Immunol. 44:585-589.
11. Naylor, C.E. et al. 1998. Nat. Struct. Biol. 5:738-746.
12. Naylor, C. E. et al. 1999. J Mol Biol. 294:757-770.
13. Saint-Joanis, B., T. Garnier, and S. T. Cole. 1989. Mol. Gen. Genet. 219:453-460.
14. Shamala, V., and G. F.-L Ames. 1993. In B. A.White (ed.), Methods in Molecular Biology, 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, p. 339-348. Humana Press Inc., Totowa.
15. Titball, R. W. et al. 1991. Infect. Immun. 59:1872-1874.
16. Titball, R. W., H. Yeoman, and S. E. C. Hunter. 1993. In M. Sebald (ed.), Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria, p. 211-226. Springer-Verlag, New York.
17. Titball, R. W., C. E. Naylor, and A. K. Basak. 1999. Anaerobe 5:51-64.
18. Tso, J. Y., and C. Siebel. 1989. Infect. Immun. 57:468-476.
19. Tsutsui, K. et al. 1995. J Bacteriol. 177:7164-7170.

20. Walker, N. et al. 2000. Arch. Biochem. Biophys. 384:24-30.

21. Williamson, E. D., and R. W. Titball. 1993. Vaccine 11:1253-1258.

TABLE 1. Comparison of amino acid sequences of Csp, Cbp, Cpa, and Cnp<sup>a</sup>

Phospholipase	% Identity (N-terminal domain/C-terminal domain) to:			
	Csp	Cbp	Cpa	Cnp
Csp		77.4 (81.7/71.8)	53.4 (58.1/45.3)	56.7 (59.8/53.9)
Cbp	77.4 (81.7/71.8)		53.0 (57.7/46.2)	54.6 (59.4/48.7)
Cpa	53.4 (58.1/45.3)	53.0 (57.7/46.2)		61.9 (68.7/51.3)
Cnp	56.7 (59.8/53.9)	54.6 (59.4/48.7)	61.9 (68.7/51.3)	

<sup>a</sup> Data for Csp and Cbp are from this study, and data for Cpa and Cnp are from reference 19.

TABLE 2. Enzymatic activities of Cbp, Csp, and Cpa

Phospholipase	egg yolk-phospholipid hydrolysis	NPPC hydrolysis <sup>a</sup>	Dose giving 50%
	(U/mg/min) (% activity relative to Cpa)	(nmol/mg/min) (% activity relative to Cpa)	hemolysis <sup>b</sup> (ng/0.2 ml) (% activity relative to Cpa)
Cbp	7.41 ± 0.13 (6.1)	2.37 ± 1.94 (2.5)	>3,000 (<1)
Cpa	122 ± 0.39 (100)	94.7 ± 2.27 (100)	29.8 (100)
Csp	46.6 ± 13.6 (38.2)	7.16 ± 2.88 (7.6)	>3,000 (<1)

<sup>a</sup> Experiments were carried out at least three times, and the numbers are mean ± standard deviation.

<sup>b</sup> Experiments were carried out at least three times, and the doses which shows 50% hemolysis in the assay were calculated.

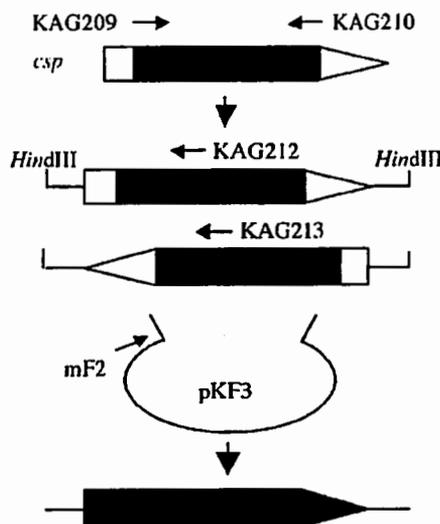


FIG. 1. Schematic presentation of the single specific primer PCR used to clone the *csp* gene. A 1-kb partial fragment of the *csp* gene was amplified from *C. sordellii* NCIB10717 total DNA with KAG209 and KAG210 PCR primers, designed in highly conserved regions among Cbp, Cnp, and Cpa. Using a *Hind*III DNA library of *C. sordellii* NCIB10717 as a template, PCR was conducted with mF2, located on pKF3, and with KAG212 or KAG213, located on the known 1-kb fragment. Nucleotide sequences of the upstream, the known 1-kb, and the downstream DNA fragments showed an open reading frame of Csp. The thick arrowed line depicts the *csp* gene. The filled and open areas indicate nucleotide sequence-determined (known) and -non-determined (unknown) regions, respectively.

