

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
古武 彌 嗣	主査 教授 勝 岡 洋 治
	主査 教授 林 秀 行
	副査 教授 佐 野 浩 一
	副査 教授 朝 日 通 雄
	副査 教授 古 谷 榮 助
主論文題名 Substrate Recognition Mechanism of the Peptidase Domain of the Quorum-Sensing-Signal-Producing ABC Transporter ComA from <i>Streptococcus</i> (ストレプトコッカスの細胞間情報伝達システムにおけるシグナル分子産生酵素の基質認識メカニズムの解析)	
学位論文内容の要旨	
《研究目的》 現在、難治感染症の原因としてバイオフィーム(多糖類で覆われた細菌の集合体)の形成が注目されている。例えば、常在菌である口腔内 <i>Streptococcus</i> 属細菌が歯肉溝から血管内に侵入すると、心臓の弁にバイオフィームを形成し、心内膜炎や人工弁感染症といった難治性感染症を引き起こす。また <i>S. pneumoniae</i> は髄膜炎や中耳炎、抗癌化学療法施行等の免疫能低下時の肺炎の起炎菌となるが、この際にも病巣でのバイオフィーム形成が起こっている。一方、尿路系では大腸菌や緑膿菌といったグラム陰性菌が感染起炎菌となることが多く、特に尿道カテーテルや尿管ステントなどの長期留置例ではこれらの菌によりバイオフィームが形成され、難治性尿路感染症を発症させる。細菌がバイオフィームを形成すると抗生物質や白血球の浸透・拡散に対して耐性を示すようになる。そこでこれらの難治性感染症に対してはバイオフィーム形成阻害を目的とした創薬が必要となってくる。 <i>Streptococcus</i> 属細菌では quorum-sensing system (QSS) という細胞間情報伝達系がバイオフィーム形成開始に重要であることがわかっている。QSS の初発段階で機能する ComA は基質分子 ComC を切断するシグナルペプチダーゼドメインと、生成したシグナルペプチドを菌体外へ輸送する ABC トランスポータードメインを併せ持つことにより、シグナルペプチドの産生をつかさどる鍵となるタンパク質である。したがってこの ComA、特にそのペプチダーゼドメイン(以下 PEP)がバイオフィーム形成阻害薬のターゲットに最適であると考えられる。 現在までに、QSS の全般に関して細菌学的・遺伝学的に最も詳細に調べられている <i>S. pneumoniae</i> について、ComA の PEP と ComC を安定かつ大量に発現・精製させ、生化学的解析を行ってきた。しかし、 <i>Streptococcus</i> 属細菌に対して広域に作用し、あるいは一部の <i>Streptococcus</i> 属細菌に対して選択的に作用する阻害薬開発のためには、各種 <i>Streptococcus</i> 属細菌の PEP の詳細な基質認識機構を解明することが必要である。本研究では <i>S. pneumoniae</i> を含め数種の <i>Streptococcus</i> 属細菌の PEP について基質認識機構を中心とした系統的な機能解析を行った。	

《方法と結果》

これまでに解析した *S. pneumoniae* の PEP (PPEP) に加え *S. mitis* (MiPEP)、*S. oralis* (OPEP)、*S. mutans* (MuPEP1 と MuPEP2 の 2 種類)、*S. thermophilus* (TPEP) の計 6 種類の PEP を発現・精製し、それぞれの酵素学的性質を比較した。また ComC も *S. pneumoniae* の ComC (PComC) に加えて *S. cristatus* (CComC)、*S. gordonii* (G1ComC と G3ComC の 2 種類) 由来の ComC 計 4 種類を発現・精製し、実験に用いた。

24 種類の PEP-ComC の組み合わせで酵素反応を行ったところ、いずれにおいても ComC が Gly-Gly 配列の C 末側で特異的に切断されていた。さらにそれぞれの ComC に対する活性の傾向が異なっていた PPEP と MuPEP1 の PComC、CComC、G1ComC に対する酵素反応の速度論的パラメーターを求めたところ、活性が低かったものも含め、全ての組み合わせで、PEP は ComC に対して高い親和性を示した。これらの結果から *Streptococcus* 属細菌の PEP に共通の基質認識機構の存在が示唆された。

この機構を解明するために、まず *Streptococcus* 属細菌の ComC のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、切断部位の N 末側に保存性残基が多いことが明らかになった。そこで高度に保存されている残基 (Phe-15、Leu-12、Leu-7、Ile-4)、ある程度保存がみられた残基 (Glu+1、Arg+3)、保存性のない残基 (Val-14、Gln-6、Lys-3) を Ala に改変した変異型 ComC をそれぞれ作製し、PPEP を用いて活性測定を行った。その結果として Phe-15Ala、Leu-12Ala、Leu-7Ala、Ile-4Ala で著しい活性の低下が認められたことから、これまでに明らかになっている基質切断部位近傍の Gly-Gly 配列だけでなく、これら 4 つの高度に保存された疎水性残基も PEP による基質認識に重要であることが判明した。

次に、円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定すると、ComC は水溶液中ではランダムな構造であるが、 α -ヘリックス形成促進溶媒であるトリフルオロエタノールを加えると α -ヘリックスを形成し、ComC が α -ヘリックス形成能力を有していることが判明した。さらに、PEP 共存下での ComC の CD スペクトルを測定したところ ComC は α -ヘリックスを形成していた。この事実から、ComC は単独ではランダムな構造であるが、PEP に結合するとその N 末領域が α -ヘリックス構造を形成することが明白になった。

《結 語》

以上の結果から、PEP の基質 ComC は通常はランダムな構造を取っているが、PEP に結合すると N 末領域が α -ヘリックス構造を形成し、さらに Phe-15、Leu-12、Leu-7、Ile-4 が α -ヘリックスの片側に位置することによって両親媒性 α -ヘリックスを形成することが示された。また PEP は、単にこの α -ヘリックス上の疎水面を結合するのではなく、これら 4 つの保存された残基の構造を認識していることが明らかとなった。以上より PEP の基質認識機構と PEP に結合した ComC の取る構造が明確となり、PEP の阻害薬開発のための基盤となる情報が得られた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	古 武 彌 嗣
論文審査担当者		主 査 教 授 勝 岡 洋 治	
		主 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 佐 野 浩 一	
		副 査 教 授 朝 日 通 雄	
		副 査 教 授 古 谷 榮 助	
主論文題名 Substrate Recognition Mechanism of the Peptidase Domain of the Quorum-Sensing-Signal-Producing ABC Transporter ComA from <i>Streptococcus</i> (ストレプトコッカスの細胞間情報伝達システムにおけるシグナル分子産生酵素の基質認識メカニズムの解析)			
論文審査結果の要旨			
<p>現在、医療の各方面において難治感染症の原因としてバイオフィーム形成が注目されている。細菌がバイオフィームを形成すると抗生物質や白血球の浸透・拡散に対して耐性を示すようになる。そこでバイオフィーム形成を阻止する薬剤の開発が重要な課題となっている。申請者はバイオフィーム形成を行う重要な菌として <i>Streptococcus</i> 属細菌を題材に選び、そのバイオフィーム形成開始において主要な役割を果たしている quorum-sensing system (QSS) に注目した。QSS の初発段階で機能する ComA 分子のペプチダーゼドメイン (PEP) に対する阻害薬は QSS を阻害することによりバイオフィーム形成を阻止することが期待される。ただしこのような阻害薬を開発するためには、PEP の活性部位において基質分子がどのように結合しているかを明らかにすることが必要である。この観点から申請者は <i>Streptococcus</i> の PEP が基質 ComC 分子を認識する機構を各種 <i>Streptococcus</i> 属細菌について系統的に解析し、PEP の基質認識機構を詳細に調べた。</p> <p>申請者は 6 種の PEP と 4 種の ComC の計 24 通りの組合せの酵素反応を調べ、いずれにおいても ComC が Gly-Gly 配列の C 末端側で特異的に切断されていること、および切断部位の N 末端側の配列が基質認識に重要であることを明らかにした。さらに申請者は ComC 切断部位の N 末端側配列の意義を調べる目的で部位特異的変異や分光学的な解析を行った。その結果、ComC の N 末端側は通常ランダムな構造を取っているが、ヘリックスを形成することで PEP に結合し、その際、高度に保存された 4 つの疎水性残基がヘリックスの片側に集まって PEP 活性部位に特異的に結合することを明らかにした。</p> <p>申請者の研究は <i>Streptococcus</i> 属細菌の PEP が基質 ComC 分子を認識する機構を明らかにしたものであり、<i>Streptococcus</i> 属細菌に限らずグラム陽性細菌の QSS の初めての生化学的な詳細な解析である。ここで得られた知見はバイオフィーム形成阻止を目指した創薬に重要な情報を提供するものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌) Biochemistry 47(8): 2531-2538, 2008			