

論文題名

黄色ブドウ球菌が産生する36-kDa 溶菌酵素についての研究

学位申請者 二宮 嘉昭

原著

原稿総ページ数 44

図 17

表 7

別刷数 50

連絡先 二宮 嘉昭

(所属) 広島大学歯学部口腔細菌学講座

電話 082 (257) 5637 内線3153

黄色ブドウ球菌が産生する 36-kDa 溶菌酵素
についての研究

二宮 嘉昭

Studies of 36-kDa bacteriolytic enzyme produced by
Staphylococcus aureus

Yoshiaki Ninomiya

(平成 11 年 1 月 21 日 受付)

緒言

黄色ブドウ球菌はヒトの鼻腔、皮膚、口腔などに常在し、化膿性疾患の最も重要な起炎菌である。近年、ペニシリン系抗生物質の 1 つであるメチシリン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。また、口腔にお

いても顎骨骨髓炎及び膿瘍の多くは黄色ブドウ球菌により起こると言われており、本菌の病原性及び抗生物質抵抗性のメカニズムを解明することは極めて重要であると考えられる。細菌細胞表層の細胞壁は、細菌の形と大きさを決定して、その菌固有の形態を維持し、細胞質を保護する役割を担っている。グラム陽性菌の細胞壁は大部分がペプチドグリカンと呼ばれる網目構造によって構成されており、タイコ酸、タンパクなども細胞壁成分として存在している。一般に黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンは、*N*-acetylglucosamine と *N*-acetyl-muramic 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 からテトラペプチド (L-alanyl-D-glutamyl-L-lysyl-D-alanine) からなるペプチド鎖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 ϵ -NH₂ 基と隣り合うテトラペプチドの D-alanine の COOH 基末端との間を glycine ペンタペプチドがペプチド結合して架橋しており、その架橋

度は 90 % 程度である。このように複雑な構造を持つペプチドグリカンには、絶えずその合成と分解が行われている。ペプチドグリカン合成については、数多くの研究がなされ、現在までに合成経路はほとんど解明されている。一方、ペプチドグリカンの分解については、細菌自身がこのペプチドグリカンの特異的に加水分解する酵素を産生していることが指摘され^{10,30,36)}、*Staphylococci*^{10,18,24,44)}、*Streptococci*^{3,5)}、*Bacilli*²⁶⁾、*Lactobacilli*⁴⁾、*Escherichia coli*⁴⁷⁾等様々な菌種からペプチドグリカン加水分解酵素（細胞壁分解酵素）が分離、精製されている。細胞壁分解酵素は、ブドウ球菌の場合、その作用点により4つに分けられる。即ち、endo- β -N-acetylmuraminidase^{4,30)}、endo- β -N-acetylglucosaminidase (GL)⁴⁷⁾、N-acetylmuramyl-L-alanine amidase (AM)³³⁾及び endopeptidase⁴³⁾であり、これらの酵素の多くは、細菌の伸長^{6,44)}、分裂²⁹⁾、分離¹⁵⁾、細胞壁の代謝^{8,17,47)}などの様々な生理作用に関与している^{1,9,23,31,32,46)}。黄色ドウ球菌を

含め種々の細菌感染症の治療にはしばしばβ-ラクタム系抗生物質が用いられている。この系の抗生物質は細胞壁合成の最終過程であるペプチドグリカン架橋形成反応を阻害する。この反応が阻害されると、菌が溶菌し、殺菌的に働くといわれている。溶菌酵素はこの溶菌の過程にも関与していると考えられている^{19,25)}。また菌の自己溶解にも溶菌酵素が関与し、このような酵素は自己溶解酵素と呼ばれている⁴⁶⁾。従って、細菌の産生する溶菌酵素についての研究⁴⁶⁾は、抗生物質の殺菌作用のメカニズムを解明する上でも非常に重要であると考えられる。黄色ブドウ球菌が有する溶菌酵素であるGLはN-acetylglucosamineとN-acetylmuramic acidの間のβ-1、4グリコシド結合を切断してN-acetylglucosamine由来の還元基を遊離し、AMはN-acetylmuramic acidとL-alanineの間のアミド結合を切断し⁷⁾、glycylglycine endopeptidaseはpentaglycine架橋glycine間を切断する。Sugaiらは黄色ブドウ球菌の培養上清から溶菌酵素を分離、精製して

いる^{39,40)}。この酵素は、分子量 51-kDa の GL と 62-kDa の AM であり、両酵素は溶菌活性を有すると共に、菌体クラスターを分散させる活性をも有していると示唆している。また、Oshida らは黄色ブドウ球菌から自己溶解酵素遺伝子 *atl* のクローニングを報告している²²⁾。得られた遺伝子の解析、ならびに既に精製されている培養上清中の 51-kDa GL 及び 62-kDa AM の N 末端アミノ酸配列、分子量及びアミノ酸組成の結果から、*atl* 遺伝子は GL 及び AM の 2 つのドメインを有していること、また、*atl* 遺伝子より産生されるタンパク ATL は GL 及び AM の 2 つのドメインを有した前駆体として産生され、後にプロセッシングを受け、51-kDa GL 及び 62-kDa AM となって培養上清中に放出されることなどが示唆されている¹¹⁾。溶菌酵素を菌体を含有した SDS - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ゲルをバッファーで洗いゲル内で変性していた溶菌酵素の活性を回復させると、溶菌酵素が近傍の菌

体を溶かすことによって、サンプル中の溶菌酵素を検出することができる^{2,14)}。 *S. aureus* 菌体抽出画分を分析すると、基質として *Micrococcus luteus* や *S. aureus* 菌体を用いた場合、通常複数の溶菌バンドが認められた。 *atl* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されて不活化された変異株 RUSAL2 菌体抽出画分を同様の方法で分析すると、親株に認められるほとんどの溶菌バンドが消え、 *S. aureus* を基質とした Zymogram 上の 36-kDa 付近に 1 本の溶菌バンドが認められた。このバンドは *M. luteus* を基質とした場合には認められなかった。このことから、36-kDa 溶菌バンドは *atl* 遺伝子に由来しない *S. aureus* 菌体を溶かす溶菌酵素によるものと考えられた。そこで本研究では 36-kDa 溶菌酵素を精製し、その性状について検討することを目的とした。

材料及び方法

I . 使用菌株及びプラスミド

使用菌株及びプラスミドは表 1 に示す。

II . 菌の培養

ブドウ球菌の培養には Trypticase Soy (TS) 液体培地 (Becton Dickinson , Cockeysville , MD , USA) を用い、大腸菌の培養には Luria-Bertani (LB) 液体培地を用い、37 °C で振とう培養を行った。必要に応じてクロラムフェニコール (30 μ g / ml) を添加して培養した。

III . 粗画分の調整

上清硫酸沈殿画分：培養上清に 80 % 飽和となるように硫酸を加え 12 h 、 4 °C で攪拌後、遠心 (8,000 rpm x 10 min , 4 °C) し、沈さを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で溶解透析したものを上清硫酸沈殿画分とした。LiCl 菌体抽出画分：培養液より集菌した菌体を PBS にて 2 回洗浄し、3 M LiCl (1 ml / 湿菌体 1 g) を加えて、懸濁し、氷温中で 15 分間放置後、遠

心 (9,000 rpm x 10 min , 4 °C) 後に得られた上清を LiCl 菌体菌体抽出画分とした。

IV . Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS - PAGE) 、 Immunoblotting 、 Zymography 、 N 末端アミノ酸分析法

SDS-PAGE は Laemmli の方法¹²⁾に準じ、12% ポリアクリルアミドを用いて行った。蛋白は 0.04% クーマシー染色あるいは銀染色 (第一化学薬品 , 東京) にて検出した。Western blotting はミニトランスブロット (Bio-Rad Laboratories , Richmond , CA , USA) を用いて行い¹³⁾、検出には酵素抗体法を用いた。一次抗血清による処理として、Phosphate buffered saline (PBS) にて 20,000 倍希釈した家兎血清を 37 °C で 1 時間反応させた。コントロールとしては免疫前家兎血清を用いた。PBS による洗浄後、二次抗体として PBS にて 5,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Life Science Co . , Buckinghamshire , UK) を 37 °C 、 1 時間反応させた。発色は Enhanced

Luminol Reagent (NEN Life Science Products , Inc ., Boston , MA , USA) を用いて行った。Zymography は、*Lactobacillus plantarum*、*M. luteus* あるいは *S. aureus* を 4 % SDS 処理した加熱死菌を用い、この菌体を封入したゲル (12 % ポリアクリルアミドゲル、0.5 mg 乾燥菌体 / ml) (菌体封入ゲル) を用いて SDS-PAGE 後、ゲルを取り出し、30 分間水洗した。その後、37 °C で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に浸漬しインキュベート後、間接光を用いて観察し、封入菌体の溶解による溶菌バンドを観察した。N 末端アミノ酸分析は精製蛋白を、12 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にかき、PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories , Richmond , CA , USA) に 10 °C で 65 分間、電氣的に転写した。PVDF 膜上の蛋白をクーマシー染色して 36-kDa 溶菌酵素蛋白のバンドを切り出し、ペプチドシーケンサー (PSQ2 システム、島津製作所、東京) にて N 末端アミノ酸配列を決定した。

V . 調整用電気泳動

調整用電気泳動はディスクプレパレティブ電気泳動装置（日本エイドー，東京）（濃縮ゲル 8 ml，分離ゲル 42 ml（濃縮ゲル，分離ゲルはそれぞれ 4%，12% ポリアクリルアミドゲルを用いた））を用いて、サンプルを 100V constant（40-50 mA）の条件で 4 時間通電し、キャピラリーチューブに接続してあるシリコンチューブより滴下する溶出液を 0.3 ml/フラクション（10 滴）ずつフラクションコレクターで回収した。

VI. 遺伝子操作法

染色体 DNA の調整、プラスミドの精製、制限酵素、ligation は既法に従って行った^{28,35,40}。

1. PCR

PCR を用いた DNA の増幅は Gene Amp PCR System 2400（Perkin-Elmer，Chiba，Japan）を用い、PCR 反応はエキスパンドハイファイ PCR システム（ベリンガー・マンハイム，東京）を用いて行った。プライマーは Greiner Japan Co.（東京）によって供給された（表 2）。PCR 産物は pGEM-T

Easy に挿入し、*E. coli* でクローニングした。

2. 形質転換

形質転換には Electroporation System (BTX , San Diego , CA , USA) を用いた。*E. coli* の場合は R 5 、 2 kV 、 *S. aureus* の場合は R 4 、 2.2 V の条件で行った。

3. 形質導入

(1) RUSAL2 のファージ溶解液の調整
バクテリオファージ 80 α を RUSAL2 に感染させ、調整を行った。37 $^{\circ}$ C で一夜培養した RUSAL2 の培養液 10 ml を遠心 (9,000 rpm x 10 min , 4 $^{\circ}$ C) した後、1 ml の TSB で懸濁し、菌液 100 μ l とバクテリオファージ 80 α 60 μ l と 3 ml の溶解した phage top agar (表 3) を混合し、あらかじめ作成しておいた 20 ml の phage bottom agar (表 3) 上にまき、24 時間 37 $^{\circ}$ C で培養した。その後 phage top agar のみをかきとり、2 ml の phage buffer (表 3) を加え、1 時間 4 $^{\circ}$ C で静置し、遠心 (3,500 rpm x 20 min , 4 $^{\circ}$ C) した後、上清を 0.2 μ m のセルロースメンブレンにて

ろ過した溶液を phage lysate とした。

(2) 形質導入

37 °C で一夜培養した Smith5R の培養液 10 ml を遠心 (9,000 rpm x 10 min , 4 °C) した後、1 ml の TSB で懸濁し、菌液 100 μ l と RUSAL2 の 80 μ l と phage buffer 100 μ l を混合し、20 min 、37 °C で振とうした。その後、溶解した 0.3 GL top agar を 3 ml 加え、あらかじめ作成しておいた 2 層の 0.3 GL bottom agar (下層 : erythromycin (EM) 30 μ g / ml を添加した 0.3 GL bottom agar 10 ml 上層 : 薬剤を添加してない 0.3 GL bottom agar 20 ml) にまき、48 時間 37 °C で培養した。増殖したコロニーを TS 寒天培地上にまき、増殖したコロニーを採取した。

VII . GST-融合蛋白の発現および精製

組み換えプラスミドをもつ *E. coli* は 500 ml の LB 培地で 37 °C にて培養し、660 nm の吸光度が 0.7 ~ 0.8 で最終濃度が 0.1 mM になるように isopropyl- β - D (-) -thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、37 °C 、5 h 培養した。遠心 (8,000 rpm x

15 min , 4 °C) 後、菌体を 0.1 M acetate buffer (pH 8.0)、1 mM ZnSO₄ で懸濁し、超音波 (Ultrasonic disruptor , TOMY , 東京) をかけた。遠心 (19,500 rpm x 30 min , 4 °C) 後の上清を Glutathione Sepharose 4B 1 ml にかき 0.1 M acetate buffer (pH 8.0)、1 mM ZnSO₄ で 10 ml 洗い、0.1 M acetate buffer (pH 8.0)、1 mM ZnSO₄、10 mM glutathione (Reduced form) で溶出した。精製 GST 融合タンパクは室温で 0.1 M acetate buffer (pH 8.0) にて 4 時間透析後、thrombin (0.8 U / μl) を加え一夜、20 °C で静置して消化した。thrombin 消化産物はディスクレパラティブ電気泳動法を用いて分画し、精製した。

VIII . 抗血清の作成

抗原に用いる蛋白は 12 % ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 後、クーマシー染色を行った。ゲル中の染色された蛋白を切り出し AE6580 マックスイールド NP 電気泳動式タンパク質回収装置 (ATTO , 東京 , 100V , 3h) を用いて抽出した。Adjuvant complete freund (DIFCO

Laboratories , Detroit , MI , USA) によりエマルジョン化 (200 μ g of protein / ml) し、1 ml を日本白色ウサギ (体重 2 kg) の皮内、皮下及び筋肉に注射した。その後、14 日おきに上記の方法で精製した蛋白を Adjuvant complete freund (DIFCO) によりエマルジョン化し、同様に投与した。56 日後、抗原 (200 μ g of protein / ml) を静脈内投与し、その3 日後に採血して抗血清を得た。免疫沈降反応は被験溶液中の SDS 濃度が 0.1 % 以下となるように PBS で希釈し、血清を添加、室温で 30 min 放置した。ProteinA - Sepharose 10 μ l (Pharmacia Biotech , Uppsar , Sweden) を加え室温で 30 min 放置し、遠心 (12,000 rpm x 10 min , 4 $^{\circ}$ C) 後、沈さを3 回洗った。その沈さに lysing buffer 10 μ l (精製水 4 ml , 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1 ml , Glycerol 0.8 ml , 10 % SDS 1.6 ml , 0.1 % BPB 0.2 ml) を加え *S. aureus* 加熱死菌を用いた Zymography を行った。

IX . *S. aureus* 菌体を用いた蛋白の精製

1. epr 菌体の調整

lysostaphin に耐性の遺伝子 *epr*⁴⁰⁾ をコードしたプラスミドを持った株 TF8 を 4 % SDS で 100 °C、30 min 加熱処理し、その後 PBS (2 ml / g) で 3 回洗った菌体 (以下 *epr* 菌体) を用いた。

2. 菌体を用いた精製²⁷⁾

S. aureus 培養上清に *epr* 菌体を加え (8 g / 6 l) 4 °C で 12 h 攪拌後、遠心 (8,000 rpm x 10 min , 4 °C) し、*epr* 菌体の表層に結合した蛋白を 3 M LiCl 8 ml で抽出し、Centriprep-10 (Amicon No.4304) を用いて濃縮した。その濃縮画分 (*epr* 菌体 LiCl 画分) を用いてディスクプレパレティブ電気泳動を行った。溶菌酵素の検出は菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いた Zymography を行った。

X. 36-kDa 溶菌酵素活性に及ぼす種々の因子の影響³⁷⁾

精製 36-kDa 溶菌酵素を菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いて SDS-PAGE 後、renaturation buffer に種々の因子を添加し、10 h インキュベート後の 36-kDa 溶菌バンドの濃さを、コントロールと

比較した。種々の因子としては次のようなものを用いた。NaCl (100 mM) 、 KCl (100 mM) 、 Ca²⁺ (10 mM) 、 Mg²⁺ (10 mM) 、 Mn²⁺ (10 mM) 、 Ba²⁺ (10 mM) 、 Hg²⁺ (10 mM) 、 Iodoacetic acid (10 mM) 、 EDTA (10 mM) 。

XI . 種々の溶菌酵素画分の調整

RUSAL2 株を対数増殖期中期まで培養した培養液 40 ml から、以下の方法で溶菌酵素画分を調整した。Triton 菌体抽出画分：培養液より集菌した菌体を PBS にて 2 回洗浄し、1 % TritonX-100 1 ml / 湿菌体 1 g を加えて、懸濁し、遠心 (9,000 rpm x 10 min , 4 °C) 後に得られた上清を Triton 菌体抽出画分とした。urea 菌体抽出画分：上記と同様の方法で 8 M urea を用いて抽出した画分を urea 菌体抽出画分とした。塩酸グアニジン菌体抽出画分：上記と同様の方法で 8 M 塩酸グアニジンを用いて抽出した画分を塩酸グアニジン菌体抽出画分とした。LiCl 菌体抽出画分：培養液より集菌した菌体を PBS にて 2 回洗浄し、3 M LiCl を加え、懸

濁し、氷温中で15分間放置後、遠心（9,000 rpm x 10 min , 4 °C）で得られた上清をLiCl菌体抽出画分とした。SDS菌体抽出画分：LiCl処理した菌体をPBSにて2回洗浄し、4% SDSを加え、懸濁し、室温で30分間放置後、遠心（9,000 rpm x 10 min , 4 °C）後に得られた上清をSDS菌体抽出画分とした。菌体抽出画分：培養液より集菌した菌体をPBSにて2回洗浄し、10 mM リン酸緩衝液を加え30秒間隔で30秒間6回超音波（Ultrasonic disruptor , TOMY , 東京）処理を行い、遠心（9,000 rpm x 10 min , 4 °C）後に得られた上清を菌体抽出画分とした。

trypsin 処理菌体抽出画分：培養液より集菌した菌体をPBSにて2回洗浄し、trypsin 300 μ l（100 μ g / ml PBS）を加え、37 °Cで30分振とうした。遠心（9,000 rpm x 10 min , 4 °C）後、菌体をPBSにて2回洗浄し、1% SDSを加え、懸濁し、室温で10分間放置した。遠心（9,000 rpm x 10 min , 4 °C）後に得られた上清をtrypsin 処理菌体抽出画分とした。

XII . 最 小 溶 菌 酵 素 量 (MBD) の 測 定

MBD 値 の 測 定 は Komatsuzawa ら の 方 法 ²⁰⁾ に 従 っ た 。 加 熱 死 菌 を 封 入 し た ポ リ ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル (0.5 mg 乾 燥 菌 体 / ml) の 各 レ ー ン に 2 倍 系 列 希 釈 し た 溶 菌 酵 素 を 添 加 し 、 SDS-PAGE 後 、 純 水 で 30 分 洗 い 、 0.1 M リ ン 酸 緩 衝 液 (pH 6.8) で 37 ℃ 、 10 h イ ン キ ュ ベ ー ト す る 。 そ の 後 、 ゲ ル 中 の 溶 菌 活 性 を 視 覚 で 判 断 出 来 る 最 小 の 溶 菌 酵 素 量 (MBD) を 測 定 し た ¹⁹⁾ 。

結 果

I . 36-kDa 溶 菌 酵 素 と LytM 蛋 白 と の 相 同 性

溶 菌 酵 素 を 菌 体 を 含 有 し た SDS - ポ リ ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル で 電 気 泳 動 し た 後 に 、 ゲ ル を バ ッ フ ァ ー で 洗 い 、 ゲ ル 内 で 溶 菌 酵 素 の 活 性 を 回 復 さ せ る と 、 近 傍 の 菌 体 を 溶 か す こ と に よ っ て 、 サ ン プ ル 中 の 溶 菌 酵 素 を 検 出 す る こ

とが出来る³⁷⁾。 *S. aureus* RN450 の SDS 画分で、ATL はプロセッシングを受けて Zymogram 上では多数の溶菌バンドとして認められた (図 1)。*atl* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されて不活化された変異株 RUSAL2 では、ほとんどの溶菌バンドが消えた。しかしながら *S. aureus* を基質とした Zymogram 上の 36-kDa 付近に 1 本の溶菌バンドが認められた。このバンドは *M. luteus* を基質とした場合には認められなかった。最近、Ramadurai¹³⁾ が、*S. aureus* *lytM* 株の遺伝子ライブラリーから、*lytM* のクローニング、ならびに性状の検討を行った。LytM 蛋白の推定分子量は 34.4-kDa で、大腸菌で発現させた蛋白は *S. aureus* に対して溶菌活性を示し、*M. luteus* に対しては溶菌活性を示さない。従って LytM 蛋白と 36-kDa 溶菌酵素は非常によく似ている蛋白であると考えられた。そこでまず使用菌株が *lytM* 遺伝子産物を有するかどうかについて検討した。*lytM* の塩基配列をもとにプライマーを設計し (表 2)、*S. aureus* RN450、209P の

染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。対象として pLytM (*lytM* 遺伝子を持ったプラスミド) を鋳型として PCR を行った。その結果、RN450 及び 209P に予想される 890 bp の PCR 産物が産生された (図 2) 。このことから、これらの菌体も *lytM* 遺伝子を保有することが示唆された。LytM 蛋白に対する血清を作成する目的で GST-LytM 融合蛋白の発現、精製を試みた。プライマー 1、2 を用いて作成した DNA 断片を pGEM-T Easy Vector にクローニング後、*EcoRI*、*BamHI* で切断を行い断片を pGEX2 Vector に挿入し pGST-LytM を構築した (図 3) 。得られたプラスミド pGST-LytM で *E. coli* を形質転換した株 YN004 を得て GST-LytM 融合蛋白の調整に用いた。*S. aureus* を用いた Zymography の結果、GST-LytM に *S. aureus* 溶菌活性を認めたが、その活性は極めて弱く、thrombin 切断後の LytM 蛋白には活性はほとんど認められなかった (図 4) 。精製 LytM 蛋白を用いて家兎を免疫し、抗 LytM 血清を得た。菌体を基質として用いる Zymography

は、溶菌酵素の活性を指標として、酵素を検出する方法で、検出感度が極めて高い。LytM 蛋白が *S. aureus* で発現していても Immunoblotting で検出出来ない可能性も考えられた。そこで、LytM 蛋白を融合蛋白の形で *S. aureus* で発現させることを試みた。プライマー 2、3 を用いて作成した *lytM* 遺伝子、プライマー 4、5 を用いて作成した *epr* 遺伝子、*ale-1* の一部の遺伝子をそれぞれ pGEM-T Easy Vector (Promega , Madison , WI , USA) に挿入し *EcoRI*、*PstI* で切断後、ligation した後 *EcoRI* で切断し、pGC2³⁴⁾ に ligation して組み換えプラスミド pALytM を構築した (図 5)。得られたプラスミド pALytM で YN001 を形質転換して作成した株 YN002 とその親株の 3 M LiCl 抽出画分の溶菌活性を *S. aureus* を用いた Zymography で比較検討したところ、YN002 に強い 36-kDa 溶菌活性の亢進が認められた (図 6)。この溶菌活性の亢進が *lytM* 遺伝子に由来するものかどうかを調べるために、抗 LytM 血清を用いた Immunoblotting を行った。抗

LytM 血清を用いた Immunoblotting では、予想に反して YN001、YN002 両株の 3 M LiCl 抽出画分に LytM 蛋白は認められなかった（図 7）。LiCl 画分の 45-kDa 付近に血清と反応するバンドが認められるが、これは電気泳動度ならびにコントロール血清を用いた場合にも認められることから Protein A であると考えられた。従って YN002 の 36-kDa 溶菌活性の増強は LytM 蛋白の発現増強によるものではないと考えられた。さらに相同性組み換えによって作成した *lytM* 遺伝子破壊株及びその親株から 4 % SDS によって抽出した画分の *S. aureus* を用いた Zymography の結果、*lytM* 遺伝子破壊株においても 36-kDa 溶菌活性が認められた（図 8）。以上の結果から、36-kDa 溶菌酵素は LytM 蛋白とは異なる蛋白であることが示された。

II . 36-kDa 溶菌酵素の精製

YN002 は菌体の LiCl 画分に 36-kDa 溶菌酵素活性が亢進していたが、培養上清中にも 36-kDa 溶菌酵素を分泌している事を見出した。

そこで培養上清を用いて 36-kDa 溶菌酵素の精製を試みた。*S. simulans* bv. *staphylolyticus* の培養上清に lysostaphin に耐性の *S. aureus* 変異株を加え、その菌体を 3 M チオシアン酸カリウムで処理することにより、酵素の基質親和性を利用して lysostaphin を精製することが出来るという報告がある²⁵⁾。そこでこの方法を応用することにより *S. capitis* EPK-1、*S. simulans* bv. *taphylolyticus* が産生する glycyglycine endopeptidase の精製を試みた。*S. capitis* EPK-1 が有する遺伝子 *epr* は、ペプチドグリカン架橋に serine を挿入することにより、*S. capitis* EPK-1 を lysostaphin に耐性化していることが知られている³⁶⁾。*epr* を多コピーベクターに持つ *S. aureus* は lysostaphin に高度耐性となる。lysostaphin 耐性の菌株として *epr* 菌体を用い、*S. capitis*、*S. simulans* の培養上清に菌体 (4 g / l) を加え、その菌体を 3 M LiCl 4 ml で処理した。菌体懸濁の上清を *S. aureus* を用いた Zymography で検討した結果、それぞれ *S. capitis* EPK-1、*S. simulans* bv. *staphylolyticus* の産生する glycyglycine

endopeptidase が効率よく精製されることが明らかとなった（図 9，表 4）。そこでこの方法を用いて YN002 培養上清に epr 菌体（8 g / 6 l）を加え、その菌体を 3 M LiCl 8 ml で処理し、その濃縮画分（epr 菌体 LiCl 画分）を用いてディスクプレパレティブ電気泳動を行うことにより 36-kDa 溶菌酵素を精製した（図 10，表 5）。精製した酵素は Zymogram 上でおよそ 36-kDa の分子量を示す。そこで精製蛋白を用いて通常の SDS-PAGE を行い、精製蛋白の分子量を推定した。36-kDa 溶菌酵素の分子量は 36,000 であった（図 11）。この 36-kDa 溶菌酵素を抗原として家兎に免疫し抗血清を得た。抗 36-kDa 溶菌酵素血清を用いた Immunoblotting の結果、1 本のバンドが認められたが、コントロール血清では認められなかった（図 12）。また、YN001 と YN002 の 3 M LiCl 抽出画分での *S. aureus* を用いた Zymogram、抗 36-kDa 溶菌酵素血清を用いた Immunoblotting の結果を比較検討したところ、前述したように YN002 の LiCl 画分に強い 36-kDa 溶

菌活性が見られるのに比例して、Immunoblotting においても YN002 の LiCl 画分に 36-kDa 蛋白の強い反応が見られた（図 13）。次に、RUSAL2、YN002 の 4% SDS 抽出画分中の 36-kDa 溶菌酵素を抗 36-kDa 溶菌酵素血清を用いて免疫沈降出来るかどうかについて検討した。反応液中の血清濃度を変えて免疫沈降反応を行い、免疫沈降物を Zymography で解析した結果、免疫反応物中に 36-kDa 溶菌バンドが認められた（図 14）。従ってこの抗血清は 36-kDa 溶菌酵素に特異的であることがわかった。36-kDa 溶菌活性に及ぼす種々の因子の影響を、Zymography で検討した。36-kDa 溶菌酵素は Ca^{2+} （10 mM）、 Mg^{2+} （10 mM）、 Mn^{2+} （10 mM）、 Ba^{2+} （10 mM）を加えた時に溶菌活性の亢進が見られ、 NaCl （100 mM）、 KCl （100 mM）、 Hg^{2+} （10 mM）、Iodoacetic acid（10 mM）を加えた時には逆に溶菌活性の低下が見られた。EDTA を加えた時には変化は見られなかった（表 6）。次に RUSAL2 株菌体から抽出した 7 つの画分で *S. aureus* を用いた

Zymography、抗 36-kDa 溶菌酵素血清を用いた Immunoblotting を行った (図 15)。Zymogram 上では LiCl 画分、SDS 画分、菌体画分、Triton 画分、urea 画分において 36-kDa 溶菌活性が見られ、Immunoblotting では、すべての画分において 36-kDa のバンドが認められた。

Ⅲ. *S. aureus* 臨床分離 11 株菌体、他のブドウ球菌 10 株菌体の SDS 抽出画分の Zymography、Immunoblotting を用いた分析

S. aureus 臨床分離 11 株菌体、他のブドウ球菌 10 株菌体の SDS 抽出画分で *S. aureus* を用いた Zymography、抗 36-kDa 溶菌酵素血清を用いた Immunoblotting を行った。その結果、黄色ブドウ球菌臨床分離 11 株すべてに 36-kDa 溶菌活性、36-kDa 抗血清と反応するバンドが見られた (図 16)。又、他のブドウ球菌 10 株菌体の SDS 画分での Zymogram では 2、4、6、8 レーンにおいて 36-kDa 溶菌バンドが見られたが、Immunoblotting ではバンドが見られなかった (図 17)。

IV . 36-kDa 溶菌酵素と lysostaphin の各種加熱死菌に対する溶菌活性の比較

36-kDa 溶菌酵素は *S. aureus* 菌体を溶菌させるが *M. luteus* 菌体は溶菌させないので、glycylglycine endopeptidase である可能性が考えられた。このためグリシン5量体に変化した株、TF8、BB841 (*femB::Tn551*) を用いて加熱死菌に対する感受性について検討した。BB841 菌体に対して、グリシン5量体を切断する溶菌酵素である lysostaphin の最小溶菌酵素量 (MBD 値) が親株 (BB705) に比べ上昇し、36-kDa 溶菌酵素も同様に MBD 値の上昇が見られた (表7)。しかしながら *epr* 菌体に対して lysostaphin の MBD 値は親株 (RN4220 pGC2) に比べ上昇したが、36-kDa 溶菌酵素の MBD 値は低下した。

考察

I . 36-kDa 溶菌酵素と LytM 蛋白の違い

最近、*S. aureus* ATL 非発現株の遺伝子ライブラリーから、溶菌酵素遺伝子 *lytM* のクローニング、並びに性状の検討がなされた¹³⁾。LytM 蛋白質の推定分子量は 34.4-kDa で、大腸菌で発現させたその蛋白質は *S. aureus* に対して溶菌活性を示したが、*M. luteus* に対してはその活性を示さなかった。従って LytM 蛋白質と 36-kDa 溶菌酵素は非常によく似ている蛋白質であると考えられた。このため LytM 蛋白質が 36-kDa 溶菌酵素であるかどうかについてまず検討した。抗 LytM 血清を用いた Immunoblotting では、YN001 株の LiCl 抽出画分に LytM 蛋白質を検出出来なかった。さらにシャトルベクターに LytM を組み込み発現させることをねらった pALytM を持つ株 YN002 株においても LytM 蛋白質を検出することが出来なかった。この株では LiCl 画分の 36-kDa 溶菌活性の著しい亢進が認められたことから、36-kDa 溶菌酵素は LytM 蛋白質とは異なることが強く示唆された。さらに *lytM* 遺伝子破壊株の SDS 抽出画分の *S. aureus* を用いた Zymogram におい

ても親株と同様、36-kDa 溶菌活性が認められた。以上の結果から、LytM 蛋白と 36-kDa 溶菌酵素とは異なることが示された。YN002 の LiCl 画分に強い 36-kDa 溶菌活性が認められたのは、プラスミドを保持するために用いたクロラムフェニコールによる影響あるいは、*epr* の発現によるペプチドグリカンの変化による影響かと考えられた。

II . 36-kDa 溶菌酵素の精製

S. capitis EPK-1 が有する遺伝子 *epr* は、ペプチドグリカン架橋に serine を挿入することにより、*S. capitis* EPK-1 を lysostaphin に耐性化していることが知られている³⁶⁾。*epr* を多コピーベクターに持つ *S. aureus* は lysostaphin に高度耐性となる。そこで、この株を精製の担体として用いることを試みた。*S. capitis* EPK-1、*S. simulans* bv. *staphylolyticus* の培養上清に *epr* 菌体を加え、その菌体を 3 M LiCl 処理することによって精製を行ったところ、培養上清中の溶菌酵素が精製出来た。この方法が *S. aureus* を溶解する

glycylglycine endopeptidase に応用出来ることがわかったので、同様に YN002 培養上清に epr 菌体を加え、その菌体を 3 M LiCl 処理し、その濃縮画分を用いてディスクプレパラティブ電気泳動を行うことにより 36-kDa 溶菌酵素の精製を行った（図 10）。その結果、溶菌バンドに一致して 1 本になった蛋白バンドが見られた。精製 36-kDa 溶菌酵素を用いた N 末端アミノ酸配列は H V S D Q V Q Q F P I P F で、既存のデータベース検索の結果、相同性のある蛋白は認められなかった。

III . 36-kDa 溶菌酵素の性状

36-kDa 溶菌酵素活性に及ぼす種々の因子の影響の結果より、2 価イオンを renaturation buffer に加えた時に *atl* 遺伝子産物と同様に 36-kDa 溶菌活性の増加が見られた。また 100 mM の塩（NaCl , KCl ）、Iodoacetic acid（10 mM）を加えた時には、*atl* 遺伝子産物とは逆に 36-kDa 溶菌活性の減少が見られた。RUSAL2 株菌体の 7 つの画分を用いての菌体封入ゲル（*S. aureus*）を用

いた Zymogram、Immunoblotting の結果より、界面活性剤、塩で 36-kDa 溶菌酵素を溶出することが出来た。界面活性剤、特に SDS では *S. aureus* の場合、細胞が破壊されなくて、細胞表層成分のみ溶出されるという報告がある²¹⁾。SDS 画分を用いた場合、36-kDa 溶菌活性、36-kDa の抗体と反応するバンドが見られ、また塩である LiCl 画分を用いた場合にも同様の結果が見られたことから、36-kDa 溶菌酵素は菌体表層に存在することが示唆された。黄色ブドウ球菌臨床分離株菌体、他のブドウ球菌菌体の SDS 画分による Zymogram、Immunoblotting の結果から 36-kDa 溶菌酵素は黄色ブドウ球菌特有の溶菌酵素であることが強く示唆された。36-kDa 溶菌酵素は *S. aureus* 菌体は溶かすが *M. luteus* 菌体は溶かさないので glycyglycine endopeptidase である可能性が考えられた。各種加熱死菌に対する感受性テストの結果から、BB841 菌体に対しての MBD 値が lysostaphin と同様に上昇しているので、36-kDa 溶菌酵素は glycyglycine endopeptidase であること

が強く示唆された。しかしながら epr 菌体に対して MBD 値が低下している。この結果は、lysostaphin と 36-kDa 溶菌酵素がグリシン 5 量体を切断する際、切断部位が異なるためではないかと考えられた。

総括

S. aureus が産生する 36-kDa 溶菌酵素を精製し、その性状について検討し、以下の結果を得た。

1. LytM 蛋白と 36-kDa 溶菌酵素は、異なることが明らかとなった。
2. YN002 株培養上清中に lysostaphin に耐性の遺伝子 *epr* をコードしたプラスミドを持った株 TF8 (*epr* 菌体) を加え、この菌体を 3 M LiCl 処理しその濃縮画分を用いてディスクプレパラティブ電気泳動にかけるとにより 36-kDa 溶菌酵素を精製した。
3. RUSAL2 の種々の抽出画分の *S. aureus* 菌体を

体表層に存在することが示唆された。

Immunoblotting の結果から、36-kDa 溶菌酵素は菌体表層に存在することが示唆された。

4. 36-kDa 溶菌酵素は黄色ブドウ球菌特有の酵素であった。

5. MBD 値から 36-kDa 溶菌酵素は glycylglycine endopeptidase であることが強く示唆された。

以上の結果、*S. aureus* 培養上清から精製した 36-kDa 溶菌酵素は新規の glycylglycine endopeptidase であることが強く示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の指導と論文の御校閲を賜った広島大学歯学部口腔細菌学講座杉中秀壽教授に心から感謝の意を表します。また、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました同口腔外科学第二講座石川武憲教授、並びに同歯科薬理学講座土肥敏博教授に

深謝いたします。

研究遂行上及び本論文作成上、御助言と御鞭撻をいただきました本学口腔細菌学菅井基行助教授に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行上、pLytMを提供して頂いた Department of Biological Sciences、Illinois State University、Radheshyam K. Jayaswal 博士、Smith 5R 株を提供して頂いた東北大学農学部神尾好是教授、YN003 株を提供して頂いた大日本製薬株式会社山岸純一博士に厚く御礼申し上げます。

さらに、研究遂行上惜しみない御協力をいただいた口腔細菌学教室員各位に、深く感謝します。

文献

- 1) Actor, P., Daneo-Moore, L., Higgins, M. L., Salton, M. R. J. and Shockman, G. D.: Antibiotic inhibition of bacterial surface assembly and function. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 181-257, 1988.
- 2) Audy, P., Greiner, J. and Asselin, A. : Lysozyme activity in animal extracts after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**,523-527, 1989.
- 3) Cleveland, R. F., Wicken, A. J., Daneo-Moore, L. and Shockman, G.D.: Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. *J. Bacteriol.* **126**, 192-197, 1976.
- 4) Coyette, J. and Shockman, G. D.: Some properties of autolytic *N*-acetylmuraminidase of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **114**, 34-41, 1973.
- 5) Dolinger, D. L., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D.: The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *J. Bacteriol.* **171**, 4355-4361, 1989.

- 6) Forsberg, C. and Rogers, H. J.: Autolytic enzymes in growth of bacteria. *Nature*. **229**, 272-273, 1971.
- 7) Ghuysen, J.-M., Tipper, D.J. and Strominger, J. L.: Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.* **8**, 685-699, 1966.
- 8) Gilpin, R.W., Narrod, S., Wong, W., Young, F. E. and Chatterjee, A. N.: Autolysis in *Staphylococcus aureus* : Preferential release of old cell wall. *J. Bacteriol.* **119**, 672-676, 1974.
- 9) Holtje, J. and Tuomanen, E. I.: The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 441-454, 1991.
- 10) Huff, E. and Silverman, C. S.: Lysis of *Staphylococcus aureus* cell walls by a soluble Staphylococcal enzyme. *J. Bacteriol.* **95**, 99-106, 1968.
- 11) Komatsuzawa, H., Sugai, M., Nakashima, S., Yamada, S., et al.: Subcellular localized of the major autolysin, ATL and its processed proteins in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **41**, 469-479, 1997.
- 12) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the

- head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685, 1970.
- 13) Lakshmi, R. and Radheshyam, K.J.: Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**, 3625-363, 1997.
 - 14) Leclerc, D. and Asselin, A.: Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* **35**, 749-753, 1989.
 - 15) Lominiski, I., Cameron, J. and Willi, G.: Chaining and unchaining *Streptococcus faecalis* - a hypothesis of the mechanism of bacterial cell separation. *Nature*. **181**, 1477, 1958.
 - 16) Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038, 1987.
 - 17) Mauck, J., Chan, L. and Glaser, L.: Turnover of the cell wall of Gram positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **246**, 1820-1827, 1971.
 - 18) Mitchell, P. and Moyle, J.: Autolytic release and osmotic properties of "protoplast" from *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **16**, 184-194,

1957.

- 19) 野上龍造: ペニシリンによって誘発される黄色ブドウ球菌の溶菌機序.
広大歯誌 15, 259-271, 1983.
- 20) Ohta, K., Komatsuzawa, H., Sugai, M. and Suginaka, H.: Zymographic characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall. *Microbiol. Immunol.* 42, 231-235, 1983.
- 21) Schneewind, O., Model, P. and Fischetti, V. A., Olaf, S., Peter, M. and Fischetti, V. A.: Sorting of Protein A to the Staphylococcal Cell Wall. *Cell.* 70, 267-281, 1992.
- 22) Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.-M., Suginaka, H. and Tomasz, A.: A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -*N*-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 285- 289, 1995.
- 23) The bacterial autolysin ; in Microbial cell walls and membranes (Perkins, H. J., Ward, J.B.) . Chapman & Hall , London ; 437-456, 1980.
- 24) Richmond, M. H.: Lytic enzyme of *Staphylococcus aureus*. *Biochim.*

Biophys. Act. **31**, 564-565, 1959.

- 25) Rogers, H. J.: Killing of staphylococci by penicillins. *Nature.* **213**, 31-33, 1967.
- 26) Rogers, H. J., Taylor, C., Rayter, S. and Ward, J. B.: Purification and properties of autolytic endo- β -*N*-acetylglucosaminidase and the *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2395-2402, 1984.
- 27) Sakurada, J., Murai, M., Zhijun, L., Usui, A., Seki, K., Kobayashi, K., Sumi, Y., et al.: Efficient adsorption of lysostaphin on bacterial cells of lysostaphin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. *Microbiol. Immunol.* **37**, 29-34, 1993.
- 28) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. Molecular cloning. a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- 29) Schwarz, U., Asmus, A. and Frank, H.: Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 419-429, 1969.
- 30) Shockman, G.D. and Cheney, M. C.: Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*: Nature of the autolysin-cell wall complex and its

relationship to properties of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*.
J. Bacteriol. **98**, 1199-1207, 1969.

- 31) Shockman, G. D. and Holtje, J. V.: Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases; in Bacterial cell wall (Ghuysen, J. M. and Hakenbeck, R) . Elsevier Science B.V., Amsterdam, 131-166, 1994.
- 32) Shockman, G. D.: Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 501-527, 1983.
- 33) Singer, H. J., Wise, J., E. M. and Park, J.T.: Properties and purification of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus aureus* H. *J. Bacteriol.* **112**, 932-939, 1972.
- 34) Skinner, S., B. Inglis, P. R. Matthews, and P. R. Stewart .: Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2**, 289-297, 1988.
- 35) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517, 1975.
- 36) Strominger, J. L. and Ghuysen, J.-M.: Mechanisms of enzymatic

- bacteriolysis : Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science*. **156**, 213-221, 1967.
- 37) Sugai, M., Akiyama, T., Komatsuzawa, H., Miyake, Y. and Suginaka, H.: Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **172**, 6494-6498, 1990.
- 38) Sugai, M., Koike, H., Hong, Y.-M., Miyake, Y., Nogami, R. and Suginaka, H. : Purification of a 51-kDa endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**, 267-272, 1989.
- 39) Sugai, M., Komatsuzawa, H., Akiyama, T., Hong, Y.-M., Oshida, T., Miyake, Y., Yamaguchi, T., et al.: Identification of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase and *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *taphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **177**, 1491-1496, 1995.
- 40) Sugai, M., T. Fujiwara, T. Akiyama, M. Ohara, Komatsuzawa, H. Inoue, S., and Suginaka, H. : Purification and molecular characterization of glycyglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK-1. *J. Bacteriol.* **179**, 1193-1202, 1997.

- 41) Sugai, M., Fujiwara, T., Ohta, K., Komatsuzawa, H., et al.: *epr*, which encodes glycylglycine endopeptidase resistance, is homologous to *femAB* and affects serine content of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**, 4311-4318, 1997.
- 42) Suginaka, H., Kashiba, S. and Amano, T.: Purification and properties of an autolytic factor produced by a strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biken J.* **10**, 109-120, 1967.
- 43) Takabe, I., Singer, H. J., Wise, J. R., E. M., and Park, J.T.: *Staphylococcus aureus* autolytic activity: general properties. *J. Bacteriol.* **102**, 14-19, 1970.
- 44) Thompson, J. S.: Role of autolytic enzymes in growth of bacteria. *J. Theoret. Biol.* **33**, 63-75, 1971.
- 45) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* **76**, 4350-4354, 1979.
- 46) Ward, J. B. and Williamson, R.: Bacterial autolysins: specificity and function; in *Microbial cell wall synthesis and autolysis* (Nombela, C). Elsevier Science Publishers B. V, Amsterdam, 159-166, 1984.

- 47) Wong, W, . Chatterjee, A. N. and Young, F. E.: Regulation of bacterial cell walls: correlation between autolytic activity and cell wall turnover in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **134**, 555-561, 1978.
- 48) Yen, D. W. and Wu, H. C.: Purification and properties of β -N-acetylglucosaminidase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **125**, 324-331, 1976.

広島大学歯学部口腔細菌学講座

(主任：杉中秀壽教授)

本論文の内容の一部は、第48回日本細菌学会中国・四国支部総会(1995年10月高松)、第41回ブドウ球菌研究会(1996年9月、東京)、第71回日本細菌学会総会(1998年3月、長野)、第31回広島大学歯学会総会(1998年6月、広島)において発表した。

表1 使用した菌株及びプラスミド

Strain	Description			Source or reference
<i>S. aureus</i>				
RN450				Novick
RUSAL2	RN450	<i>atl::Tn551</i>		21
Smith5R	leucocidin ⁻			神尾
YN001	Smith5R	<i>atl::Tn551</i>		This study
YN002	Smith5R	<i>atl::Tn551</i> , pALytM		This study
TF8	RN4220	pTFS6		40
YN003	RN4220	<i>lytM::pTS1</i>		山岸
<i>E. coli</i>				
BLR DE3	pLytM			13
YN004	XL-1 blue	pGST-LytM		This study
Plasmid	Vector	Cloning site	Relevant properties	Source or reference
pGC2			<i>E. coli</i> cloning vector	33
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector	Promega
pGEX-2T			<i>E. coli</i> cloning vector	Pharmacia
pTFS6	pGC2	<i>EcoRI</i>	1.65 kbp PCR product	40
pYN6001	pGEM-T Easy	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>lytM</i> PCR fragment 884bp	This study
pYN6002	pGEM-T Easy	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>epr</i> と <i>ale-1</i> のN末端部分を含み <i>ale-1</i> 側に <i>PstI</i> 制限サイトをつけたDNA断片	This study
pYN6003	pGC2	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>EcoRI/PstI</i> fragment of pYN6001、pYN6002	This study
pALytM	pGC2	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i> fragment of pYN6003	This study
pYN6004	pGEM-T Easy	<i>EcoRI/BamHI</i>	<i>lytM</i> PCR fragment 891 bp	This study
pGST-LytM	pGEX-2T	<i>EcoRI/BamHI</i>	<i>EcoRI/BamHI</i> digest of pYN6004	This study

表2 使用したプライマー

primer	sequence
1	5'-GCCGATCAAGCAGGATCCGCAGAA ACGACA-3'
2	5'-TCTACTTTGCAAGTATGACGTTGG-3'
3	5'-AAGCAGATTCTGCAGAAACGACAA-3'
4	5'-GCCGAATGATTAGATTGAGCTGCAGCTCTTACA-3'
5	5'-GCCAGCTTGTGGGATACTC-3'

表3 形質導入に用いた培地と緩衝液

	Component	conc.
0.3GL top agar及び	casamino acids (Difco)	3.0 g/l
	yeast extract (Difco)	3.0 g/l
0.3GL bottom agar	NaCl	5.9 g/l
	sodium lactate、60% syrup	3.3 ml/l
	50% glycerol	2.0 ml/l
	Tris-sodium citrate (if necessary)	0.5 g/l
	agar (Difco)	15.0 g/l (bottom agar)
	agar	7.5 g/l (topagar)
	adjust pH to 7.8	
Phage top agar及び	casamino acids	3.0 g/l
	yeast extract	3.0 g/l
Phage bottom agar	NaCl	5.9 g/l
	agar	15.0 g/l (bottom agar)
	agar	5.0 g/l (top agar)
	adjust pH to 7.8	
Phage buffer	0.1MMgSO ₄	10.0 ml/l (1 mM)
	0.4M CaCl ₂	10.0 ml/l (4 mM)
	2.5M Tris, PH7.8	20.0 ml/l (50 mM)
	NaCl	5.9 g/l
	gelatin	1.0 g/l

表 4 Glycylglycine endopeptidase 精製の要約

Sample	Protein (μg)	Specific activity * (U/ μg)	Purification (fold)	Yield (%)
<i>S. capitis</i>	270,000	9.48	1	100
<i>S. capitis</i>	epr 菌体溶出画分	9.66	1.02	2
<i>S. simulans</i>	同上	10.89	1	100
<i>S. simulans</i>	同上	21.25	1.95	4

*、1Uは菌体を含むポリアクリルアミドゲルでの最小の溶菌活性とする。

表 5 YN002株培養上清からの36-kDa溶菌酵素精製の要約

Sample	Protein (μg)	Specific activity* (U/ μg)	Purification (fold)	Yield (%)
上清硫酸沈殿画分	420,000	0.09	1	100
epr菌体溶出画分	23,400	0.07	0.78	4.2
ディスクプレパライズゲル 電気泳動溶出画分	4,000	0.8	8.9	8

*、1Uは菌体を含むポリアクリルアミドゲルでの最小の溶菌活性とする。

表6 36-kDa溶菌酵素活性に及ぼす種々の因子の影響

Chemical factor (concn.)	Activity of 36-kDa bacteriolytic band *
NaCl (100mM)	-
KCl (100mM)	-
Ca ²⁺ (10mM)	+
Mg ²⁺ (10mM)	+
Mn ²⁺ (10mM)	+
Ba ²⁺ (10mM)	+
Hg ²⁺ (10mM)	-
Iodoacetic acid (10mM)	-
EDTA (10mM)	±

* , - , Inhibition ; ± , not affected ; + , activation

表7 種々のブドウ球菌加熱死菌の36-kDa溶菌酵素及びLyso-staphinに対する感受性

Strain	properties	Amino acid composition in interpeptide bridges	MBD	
			36-kDa (μ g)	lyso-staphin (pg)
RN4220 pGC2	wild type	(Gly) ₅	8.2	250
RN4220 pTFS6	<i>epr</i>	(Gly) ₃ (Ser) ₂	4.1	1000
BB705	wild type	(Gly) ₅	8.2	125
BB841	<i>femB::Tn551</i>	(Gly) ₃	32.8	250
<i>L. plantarum</i>		Glu	—*	—
<i>M. luteus</i>		Ala Glu (Gly) Lys Ala	—	—

*、検出されなかった。

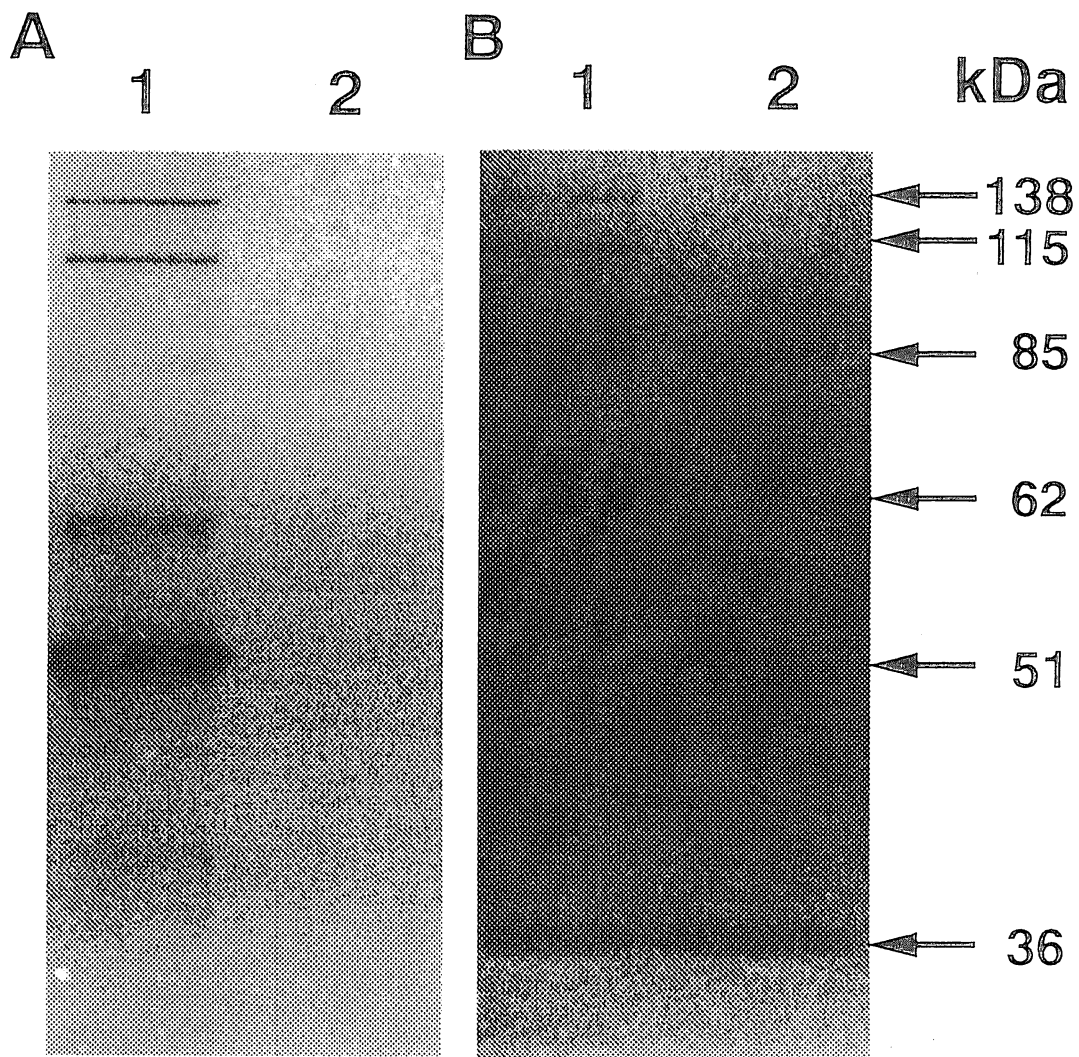


図1 36-kDa溶菌酵素の検出。

菌体封入ゲル (A, *M. luteus* ; B, *S. aureus*) を用いた Zymogram。

Lane: 1, RN450 4%SDS 抽出画分; 2, RUSAL2 4%SDS 抽出画分。

1 2 3

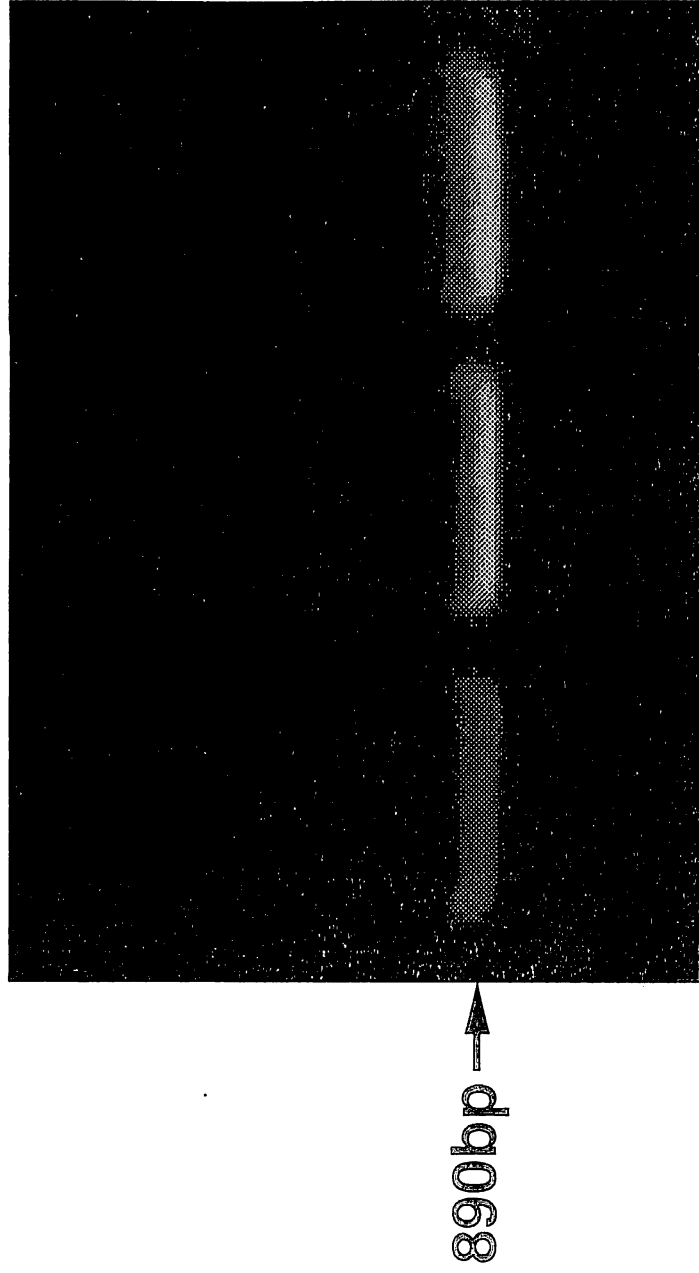


図2 *LytM*遺伝子の検出.

プライマー1、2を用いたPCR産物のアガロース電気泳動（1%アガロース）。
鋳型として1, RN450染色体DNA; 2, 209P染色体DNA; 3, pLytMを用いた。

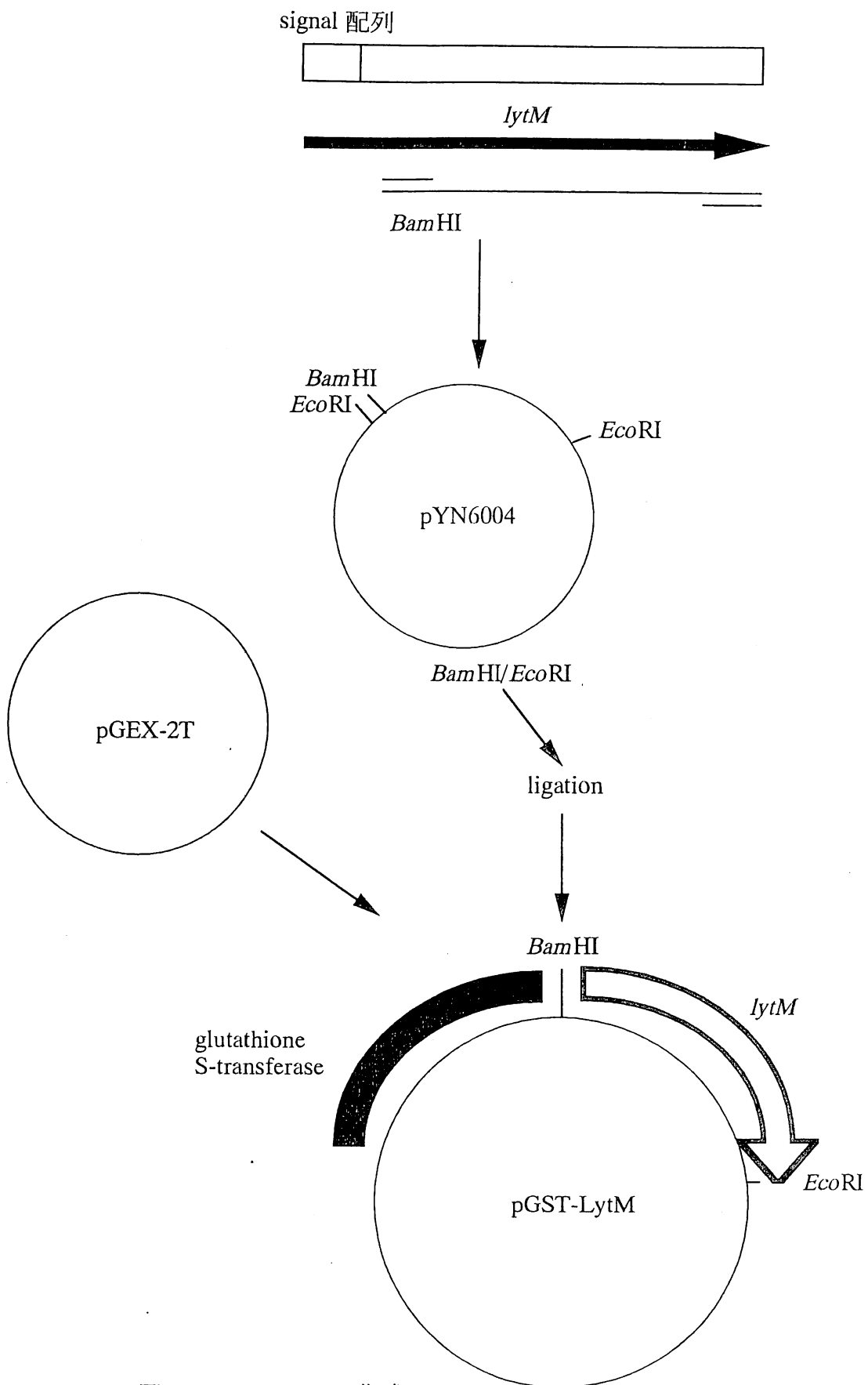


図 3 pGST-LytMの作成.

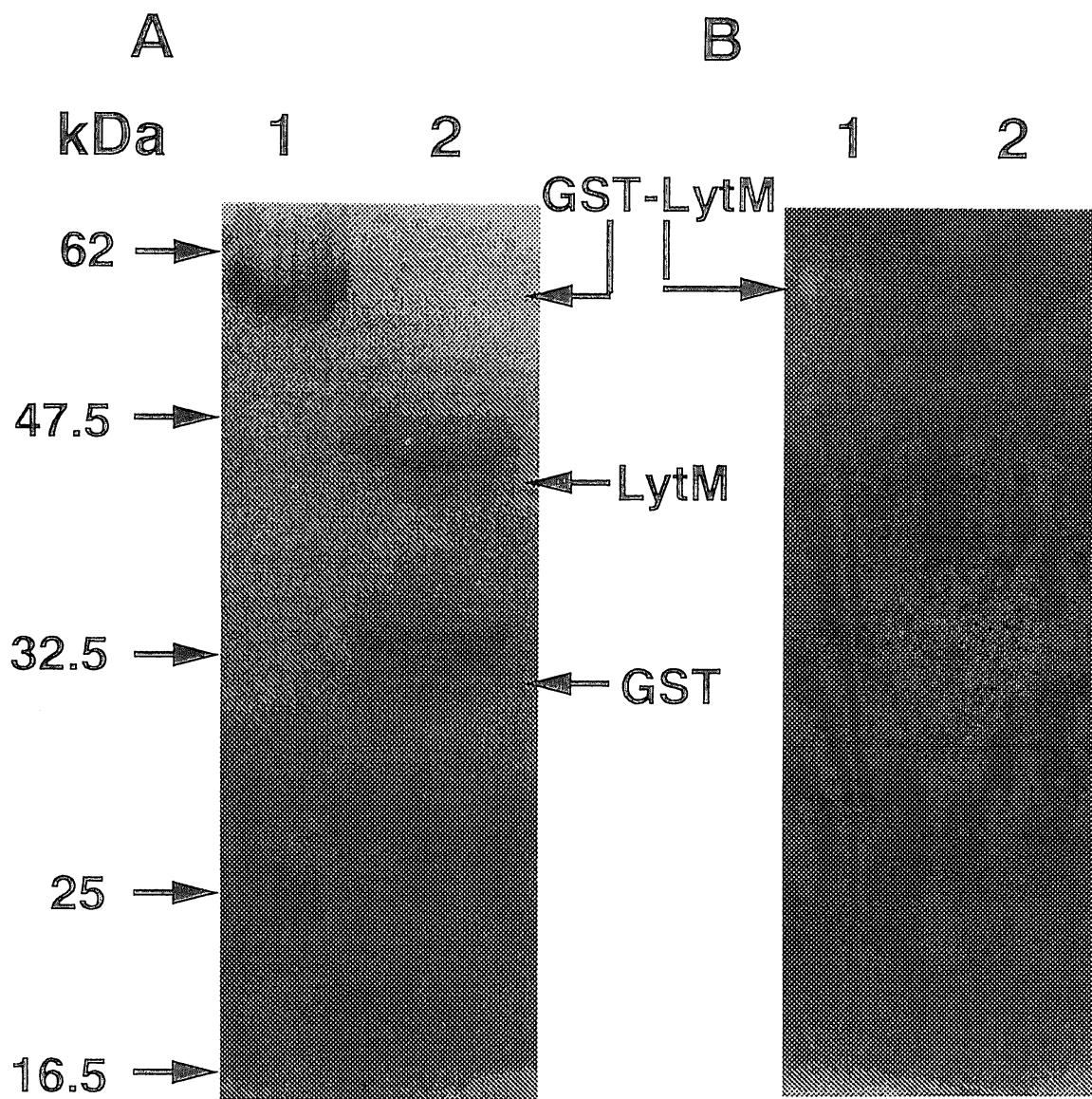


図4 GST-LytM蛋白の精製.

A, SDS-PAGE (12%ポリアクリルアミドゲル) 後のクーマシー染色。B. 菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。Lane: 1, Glutathione Sepharose 4Bカラムを用いて精製したGST-LytM標品; 2, 1の thrombin消化物。

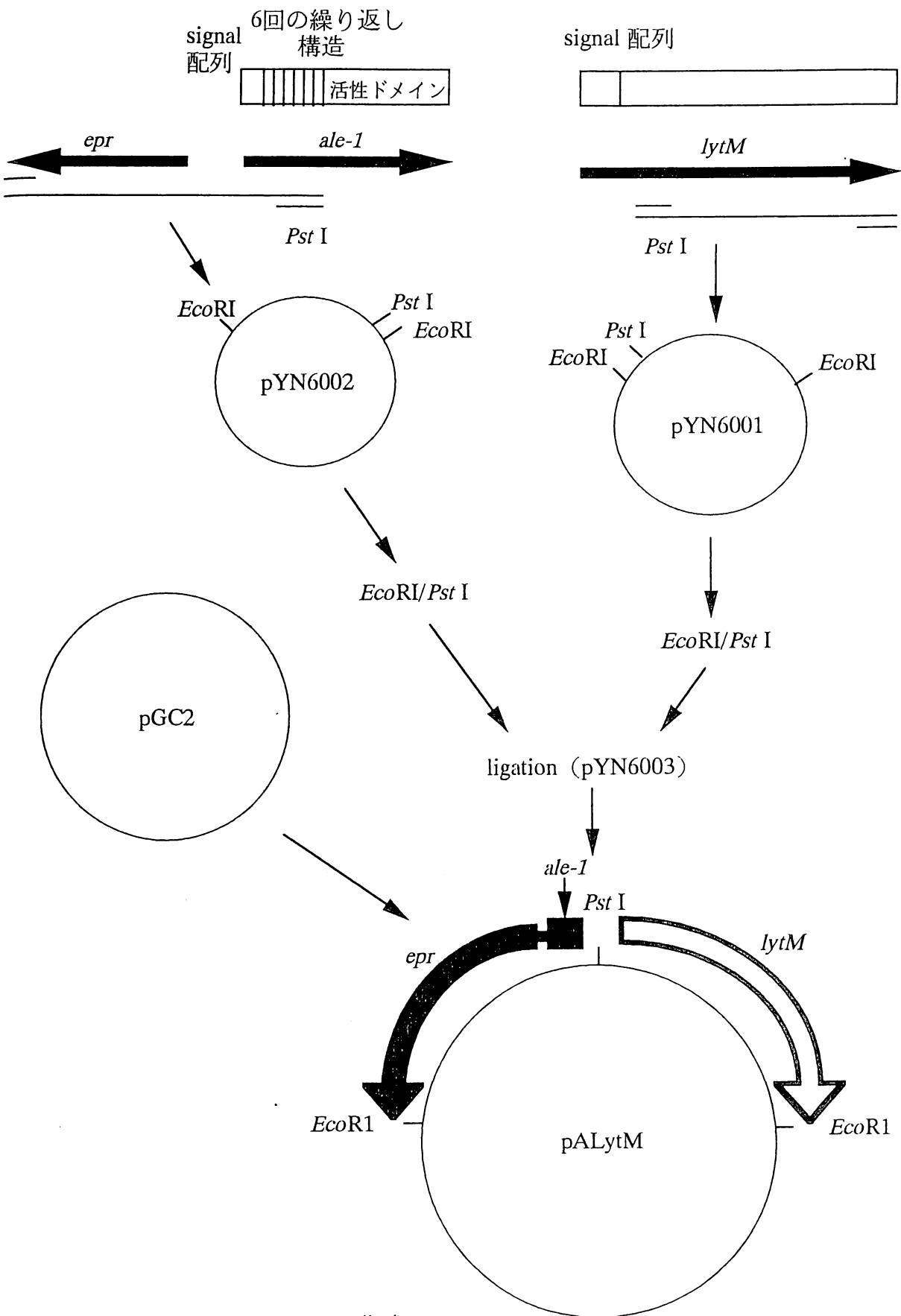
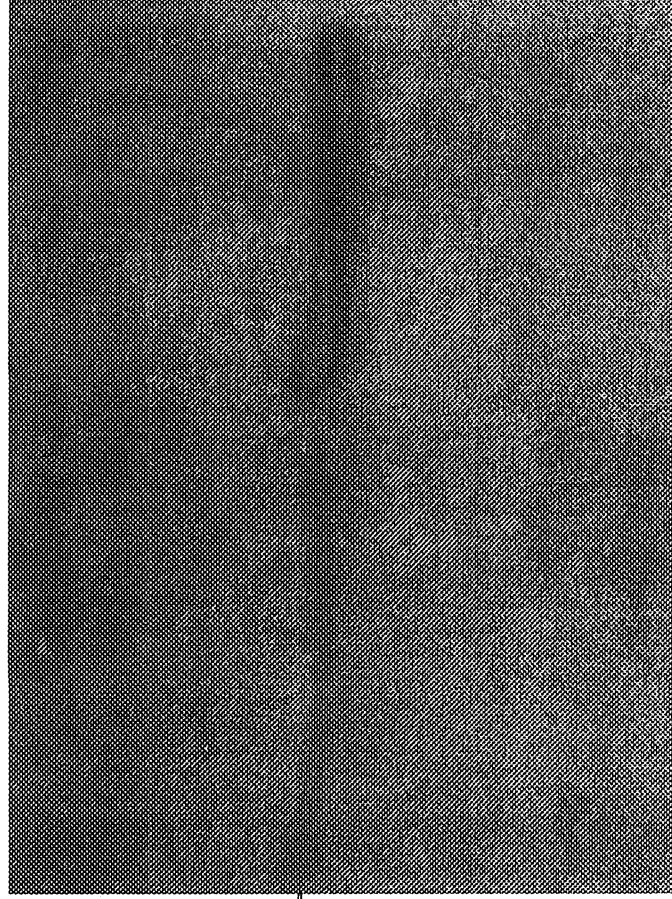


図 5 pALytMの作成.

1

2



36-kDa →

図6 YN001, YN002株のLiCl菌体抽出画分のZymogram.

菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。Lane: 1, YN001 LiCl 抽出画分 ; 2, YN002 LiCl 抽出画分。

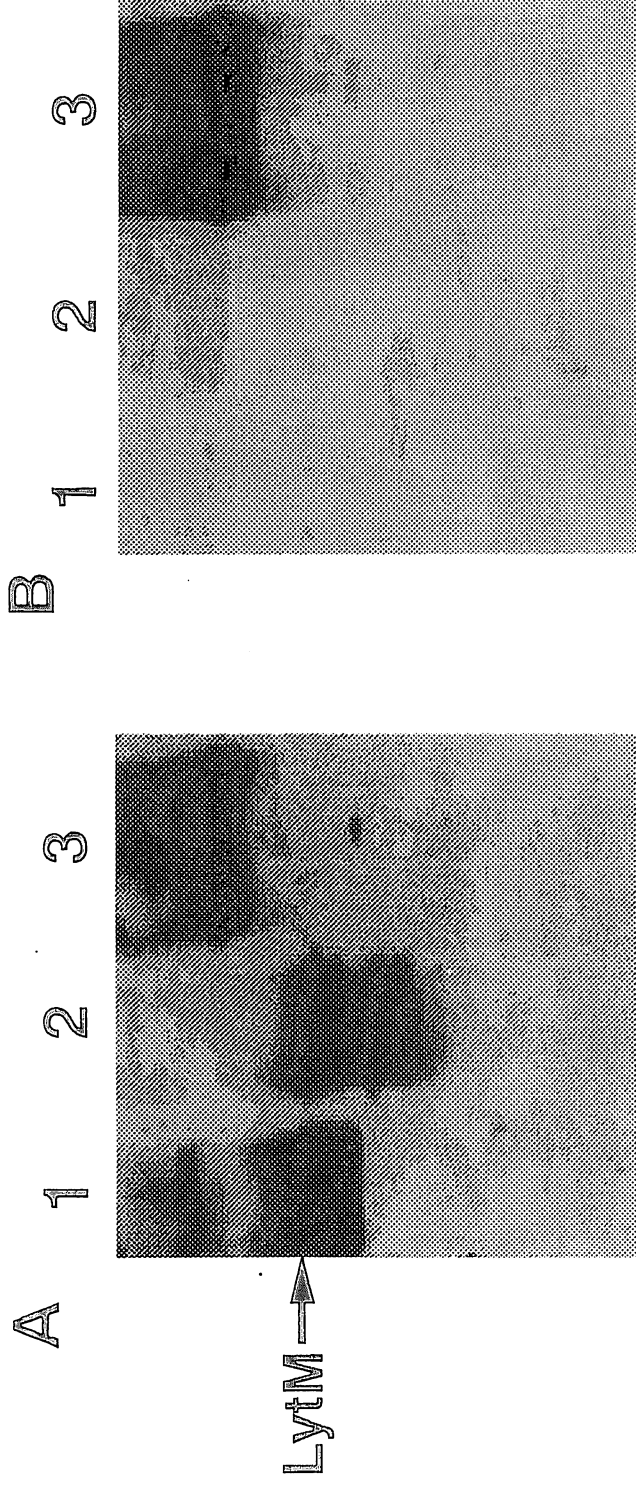


図7 抗LytM血清を用いたImmunoblotting.

A, 抗LytM血清あるいはB, コントロール血清を用いたImmunoblotting。Lane: 1, GST-LytM thrombin 消化産物; 2, BLR DE3 pLytM菌体画分; 3, YN002 LiCl 抽出画分。

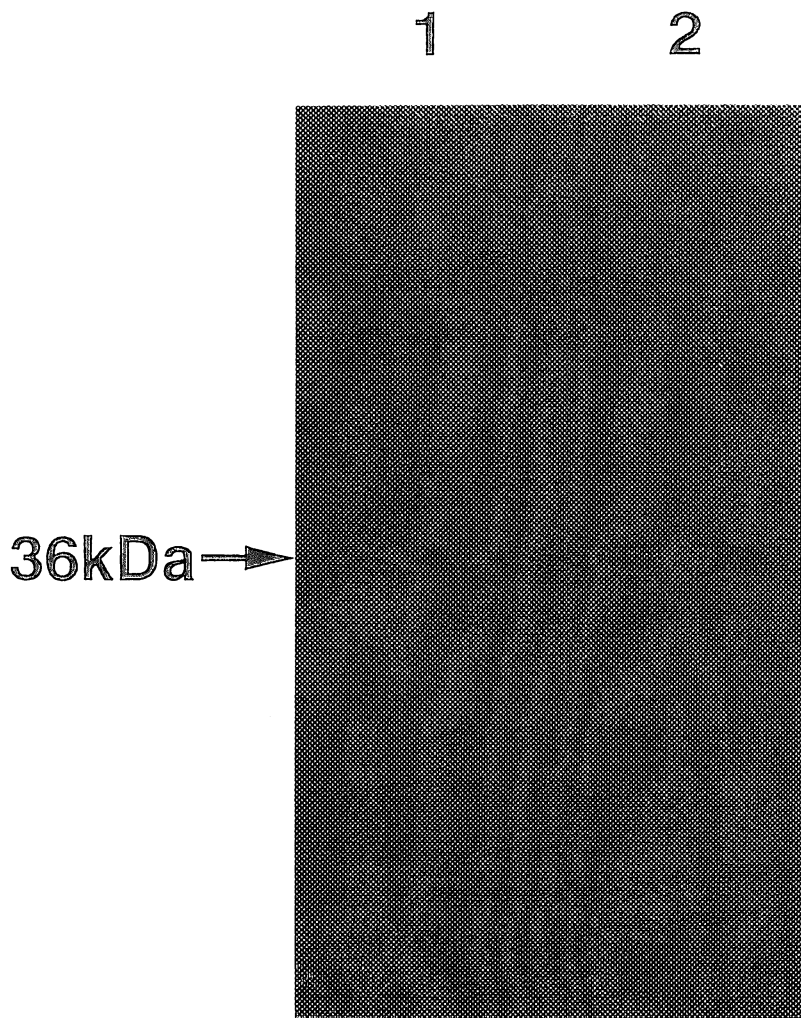


図 8 RN4220, YN003のSDS抽出画分のZymogram.

菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。Lane: 1, YN003 4%SDS菌体抽出画分; 2, RN4220 4%SDS菌体抽出画分。

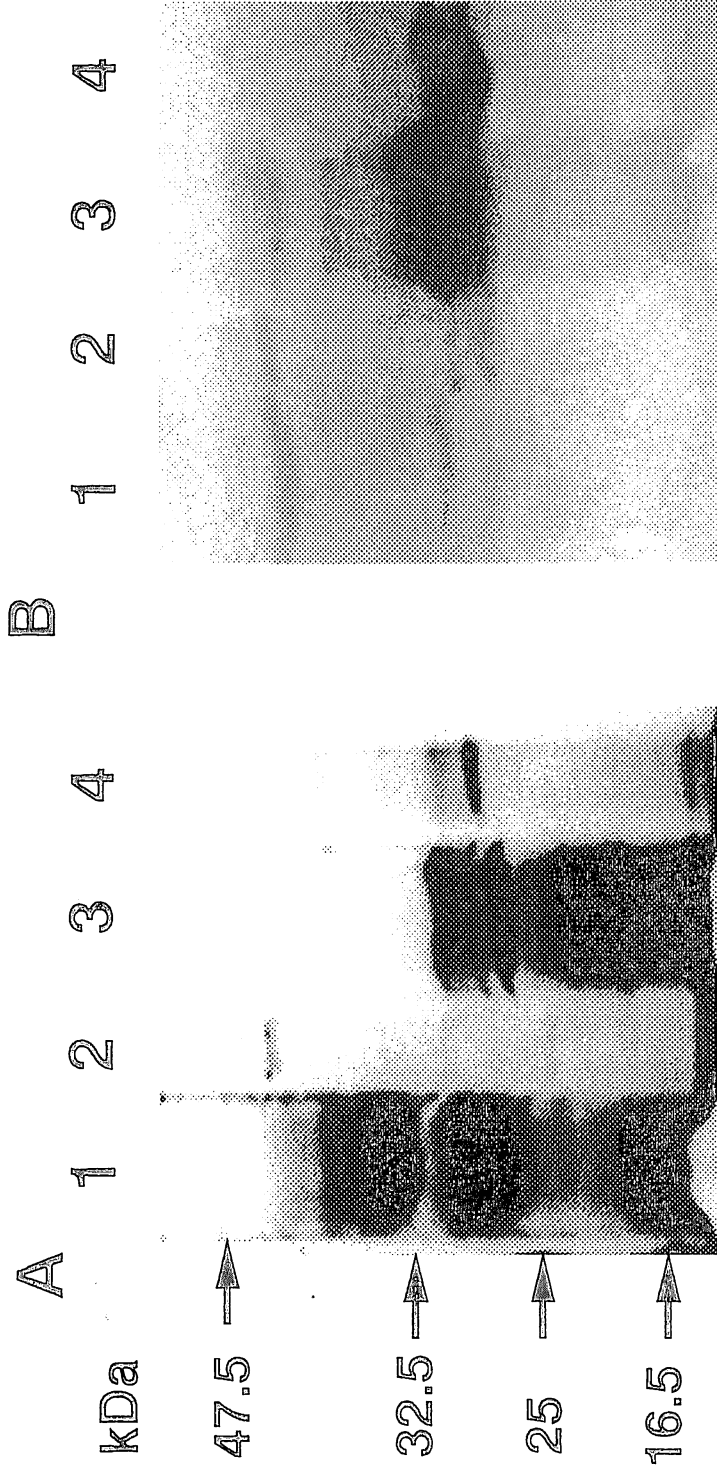


図9 Glycylglycine endopeptidaseの精製.

A. SDS-PAGE (12%ポリアクリルアミドゲル) 後の銀染色。B. 菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いた Zymogram。Lane: 1, *S. capitis* EPK1上清硫酸沈殿画分; 2, *S. capitis* EPK1培養上清にepr菌体を加え攪拌後、epr菌体をLiCl処理して得た画分; 3, *S. simulans* bv. *staphylolyticus* 上清硫酸沈殿画分; 4, *S. simulans* bv. *staphylolyticus* 培養上清にepr菌体を加え攪拌後、epr菌体をLiCl処理して得た画分。

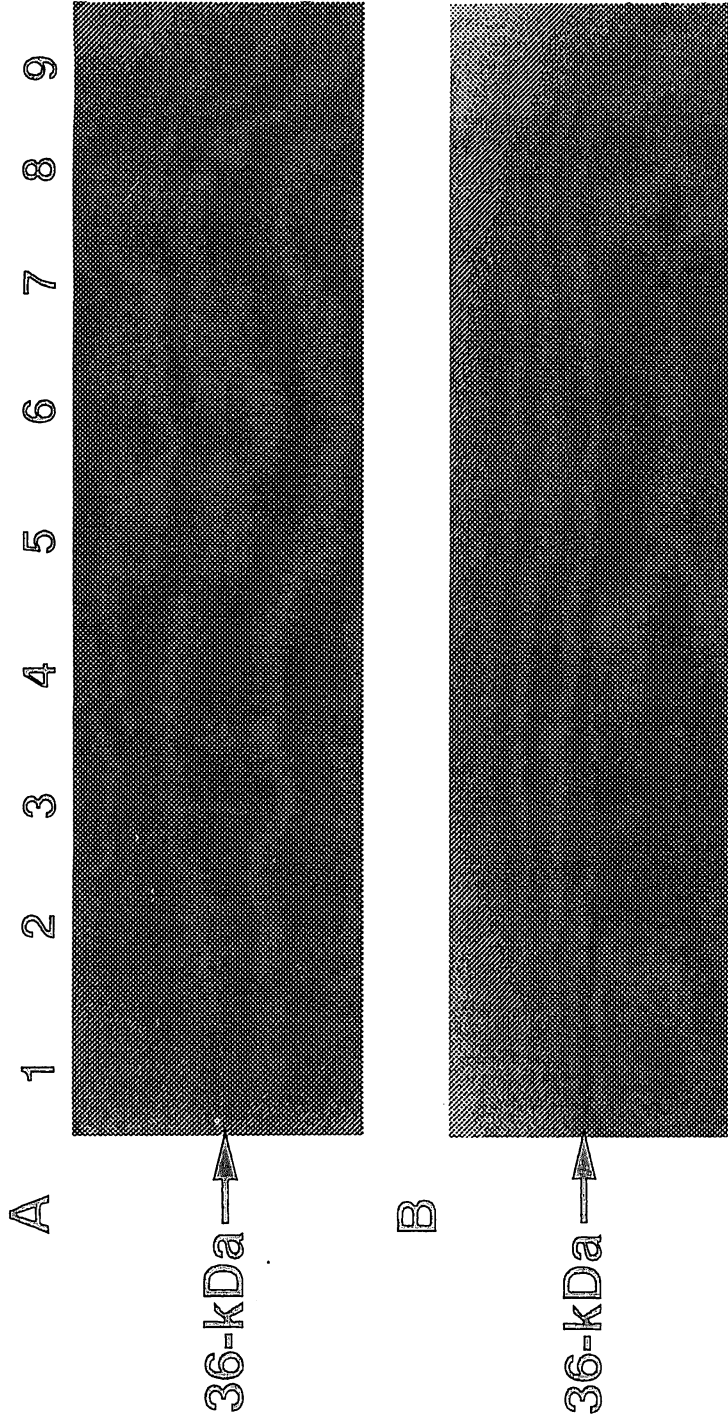
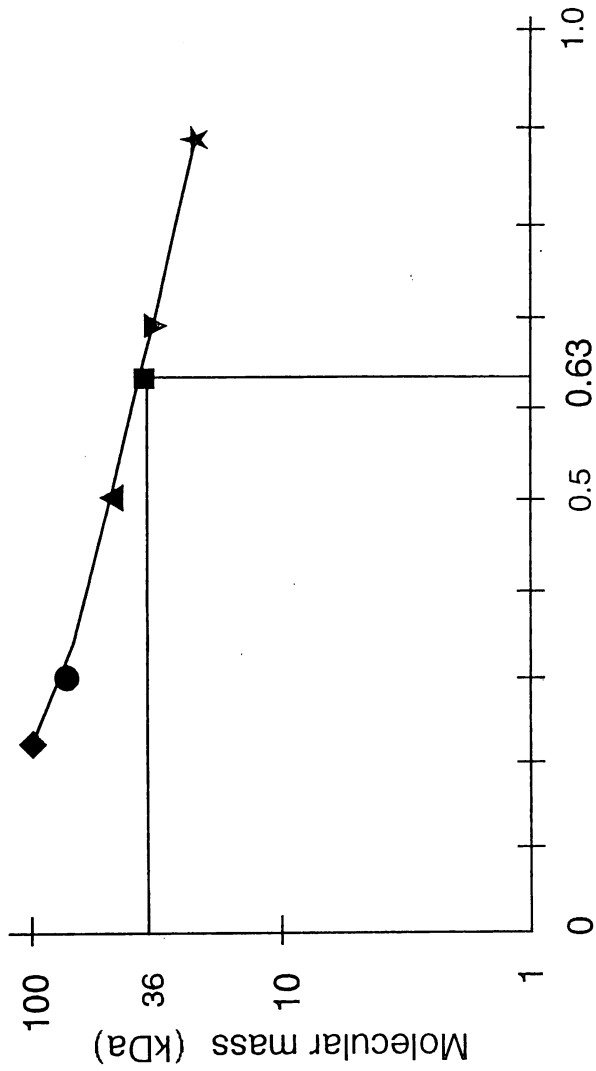


図 10 36-kDa溶菌酵素の精製.

A. 菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymography 後の銀染色。B. SDS-PAGE (12%ポリアクリルアミドゲル) 後のクーマシー染色。Sample: ディスクプレパラティブ電気泳動溶出画分。



Relative Electrophoretic mobility

図 11 SDS-PAGEでの36-kDa分子量測定.

◆, rabbit muscle phosphorylase B , 97.4-kDa; ●, bovine serum albumine , 66.2-kDa; ▲, hen egg white ovalbumin , 45.0-kDa;

▼, bovine carbonic anhydrase , 31.0-kDa; ★, soybean trypsin inhibitor , 21.5-kDa

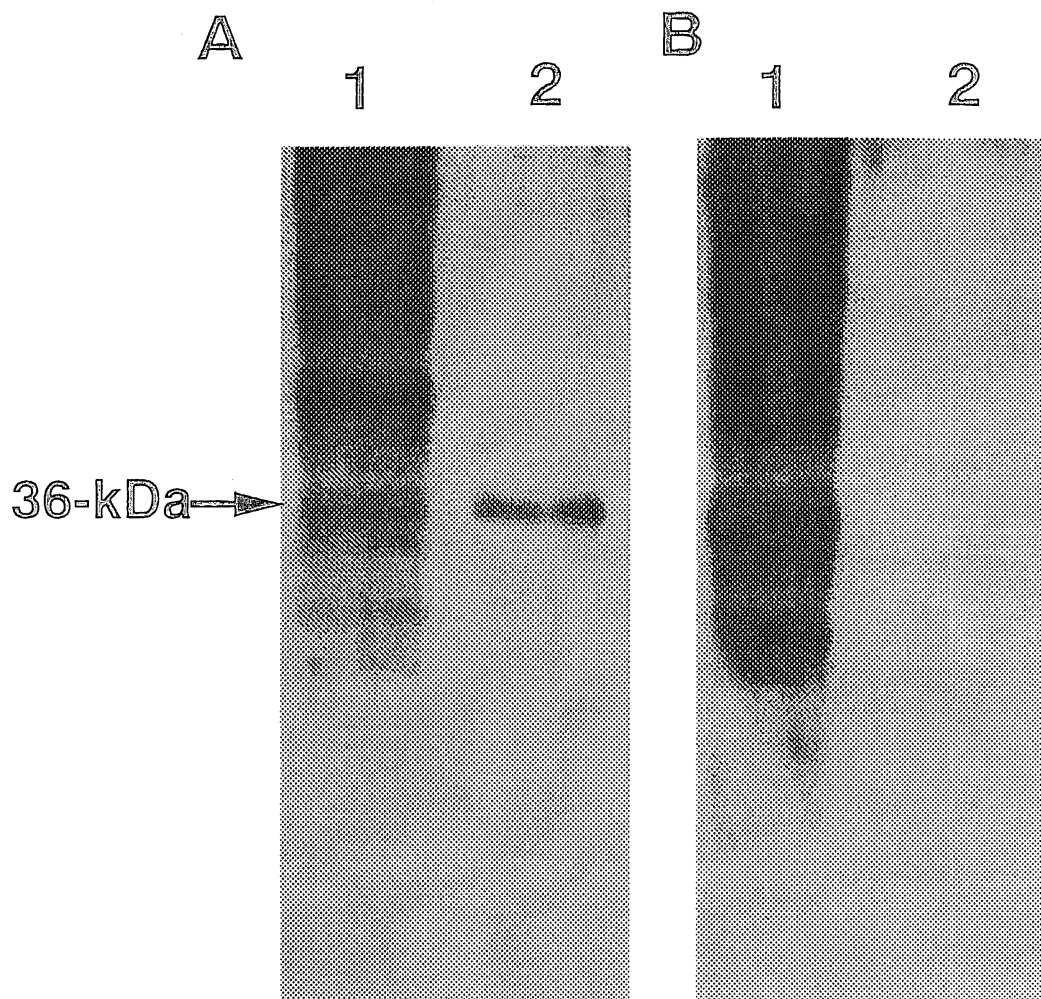


図 12 抗36-kDa溶菌酵素血清を用いたImmunoblotting.

A, 抗36-kDa血清あるいはB, コントロール血清を用いた
Immunoblotting。Lane: 1, YN002上清硫酸沈殿画分; 2, 36-kDa精
製酵素。

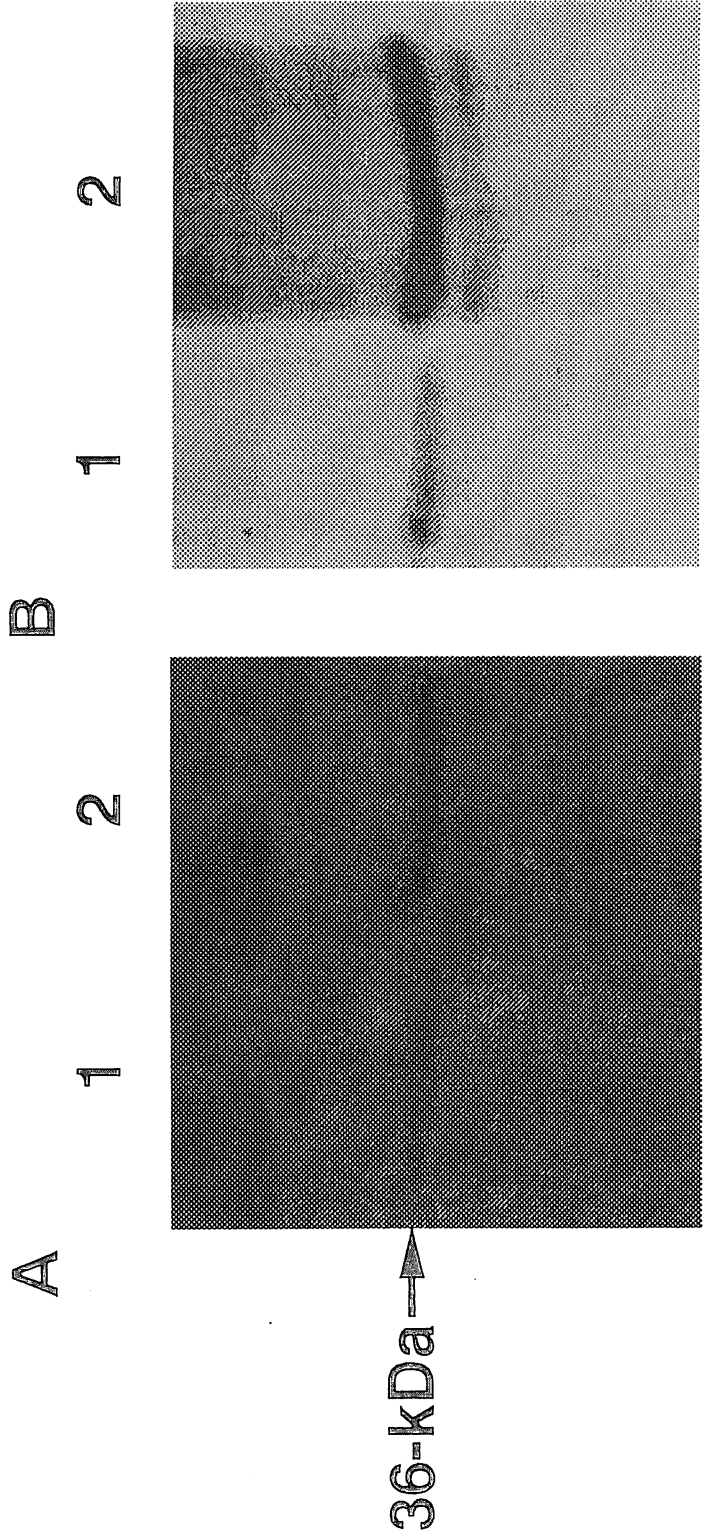


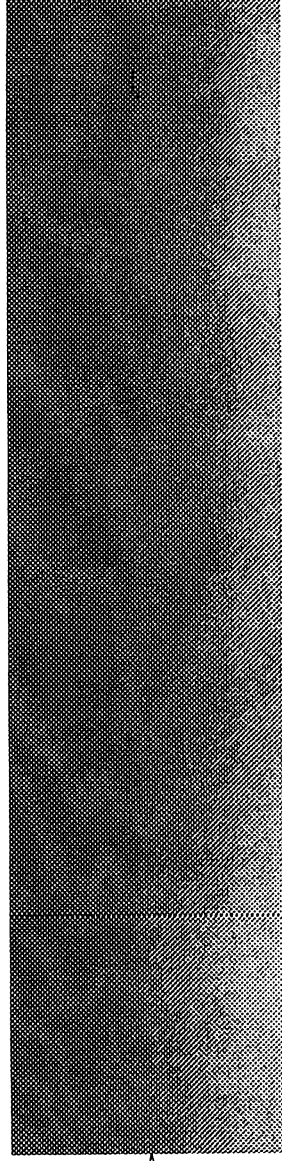
図 13 YN002菌体抽出画分の36-kDa溶菌酵素の検出.

A. 菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。 B. 抗36-kDa溶菌酵素血清を用いたImmunoblotting。 Lane:1.YN001 LiCl抽出画分; 2. YN002 LiCl抽出画分。

anti 36-kDa serum (μ l)

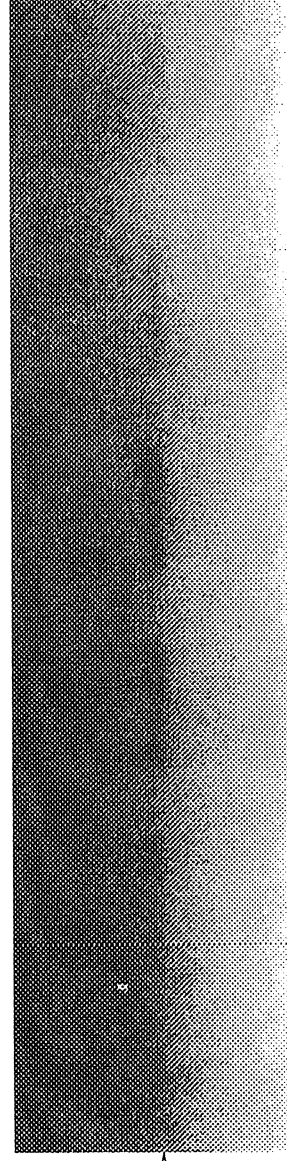
A

0 2 5 10 20 40



36-kDa

B



36-kDa

図 14 抗36-kDa血清を用いた免疫沈降反応.

A; RUSAL2; B; YN002の4%SDS抽出画分を抗36-kDa溶菌酵素血清を用いて免疫沈降反応を行い、免疫沈降物を菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymographyで解析した。

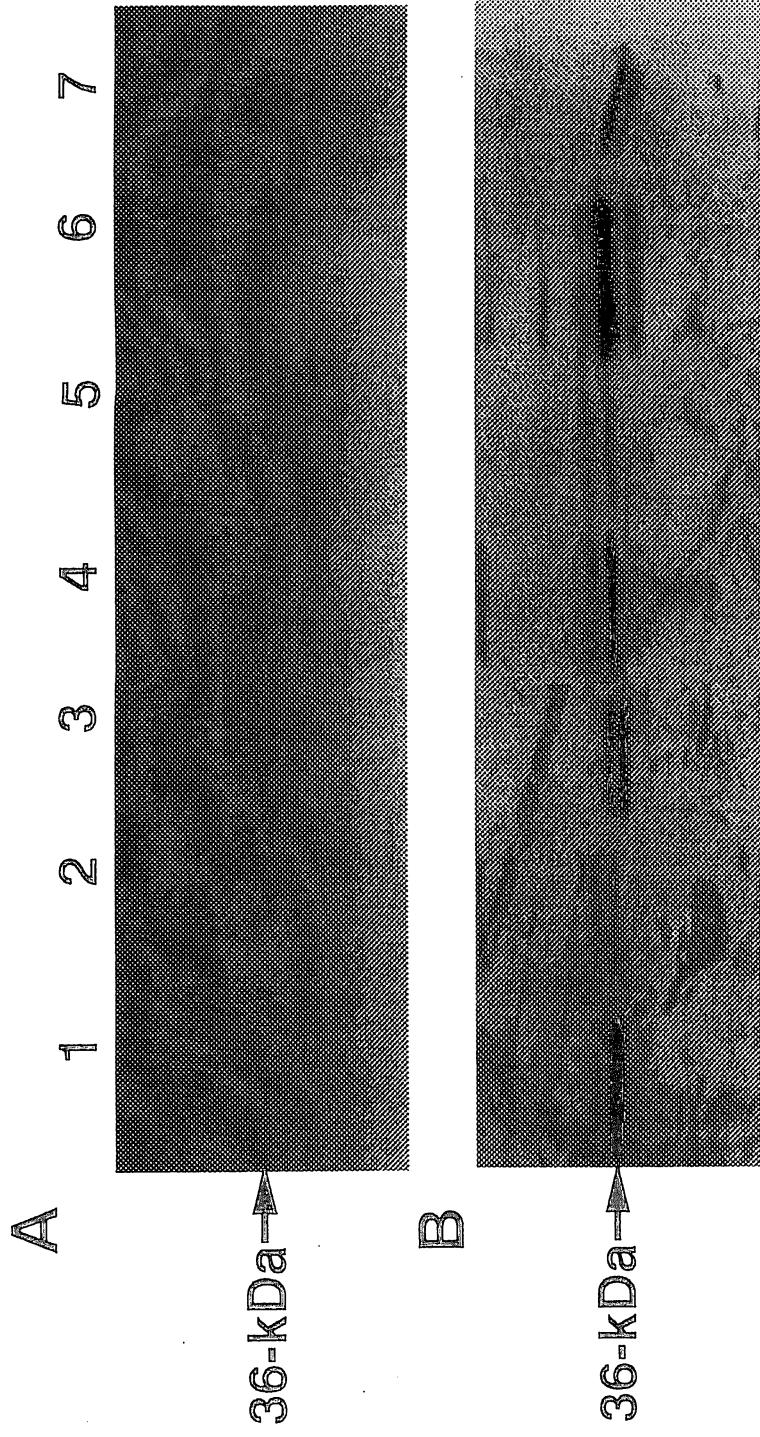


図 15 36-kDa溶菌酵素の局在性.

A.菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。B. 抗36-kDa溶菌酵素血清を用いたImmunoblotting。RUSAL2株菌体を用いて調整した7つの画分 Lane: 1. LiCl 抽出画分; 2. SDS 抽出画分; 3. 菌体画分; 4. trypsin 処理菌体抽出画分; 5. triton X-100抽出画分; 6. urea 抽出画分; 7. 塩酸グアニジン抽出画分。

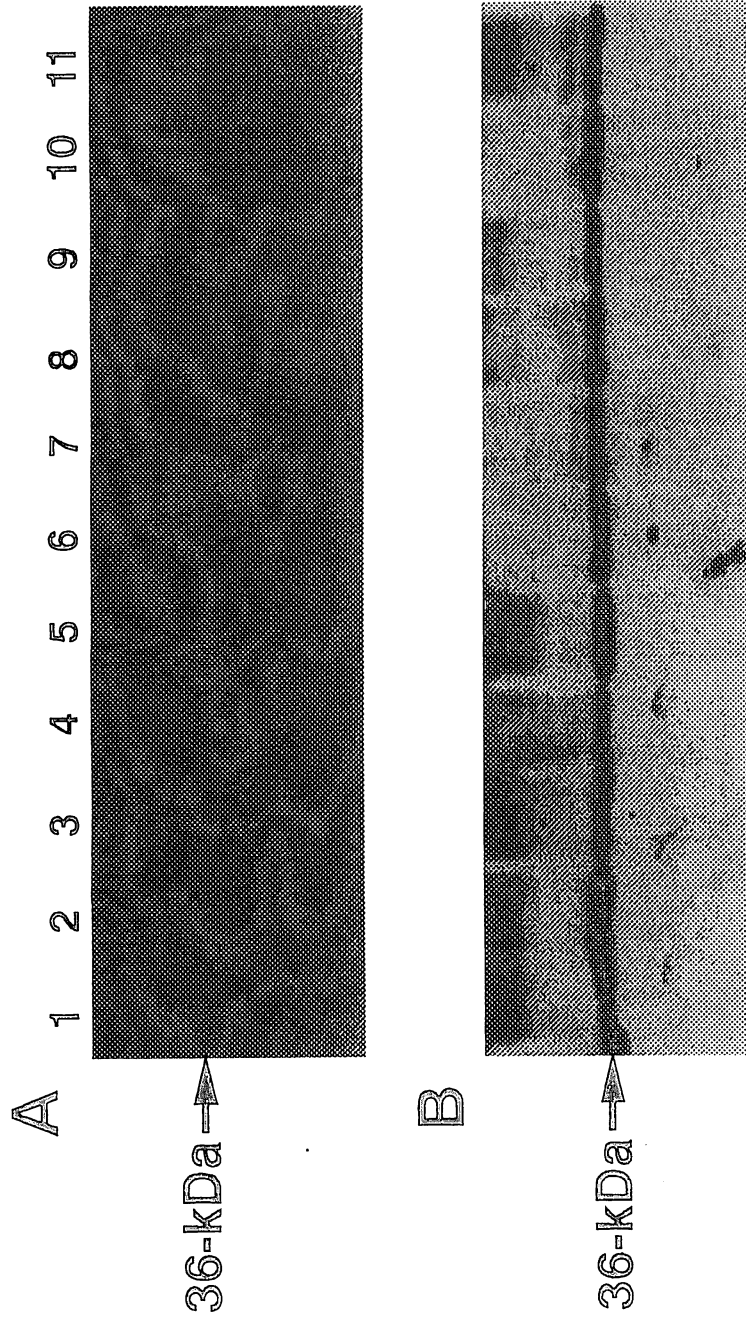


図 16 *S.aureus* 臨床分離菌株体のSDS抽出画分のZymogram及びImmunoblottingによる分析.

A.菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。B. 抗36-kDa溶菌酵素血清を用いたImmunoblotting。

Lane: 1, M-1-145; 2, U-60; 3, 31567; 4, U-78-1; 5, O-42; 6, 31574; 7, U-9-1; 8, 31565; 9, 31562; 10, 31570; 11,

M-1-143。

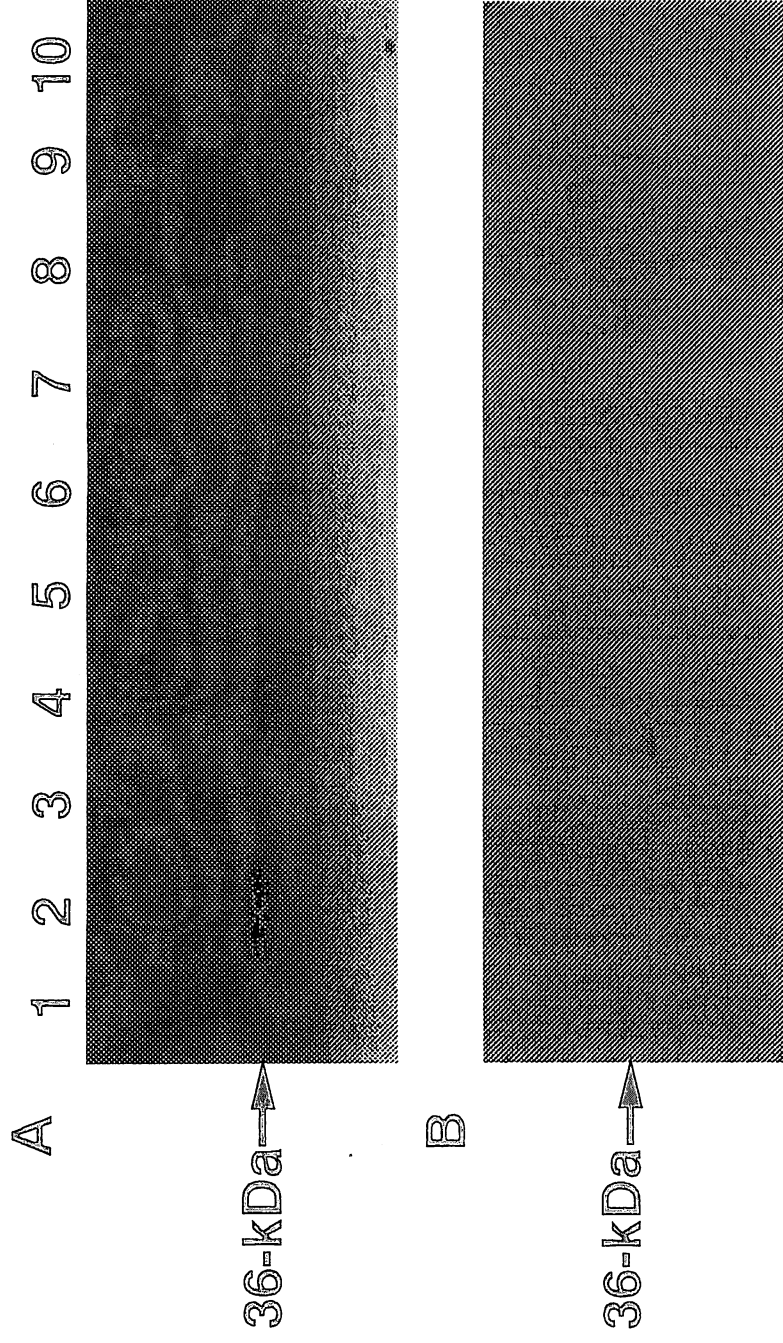


図 17 各種ブドウ球菌菌体のSDS抽出画分のZymogram及びImmunoblottingによる分析.

A. 菌体封入ゲル (*S. aureus*) を用いたZymogram。 B. 抗36-kDa溶菌酵素血清を用いた

Immunoblotting。 Lane: 1, *S. lugdunensis* ATCC438097; 2, *S. saprophyticus* ATCC15305; 3,

S. schleiferi N880033; 4, *S. capitis* ATCC27840; 5, *S. simulans* ATCC27848; 6, *S. xylosus*

ATCC27971; 7, *S. epidermidis* 1914; 8, *S. warnei* ATCC27836; 9, *S. sciuri* BCL1; 10, *S.*

haemolyticus ATCC29970。