

日和見病原性ウェルシュ菌のヒアルロン酸分解機構

—抗菌剤開発への展開—

概要

京都大学大学院農学研究科 久門 知也 修士課程学生（研究当時）と橋本 涉 同教授らの研究グループは、日和見感染症^{*1}や食中毒を惹起するウェルシュ菌^{*2} (*Clostridium perfringens*) の宿主動物細胞に侵入する候補因子としてヒアルロン酸^{*3}分解の初発酵素を同定しました。

ヒアルロン酸は、ウロン酸^{*4}とアミノ糖^{*5}からなる二糖の繰り返し配列をもつ多糖であり、動物の細胞外マトリックスとして機能します。細胞外マトリックスは、細胞の物理的障壁や細胞の分化と増殖にはたります。ヒト常在菌や病原菌の中には、細胞外マトリックスを定着や分解の標的とする細菌が存在します。

ウェルシュ菌は腸内に優占する細菌の一種ですが、時には日和見感染症や食中毒を引き起こします。その際、宿主動物細胞に侵入する因子として、ヒアルロン酸分解に機能するヒアルロニダーゼ^{*6} (mu トキシン) を生産します。これまでに、mu トキシンの構成要素としてエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NagHJK) が同定されています。本研究では、ウェルシュ菌標準株 (*C. perfringens* ATCC 13124) を対象に、ヒアルロン酸分解機構を再検証しました。その結果、ウェルシュ菌標準株のゲノムには同研究グループが連鎖球菌 (*Streptococcus*) に同定したグリコサミノグリカン (GAG) ^{*7} の分解・輸送・代謝に関わる遺伝子クラスターが存在すること、ヒアルロン酸存在下で NagHJK 遺伝子の発現は抑制される一方、GAG 遺伝子クラスターが顕著に発現すること、ならびに GAG 遺伝子クラスターにコードされる酵素ヒアルロン酸リアーゼ^{*8} HysA がヒアルロン酸分解の初発酵素として機能することが明らかになりました。

本研究では、mu トキシン (NagHJK) よりもヒアルロン酸リアーゼ (HysA) がウェルシュ菌標準株による宿主動物細胞に侵入する因子の一つとしてはたらし、本酵素がウェルシュ菌感染症に対する治療や予防の創薬ターゲットになる可能性が示されました。

本成果は、2024年10月22日に英国の国際学術誌「Scientific Reports」にオンライン掲載されました。

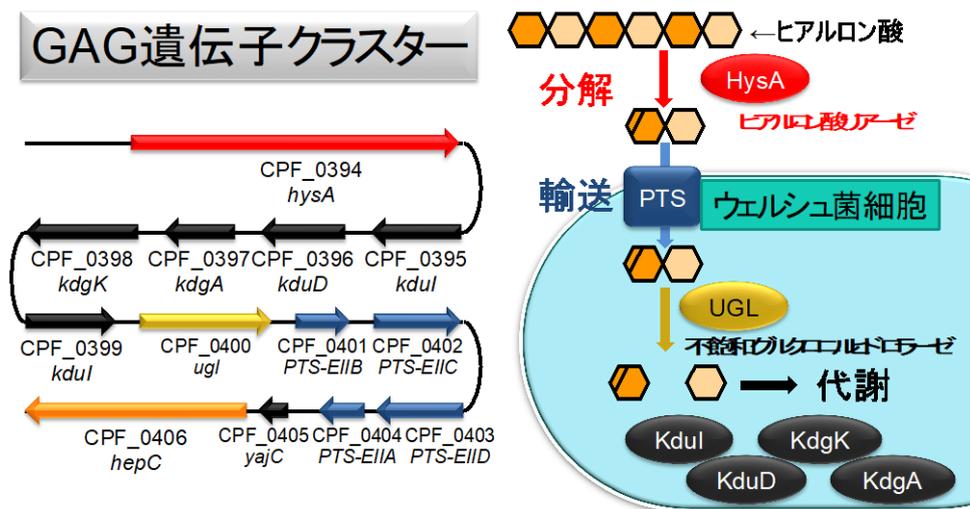


図. ウェルシュ菌の GAG 遺伝子クラスター (左) とヒアルロン酸分解機構 (右)

1. 背景

グリコサミノグリカン (GAG) は、動物細胞の外に分泌される細胞外マトリックスの主要な構成成分として存在するヘテロ多糖です。主にウロン酸 (グルクロン酸またはイズロン酸) とアミノ糖 (グルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン、または *N*-アセチルガラクトサミン) からなる二糖が GAG の構成単位となります。構成糖、グリコシド結合様式、および硫酸化レベルがそれぞれ異なるヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸、ヘパリン/ヘパラン硫酸などは典型的な GAG であり、動物細胞の構造維持や細胞どうしの接着などの多彩な機能を示します。一方、ある種の常在菌や病原菌は、宿主動物細胞に共生・感染する際、GAG を定着や分解の標的とします。同研究グループは、ヒト常在菌 (連鎖球菌 *Streptococcus*、乳酸桿菌 *Lactocaseibacillus*) や病原菌 (連鎖桿菌 *Streptobacillus*) を対象に、GAG の分解・輸送・代謝機構を明らかにしています。

ウェルシュ菌 (*C. perfringens*) はヒト腸内優占細菌の一種ですが、時には日和見感染症や食中毒を惹起します。これまでに、ヒアルロン酸分解に機能するヒアルロニダーゼ (μ トキシン) が宿主動物細胞に侵入する因子として知られており、その主要な構成要素としてエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (NagHJK) が同定されています。

2. 研究手法・成果

本研究では、まずウェルシュ菌標準株 (*C. perfringens* ATCC 13124) のヒアルロン酸分解性をハローアッセイにより再検証しました (図 1 左)。ハローアッセイ^{※9}では、GAG は BSA 存在下では酢酸の添加により共沈し白濁するのに対し、分解されると共沈せずに透明体 (ハロー) が現れます。その結果、類縁菌であるブチリカム菌 (*Clostridium butyricum*) やディフィシル菌 (*Clostridioides difficile*) とは異なり、ウェルシュ菌標準株 (*C. perfringens* ATCC 13124) がヒアルロン酸を分解することが再確認されました。さらに、栄養が乏しい poor (ー) 培地を用いて、ヒアルロン酸資化性を評価したところ、ヒアルロン酸存在下で有意に増殖が促進されることから (図 1 右)、ウェルシュ菌標準株はヒアルロン酸を栄養源として資化することが示されました。また、ヒアルロン酸のみならず、宿主動物細胞外に分泌されるムチン^{※10} に対しても資化性を示すことがわかりました。

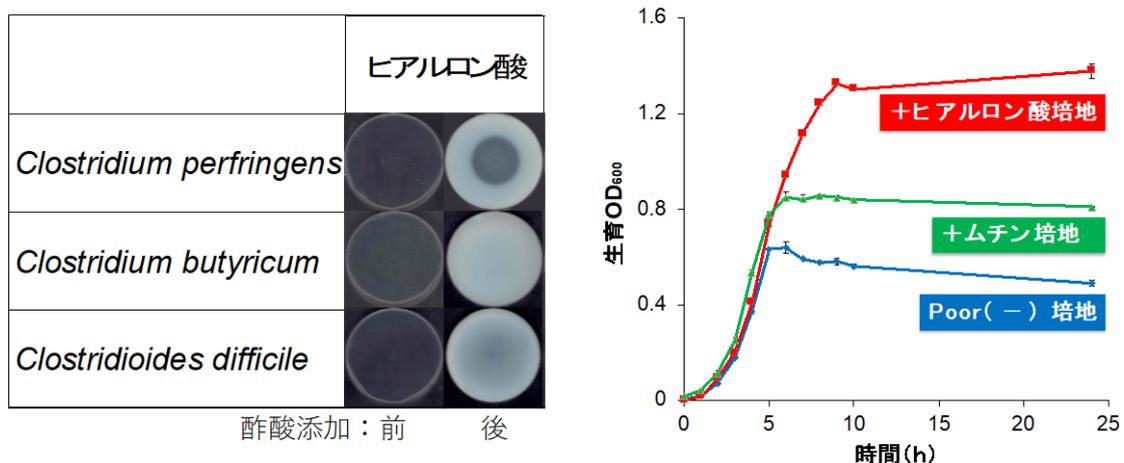


図 1. ヒアルロン酸分解性 (左) と資化性 (右)

ウェルシュ菌標準株のゲノムには、連鎖球菌や乳酸桿菌で見いだしている GAG の分解・輸送・代謝に関わる GAG 遺伝子クラスターが認められます (図. 左)。そこで、GAG 遺伝子クラスターを含めた網羅的な遺伝

子発現を調べるため、poor (－) 培地にヒアルロン酸またはムチンを添加した培地で盛んに増殖するウェルシュ菌標準株細胞を RNAsequence^{*11} に供しました。その結果、GAG 遺伝子クラスターは poor (－) 培地と比較してヒアルロン酸存在下では約 2-10 倍高く発現上昇していました (図 2)。一方、意外にも mu トキシンであるヒアルロニダーゼ (エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ NagHJK) の発現は抑制されていました。

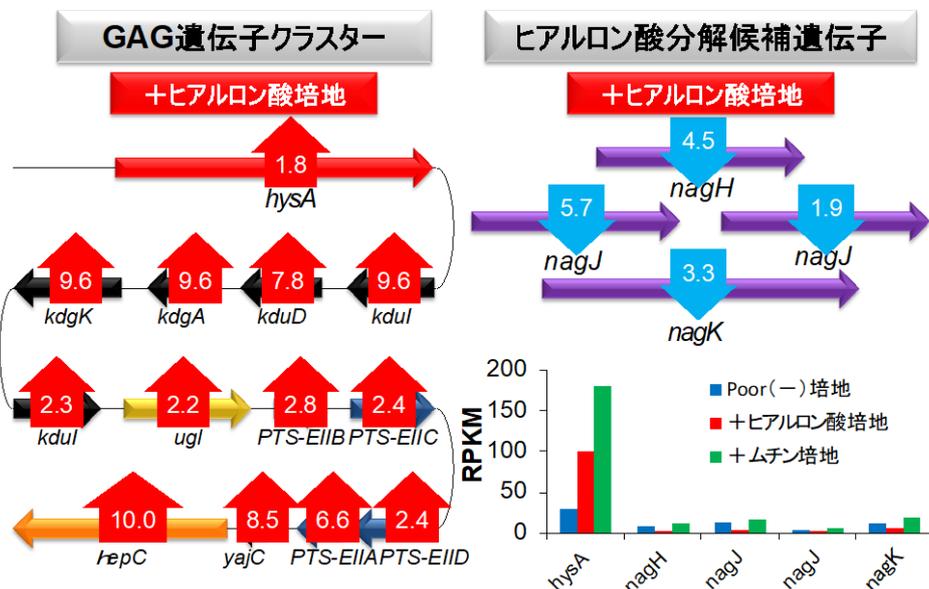


図 2. GAG 遺伝子クラスター (左) とヒアルロニダーゼ (右) の遺伝子発現

GAG 遺伝子クラスターが機能的に発現しているかを明らかにするため、遺伝子クラスターにコードされているヒアルロン酸リアーゼホモログ (CpeHysA) を遺伝子組換え大腸菌で発現させ、精製しました。精製 CpeHysA は β-脱離反応によりヒアルロン酸分解活性を示し、その反応至適 pH と温度はそれぞれ 5.5 と 60°C でした。ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリンを用いて調べたところ、本酵素はヒアルロン酸に特異的に作用することがわかりました。CpeHysA は一次構造に基づいて多糖リアーゼファミリー-8 (PL-8) に分類されます。HysA の立体構造を AlphaFold2^{*12} を用いてモデリングしたところ、本酵素は既知の PL-8 酵素 (ヒアルロン酸リアーゼやキサンタンリアーゼ) と類似の構造と活性部位をもつことが示唆されました (図 3)。

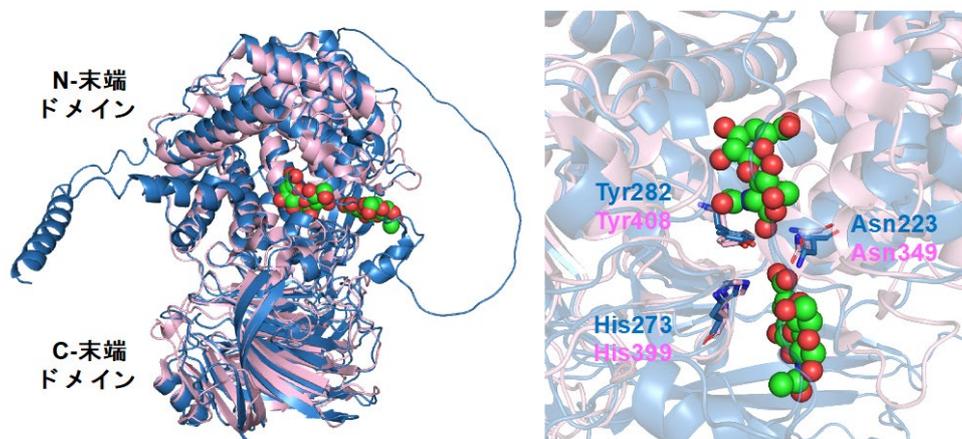


図 3. ヒアルロン酸リアーゼ CpeHysA の構造モデル (左) と活性部位 (右)

CpeHysA: 青、連鎖球菌 HysA: 桃、ヒアルロン酸二糖: 緑/赤玉

ウェルシュ菌標準株が実際に CpeHysA によりヒアルロン酸を分解しているかどうかを明らかにするため、ヒアルロン酸存在下で生育したウェルシュ菌標準株の細胞外と細胞内の各画分を調製し、CpeHysA とともにネイティブゲル電気泳動とハローアッセイを組み合わせた活性染色を行いました。その結果、主に細胞外画分に、CpeHysA と同じ位置にヒアルロン酸分解活性を示すバンドが確認できました (図 4)。このことから、ウェルシュ菌標準株は CpeHysA によりヒアルロン酸を分解することが示されました。

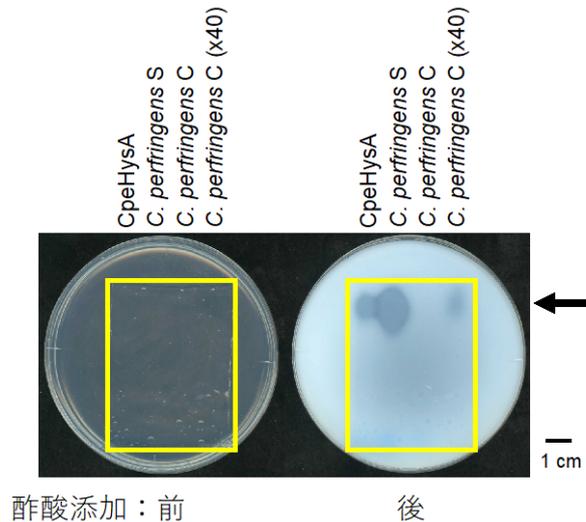


図 4. ウェルシュ菌標準株の CpeHysA の機能的発現

C. perfringens S: 細胞外、*C. perfringens* C: 細胞内、*C. perfringens* C (x40): 細胞内 40 倍濃縮

3. 波及効果、今後の予定

本研究により、ウェルシュ菌標準株は、従来ヒアルロン酸分解に機能すると同定されていたヒアルロニダーゼ (NagHJK) ではなくて、ヒアルロン酸リアーゼによりヒアルロン酸を分解することが明らかになりました。また、ウェルシュ菌標準株がヒアルロン酸の分解・輸送・代謝に関わる GAG 遺伝子クラスターを機能的に発現し、ヒアルロン酸資化性を示すことがわかりました。宿主動物細胞への侵入因子として機能するヒアルロン酸分解酵素や動物の細胞外マトリックスを栄養源として増殖するにはたらく GAG 遺伝子クラスターは創薬ターゲット^{*13}として位置づけられます。今後は、GAG 遺伝子クラスターにコードされるヒアルロン酸の分解・輸送・代謝機構の阻害剤の開発が求められます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (B) 15H04629、18H02166、21H02156) の支援を受けて実施されました。

<研究者のコメント>

「ウェルシュ菌と同様、ヒト常在菌や病原菌の多くのゲノムには、GAG 遺伝子クラスターが見いだされます。また、その遺伝子クラスター内の各遺伝子には多様性が認められます。今後は、GAG 遺伝子クラスターの発現と機能解析を進め、本クラスターと各細菌の常在性・病原性との相関、ならびに GAG 遺伝子クラスターの分子進化を明らかにする所存です。」 (橋本 渉)

<用語解説>

- ※1 **日和見感染症**：宿主の免疫力が低下している場合などに発症する感染症です。
- ※2 **ウェルシュ菌**：腸内優占菌の一種で、日和見感染症や食中毒を惹起します。
- ※3 **ヒアルロン酸**：動物の細胞外マトリックスを構成する多糖類の一種です。
- ※4 **ウロン酸**：分子内にカルボキシ基をもつ糖です。
- ※5 **アミノ糖**：分子内にアミノ基をもつ糖です。
- ※6 **ヒアルロニダーゼ**：ヒアルロン酸を加水分解する酵素です。
- ※7 **グリコサミノグリカン (GAG)**：ウロン酸とアミノ糖の繰り返し配列をもつ多糖類です。
- ※8 **ヒアルロン酸リアーゼ**：ヒアルロン酸を β -脱離反応により分解する酵素です。
- ※9 **ハローアッセイ**：GAGの分解を評価するための測定法です。
- ※10 **ムチン**：細胞外マトリックスと同様、動物細胞から分泌される粘液性糖タンパク質です。
- ※11 **RNAsequence**：遺伝子の発現を網羅的に解析する方法の一種です。
- ※12 **AlphaFold2**：タンパク質の立体構造を予測するプログラムです。
- ※13 **創薬ターゲット**：疾患と関連するタンパク質のはたらきを抑える創薬の標的ではあります。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Molecular identification of hyaluronate lyase, not hyaluronidase, as an intrinsic hyaluronan-degrading enzyme in *Clostridium perfringens* strain ATCC 13124 (ウェルシュ菌標準株における本質的なヒアルロン酸分解酵素としてのヒアルロン酸リアーゼの分子同定)

著者：Tomoya Kumon, Sayoko Oiki & Wataru Hashimoto

掲載誌：Scientific Reports DOI：10.1038/s41598-024-73955-y