

22N-am06

ウエルシュ菌細胞壁分解酵素 CPE1138 の生化学的解析と X 線構造解析

○玉井 栄治^{1,2}, 神鳥 成弘², 成谷 宏文³, 関谷 洋志¹, 渡部 あずさ¹, 牧 純¹ (¹松山大薬, ²香川大総合生命研セ, ³広島大生物圏科学)

【目的】細菌細胞壁は、細菌が生存する上で必須の構造であり抗菌薬の重要なターゲットである。一方、溶菌酵素（細胞壁分解酵素）は、次世代の抗菌薬としての可能性をもつもので、その作用部位によりムラミダーゼ、グルコサミニダーゼ、アミダーゼ、エンドペプチダーゼに分類される。本研究では、ウエルシュ菌が持つ溶菌酵素（CPE1138）の性質及び構造を明らかにすることを目的とした。

【方法】ウエルシュ菌 strain13 株の CPE1138 及びその各種変異体を発現するベクターを構築し大腸菌株 (BL21-RIL) を用いて発現させた。目的のタンパク質は、Ni-カラム又は TALON カラムを用いて精製を行い、溶菌活性測定、ザイモグラフィ、結合活性測定により生化学的解析を行った。また、各種結晶化キットを用いて結晶化を行い、得られた結晶を用いて X 線構造解析を行った。

【結果と考察】CPE1138 は、ホモロジー解析により N 末端にアミダーゼドメインと C 末端に新規の構造を持つ溶菌酵素であることが予想された。そこで、各種欠損変異体を作成し、生化学的解析を行った。その結果、溶菌活性には N 末端が必要であり、C 末端は細胞結合ドメインであることがわかった。さらに、精製した CPE1138 の生化学的解析によりウエルシュ菌に特異的に作用することがわかった。一方、CPE1138 の触媒ドメインの X 線構造解析を行った結果、2.0 Å の解像度で構造を決定することができた。その構造は、5 本のストランドからなる中央の β シートの両側に 5 本のヘリックスが配置されており、 β シート中央に金属イオン (Zn^{2+}) が含まれていた。このフォールドは、T7 lysozyme hold と呼ばれるものであり、アミダーゼ活性を持つ溶菌酵素によく見られるものであった。活性中心に関与するアミノ酸の変異体の解析結果より触媒反応機構を推定することができた。