

Clostridium  
sordelliiのレシチナーゼの一次構造に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4588">http://hdl.handle.net/2297/4588</a>

## *Clostridium sordellii* のレシチナーゼの一次構造に関する研究

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

金沢大学医学部医学科微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

道 輪 良 男

*Clostridium sordellii* (*C. sordellii*) と培養性状, 生物学的性状が極めて類似した菌種として *Clostridium bifermentans* (*C. bifermentans*) が存在する。両者は遺伝学的にも類似するが別菌種であることが判明している。*Clostridium* 属菌種にはレシチナーゼ産生菌が多数存在するが, その一次構造が明らかにされたのは *C. bifermentans* レシチナーゼ (*cbia*), *Clostridium novyi* (*C. novyi*) レシチナーゼ (*cna*), *C. perfringens* レシチナーゼ (*cpa*) にすぎない。本研究では *C. sordellii* レシチナーゼ (*csa*) について遺伝子クローニングを行い, 一次構造を決定し, *cbia*, *cna*, *cpa* との比較解析を行った。*csa* 遺伝子は 1197 ヌクレオチド, 399 アミノ酸残基から成っていた。成熟タンパクは 371 残基から成り, 28 残基のシグナルペプチドを有していた。*csa* と *cbia*, *cna*, *cpa* とのアミノ酸の同一性は各々 77.4%, 56.7%, 53.4% で, *cbia* と高い類似性を有していた。また, *Clostridium* 属レシチナーゼにて作成した分子系統樹は 16S リボソーム RNA で作成した *Clostridium* 属系統樹 (*Clostridium* 属の分類) によく合致していた。*csa* 大腸菌クローンは卵黄寒天上でレシチナーゼ反応を呈し, ウェスタンブロットにてその遺伝子の発現を確認できたが, 溶血活性は観察されなかった。さらに PCR 法によって *csa* 遺伝子の保有状況を検討した結果, レシチナーゼ反応陽性 *C. sordellii* 21 株全てが *csa* 遺伝子を保有し, 同陰性 1 株は PCR 陰性であった。

以上の結果は, 培養性状, 生物学的性状, 更に遺伝学的にも類似する *C. sordellii* と *C. bifermentans* は, 同時に分子系統樹上同一グループを形成する非常に類似したレシチナーゼを有することを示している。また, *csa* にはサイレント遺伝子がないことを示唆している。

**Key words** *Clostridium sordellii*, lecithinase, phospholipase C, *Clostridium bifermentans*

*Clostridium sordellii* (*C. sordellii*) は偏性嫌気性・グラム陽性・芽胞形成菌であり, 土壌, 正常なヒトおよび動物の糞便から分離される場合がある。本菌はヒトではガス壊疽<sup>1)</sup>, 新生児臍炎<sup>2)</sup>の起原菌として, またヒツジやウシでは腸炎, 腸性中毒症の起原菌<sup>3)</sup>として知られている。

*C. sordellii* と培養性状, 生物学的性状が極めて類似した菌種として *Clostridium bifermentans* (*C. bifermentans*) が存在する。両菌種はその類似性の故にその同一性については長い間決着を見なかったが, 1975年, Nakamuraら<sup>4)</sup>のDNA相同性実験により両者は遺伝学的にも類似するが別菌種であることが判明した。両者の主要な鑑別性状はウレアーゼ産生性と毒素原性である<sup>5)</sup>。*Clostridium* 菌種の同定上通常は有効である卵黄寒天上におけるレシチナーゼ反応中和試験では, 共に *cpa* に対する抗体により部分的に中和され, 両者が産生するレシチナーゼは極めて類似していることが想定されている。両菌種のレシチナーゼ遺伝子の解析は, 両菌種の系統発生的観点から関心がもたれるところである。

最近の遺伝子クローニング技術の進展により, 細菌の各種の毒素の遺伝子がクローニングされている。レシチナーゼは細菌が産生する主要な毒素の一つであり, *Clostridium* 属における主

要な産生菌種は *Clostridium absonum* (*C. absonum*), *Clostridium baratii* (*C. baratii*), *C. bifermentans*, *Clostridium ghonii*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium limosum*, *Clostridium novyi* (*C. novyi*), *C. perfringens*, *Clostridium sardiniense*, *C. sordellii* である。これらの菌種には互いにDNA相同性が高い菌種が存在し, それらのレシチナーゼについての遺伝学的類似性の解析が, 系統発生的視点のみならず, その酵素活性, 基質特異性の解明の点においても待たれている。しかしながら, 現在のところその一次構造が明らかにされたのは *C. bifermentans*<sup>7)</sup>, *C. novyi*<sup>8)</sup>, *C. perfringens*<sup>9)</sup> にすぎない。

以上を鑑み, 本研究では *C. sordellii* のレシチナーゼ (*csa*) について遺伝子クローニングを行い, 一次構造を決定した。さらに, 当該遺伝子検索のためのPCRプライマーにて, レシチナーゼ非産生 *C. sordellii* を含めレシチナーゼ遺伝子の検索を行った。

### 材料および方法

#### I. 使用菌株, 培地およびプラスミド

レシチナーゼ遺伝子のクローニングには, *C. sordellii* KZ 1842株, *C. perfringens* KZ 221株および *C. bifermentans* KZ 1012

平成12年11月27日受付, 平成13年1月24日受理

Abbreviations: BHI, brain heart infusion; *C. absonum*, *Clostridium absonum*; *C. baratii*, *Clostridium baratii*; *C. bifermentans*, *Clostridium bifermentans*; *C. novyi*, *Clostridium novyi*; *C. perfringens*, *Clostridium perfringens*; *C. sordellii*, *Clostridium sordellii*; NPPC, *p*-nitrophenylphosphorylcholine

株を用いた。レシチナーゼ遺伝子の保有状況を検討するためには、金沢大学医学部微生物学講座保存の *C. sordellii* 25株を用いた。形質転換用宿主大腸菌には TOP10F'株 (Invitrogen, Carlsbed, CA, USA) を用いた。プラスミドベクターとしては pCRII-TOPO (Invitrogen) および pKF3 (宝酒造, 京都) を用いた。遺伝子組み換え操作は機関承認を受けて B1P2EK1 レベルで行った。

*Clostridium* 属の培養は、液体培地であれば自家製肝片加肝ブイオンまたはブレインハートインフュージョン (brain heart infusion, BHI) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA), 平板培地であれば BHI 寒天培地または 10% 卵黄液加 BHI 寒天培地を用いて、嫌気下にて 37°C で行った。大腸菌の培養は、液体培地であれば 2×YT 培地<sup>10)</sup>、平板培地であれば 2×YT 培地または 10% 卵黄液加 2×YT 寒天培地を用いて、大気下にて 37°C で行った。必要に応じて振とう培養を行った。

## II. レシチナーゼ反応中和試験

半面に 1250 単位/ml の抗 cpa ウマ血清 (千葉県血清研究所, 市川) 0.1 ml を塗布した 10% 卵黄液加寒天培地に、肝片加肝ブイオン 18 時間培養菌液を画線塗抹し 48 時間 37°C にて嫌気培養を行った。

## III. 全 DNA の抽出

*Clostridium* 属からの全 DNA の抽出は Wang らの方法<sup>11)</sup> に従った。10 ml BHI による培養液から遠心分離した菌体を 25 単位のムタノリジン (ナカライテスク, 京都) と 500 μg のプロテアーゼ K (ナカライテスク) を含む TE [10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] にて 37°C で 45 分保温した後、10 μg の RNase と最終濃度 1% の SDS を加え、さらに 15 分保温した。菌体溶解液をフェノールおよびクロロホルム処理し、エタノール沈澱を行って精製 DNA を得た。ただし、レシチナーゼ遺伝子の保有状況を検討する際には簡便法を用いた。すなわち、1.5-2.0 ml 培養液から遠心分離した菌体を TE に懸濁し、5 分間煮沸した。その遠心上清をフェノールおよびクロロホルム処理し、エタノール沈澱を行って DNA を抽出した。大腸菌においては常法を用いた<sup>10)</sup>。

## IV. PCR

PCR 反応は、Takara Ex Taq (宝酒造) 2.5 単位、1×添付緩衝液、0.2 mM dNTP 混合液、1 μM センスおよびアンチセンスストランドプライマーに鋳型 DNA 抽出試料を加えて 25-50 μl の容量にし、GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City,

USA) または Touch Down Thermal Cycler (Hybaid Ltd., Ashford, UK) にて行った。PCR プライマーは北海道システムサイエンス社 (札幌) に合成を依頼した。使用した PCR プライマー、および反応条件は表 1, 2 の通りである。

## V. C. bifermentans, C. perfringens, C. novyi のレシチナーゼ遺伝子 cbia, cpa および cna

cbia, cpa および cna 遺伝子に関する情報は、それぞれ DDBJ/EMBL/GeneBank データバンクの AF072123, D32124 および D32125 から得た。cpa および cbia 遺伝子についてはプライマーセット KAG181-KAG182 および KAG220-KAG221 を作製し、各遺伝子を *C. perfringens* KZ 221 および *C. bifermentans* KZ 1012 の抽出 DNA から PCR により増幅して pCRII-TOPO にクローニングし、大腸菌 TOP10F' 株にて発現させた。

## VI. DNA 塩基配列の決定

BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて GeneAmp9700 にてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列を決定した。

## VII. ウェスタンブロット

大腸菌クローンは B-PER (Pierce, Rockford, USA) にて処理し、菌体抽出液を調製した。SDS-PAGE にてタンパクを分離し、トランスブロッター (アトー, 東京) を用いて PVDF 膜 (Immobilon P) (Millipore, Bedford, USA) に転写した。PVDF 膜を 5% 脱脂ミルク、0.1% Tween20 加 PBS でブロッキングした後、抗 cpa ウマ血清より ImmunoAssist MG-PP (関東化学, 東

Table 1. PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')
KAG181	AAATTAACGGGGATATAAAAATGAA
KAG182	CAAAACCAATAATTATTTTTTACTTTTATTATT
KAG209	TGGGATGGAAAAGATTGATGGAACAGG
KAG210	TTTCTCTTTTCTTATCCACATATTCCTGTATATC
KAG211	CTGCAGTAGTAGTCCAGGTCATGT
KAG212	CCTGTATCTGGGTCAAAGAAATGGTC
KAG213	CTGCAGACAATGAATATGCAGGAAC
KAG215	GGCCTATAAAAATTATGACTTTTTAAATACGGT
KAG216	CTCAAAGAGCTTATGTTCCACCAG
KAG220	GGATCCGCAATGCAAGATTAGAGGATATTA
KAG221	GGATCCTTATTTTATTTATGTAATAAGTTTCG
mF2	GAGCTCGTAAAGTGGCCAATCTAACGT

Table 2. Conditions for PCR

Primer set	Initial denaturation [Temperature (°C)/ duration (sec)]	Denaturation [Temperature (°C)/ duration (sec)]	Annealing [Temperature (°C)/ duration (sec)]	Extension [Temperature (°C)/ duration (sec)]	Cycle
KAG181-KAG182	94/60	94/20	58/15	72/30	30
KAG209-KAG210	94/60	94/20	45/15	72/30	30
KAG211-KAG210	94/60	94/20	50/20	72/20	30
KAG212-mF2	94/60	94/20	60/15	72/30	30
KAG213-mF2	94/60	94/20	60/15	72/30	30
KAG215-KAG216	94/60	94/20	60/15	72/30	30
KAG220-KAG221	94/60	94/30	45/30	72/60	30

京)にて精製した抗cpaウマIgGと1時間、次いで西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウマIgGヤギIgGと1時間インキュベーションした。反応の検出は、ECL検出システム(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)でLumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて行った。

#### VII. 溶血試験

等張ほう酸緩衝液<sup>7)</sup>にて試料(菌体抽出液)の2倍希釈系列をマイクロタイタープレート上に作製し、その試料希釈系列100  $\mu$ lに同じく等張ほう酸緩衝液浮遊1%羊赤血球100  $\mu$ lを加えた。37℃に1時間静置した後4℃に30分静置し、目視にて溶血を測定した。溶血を生じた最高希釈倍数の逆数を単位/60分と

した。

#### IX. ニトロフェニルホスホリルコリン (*p*-nitrophenylphosphorylcholine, NPPC) 水解試験

NPPC水解試験はKurokiら<sup>12)</sup>の方法に準じた。本試験はホスホリパーゼC活性を測定するためのひとつの方法である<sup>12)</sup>。光路長1 cmのキュベット中で、試料を含む20 mM NPPC, 0.25 M Tris · Cl pH 7.2, 60% グリセロールから成る1 ml反応液を35℃で保温し、吸光度410 nm ( $A_{410}$ )を測定した。

#### X. *Clostridium* 属菌種レシチナーゼの系統樹

系統樹作成にはアミノ酸配列を用いてClustal W version 1.8を使用した。

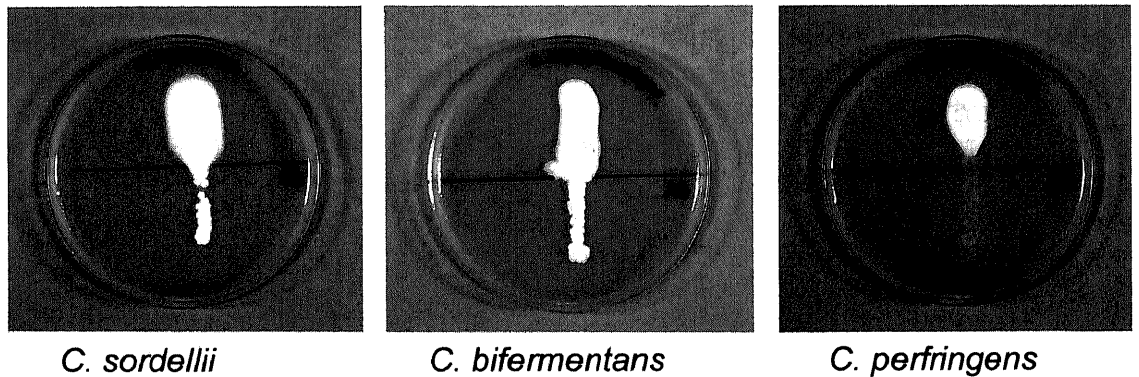


Fig. 1. Half-antitoxin tests for *C. sordellii*, *C. bifermentans*, and *C. perfringens*. Anti-cpa serum was spread on the lower half of each plate.

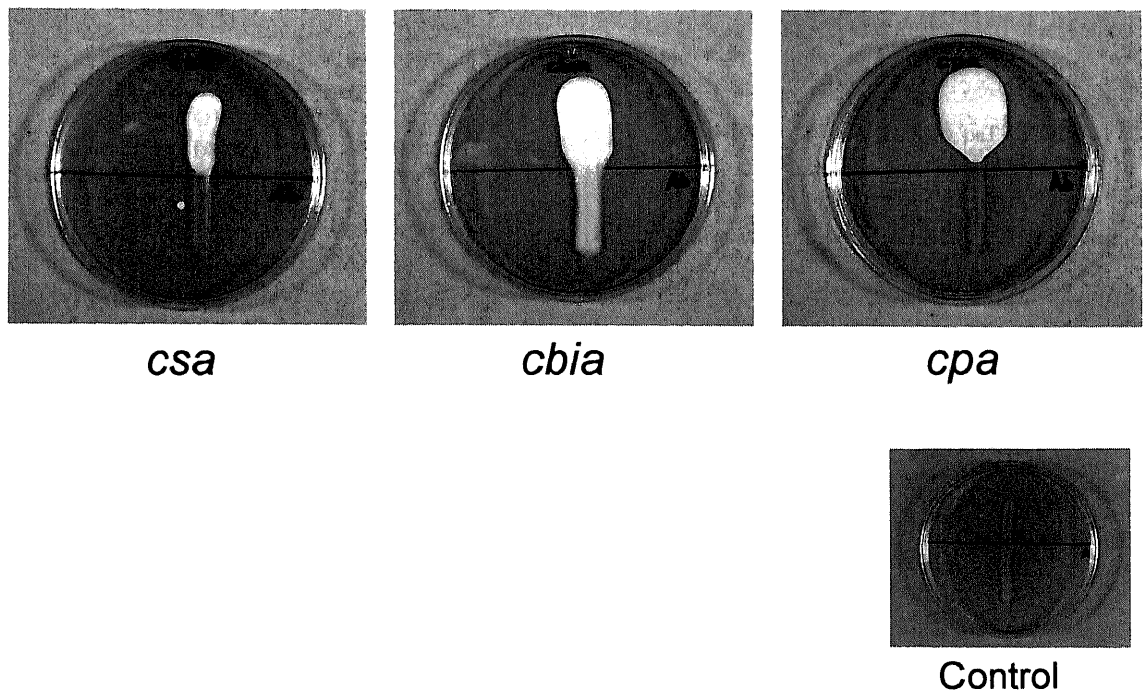


Fig. 2. Half-antitoxin tests for *E. coli* clones containing the *csa*, *cbia*, and *cpa* genes.

成 績

I. C. perfringens, C. bifermentans, C. sordellii のレシチナーゼ中和反応

C. perfringens のレシチナーゼ反応は抗cpa血清により完全に中和されたが, C. bifermentans および C. sordellii のレシチナーゼ反応は不完全に中和されたにすぎなかった (図1).

II. csa 遺伝子のクローニング

C. sordellii KZ 1842 の DNA を BamHI, HindIII および HincII にて消化し, pCRII-TOPO を用いて DNA ライブラリーを作製した. そのライブラリーにて大腸菌 TOP10F<sup>+</sup> を形質転換し, 10% 卵黄液加 2×YT 寒天培地に塗布し, 37℃にてインキュベーションした. しかし, レシチナーゼ反応陽性クローンは得られなかった. そこで, まずこれまでに明らかにされた Clostridium 属のレシチナーゼのアミノ酸配列を比較し, それら配列の保存領域に PCR 用共通プライマーを設定しその部分をクローニングすることを試みた. C. sordellii KZ 1842 株の全 DNA を鋳型として, プライマーセット KAG209-KAG210 にて PCR 反応を行うと, 予想される約 1 kb の DNA 断片が増幅された. この断片をクローニングし塩基配列を決定したところ, この DNA 断片は他のレシチナーゼ遺伝子との比較から C. sordellii のレシチナーゼ遺伝子 csa の一部であると判明した. 次に, 単一特異的プライマー PCR 法 (single-specific-primer-PCR)<sup>13)</sup> を用いて csa 全長

の塩基配列を明らかにすることを試みた. まず, 全 DNA を HindIII にて消化し, pKF3 プラスミドベクターに挿入し DNA ライブラリーを作製した. 次に csa 部分断片内部に設定した PCR プライマー (KAG212, 上流部増幅用; KAG213, 下流部増幅用) と, pKF3 ベクター内に設定した PCR プライマー (mF2) とを用いて PCR を行い, 増幅された断片をクローニングした. それら断片の塩基配列を決定することによって, csa 遺伝子全長の塩基配列を明らかにした. 最終的に, これら明らかにした塩基配列から PCR プライマーセット KAG215-KAG216 を作製し, csa 遺伝子全長を含む DNA 断片を PCR 増幅し pCRII-TOPO にクローニングし, 大腸菌 TOP10F<sup>+</sup> 株にて csa を発現させた (図2).

III. レシチナーゼ一次構造の解析

1. Clostridium 属レシチナーゼ一次構造の比較

csa 遺伝子は 1197 スクレオチド, 399 アミノ酸残基から成っていた. 他の Clostridium 属レシチナーゼとの比較により, 成熟タンパクは 371 残基から成り, 28 残基のシグナルペプチドを有していると考えられた. これまでに一次構造の明らかになっている Clostridium 属レシチナーゼ (成熟タンパク), cbia, cpa, cna とのアミノ酸配列の比較を図3に, アミノ酸同一性を表3に示した. いずれのレシチナーゼにも酵素活性・生物活性発現に重要であると報告されている7つのアミノ酸残基, トリプトファン1, ヒスチジン11, ヒスチジン68, ヒスチジン126, ヒス

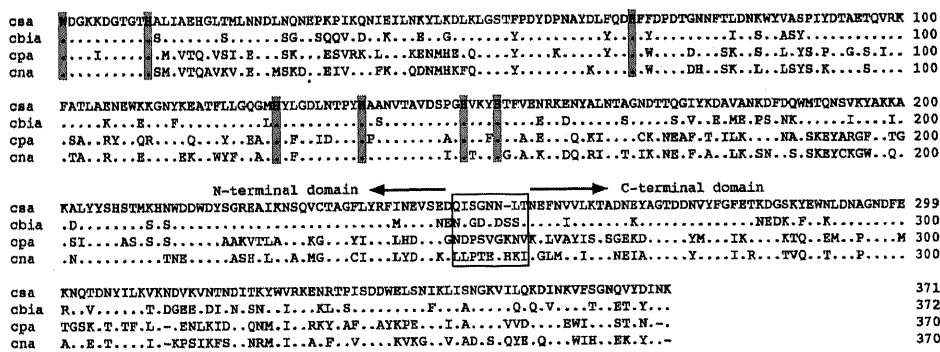


Fig. 3. Alignment of deduced amino acid sequences of csa, cbia, cpa and cna. Amino acid residues essential for biological activities<sup>14)</sup> are shaded. The flexible linker portion is boxed. N- and C-terminal domains are depicted by arrows.

Table 3. Comparison of amino acid sequences of clostridial lecithinases

Lecithinase	% identity (N-terminal domain/C-terminal domain*) to			
	csa	cbia	cpa	cna
csa	-	77.4 (81.7/71.8)	53.4 (58.1/45.3)	56.7 (59.8/53.9)
cbia	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)
cna	56.7 (59.8/53.9)	54.6 (59.4/48.7)	61.9 (68.7/51.3)	-

\*N- and C-terminal domains were defined as described in reference 14 and indicated in Fig. 3.

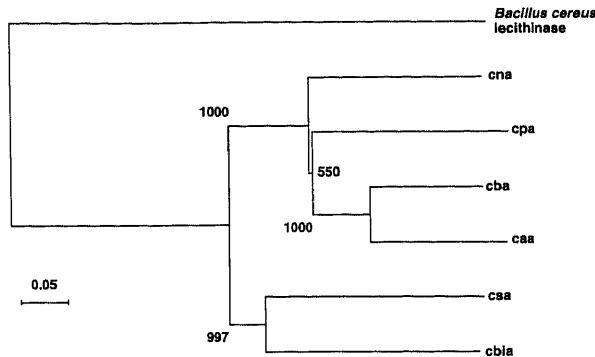


Fig. 4. Dendrogram showing the relationships of *can*, *cpa*, *cba*, *caa*, *csa*, and *cbia*. Amino acid sequences of lecithinases were used for analysis. The reliability of tree nodes was analyzed by generating 1000 bootstrap trees (indicated). Sequence data of *caa* and *cba* were provided from Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University (unpublished data). *Bacillus cereus* lecithinase (accession number X12854), an outgroup. Bar, 0.05 substitutions/site.

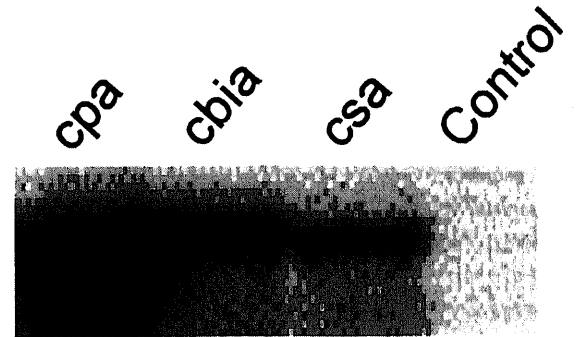


Fig. 5. Western blot analysis of *E. coli* clones containing clostridial lecithinases with anti-*cpa* IgG.

チジン 136, ヒスチジン 148, グルタミン酸 152<sup>10</sup>は保存されていた (図3). *csa*は *cpa*や *cna* (アミノ酸同一性は配列全体でそれぞれ 53.4%および 56.7%)と比較して *cbia*との類似性が著しく高く, アミノ酸同一性は全体で 77.4%, N末端ドメインおよび C末端ドメインにおいてそれぞれ 81.7%と 71.8%であった (表3). 4つのレシチナーゼにおいて, C末端ドメインよりも N末端ドメインのほうが互いに類似性が高く, アミノ酸同一性でみれば約 10%の差があった. *cpa*と *cna*の配列全体のアミノ酸同一性は 61.9%であった.

## 2. Clostridium 属レシチナーゼの分子系統樹

アミノ酸配列による分子系統樹を図4に示した. *Clostridium*属レシチナーゼはまず, *csa*および *cbia*のグループと, *cna*, *cpa*, *C. bifementans*レシチナーゼ (*cba*) および *C. absonum*レシチナーゼ (*caa*)とのグループに大別された. 後者はさらに *cba*および *caa*がサブグループを形成することが明らかになった.

## IV. 大腸菌におけるレシチナーゼの活性発現

### 1. レシチナーゼ遺伝子の発現

*csa*, *cbia*, *cpa*の各レシチナーゼ遺伝子の*E. coli*大腸菌における発現を解析するために, 抗*cpa*抗体を用いウェスタンブロットを行った (図5). いずれの場合でも目的のレシチナーゼが発現していることが観察されたが, *csa*と *cbia*の発現は *cpa*に比較して顕著に低かった.

### 2. 卵黄反応, 溶血活性およびNPPC水解活性

48時間培養で, *cpa*大腸菌クローンではレシチナーゼ反応を示す白濁帯が非常に大きく, *cbia*がこれに次ぎ *csa*は小さかった (図2). 菌体抽出液を用いて溶血活性およびNPPC水解活性を測定したが, *cpa*が  $8510 \pm 208$  (平均±標準偏差) 単位/mg タンパク/60分の溶血活性を示したのみで, NPPC水解活性はいずれのレシチナーゼも示さなかった.

### V. csa 遺伝子の保有状況

*C. sordellii*における *csa* 遺伝子の保有状況を検討するため, 569 bpの増幅断片を予定する KAG211-KAG210プライマーセットによってPCRを行った (図6). 被験22株中21株 (95.5%)が卵黄寒天培地上でレシチナーゼ反応を呈し, そのいずれもが *csa* 遺伝子を保有していた. 一方レシチナーゼ反応を示さなかった1菌株 (KZ 1878) はPCR陰性であった.

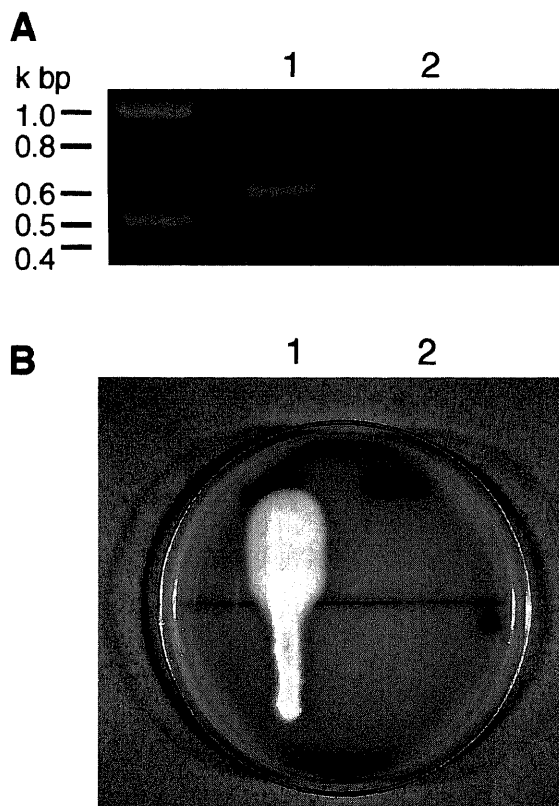


Fig. 6. PCR detection of the *csa* gene among *C. sordellii* isolates. (A) Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of the *csa* gene. Lane 1, a lecithinase-reaction-positive and PCR-positive strain (KZ 1842); lane 2, a lecithinase-reaction-negative and PCR-negative strain (KZ 1878). (B) Half-antitoxin tests. 1. strain KZ 1842; 2. strain KZ 1878.

## 考 察

cpa においては結晶構造解析がなされている<sup>15)16)</sup>。それによれば、cpa は大きく N 末端ドメインと C 末端ドメインの 2 つに分かれていて、その間を可動性リンカーが連結した構造をしている。N 末端ドメインは触媒ドメインと呼ばれホスホリパーゼ C 活性を有し、一方 C 末端ドメインは膜結合部位であると推測されている。さらに C 末端ドメインは真核生物のホスホキナーゼ C や腓リパーゼ等の C2 ドメインと構造上の類似性が示されている<sup>15)</sup>。C2 ドメインは約 120 アミノ酸残基を持つカルシウムまたはリン脂質、または両者の結合ドメインのことで、真核生物の脂質代謝や情報伝達系に関わるタンパクに広く存在し、脂質を介したセカンドメッセンジャー系、GTPase の活性化、リン酸化コントロールの過程に関与している<sup>17)</sup>。cbia と cpa については、研究者によって相違はあるものの、cbia に比較して cpa の溶血活性・マウス致死活性が 100 倍程度活性が高いことがわかっており<sup>7)10)18)</sup>、その理由のひとつが C 末端ドメイン構造の違いにあることが明らかにされている<sup>18)</sup>。すなわち、レシチナーゼ C 末端ドメインは宿主細胞の生体膜の脂質に結合することによって、レシチナーゼ本来の酵素活性以外に、細胞の情報伝達系・代謝系を修飾してカスケード的に細胞障害に与えることが推測される。C 末端ドメイン構造の違いによってそのカスケード的な細胞障害の程度が異なると考えられる。

本研究では C. sordellii レシチナーゼ遺伝子、csa の一次構造を決定したことによって、他の Clostridium 属レシチナーゼとの類似性が明らかになった。すなわち、培養性状、生物学的性状が極めて類似する C. bifementans のレシチナーゼ、cbia と非常によく類似していた。ただし、両菌種は遺伝学的にも類似する (DNA 相同性は約 70%) が別菌種であるごとく、そのアミノ酸同一性の程度から、csa と cbia は類似しているが、同一遺伝子の単なる変異体ではなく別の相同遺伝子であることが明らかになった。C. sordellii と C. bifementans は極めて類似しているが、前者と比較すれば後者は病原性が非常に低い菌種である。その主な理由は産生する毒素の相違によるが、cbia および csa もまた両菌種の病原性の差異に関与している可能性がある。それ故、C 末端ドメインの同一性を検討したが、両者の C 末端ドメインとも生物活性が強い cpa と約 45% の同一性を示し、有意な差異は見出せなかった。

これまで cpa, cbia, cna に関して分子系統解析がなされているが<sup>9)10)</sup>、他の Clostridium 属菌種のデータがなかったため、その意義について明確ではなかった。現在 Clostridium 属の分類に最もよく用いられている 16S リボソーム RNA で作成した Clostridium 属系統樹によれば、C. novyi, C. perfringens, C. absonum, C. baratii はクラスター I に、C. sordellii と C. bifementans はクラスター XI に分類され、しかも C. absonum, C. baratii は近縁に位置している<sup>20)</sup>。今回作成したレシチナーゼの系統樹は 16S リボソーム RNA で作成した系統樹とよく合致していた。全ての Clostridium 属菌種がレシチナーゼを保有しているわけではない。しかしながら今回の所見は Clostridium 属分類に関して興味深い所見であり、今後他の Clostridium 属菌種のレシチナーゼの一次構造が明らかになることによって Clostridium 属分類におけるレシチナーゼの重要性が再認識されることが予測された。

cpa, cbia, cna の大腸菌クローンはいずれも卵黄寒天培地上

でレシチナーゼ反応を呈し、ウェスタンブロットにてその発現を確認できた。一方、溶血活性は cpa のみ観察され、NPPC 水解活性はいずれにおいても観察されなかった。ウェスタンブロットに用いた一次抗体は抗 cpa ウマ IgG であり、交叉反応を利用して各レシチナーゼを検出している。従って、図 5 の反応の濃度は必ずしも真の発現程度を正確に反映しているとはいえない。しかし、おおよその発現量は推測可能であり、cpa の発現が顕著であるのに対し、csa と cbia ではさほど高くはなかった。各レシチナーゼの大腸菌クローンは、発現程度に差はあるが菌を培養している期間中レシチナーゼを卵黄寒天培地に産生し続けることから、全てのレシチナーゼにおいてレシチナーゼ反応陽性を示したと考えられる。溶血活性と NPPC 水解活性の結果においては、発現量もさることながら、精製標品ではなく大腸菌抽出液を用いていることによって受ける影響 (アッセイ感度が相対的に低くなること、大腸菌抽出液中に酵素反応阻害物が存在するかもしれないことなど) を考慮しなければならない。詳細な酵素学的な解析あるいは C 末端ドメインの細胞に与える影響の解析を行うためには各レシチナーゼの精製標品を用いる必要があり、その点が今後の課題である。今後新たに Clostridium 属レシチナーゼファミリーの構造と機能を明らかにすることによって、Clostridium 属レシチナーゼファミリーを細胞生物学用ツールとして、用途に応じて使い分けて利用することができる可能性が考えられた。

本研究において C. sordellii 分離株を用いて csa の PCR による検出を試みた結果、csa 遺伝子を保有しないと考えらる菌株を見出した。レシチナーゼ反応陰性の C. sordellii 菌株は既に報告されているが<sup>21)</sup>、本研究における菌株も含め、レシチナーゼ陰性 (表現型および遺伝子型両者含む) の菌株については、生化学的、生物学的、遺伝学的性状および csa 遺伝子の再検討を必要とすると考えられる。Clostridium 属菌種にとってレシチナーゼ産生性は、C. perfringens の同定<sup>22)</sup>、C. sordellii と Clostridium difficile との鑑別に用いる<sup>23)</sup> など、鑑別同定のための性状として重要である。従って、Clostridium 属レシチナーゼファミリーの研究が発展することによって、特異プライマー PCR による各 Clostridium 属レシチナーゼ遺伝子の検出、あるいは特異的ペプチド抗体による酵素抗体法等により、C. sordellii と C. bifementans の鑑別同定 (C. sordellii 中にはウレアーゼ陰性、毒素非産生で、C. bifementans との鑑別が極めて困難な菌株が存在する<sup>24)</sup>) をも含め、Clostridium 属菌種感染症の新たな診断法の開発に繋がる可能性がある。

## 結 論

C. sordellii のレシチナーゼ遺伝子 csa をクローニングし、一次構造を決定することによって以下の結果を得た。

1. csa 遺伝子は 1197 ヌクレオチド、399 アミノ酸残基からなっていた。また
2. 他の Clostridium 属レシチナーゼとの比較から、成熟タンパクは 371 アミノ酸残基から成り、28 アミノ酸残基のシグナルペプチドを有していると考えられた。
3. Clostridium 属レシチナーゼの分子系統樹を作成し、csa と cbia は同一のグループを形成し、全体的には 16S リボソーム RNA による Clostridium 属系統樹 (Clostridium 属の分類) とよく合致していた。
4. csa 遺伝子検出のための PCR 法を開発し、C. sordellii 22

菌株について検討した結果、レシチナーゼ反応陽性21株全てが *csa* 遺伝子を保有し、同陰性1株は当該遺伝子を有していなかった。

以上の結果は、培養性状、生物学的性状、さらに遺伝学的にも類似する *C. sordellii* と *C. bifermentans* は、同時に分子系統樹上同一グループを形成する遺伝学的に類似するレシチナーゼを有することを示している。また、*csa* にはサイレント遺伝子がないことを示唆している。

#### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部外科学第二講座三輪見一教授ならびに終始直接御指導、御校閲いただきました金沢大学医学部微生物学講座中村信一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究遂行にあたり、終始直接の多大なる御指導と御協力を頂きました金沢大学医学部微生物学講座唐澤忠宏助教授、王興民学士に心から感謝の意を表します。さらに本研究遂行にあたり多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部微生物学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Willis AT. Clostridia of wound infection, 1st ed, p218-234, Butterworth & Co., London, 1969
- 2) Willis AT. Gas gangrene and clostridial cellulitis. In BI Deurden, BS Drasar (eds), Anaerobes in Human Disease, 1st ed, p299-323, John Wiley & Sons, New York, 1991
- 3) Adamkiewicz TV, Goodman D, Burke B, Lyerly DM, Goswitz J, Ferrieri P. Neonatal *Clostridium sordellii* toxic omphalitis. *Pediatr Infect Dis J* 12: 253-257, 1993
- 4) Al-Mashat RR, Taylor DJ. Bacteria in enteric lesions of cattle. *Vet Rec* 112: 5-10, 1983
- 5) Al-Mashat RR, Taylor DJ. *Clostridium sordellii* in enteritis in an adult sheep. *Vet Rec* 112: 19, 1983
- 6) Nakamura S, Shimamura T, Hayashi H, Nishida S. Reinvestigation of the taxonomy of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*. *J Med Microbiol* 8: 299-309, 1975
- 7) Tso JY, Siebel C. Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infect Immun* 57: 468-476, 1989
- 8) Titball RW, Hunter SE, Martin KL, Morris BC, Shuttleworth AD, Rubidge T, Anderson DW, Kelly DC. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* 57: 367-376, 1989
- 9) Tsutsui K, Minami J, Matsushita O, Katayama S, Taniguchi Y, Nakamura S, Nishioka M, Okabe A. Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* type A to E and *Clostridium novi*. *J Bacteriol* 177: 7164-7170, 1995
- 10) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 11) Wang X, Maegawa T, Karasawa T, Kozaki S, Tsukamoto K, Gyobu Y, Yamakawa K, Oguma K, Sakaguchi Y, Nakamura S. Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. *Appl Environ Microbiol* 66: 4992-4997, 2000
- 12) Kurioka S, Matsuda M. Phospholipase C assay using *p*-nitrophenylphosphoryl-choline together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal Biochem* 75: 281-289, 1976
- 13) Shamala V, Ames GFL. (1993) Single specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR) and genome walking. In BA White (ed), *Methods in Molecular Biology*, 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications p339-348, Humana Press Inc., Totowa.
- 14) Titball RW, Naylor CE, Basak AK. The *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin. *Anaerobe* 5: 51-64, 1999
- 15) Naylor CE, Eaton JT, Howells A, Justin N, Moss DS, Titball RW, Basak AK. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat Struct Biol* 5: 738-46, 1998
- 16) Basak AK, Howells A, Eaton JT, Moss DS, Naylor CE, Miller J, Titball RW. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of alpha-toxin from two different strains (NCTC8237 and CER89L43) of *Clostridium perfringens*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 1425-1428, 1998
- 17) Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5: 2375-2390, 1996
- 18) Jepson M, Howells A, Bullifent HL, Bolgiano B, Crane D, Miller J, Holley J, Jayasekera P, Titball RW. Differences in the carboxy-terminal (putative phospholipid binding) domains of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* phospholipases C influence the hemolytic and lethal properties of these enzymes. *Infect Immun* 67: 3297-3301, 1999
- 19) Kameyama K, Matsushita O, Katayama S, Minami J, Maeda M, Nakamura S, Okabe A. Analysis of the phospholipase C gene of *Clostridium perfringens* KZ1340 isolated from antarctic soil. *Microbiol Immunol* 40: 255-263, 1996
- 20) Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JA. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44: 812-826, 1994
- 21) Popoff MR, Guillou J-P, Carlier J-P. Taxonomic position of lecithinase-negative strains of *Clostridium sordellii*. *J Gen Microbiol* 131: 1697-1703, 1985
- 22) Nakamura S, Shimamura T, Hayase M, Nishida S. Numerical taxonomy of saccharolytic clostridia, particularly *Clostridium perfringens*-like strains: description of *Clostridium absonum* sp. n. and *Clostridium paraperfringens*. *Int J Syst Bacteriol* 23: 419-429, 1973
- 23) Nakamura S, Shimamura T, Nishida S. Urease-negative strains of *Clostridium sordellii*. *Can J Microbiol* 22: 673-676, 1976



**A Study on the Primary Structure of Lecithinase Gene from *Clostridium Sordellii*** Yoshio Michiwa, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **110**, 126 — 133 (2001)

**Key words** *Clostridium sordellii*, lecithinase, phospholipase C, *Clostridium bifermentans*

**Abstract**

*Clostridium sordellii* (*C. sordellii*) and *Clostridium bifermentans* (*C. bifermentans*) resemble each other in cultural and biological properties. They are also related genetically but elucidated to be different species. Although many of the clostridia produce lecithinases, only the three lecithinases from *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) (*cpa*), *C. bifermentans* (*cbia*), and *Clostridium novyi* (*C. novyi*) (*cna*) have been determined at the DNA sequence level. In the present study, the *C. sordellii* lecithinase gene (*csa*) was cloned in *Escherichia coli* (*E. coli*) and the primary structure was determined. The *csa* gene consisted of 1197 nucleotides encoding 399 amino acid residues including a 28-amino-acid signal peptide. Amino acid identities of *csa* with *cbia*, *cna*, and *cpa* were 77.4, 56.7 and 53.4%, respectively, and *csa* was highly homologous to *cbia*. A phylogenetic tree deduced from the amino acid sequences of clostridial lecithinases showed a good agreement with analyses of the 16S ribosomal RNA sequences. The *E. coli* strain containing *csa* presented the lecithinase reaction on an egg-yolk-agar plate and gene expression was demonstrated with a Western blot. However, hemolytic and *p*-nitrophenylphosphorylcholine (NPPC) hydrolysing activities were not found. Occurrence of the *csa* gene in *C. sordellii* strains was tested for with the PCR assay. Twenty-one lecithinase-reaction-positive strains were shown to possess the *csa* gene, while one lecithinase-reaction-negative strain was PCR-negative. These results demonstrate that lecithinases from *C. sordellii* and *C. bifermentans*, which are closely related taxonomically, are highly homologous to each other, especially when compared to the other clostridial species tested. Furthermore, the silent *csa* genes are not likely to occur in *C. sordellii* strains.