

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月29日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11485

研究課題名(和文) 歯周病原細菌による有臭有毒物質産生を抑制する化合物の探索と改良

研究課題名(英文) Searching and improvement of the compounds that prevent production of odorous and toxic substances produced by periodontal pathogens

研究代表者

毛塚 雄一郎 (Kezuka, Yuichiro)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50397163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口臭の原因物質である揮発性硫化物や短鎖脂肪酸の産生に関与する歯周病細菌由来酵素に着目し、研究を実施した。酢酸合成に関わるリン酸トランスアセチラーゼと酢酸キナーゼは、歯周病菌のキーストーン病原体である *Porphyromonas gingivalis* の生育に必須であることが強く示唆され、これらの酵素学的性質および結晶構造を明らかにした。これは、今後の阻害剤探索に向けた基盤と位置付けられる。また、揮発性硫化物の一つであるメチルメルカプタンを産生する酵素に対しては、阻害剤の評価系を構築し、その精度がスクリーニングに十分堪えることを確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病治療は、歯石や歯垢の除去といった物理的処置が基本であるが、炎症が重度の場合には、抗菌薬の経口投与や局所への直接投与がなされる。しかし、このような薬物療法は既存の抗菌薬の中から感染原因菌に対して感受性が高いものを選んでいくに過ぎない。本研究で得られた成果は、特定のキーストーン病原体の生育を特異的に抑制する医薬品候補化合物の探索の基礎となることが期待できる。つまり、口腔細菌叢全体への影響が極めて少ない、革新的な歯周病の薬物療法を開拓することにつながる可能性がある。また、構築した阻害剤の評価系は、酵素阻害という新規作用機序を持った口臭予防薬の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focus on some enzymes that produce volatile sulfur compounds and short chain fatty acid from periodontal pathogens. Phosphotransacetylase and acetate kinase from *Porphyromonas gingivalis*, a keystone pathogen of periodontitis, were associated with acetate production. In the pathway, ATP is synthesized through substrate-level phosphorylation by acetate kinase. The two enzymes were strongly suggested to be essential for the growth of the bacterium. We revealed the enzymatic properties and crystal structures of the enzymes. On the other hand, we constructed an assay system for evaluation of inhibitors of methyl mercaptan-producing enzyme, and validated the quality of the system.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：揮発性硫化物 短鎖脂肪酸 口臭 歯周病 酵素 阻害剤 X線結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌の代謝産物である揮発性硫化物や短鎖脂肪酸は、上皮および免疫細胞に対する毒性を示す。口腔内で検出されるこれらの物質濃度と歯周病の進行度には高い相関がある。一方で、これらは悪臭を伴う物質であり、歯周病に起因する口臭の原因物質としても知られている。その中でも、メチルメルカプタン (CH_3SH) と酪酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) は、呼気中の有臭物質の中でも、特に検知閾値が低く、ppb オーダーの低濃度であっても、極めて高い臭気強度 (悪臭) を持つ (図1)。いずれも、歯周病患者の歯周ポケット内では、健常者の約10倍以上の濃度上昇があることが報告されており (Yaegaki & Sanada, *J. Periodontol.*, 1992; Niederman *et al.*, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1997)、特にメチルメルカプタンは、臨床現場において歯周病および口臭のマーカーとしての利用がなされている。

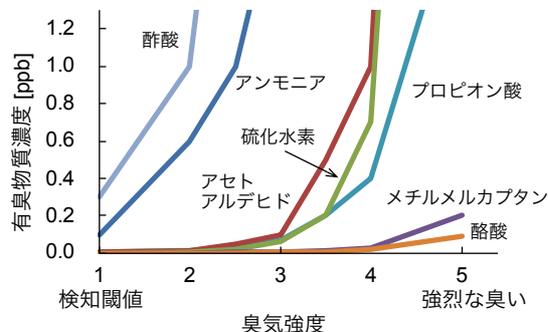


図1 口腔内で検出される有臭物質の臭気強度

歯周病細菌は一般に高い揮発性硫化物産生能を有する。硫化水素 (H_2S) を産生する酵素は、複数種類があることが知られている。例えば、高硫化水素産生口腔細菌である *Fusobacterium nucleatum* には少なくとも4種類の酵素が同定されている (Yoshida *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; Yoshida *et al.*, *Microbiology* 2010; Yoshida *et al.*, *Microbiology* 2011)。一方で、歯周病のキーストーン病原体 (宿主免疫システムを阻害し、口腔細菌叢のバランスを変えることによって炎症疾患を引き起こす細菌) である *Porphyromonas gingivalis* においては、メチオニン γ -リアーゼ (Methionine γ -lyase, MGL) が、主要なメチルメルカプタンの産生源であることが報告されている (Yoshimura *et al.*, *Infect. Immun.* 2000)。また、マウスを使った実験により、*P. gingivalis* の *mgl* 遺伝子欠損株は野生株に比べ病原性が低下することも併せて示されている。このことは、メチオニン γ -リアーゼ阻害剤は、メチルメルカプタンの産生を抑えることで有効な口臭除去手段となりうるだけでなく、*P. gingivalis* の病原性の低減にもつながると考えられる。

P. gingivalis において酪酸は、酸性アミノ酸を出発物質とし、スクシニル CoA (CoA) \rightarrow スクニルセミアルデヒド \rightarrow (一部省略) \rightarrow クロトノイル CoA \rightarrow ブチリル CoA を経て産生されると考えられている (Yoshida *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 2015)。酢酸 (CH_3COOH) の産生も同様に酸性アミノ酸が出発物質であり、その経路は酪酸合成の経路と密接に関わっている (Yoshida *et al.*, *J. Oral Microbiol.* 2019)。*P. gingivalis* の短鎖脂肪酸の産生経路については、部分的に合成酵素の同定がなされているが、その全経路の詳細は不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病細菌により産生される有臭有毒物質 (メチルメルカプタン、硫化水素、酪酸、酢酸) の産生に関与する酵素に着目し、それらの立体構造解析と生化学的解析を実施する。阻害剤探索を行い、阻害剤候補化合物による酵素阻害効果を測定し、評価する。

3. 研究の方法

(1) X線結晶構造解析 (アシル CoA 還元酵素、リン酸トランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ)
上記3種類の酵素 (必要に応じてそれらの変異酵素) を大腸菌でヘキサヒスチジンタグあるいはグルタチオン *S*-トランスフェラーゼタグ融合タンパク質として大量発現させ、アフィニティ、イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーで高純度に精製した。その後、精製酵素を、ハンギングドロップ蒸気拡散平衡法を用いて結晶化条件の初期スクリーニングを行った。得られた初期条件をもとに結晶化条件の最適化を行った後、高エネルギー加速器研究機構において X線回折実験を行った。同結晶化条件に基づいて、各酵素と基質や生成物等の各種リガンドとの複合体結晶の作製を試みた。共結晶化とソーキングの2種類の方法を試した。

(2) 酵素学的解析

リン酸トランスアセチラーゼの反応速度は、基質であるアセチル CoA の減少を A_{233} を測定することで算出した。酢酸キナーゼの反応速度は、反応生成物である ATP を基質とする酵素反応系を用いた。これにより最終的に生成するニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

(NADPH) を A_{340} を測定することで算出した。

(3) 阻害剤評価系の構築

メチオニン γ -リアーゼの反応生成物のひとつである 2-ケト酪酸を 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone (MBTH) により誘導体化して定量するアッセイ系を 96 ウェルプレート上に構築した。酵素および基質濃度を検討し、タイムコース測定により MBTH 誘導体のシグナル強度 (A_{320}) が直線性を有する反応時間の範囲を検証した。決定したアッセイ条件下でバリデーションを行い、系の精度の指標となる Z' 値を算出して評価を行った。最後に既知阻害剤を用いてアッセイを行い、ガスクロマトグラフィーによるメチルメルカプタンを直接測定する方法によって得られた結果と比較した。

4. 研究成果

アシル CoA 還元酵素の構造解析

P. gingivalis の短鎖脂肪酸合成に関与するアシル CoA 還元酵素 (Pgn0723; Yoshida *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 2016) はスクシニル CoA と NAD(P)H 存在下でスクシニルセミアルデヒドを生成する。この酵素遺伝子欠損株は、培養上清中への酪酸、イソ酪酸およびイソ吉草酸の産生が顕著に低下するだけでなく、高い生育阻害が起こる。したがって、この酵素の阻害剤は、*P. gingivalis* 特異的な抗菌薬や酪酸に起因する口臭の予防薬になり得る可能性を秘めている。

まず、酵素単独の結晶構造を解析した。アシル CoA 還元酵素は、二量体が三量体化した類縁酵素では見られない新規な六量体構造を取っていた (図 2a)。基質が結合すると考えられる部位は、ポリペプチド鎖がディスオーダーしており、高い柔軟性を持つことが考えられた (図 2b)。そのため、引き続いて各種基質あるいは反応生成物存在下での解析を試み、アシル CoA 還元酵素/CoA 複合体の構造解析に成功した。上述の CoA 非存在下においては、基質結合部位の一部を、Leu408 を含むループが占めていると推察されたが (図 2b)、CoA 複合体においては、このループが一定の構造を取り分子表面まで伸展することで、基質結合部位には基質を収容する空間ができていた (図 2c)。すなわち、基質結合を妨げる立体障害は解消されていた。

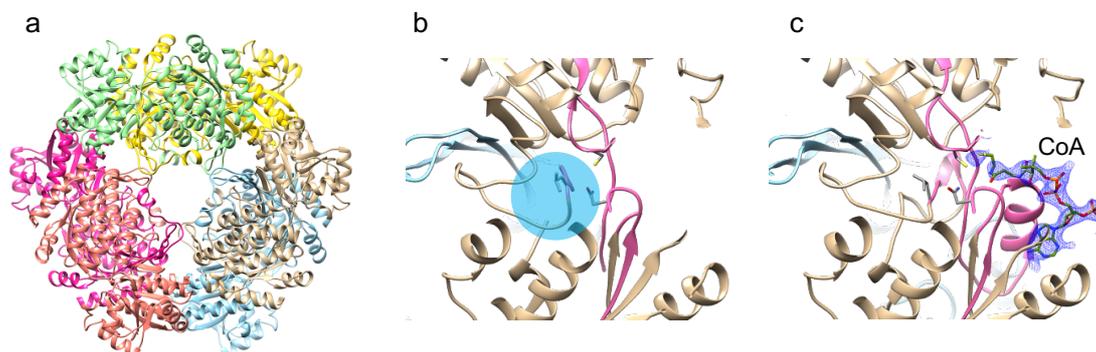


図2 アシル CoA 還元酵素の結晶構造

(a) 六量体構造 サブユニット毎に色を変えて表示している。(b) CoA 非存在下および (c) CoA 存在下における基質結合部位付近の構造 水色の円で示した部分を Leu408 が占有している。円の中央には、Leu408 が位置する。CoA 存在下では、この領域は短いヘリックスを取っており、Leu408 の位置も CoA 非存在下の場合と異なる。

リン酸トランスアセチラーゼと酢酸キナーゼの構造解析および生化学的解析

P. gingivalis は酸性アミノ酸を出発物質として酢酸を生成する。この経路の最後で、リン酸トランスアセチラーゼがアセチルコエンザイム A からアセチルリン酸を生成し、次いで酢酸キナーゼがアセチルリン酸から酢酸を生成する際に、ATP が産生される。遺伝学的手法で、これら酵素遺伝子のどちらか一方でも欠損させると *P. gingivalis* は生育することができなかつたが、欠損させた遺伝子を同時にプラスミドで導入した場合には、*P. gingivalis* は生育することができた。これらの結果は、2 種類の酵素遺伝子は *P. gingivalis* の生育に必須であることを強く示唆している。

リン酸トランスアセチラーゼとアセチル CoA の複合体構造を 2.0 Å 分解能で解析した。リン酸トランスアセチラーゼはホモ二量体を形成しており、リン酸トランスアセチラーゼとアセチル CoA の複合体構造ではそれぞれのサブユニットの同一部位に 1 つのアセチル CoA が結合していた。別のグループにより解析されている *Methanosarcina thermophila* リン酸トランスアセチラーゼにおいては、1 つのサブユニットに 2 ヶ所の基質結合部位を持つことが実験的に確かめられており、*P. gingivalis* リン酸トランスアセチラーゼで観測されたアセチル CoA の結合部位は、*M. thermophila* リン酸トランスアセチラーゼに倣えば親和性が低いとされる方の部位であった。*P.*

gingivalis リン酸トランスアセチラーゼにおいて、この部位のアミノ酸残基を置換した変異酵素の活性を測定したところ、約 20~60%の低下が確認された。一方で、基質への親和性が高いと推察される部位のアミノ酸置換は、変異酵素の活性を消失させた。したがって、*P. gingivalis* リン酸トランスアセチラーゼでアセチル CoA が観測された部位は、触媒部位でないことが考えられた。親和性の低い部位にのみアセチル CoA の結合が観測された理由については不明であり、今後解析を進める予定としている。

酢酸キナーゼもホモ二量体を形成していた。解析に用いた結晶は、非対称単位中に 2 分子の二量体を含んでおり、4 つのサブユニットを比較すると、触媒部位のクレフトの開閉の程度に大きな差が見られた。このような変化は、酢酸キナーゼの属する Acetate and sugar kinase/Hsc70/actin (ASKHA) スーパーファミリーに共通に見られる特徴である。同ファミリーの酵素の構造も含めて考えると、酢酸キナーゼの触媒反応には 22 Å におよぶ大きな構造変化を伴うことが推察された。酢酸キナーゼにおいても、触媒部位における保存性の高いアミノ酸残基に変異を導入し、それら残基の活性への寄与を確かめた。R91A と R241A は、野生型に比べそれぞれ 0.6%と 3.9%の活性しか示さず、Arg91 と Arg241 の触媒への高い寄与が確認できた。E385A は完全に活性を消失した。酢酸キナーゼは活性に Mn^{2+} あるいは Mg^{2+} を要求する。Glu385 は、その位置から考えてこれらの二価の陽イオンの結合に関与することが考えられた。これらの成果は Journal of Oral Microbiology に掲載された (発表論文 1)。

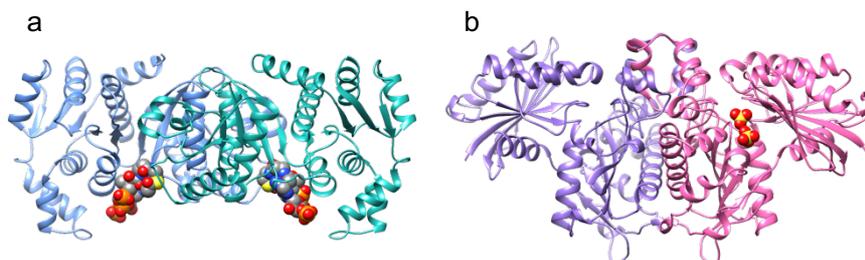


図 3 *P. gingivalis* リン酸トランスアセチラーゼと酢酸キナーゼの結晶構造

メチオニン γ -リアーゼに対する阻害剤評価系の構築

96 ウェルプレート上に、以下の条件のアッセイ系を構築した (表 1)。この条件でウェルをシールで密閉して酵素反応させた後、1 ウェル当たり 20 μ l の 4.5%トリクロロ酢酸 (停止液) を加え、反応を停止させた。次いで、0.017% MBTH 溶液 (pH 5.2) を 180 μ l 加え、50°C で 30 分反応させた。60 分以上室温で静置させた後、 A_{320} を測定した。これらの値に基づいて計算された Z' 値 (系の精度の指標で、0.5 以上が有効を意味する) は、0.8 以上を示した。したがって、このアッセイ系が十分な精度を有することが確認できた。

表 1 アッセイ系の反応条件

反応溶液 (40 μ l/ウェル)
30 mM ヘペス緩衝液 pH 7.5
0.6 μ M <i>F. nucleatum</i> メチオニン γ -リアーゼ
200 μ M L-メチオニン
1 mM ジチオスレイトール
1 μ M ピリドキサルリン酸
0.01% (v/v) トリトン X-100
1.0% ジメチルスルホキシド
反応温度 25°C
反応時間 240 分

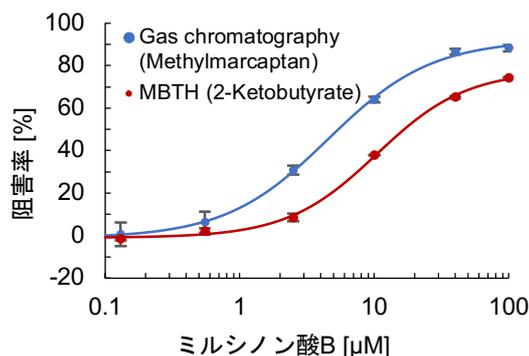


図 4 2 種類のアッセイ系による阻害率のミルシノン酸 B 濃度依存性の相違

本アッセイ系では、口臭の原因物質であるメチルメルカプタンではなく、それと等量産生される 2-ケト酢酸を誘導体化して検出している。したがって、口臭の原因物質であるメチルメルカプタンを直接検出する系と同条件で阻害実験を行い、その結果を比較した (図 4)。なお、阻害剤にはミルシノン酸 B (Ito et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008) を用いた。本アッセイ系とガスクロマトグラフィーにより算出したミルシノン酸 B の 50%阻害濃度は、それぞれ 16.7 μ M と 5.4 μ M となった。約 3 倍の差が見られるが、阻害活性を確認することは十分可能であり、スクリーニングに有用であると判断した。

硫化水素産生酵素の反応機構の解析

F. nucleatum に特有の硫化水素産生酵素 (cysteine (hydroxyl) lyase) は、ピリドキサル 5' -リ

ン酸を補因子として持ち、L-システインの β -置換反応によって硫化水素とL-セリンを生成する。この置換反応では、基質であるL-システインのSH基が脱離して生じる α -アミノアクリル酸中間体に対し、水分子が付加する過程が必要となるが、水分子の求核性の程度を考慮すれば、この付加反応は通常起こりにくいと考えられる。構造および酵素学的解析により、基質結合部位付近に位置するAsp232が水分子を活性化させる塩基として付加反応を促進していることを提案した。さらにラピッドスキャン分光法による酵素反応のミリ秒オーダーの解析を詳細に実施し、Asp232の関与する段階が反応の律速となっていることを明らかにした。また、この律速段階は、基質結合により閉じた基質結合部位を、生成物の放出に備えて、再度開けるタイミングと一致することが示唆された。これらの成果はBiochemical Journalに掲載された(発表論文3)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. Yoshida, Y., Sato, M., Nonaka, T., Hasegawa, Y., and Kezuka, Y. Characterization of the phosphotransacetylase-acetate kinase pathway for ATP production in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral Microbiol.* **11**, 1588086 (2019)
2. Xiang, H., Okamura, H., Kezuka, Y., and Katoh, E. Physical and thermodynamic characterization of the rice gibberellin receptor/gibberellin/DELLA protein complex. *Sci. Rep.* **8** (1), 17719 (2018)
3. Kezuka, Y. and Nonaka, T. Structure of a cysteine (hydroxyl) lyase from hydrogen sulfide-producing oral pathogen, *Fusobacterium nucleatum*. *Photon Factory Activity Rep.* 2017 35, 97 (2018)
4. Kezuka, Y., Ishida, T., Yoshida, Y., and Nonaka, T. Structural insights into the catalytic mechanism of cysteine (hydroxyl) lyase from the hydrogen-sulfide producing oral pathogen, *Fusobacterium nucleatum*. *Biochem. J.* **475** (4), 733-748. (2018)

[学会発表] (計11件)

1. 毛塚雄一郎、吉田康夫 *Porphyromonas gingivalis* の ATP 産生に關与する phosphotransacetylase および acetate kinase の立体構造解析と生化学的解析、第60回歯科基礎医学会学術大会、福岡市、2018年9月6日
2. 吉田康夫、毛塚雄一郎、長谷川義明 *Porphyromonas gingivalis* の ATP 合成に關与する phosphotransacetylase (リン酸トランスアセチラーゼ) および acetate kinase (酢酸キナーゼ) の遺伝学的および酵素学的解析、第60回歯科基礎医学会学術大会、福岡市、2018年9月6日
3. 毛塚雄一郎、石田哲夫、吉田康夫、野中孝昌 口腔細菌に由来する硫化水素産生酵素 cysteine (hydroxyl) lyase の構造と反応機構、日本生化学会東北支部第84回例会、2018年5月18日
4. 菊池彩子、野中孝昌、毛塚雄一郎 メチオニン γ -リアーゼに対する化合物スクリーニングアッセイ系の構築、第56回日本薬学会東北支部大会、青森市、2017年10月21日
5. 毛塚雄一郎、吉田康夫 *Fusobacterium nucleatum* に特有の硫化水素産生酵素 Fn1055 の立体構造と反応機構、第59回歯科基礎医学会学術大会、塩尻市、2017年9月18日
6. 毛塚雄一郎、石田哲夫、吉田康夫、野中孝昌 硫化水素産生口腔細菌由来 cysteine (hydroxyl) lyase の構造および生化学的解析、2017年酵素補酵素研究会、仙台市、2017年6月23日
7. 毛塚雄一郎、石田哲夫、吉田康夫、野中孝昌 硫化水素産生口腔細菌由来 cysteine (hydroxyl) lyase の構造および生化学的解析、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2017年6月20日
8. 吉田康夫、佐藤満成、毛塚雄一郎、長谷川義明、永野恵司、吉村文信 Phosphotransacetylase and acetate kinase for ATP biosynthesis are essential in *Porphyromonas gingivalis*、第90回日本細菌学会総会、仙台市、2017年3月20日
9. 毛塚雄一郎、石田哲夫、吉田康夫、野中孝昌 高硫化水素産生口腔細菌由来 cysteine (hydroxyl) lyase の立体構造と反応機構、2016年度量子ビームサイエンスフェスタ、つくば市、2017年3月14日
10. 毛塚雄一郎、吉田康夫 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生に關与する SuccinylCoA 還元酵素の構造機能解析、第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌市、2016年8月24日
11. 吉田康夫、佐藤満成、毛塚雄一郎、長谷川義明、永野恵司、吉村文信 *Porphyromonas gingivalis* における ATP 産生に關与する phosphotransacetylase および acetate kinase の酵素学的解析、第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌市、2016年8月24日

[その他]

ホームページ等

1. プレスリリース:歯周病菌のエネルギー産生に重要な酵素の性質と立体構造を決定

<http://www.iwate-med.ac.jp/wp-content/uploads/bac56d3e4a8008ad96d5b1db7a86ce31.pdf>

2. プレスリリース:「口臭の原因物質である硫化水素」を産生する酵素の立体構造と反応機構を解明
<http://www.iwate-med.ac.jp/wp-content/uploads/180301.pdf>
3. Dentalism (歯科医院を中心に配布されるフリーペーパー) 31号 News & Topics
<http://www.dentalism.jp/data/dentalism031/html5.html#page=25>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉田康夫

ローマ字氏名：YOSHIDA, Yasuo

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：10315096

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊東俊太郎

ローマ字氏名：ITO, Shuntaro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。