

機関番号：31201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791810

研究課題名 (和文) 口腔細菌による硫化水素産生機構の解明と

酵素の立体構造に基づく新規口臭予防薬の探索

研究課題名 (英文) Elucidation of hydrogen sulfide-producing mechanism by oral bacteria and searching for novel prophylactic drugs that prevent oral malodor

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

研究成果の概要 (和文)：

本研究課題では、口臭の原因となる硫化水素を高産生する口腔細菌に着目し、それらの持つ硫化水素産生酵素の酵素単独および基質アナログとの複合体の立体構造を決定した。反応中間体の捕捉にも成功した。構造情報や酵素学的データを基に、反応時のコンフォメーション変化、触媒部位近傍のアミノ酸の役割などが明らかとなった。得られた知見は個別の酵素に対して、より詳細に反応機構を記述する上で重要であり、新規口臭予防薬の探索の基盤となることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I focused on oral bacteria that highly produce hydrogen sulfide, a causative agent of oral malodor, and determined the structure of hydrogen sulfide-producing enzymes and their complex with a substrate analogue. We also succeeded to trap reaction intermediates. On the basis of structural information and/or enzymological data, conformational changes of enzyme during reaction and roles of amino acid residues at the active site were revealed. These results are quite important to describe their enzymatic reaction mechanisms and are expected to lead the search for novel prophylactic drugs that prevent oral malodor.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

口腔細菌により産生される硫化水素をはじめとする揮発性硫化物は、口臭の主要な原因物質である。これらの持つチオール基は体内の生体高分子と容易に反応し、低濃度においても強い細胞毒性を示すことから、口臭と歯周病の間には密接な関連があることが分かっている (Ratcliff & Johnson, *J. Periodontol.* 1999)。したがって、口腔細菌による硫化水素産生機構の解明は、口腔管理の観点から極めて重要な意味を持つ。

本研究課題開始当時、硫化水素は、口腔細菌の L-cysteine desulphydrase あるいは L-cysteine desulfidase (いずれも Lcd と表記する。) が L-システインを分解した際、ピルビン酸、アンモニアと共に反応生成物の一つとして産生される (Pianotti *et al.*, *J. Dent. Res.* 1986) と考えられていた。当時、口腔細菌における Lcd は 3 つのタイプが報告されており、それぞれの間にはアミノ酸配列の相同性がなく、サブユニットの分子量、補因子の種類や四次構造にも共通点が少ないことから、それぞれが異なる反応機構で同一の反応を触媒していることが考えられた (この分類は、本申請のために研究代表者が便宜的に行ったものであり、一般的なものではない)。これらのうち、最も研究が行われていたのが I 型であり、*Treponema denticola* Lcd においては、酵素学的解析だけでなく (Chu *et al.*, *Infect. Immun.* 1995)、立体構造解析もなされていた (Kurpka *et al.*, *EMBO J.* 2000)。これに続き、申請者は、*Streptococcus anginosus* および *Streptococcus gordonii* Lcd (β C-S リアーゼ) の立体構造を明らかにしていた (発表論文 2)。さらに、部位特異的変異体を用いた酵素学的解析からは、Kurpka らの提唱している反応機構モデルをより詳細に記述することのできることを示すデータを得ていた。II 型 Lcd については、酵素学的解析が予備的に行われているに過ぎなかった (Fukamachi *et al.*, *FEMS Microbiol.* 2002)。III 型 Lcd は、口腔細菌ではないが *Methanocaldococcus jannaschii* で同定されており (Tchong *et al.*, *Biochemistry* 2005)、*Fusobacterium nucleatum* や *T. denticola* のゲノム上にも III 型 Lcd 遺伝子が存在する可能性が高いことが分かっていた。この酵素は、[4Fe-4S] 中心を持つ鉄-硫黄タンパク質であり、好気条件下では鉄の離脱により、[4Fe-4S] が

[3Fe-4S] となることで失活してしまうことが予想された。歯周ポケットなどの嫌気環境下で歯周病細菌の分布割合が高いことを考えると、III 型 Lcd は歯周病に特に深い関わりを持つことが推察された。しかしながら、歯周病細菌に由来する III 型 Lcd の酵素学的解析や立体構造解析例は皆無であった。これまで 3 つのタイプの Lcd は個別に研究が行われてきており、L-システイン分解に伴う硫化水素産生能および機構の直接的な比較や関連付けが、なされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、口腔細菌による硫化水素産生機構を、酵素学および構造生物学的手法により原子レベルで解明する。さらに、硫化水素産生酵素の立体構造に基づいて医薬品候補化合物とのドッキングシミュレーションを行い、新規口臭予防薬の探索を目指す。

3. 研究の方法

I 型として、*S. anginosus* および *S. gordonii* β C-S リアーゼ、II 型として *F. nucleatum* Fn1220、そして III 型として *F. nucleatum* Fn1147 を研究対象とした。

(1) I 型

すでに酵素単独での構造解析に成功しているため、基質あるいは基質アナログとの複合体の結晶構造の解析を目指し、部位特異的変異による不活化酵素を調製した。触媒あるいは基質との結合に関わると考えられるアミノ酸を置換し、その変異体の酵素学的定数を求めた。これらの情報を基に、反応機構の解明を目指した。

(2) II 型

大腸菌により、リコンビナント酵素の発現および精製系を確立し、得られた酵素の硫化水素産生能を比色法により確認した。その後、結晶化条件の初期スクリーニングを行い、X線結晶構造解析により立体構造を決定した。部位特異的変異を作製し、複合体の構造および酵素学的解析を行った。構造情報と酵素学的データとを組み合わせることにより、Fn1220 の反応機構の解明を目指した。

(3) III型

大腸菌による発現系を構築し、リコンビナント酵素の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) I型

S. anginosus および *S. gordonii* β C-S リアーゼは、酵素単独に加え、L-セリン（基質アナログ）との複合体の結晶構造を決定した。L-セリンのソーキング時間を変化させることで、複数段階における反応中間体の形成を確認することができた。L-セリンはこれら酵素の補因子であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) と共有結合していた。高い硫化水素産生能を示す *S. anginosus* β C-S リアーゼにおいては、2種類の反応中間体を捉えることができ、そのジオメトリーおよび顕微分光測定の結果から、これらが PLP 依存性酵素の反応中間体として知られている External aldimine と α -Aminoacrylate であることを確認した。これら 2 種の中間体の結合した酵素の立体構造は、基質非結合型酵素のそれと主鎖レベルにおける相違はほとんど認められないことから、この酵素の触媒反応には大きな構造変化を伴わないことが考えられた。また、結晶構造より触媒反応に寄与すると考えられたアミノ酸 (Tyr60, Tyr119 と Arg365) に部位特異的変異を導入したところ、いずれの変異酵素も L-システインの分解活性（硫化水素産生能）が著しく低下した。立体構造と併せて考察し、各アミノ酸残基の触媒反応における役割が推察された。

(2) II型

Fn1220 の大量調製は大腸菌を宿主として行い、次いで 3 段階のクロマトグラフィーからなる精製条件を確立した。結晶化条件の探索および最適化を行い、X 線回折実験に適した単結晶を得ることができた。分子置換法により 2.0 Å 分解能で結晶構造を決定した。非対称単位中の 2 つのサブユニットのうち、一方は触媒部位を含むクレフトが閉じた形を、他方は開いた形をしていた。クレフトの閉じたサブユニットには、補因子である PLP の近傍に、結晶母液に含まれる酢酸イオンが結合していた。酢酸イオンの結合は、基質の結合の模倣であることが考えられた。Fn1220 による基質分解は、クレフトの開閉という構造変化を伴う機構により行われることが推察された。L-セリン（基質アナログ）との複合体の結晶構造を決定したところ、I型 Lcd 同様、L-セリン

と PLP が共有結合した中間体を観測することができた。L-セリンのカルボキシル基は、基質非結合型酵素で酢酸イオンが結合していた場所とほぼ同じ位置を占めていた。さらに、基質非結合型酵素でクレフトが開いた形をしていたサブユニットにおいても、反応中間体の形成によりクレフトが閉じていることが確認された。このカルボキシル基と直接相互作用するアミノ酸は Thr69 と Asn142 であり、これらをどちらか一方でもアラニンに置換すると、基質分解活性が著しく低下した。したがって、これらのアミノ酸は基質のカルボキシル基を認識し、基質をより強固に結合させるためにクレフトを閉じるスイッチの役割を果たしていることが考えられた。

この酵素は、L-システイン 2 分子から、ランチオニンというアミノ酸を生成し、その過程で硫化水素を産生していることも明らかとなった（発表論文 1）。ランチオニンは *Fusobacterium* のペプチドグリカンの構成成分としても知られており、Fn1220 がランチオニン合成酵素として働いている可能性が示唆された。

(3) III型

大腸菌を宿主とした発現系を構築した。タグの種類を変え、発現条件の検討を行ったものの、構造研究に必要な量の酵素を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yoshida, Y., Ito S., Kamo, M., Kezuka, Y., Tamura, H., Kunimatsu, K. & Kato, H. Production of hydrogen sulfide by two enzymes associated with biosynthesis of homocysteine and lanthionine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology* **156**, 2260-2269. (2010). 査読有り
2. Kezuka, Y., Yoshida, Y. & Nonaka, T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of β C-S lyases from two oral streptococci. *Acta Crystallogr. F* **65**, 874-877. (2009). 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Yuichiro Kezuka, Yasuo Yoshida, &

Takamasa Nonaka Structural insights into catalysis of β C-S lyase from *Streptococcus anginosus* The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association (2010/10/31-11/3, Busan, Korea)

(3)連携研究者
なし

2. 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌 口腔レンサ球菌由来 β C-S リアーゼ反応中間体の結晶構造解析 第10回日本蛋白質科学会年会 (2010年6月16日-18日、札幌)

3. 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌 口腔レンサ球菌由来 β C-S リアーゼ/基質複合体の結晶構造解析: 硫化水素産生能と反応機構 第9回日本蛋白質科学会年会 (2009年5月20日-22日、熊本)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし