

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05285

研究課題名（和文）抗菌L-アミノ酸オキシダーゼの金属による複合体形成と活性調節機序の解明

研究課題名（英文）Metal complex formation and activity regulation mechanism of antibacterial L-amino acid oxidase

研究代表者

葛西 宏介（KASAI, Kosuke）

弘前大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：50400148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：psLAA01の複合体と金属配位に影響を及ぼす348番ヒスチジン、241番スレオニンならびに406番アスパラギン酸は、変異させることで構造的に不安定となることから、タンパク質の安定化に不可欠なアミノ酸であり、psLAA01は348番ヒスチジンを介した亜鉛とマグネシウムの配位が明らかとなっていることから、黄色ブドウ球菌で亜鉛が補足されることは、複合体形成に大きな影響を及ぼすことが考えられる。以上より、本研究の仮説であるLAA0複合体から亜鉛を除くと活性型へと変化し、細菌は金属を捕捉することで、知らず知らずのうちにLAA0を活性化させ、金属が外れたLAA0は構造的に不安定となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

psLAA01は、エラで粘液とともに分泌され安定な複合体を形成している。エラは呼吸に関わる重要な器官であるが咀嚼した残渣により栄養豊富で細菌が増殖しやすい場所でもあるため、生体防御として抗菌物質を含む粘液を分泌していると考えられる。psLAA01は、金属を介した複合体を形成することで安定かつ不活性な状態で、細菌が金属を補足することで単量体となり活性型となっている。一方で、金属が除かれた単量体は構造的に不安定なため速やかに分解される。したがって、他の細胞に影響を与える前に消失していると考えられる。このpsLAA01の細菌特異的な抗菌活性は、学術的・医学的にも大変興味深く、医薬品転用も可能となると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, His348, Thr241, and Asp406, which affect the psLAA01 complex and metal coordination, become structurally unstable when mutated, so there are essential amino acids for protein stabilization. Since it has been revealed that psLAA01 coordinates zinc and magnesium via histidine 348, it is thought that supplementation of zinc with *Staphylococcus aureus* has a significant effect on complex formation. Thereby, the hypothesis of this study is that when zinc is removed from the LAA0 complex, it changes to the active form, and by capturing the metal, bacteria unknowingly activate LAA0, and the LAA0 with the metal removed is It was suggested that it would be structurally unstable.

研究分野：分子生物学

キーワード：L-アミノ酸オキシダーゼ 抗菌タンパク質 金属配位 活性調節

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血清、母乳、粘液などの生体液性成分に含まれる L-アミノ酸オキシダーゼ (LAAO) は、L-アミノ酸を基質にラジカルを産生して、病原性細菌の菌膜酸化と菌体破壊を引き起こす。その一方で、正常細胞には細胞毒性を示さないことが報告されている。近年、金属を介した LAAO 複合体形成と基質結合ドメイン干渉 (L-アミノ酸を利用することができない) が予測されており、金属が LAAO 活性を調節することが強く推察されている。事実、我々の先行研究において、LAAO を金属キレート処理すると亜鉛が外れて活性が一時的に亢進するものの、同時にマグネシウムも外れることで構造が不安定となりその後活性が消失することを明らかにしている。そこで本研究は、LAAO 複合体形成と活性化調節ならびに構造の安定性にこれら二つの金属がどのように関与するのかを詳細に検証し、「生体内分子の LAAO はなぜ細菌特異的な活性を示すのか？」を解明することが目的である。L-アミノ酸オキシダーゼ (LAAO; EC 1.4.3.2) は、L-アミノ酸を基質に過酸化水素 (ヒドロキシルラジカルに変化) を産生することによって強力な抗菌作用を引き起こすことが報告されている (Nature 1970 他)。また、国内外の多くの医療現場で多剤耐性化が深刻な問題となっている緑膿菌、アシネトバクター、肺炎桿菌、黄色ブドウ球菌、化膿レンサ球菌、大腸菌等の病原性微生物に対して強い抗菌作用を有することが明らかとなっている (葛西 Appl. Microbiol. Biotech. 2015 Review 他)。これまでの LAAO 研究の中で「生体内分子の LAAO はラジカルを産生するにも関わらず、なぜ正常細胞に細胞毒性を引き起こさないのか？」という疑問が未解決である。LAAO は、血清・肝臓・腸管・乳腺・表皮で分泌されているにも関わらず、血管内皮・血球・肝臓組織・腸管・乳腺上皮・皮膚などの自己細胞・組織に対して毒性を示さない (Biochimie 2011 他)。近年、LAAO 表面のアミノ酸と金属が配位結合することによる複合体形成とそれによる基質干渉が推察されている (Mol. BioSyst. 2011 他)。もし生体内で LAAO に金属が配位していればラジカルを作ることができない。興味深いことに、我々の先行研究で LAAO を金属キレート剤で処理すると亜鉛が外れて LAAO 活性が一時的に亢進するものの、同時にマグネシウムが外れることで活性が消失することを明らかにしている (葛西 Appl. Microbiol. Biotech. 2020)。そこで次の 3 つの仮説を立てた。LAAO 複合体から亜鉛を除くと低・不活性型だった LAAO が活性型へと変化する。細菌は自身の増殖に必要な微量金属を宿主から獲得する捕捉分子機構を備わっていることから、知らず知らずのうちに LAAO を活性化させる。LAAO からマグネシウムが外れることで構造的に不安定となるため正常細胞に影響を及ぼす前に分解される。この仮説の証明は、LAAO 研究の最大の疑問だった「ラジカルを産生するのになぜ正常細胞に細胞毒性を引き起こさないのか？」を解決できると考える。

2. 研究の目的

研究代表者は、魚類体表粘液から表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対して抗生物質に匹敵する強力な抗菌活性を有し、スーパー耐性菌の存在が知られる緑膿菌、アシネトバクター、肺炎桿菌、さらには、真菌類に対しても強い抗菌作用を示す psLAAO を同定し報告している (葛西 FEBS J. 2010)。前述の通り、金属が LAAO の酵素・抗菌活性調節ならびに構造安定性に深く関与していることが推察されることから、生体内および粘液中の psLAAO は、金属複合体として低・不活性状態で安定化しており、細菌が侵入した際に金属が奪われることで高活性型となって作用することを想定している。また、高活性型 psLAAO は速やかに分解され、正常細胞に影響を及ぼす前に反応が収束すると考えている。この

仮説を実証するのが本研究の最大の目的である。

3. 研究の方法

(1) 各種 LAAO の人工合成

これまで人工合成に成功している psLAAO に加えて、金属配位アミノ酸（後述する 348 番目のヒスチジン、241 番目のスレオニン、406 番のアスパラギン酸）をアラニンに置換した変異型 psLAAO を合成する（348 番変異は作成済み）。分泌シグナル付加、コドンを発現宿主に適した配列へ改変した人工遺伝子の作製、低温誘導、低濃度メタノールを添加することで分泌型（可溶化）・活性型・高純度タンパク質を常時安定して供することが可能である。

(2) LAAO 複合体形成の確認

複合体の検出が難しい等不測の事態を考慮して複数の解析手法を計画した。異なるタグ配列（FLAG・His）を付加させた 2 種の psLAAO を用いて、一方（FLAG）を FLAG 特異的結合カラムに結合させ、もう一方（His）とキレート剤（EDTA）または異なる濃度の金属（亜鉛・マグネシウム）溶液を共に流入させたときの結合性を評価する（プルダウンアッセイ）。カラムからの溶出は FLAG ペプチドを、検出は抗 His 抗体を用いる。ニッケルセンサーチップに結合させた psLAAO（His）に psLAAO（FLAG）と亜鉛又はマグネシウムを混在させたときの結合速度とアナライト最大結合量（RU 値）を算出して複合体ユニット数を評価する（SPR 解析）。なお、ニッケルと His タグは特異的に結合する。二分子蛍光補完（BiFC）法を用いて LAAO 複合体を検出する。BiFC 法は、蛍光タンパク質（Venus）を N 末端側と C 末端側の二つに分断してそれぞれを psLAAO に融合させる。2 つの LAAO が金属（亜鉛またはマグネシウム）を含んだ緩衝液中で複合体を形成した際に、psLAAO に融合した Venus が再構築されることで発する蛍光を検出する。psLAAO をタンパク質架橋剤（BS3、DTSSP：側鎖にアミノ基をもつリシン同士を架橋）で処理することで複合体を検出することが可能であることから、上記変異型 psLAAO と架橋剤を反応させたときの複合体形成をゲルろ過クロマトグラフィーならびに抗 LAAO 抗体（作成済み）を用いて検出する。

(3) 安定性試験

金属除去によるタンパク質構造の安定性を検証する。安定性試験は加速試験を用いて、非処理コントロールならびに金属除去（キレート処理または変異型 psLAAO）系列をそれぞれ 3 ロット（ $n=3$ ）温度 40 ± 2 /湿度 $75\%RH \pm 5\%$ の環境下でインキュベートする。実施直後から 24 時間ごとの LAAO 活性ならびに抗菌活性を評価する。

(4) 金属捕捉分子機構解析

LAAO を添加した細菌培養上清から LAAO をアフィニティーカラムで精製・回収し、メタロアッセイ（亜鉛・マグネシウム）ならびに質量分析装置を用いて微量金属を検出する。経時的に回収したタンパク質量と金属量からモル比（タンパク質：金属）を算出して細菌と反応させる前後でモル比を比較し、細菌と混在した際に補足される金属量を特定する。

4. 研究成果

(1) 各種 LAAO の人工合成

LAAO に金属が配位するアミノ酸部位（348 番目のヒスチジン、241 番目のスレオニン、406 番のアスパラギン酸）をアラニンに置換した変異型 psLAAO の合成を試みた。分泌シグナル付加、コドンを発現宿主に適した配列へ改変した人工遺伝子を作製し、低温誘導と低濃度メタノールを添加することで分泌型（可溶化）・活性型・高純度タンパク質を常時安定して供することが可

能である。348 番目のヒスチジンをアラニンに変異させた変異型 LAAO を発現させるベクターは作製済みで、241 番目のスレオニンおよび 406 番目のアスパラギン酸をアラニンに変えた変異型合成に着手した。2021～2022 年度は、psLAAO の金属配位アミノ酸部位を金属が配位することができないアラニンに置換した 348 番ヒスチジンならびに 209 番ヒスチジン（陰性コントロール）を合成し、合成収量が解析可能な十分量を確保できた。一方で、241 番スレオニンならびに 406 番アスパラギン酸に関しては、収量がとても少なくタンパク質発現条件の最適化を図った。また、当初の酵母株から高収量発現株（プロテアーゼ欠損株）に変更して発現誘導を実施した。2023 年度は、241 番スレオニンならびに 406 番アスパラギン酸のアラニン変異型作製に関しては、当初の酵母株からより高収量タンパク質が得られる植物カルスを用いた人工合成法に変更して発現誘導とタンパク質の収量改善を図ったが、合成したタンパク質は構造的に不安定となることから、収量がとても少なくタンパク質発現条件の最適化を図っても回収が困難であった。

（2）LAAO 複合体形成の確認

2021～2022 年度は、LAAO 複合体形成の確認のために、異なるタグ配列（FLAG・His）を付加させた 2 種の psLAAO を用いて、一方（FLAG）を FLAG 特異的結合カラムに結合させ、もう一方（His）とキレート剤（EDTA）または異なる濃度の金属（亜鉛・マグネシウム）溶液を共に流入させたときの結合性をプルダウンアッセイにて評価を試みた。FLAG タンパク質のカラム結合性と抗 His 抗体での検出を評価した結果、複合体形成実験で使用する FLAG 配列を付加した psLAAO は、FLAG 検出感度が不十分であるためより高感度且つ高収量な発現合成条件ならびに発現宿主（プロテアーゼ欠損株および植物カルス）の変更等の最適化をおこなったが、FLAG 抗体を用いた明瞭なバンドの検出は困難であった。 に関しては、 の FLAG 付加タンパク質の合成収量が解析に必要な量を確保できなかったため実施が困難であった。 については、psLAAO1 に Venus の N 末・C 末配列を付加させたが、発現が全く認められなかった。一方で、psLAAO をタンパク質架橋剤（BS3：側鎖にアミノ基をもつリシン同士を架橋）で処理することで複合体を検出することができ、水溶液中では可逆的なホモ 8 量体以上を形成することが明らかとなった。

（3）安定性試験

安定性試験（2022～2023 年度）：安定性試験に関して、psLAAO はキレート剤を用いて金属除去することにより活性の不安定化が認められている。348 番ヒスチジンをアラニンに置換させた psLAAO は、キレート剤を用いて金属を除去したものと同様に不安定性が認められている。209 番ヒスチジンをアラニンに置換させたものは変異を挿入しても安定であった。241 番スレオニンならびに 406 番アスパラギン酸のアラニン変異型に関しては、合成したタンパク質は、そもそも発現合成時から不安定な構造となることが明らかとなった。

（4）金属捕捉分子機構解析

LAAO を添加した細菌培養上清から LAAO をアフィニティーカラムで精製・回収し、メタロアッセイを用いて微量金属を検出した。経時的に回収したタンパク質量と金属量からモル比（タンパク質：金属）を算出して細菌と反応させる前後でモル比を比較し、細菌と混在した際に補足される金属量は、psLAAO1 単独の微量金属解析結果と一致し、黄色ブドウ球菌の培養において 1 分子の psLAAO1 から亜鉛が約 0.5 分子補足されていることが明らかとなった。一方、マグネ

シウムおよびその他の微量金属は検出されなかった。再現性の検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kasai Kosuke, Nakano Manabu, Ohishi Masami, Nakamura Toshiya, Miura Tomisato	4. 巻 105
2. 論文標題 Antimicrobial properties of L-amino acid oxidase: biochemical features and biomedical applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4819 ~ 4832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11381-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒトに適用されるための抗菌剤、及び、該抗菌剤の製造方法	発明者 葛西宏介	権利者 国立大学法人弘前大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-162618	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------