

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791971

研究課題名(和文)細菌の細胞膜結合型ペルオキシダーゼに関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on bacterial membrane bound peroxidase

研究代表者

河原井 武人(Kawarai, Taketo)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：90409079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性歯周炎原因菌であるAggregatibacter actinomycetemcomitansの活性酸素除去及び毒素産生に關与する細胞膜結合型キノールペルオキシダーゼ(QPO)の大腸菌ホモログであるYhjAの過剰発現系を構築し、本酵素の部分精製まで行うことができた。また、A. actinomycetemcomitansのQPO阻害剤を化合物ライブラリーを用いてスクリーニングすることにより、新たにアスコクロリン及びイリシコリンBを見出し、その阻害様式が各々competitive inhibition、mixed-type inhibitionであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A membrane-bound enzyme, quinol peroxidase (QPO) that contributes hydrogen peroxide removal and leukotoxin production of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, which is an oral pathogen causing localized aggressive periodontitis. In this study, overexpression and partial purification of YhjA, a QPO homologue in Escherichia coli, was constructed. On the other hand, The kinetic analysis characterized ascochlorin and illicicolin B as highly potent inhibitors of QPO and these compounds inhibited QPO in a competitive-type and mixed-type manners, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：酵素 細菌 感染症

1. 研究開始当初の背景

病原微生物は、ヒトに感染すると免疫応答によって誘導される食細胞のスーパーオキシドイオン、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素や過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種 (ROS; Reactive oxygen species) に暴露される。一方で、呼吸鎖は効率的な ATP 産生に必須なエネルギー代謝系であるが、同時に ROS を副産物として生成する。これらの ROS は生体に酸化ストレスを与え、DNA の損傷や膜リン脂質の過酸化、タンパク質の酸化などを引き起こす。従って、病原微生物における活性酸素除去機能は感染を成立させる上で重要な因子であると考えられる。

数種類の細菌には、ROS に抵抗する酵素としてカタラーゼ以外に、細菌性シトクロム c ペルオキシダーゼ (BCCP; Bacterial cytochrome c peroxidase) をもつことが報告されている。この BCCP は 1970 年に初めて *Pseudomonas aeruginosa* から発見・精製された。本酵素はペリプラズム中に存在し、300-400 アミノ酸で構成されており、ヘム c を 2 つ有している。一方、近年、申請者が所属する講座の古西らは、侵襲性歯周炎の起原菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の呼吸鎖が活性酸素除去作用を有することを発見した。更なる解析により、この呼吸鎖による活性酸素除去作用を担う酵素が、還元型コエンザイム Q1 (ユビキノール-1, $UQ1H_2$) を基質として H_2O_2 を水に還元するという、これまで全く知られていなかった反応を触媒する新規のヘム c を有する膜結合型ペルオキシダーゼであることを明らかにし、キノールペルオキシダーゼ (QPO) と名付けた。図 1 に *A. actinomycetemcomitans* の呼吸鎖における過酸化水素の還元モデルを示した。

この QPO は上記のように真正細菌における膜結合型のペルオキシダーゼとして初めての例であると同時に、構造的にもユニークなものであった。QPO 遺伝子は 460 アミノ酸をコードしており、C 末端側のおよそ 2/3 は、ヘム c 結合モチーフを 2 つもつ、BCCP との高い相同性を有する領域であったのに対し、N 末端側は 1 回膜貫通領域と 1 つのヘム c 結合サイトをもつ QPO 特有の領域であった。また、QPO 欠損株では、*A. actinomycetemcomitans* の毒性因子である leukotoxin (RTX toxin の一種であり hemolysin A ともいう) の分泌が著しく低下することが明らかとなっており、さらに、QPO 阻害剤であるアスコフラノンが見出され、本抗生物質も leukotoxin の分泌を著しく阻害することが確認されている。

一方、興味深いことに、*Escherichia coli* (K12 及び O157:H7) は基質となるシトクロム c をもたないにも拘らず、QPO 相同遺伝子である *yhjA* をもっている。この *yhjA* に関する論文は Partridge らによって 2007 年に報告されたものだけであり、欠損させることにより嫌気下における外因性 H_2O_2 耐性が低下する

こと、また酸素応答に關与する FNR (Fumarate and Nitrate Reduction regulatory protein) 及び OxyR によって発現制御されていることのみ明らかになっている。即ち、*YhjA* は大腸菌において発現し表現型に影響することは明らかであるが、未だ単離・精製されておらず、その機能や構造については解っていない

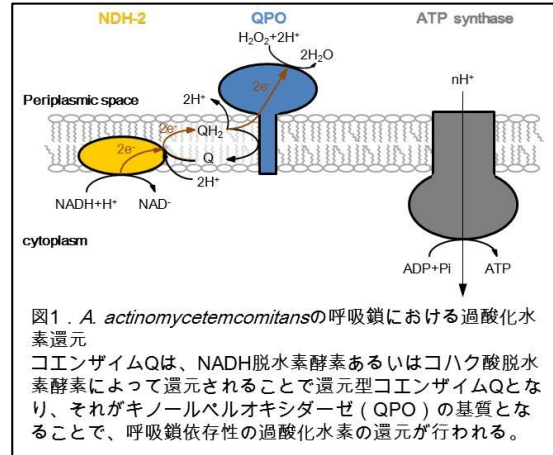


図1. *A. actinomycetemcomitans* の呼吸鎖における過酸化水素還元

コエンザイムQは、NADH脱水素酵素あるいはコハク酸脱水素酵素によって還元されることで還元型コエンザイムQとなり、それがキノールペルオキシダーゼ (QPO) の基質となることで、呼吸鎖依存性の過酸化水素の還元が行われる。

2. 研究の目的

(1) *E. coli* *YhjA* の過剰発現系及び精製条件の構築

E. coli (K12 及び O157:H7) は基質となるシトクロム c をもたないにも拘らず、*qpo* 相同遺伝子である *yhjA* をもっており、*E. coli* O157:H7 の毒性因子 *HlyA* は *A. actinomycetemcomitans* の leukotoxin と 42% の相同性をもつ。一方、*A. actinomycetemcomitans* の QPO は leukotoxin 産生に關与することが明らかになっている。このことから、*E. coli* O157:H7 の hemolysin 分泌に対しても *YhjA* が關与する可能性がある。大腸菌は遺伝学的にも生理学的にも最も解析の進んでいる真正細菌であり、細胞膜結合型ペルオキシダーゼの性質を詳細に調査するのに適した細菌種であるといえる。そこで、*E. coli* *YhjA* の生化学的性質を明らかにするため、過剰発現系及び精製条件の構築を行った。

(2) *A. actinomycetemcomitans* の QPO 阻害剤の探索

A. actinomycetemcomitans の QPO は構造的にも機能的にもユニークなものであり、その生理的機能を解明することは病原性の発現の観点からも有用であると考えられる。阻害剤による阻害メカニズムの解明は、病原菌の病原抑制のみならず、ターゲットの生化学的性質を調べる上でも重要である。既に、QPO の阻害剤としてアスコフラノンが見出されているが、更なる阻害剤の探索を目的として、化合物ライブラリーを用いて、QPO 阻害剤のスクリーニングを行った。

3. 研究の方法

(1) *E. coli* *YhjA* の過剰発現系及び精製条件

の構築

供試菌株として、シトクロム *c* の分解に関与するペリプラズム性プロテアーゼ DegP を欠損した *E. coli* Keio::JW0157 (DE3) 株を用いた。*yhjA* の過剰発現は、T7 プロモーター支配下に *yhjA* をクローン化したプラスミド (pET101::YhjA) を構築し、IPTG 添加誘導により行った。また、YhjA のアミノ酸配列解析から、本タンパク質はヘム *c* 結合サイトを3つ持つと予測されたため、シトクロム *c* の成熟化に関わる遺伝子群である *ccmA-H* オペロン全長を持つプラスミド (pCCM) を構築し、両プラスミドを移入した株 (*E. coli* JW0157(DE3)/ pCCM/ pET101::YhjA) を使用した。各種培養条件 (培養液量、温度、誘導時間など) を検討し、発現の最適化を行った。過剰発現の指標として、還元型ユビキノ-1、あるいは人工基質 tetramethyl phenylene diamine (TMPD) を基質としたオキシダーゼ活性とペルオキシダーゼ活性測定を分光学的に行った。

(2) *A. actinomycetemcomitans* QPO 阻害剤の探索

試料としてリコンビナントキノールペルオキシダーゼを用いた。精製キノールペルオキシダーゼ試料は、*A. actinomycetemcomitans qpo* をクローン化した大腸菌に過剰発現させ、キノールペルオキシダーゼ過剰発現株の膜画分から抽出精製することにより調製した。還元型ユビキノ-1 を基質として、各種濃度の薬剤存在下での精製 QPO におけるペルオキシダーゼ活性を分光学的に測定した。

4. 研究成果

(1) *E. coli* YhjA の過剰発現系及び精製条件の構築

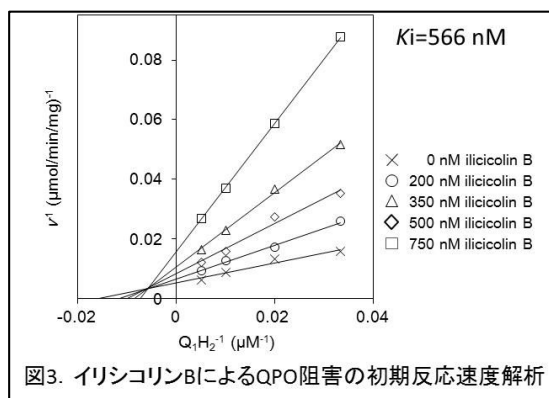
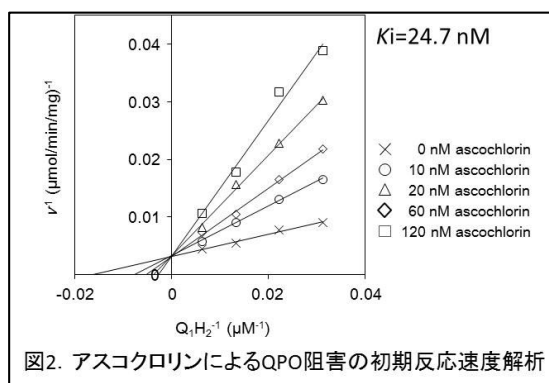
YhjA の過剰発現は、DegP 欠損、*ccm* 遺伝子群の同時過剰発現及び 5-ALA 添加により良好な結果を得られた。しかしながら、安定な過剰発現条件が未だ得られていないため、今後更なる条件検討が必要である。

YhjA 部分精製標品において、キノール及び TMPD ペルオキシダーゼ活性は、各々 117 nmol/min/mg、12.6 nmol/min/mg であり、キノールペルオキシダーゼ活性のほうが約 10 倍高かった。大腸菌の呼吸鎖においてはユビキノールが、生理的な電子供与体として機能していることから、YhjA は大腸菌呼吸鎖の一員である可能性が示唆された。

(2) *A. actinomycetemcomitans* の QPO 阻害剤の探索

本酵素に対する強力な阻害剤としてアスコフラノン (mixed-type 阻害, $K_i=9.557$ nM) が既に報告されている。このアスコフラノンの類似体であるアスコクロリン、イリシコリン B にも強いキノールペルオキシダーゼ阻害活性が認められ、その阻害様式は各々

competitive-, mixed-type であり、阻害活性は各々 $K_i=24.7$ nM、565.9 nM であった (図 2 及び図 3)。一方、呼吸阻害剤に対する IC_{50} は、 $ZnCl_2=4.9$ μ M、 $HQNO=1.4$ μ M、 $KCN=85$ μ M、 NaN_3 =阻害せず、であり、上記薬剤に比較し著しく低い阻害活性であった。以上の結果から、アスコフラノン類似体は侵襲性歯周炎予防薬として応用できる可能性があり、また QPO の生化学的性質を調べるためのツールとして用いることができると考えられた。



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)

[学会発表](計2件)

河原井 武人、古西 清司

侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤の検討

第86回日本生化学会大会

2013年9月13日

横浜

河原井 武人、古西 清司

侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤

第55回歯科基礎医学会学術大会

2013年9月22日

岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原井 武人 (KAWARAI, Taketo)

日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号：90409079

(2)研究分担者

(3)連携研究者

古西 清司 (KONISHI, Kiyoshi)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号： 20178289