

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780139

研究課題名(和文)う蝕リスク低減化食品素材探索へのグルカンスクラーゼ分子基盤

研究課題名(英文)Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen, *Streptococcus mutans*

研究代表者

伊藤 圭祐 (Ito, Keisuke)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：40580460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕(虫歯)の進行は、口腔細菌*Streptococcus mutans*による不溶性グルカンの産生をきっかけに開始される。本研究では不溶性グルカン形成を触媒する虫歯病原因子GTF-SIの立体構造を世界で初めて解明した。GTF-SIの構造には一般的なGH family 13のアミラーゼと比較してアミノ酸配列に順列置換が起きており、阻害剤・糖転移アクセプター基質との結合構造から、GTF-SIのユニークな基質認識メカニズムや反応特異性の詳細を明らかとすることに成功した。本研究から得られた情報は、GTF-SIを特異的に阻害する虫歯予防食品や医薬品の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：*Streptococcus mutans* is the dental caries pathogen. Caries formation is initiated when glucan, a sticky glucose polymer produced by *S. mutans*, forms a biofilm (dental plaque) on teeth. The GTF-SI from *S. mutans* is the key enzyme for the biofilm formation. The structure of GTF-SI analyzed in this study showed that the domain order of GTF-SI was circularly permuted as compared to common GH family 13 amylases. Based on the apo GTF-SI structure and the structures in complex with its inhibitors, we proposed its transglycosyl reaction mechanism via glycosyl-enzyme intermediate in subsite -1. Most importantly, our study reveals that the conformations of the glucose moiety in subsite +1 determines the transglycosyl reaction specificity of glucansucrases. In addition to structural differences in subsite +1, GTF-SI possesses unique structural features in subsite +2. The information should be extremely useful to design new inhibitors to prevent the biofilm formation by the GTF-SI.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：虫歯(う蝕) *Streptococcus mutans* 糖転移酵素 機能性食品 ペプチド X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

う蝕(虫歯)は全世界人口の7割 [WHO 2003年調査]、日本人の9割 [厚生労働省 2007年調査]が患っている最も身近な生活習慣病であり、スクロース(砂糖)の摂取が原因となり発症する。う蝕進行に伴い、痛みや歯を失うだけにとどまらず、長期間の放置によって敗血症を引き起こして死亡する例も報告されている。また、う蝕前段階において発生する歯垢(プラーク)は口臭や歯周病の原因ともなる。このように、う蝕発症リスクの低減はQuality of Lifeの向上のみならず予防医学的観点からも重要である。

口腔細菌 *Streptococcus mutans* はう蝕病原菌であり、その菌体外酵素であるグルカンスクララーゼが病原因子として同定されている。図1に示すように、この酵素は a) スクロースを基質として粘着性のグルコースポリマー(グルカン)を生成し、b) 食べカスや他の口腔細菌を巻き込んでプラークを形成する。続いて c) プラーク内部で酸が産生されることで歯が脱灰し、う蝕が進行する。そのためグルカンスクララーゼの阻害により効果的にう蝕発症リスクを低減可能であるが、そのためにはグルカンスクララーゼの分子基盤を明らかとする必要がある。

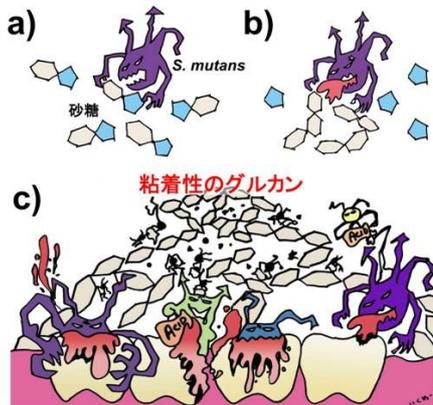


図1. *S. mutans* によるう蝕発生メカニズム

### 2. 研究の目的

プラークは一度形成されてしまうと物理的に取り除くことが容易ではなく、さらに薬剤の浸透も難しい。そのため、グルカンスクララーゼのグルカン合成メカニズムを理解し、効果的に阻害することが、う蝕発症リスク低減へとつながる。しかしこれまでグルカンスクララーゼは類似タンパク質の立体構造さえも明らかとされていなかったため、立体構造の予測すら困難であった。立体構造情報を利用することで、さらに特異性、阻害効果の高いグルカンスクララーゼ阻害物質の開発が期待できる。そこで本研究では、*S. mutans* 由来グルカンスクララーゼの立体構造解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

*S. mutans* は3種のグルカンスクララーゼ(GTF-S、I、SI)をもつ。これらはスクロー

スを基質として、GTF-IとSIは主にグルコース単位が(1-3)結合で連結した不溶性グルカンを、GTF-Sは(1-6)結合で連結した可溶性グルカンを生成する。3酵素の複合作用により粘着性の不溶性グルカンを合成されるため、いずれか1種でも産生できない変異型 *S. mutans* 株はう蝕病原性を持たないことが知られている。本研究では、プラーク形成の初期反応である不溶性グルカン生成に関するGTF-SIについて解析を行なった。

これまでグルカンスクララーゼの構造生物学的研究がほとんど進展していない理由として、X線結晶構造解析へ必要な結晶化可能なサンプルの調製が困難なことが挙げられる。大腸菌を用いた一般的な異種タンパク質発現系では、グルカンスクララーゼは不溶性画分に封入体を形成する。これまで、封入体からのリフォールディングによって得た活性型グルカンスクララーゼによる機能解析が報告されているものの、この方法によって得られたサンプルはリフォールディングが不十分なタンパク質を多く含むため、結晶化には不適であった。グルカンスクララーゼはおよそ160 kDaの巨大分子であり、触媒ドメインとグルカン結合ドメインから構成される。そこで本研究ではアミノ酸配列アライメントによりグルカンスクララーゼの触媒ドメイン領域を詳細に予測し、PCR法により *S. mutans* ゲノムよりGTF-SIの部分遺伝子を取得した。続いて大腸菌発現系による発現誘導条件を検討することで、可溶性画分に高活性型グルカンスクララーゼを大量に得る系を構築した。

得られたGTF-SIタンパク質を純度95%以上に精製し、結晶化を行なった。結晶化条件スクリーニングにおいては、界面活性剤を用いることで疎水性相互作用に起因するアモルファス形成を効率よく回避できることを見出し(図2)、またシーディング法により得られた結晶を用いることで、高分解能での立体構造解析(単波長異常分散法)に成功した。

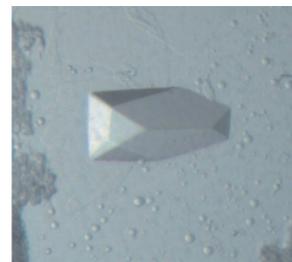


図2. GTF-SIの結晶

### 4. 研究成果

本研究により明らかとなったGTF-SIの立体構造は、触媒ドメインを含めた計4つのドメインにより構成されていた(グルカン結合ドメインはコンストラクトに含まれていない)。グルカンスクララーゼはアミノ酸配列の特徴からグルコシドヒドロラーゼファミリー(GH)70に属するが、GTF-SIの触媒ドメインはGH13に属する既知のアミラーゼに

類似したTIMバレル構造を取っていた(図3)。その一方で、GTF-SIとGH13アミラーゼのアミノ酸配列間には順列置換が起きていることが明らかとなった。すなわち、GH13アミラーゼのドメイン構成はN末端側からA1、B、A2、Cの順であるのに対し、グルカンスクラーゼのドメインはB1、A1、C、A2、B2の順で構成されていた。また、GTF-SIの触媒部位に被さるように、GH13アミラーゼには存在しない2つのヘリックスが存在し、サブサイトの一部を形成していた。このような順列置換や配列挿入は、GH70とGH13ファミリー間酵素の分子進化を示唆するものとして興味深い。

グルカンスクラーゼの糖転移反応メカニズムを理解し、効果的な阻害物質を設計開発するには、そのサブサイト構造の情報が不可欠である。そこで、阻害物質であるアカルボース、糖転移反応を受ける基質(アクセプター基質)であるマルトースとの複合体構造をそれぞれ解析した(図4)。触媒残基を含め、サブサイト-1を構成するアミノ酸残基については、*Aspergillus oryzae*由来アミラーゼ等のGH13アミラーゼとの間で高度に保存されていた。一方で、糖転移アクセプター基質の認識に関わるサブサイト+1、+2、+3を構成するアミノ酸残基は大きく異なっていた。これらの知見はグルカンスクラーゼに特異的な阻害物質の設計・探索に重要である。マルトースはTrp517とTyr430に挟まれて結合しており、これらのアミノ酸残基がアクセプター基質の結合に重要であることが明らかとなった。さらに、サブサイトを構成するアミノ酸残基のうちGTF-S、I、SI間で異なる箇所は593位のみであることがわかり、このアミノ酸残基が3酵素間の糖転移反応生成物の違いに関与していることが示唆された。なお、GTF-I、GTF-SにおいてGTF-SIの593位に相当するアミノ酸残基への変異導入が生成物の構造を変化させるとの報告もある。593位のアミノ酸残基はグルカンスクラーゼに特徴的なヘリックス上に位置し、アクセプター基質の結合配向に重要と考えられた。これらの知見は、最近報告された乳酸菌由来グルカンスクラーゼの構造解析の結果とも一致している。

続いて予備的に市販の飲料、および食品由来のポリフェノール類等についてグルカンスクラーゼ阻害効果を解析した結果、緑茶カテキン等に高いGTF-SI阻害効果がみとめられた。本研究で確立したグルカンスクラーゼの結晶構造解析技術を用いたポリフェノール類との複合体構造解析により、その作用メカニズムの詳細が明らかとなることが期待される。また、グルカンスクラーゼ阻害との相乗効果を得ることを目的として、別視点からう蝕リスク低減食品素材を探索した結果、ある種の食品ペプチドに*S. mutans*の生育を阻害する効果があることを見出した。このペプチドは細胞内ADP/ATP比の顕著な増加を引

き起こし、静菌的に作用することが示された。類似構造のペプチド群について生育阻害効果を解析した結果、効果発現にはそのアミノ酸配列が重要であり、特定の側鎖を有するアミノ酸残基が特定の位置に存在することが重要であることが明らかとなった。現在、細胞内へのペプチド取り込みを迅速・簡便に測定できるシステムを開発し、詳細な作用メカニズムについて解析中である。今後、グルカンスクラーゼ阻害物質と*S. mutans*生育阻害物質を同時に利用することで、う蝕リスクの効果的な低減が期待される。

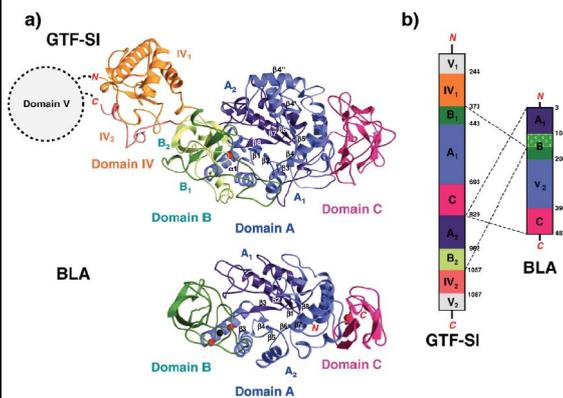


図3. GTF-SIの全体構造。a) GTF-SIと既知アミラーゼ(BLA: *Bacillus licheniformis*-amylase)との構造比較。ドメインA、B、Cの構造は全体的に類似していたが、GTF-SIには既知アミラーゼには見られない2つのヘリックス(4'と4'')とドメインIVが存在した。ドメインVは本研究では明らかとされていない。b) アミノ酸配列とドメイン構造の比較。GTF-SIでは既知のアミラーゼと比較してアミノ酸配列の順列に置換が起きている。

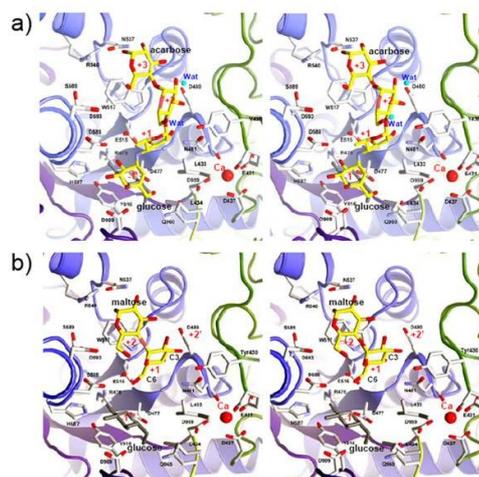


図4. 阻害剤、アクセプター基質との結合構造。a) グルカンスクラーゼ阻害剤であるアカルボースとの結合構造。サブサイト-1のアミノ酸残基は既知のアミラーゼと類似していた。一方、サブサイト+1、+2、+3のアミノ酸残基は大きく異なっていた。b) アクセプター基質であるマルトースとの結合構造。マ

ルトースは Trp517 と Tyr430 に挟まれて結合しており、さらに、アクセプター基質の結合配向には Asp593 が重要であった。

#### 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 5 件)

Vu Thi Tuyet Lan, Keisuke Ito\*, Sohei Ito, Yasuaki Kawarasaki. Trp-Arg-Xaa tripeptides act as uncompetitive-type inhibitors of human dipeptidyl peptidase IV. *Peptides* 2014 54 166-170 DOI: 10.1016/j.peptides.2014.01.027

Keisuke Ito\*, Aya Hikida, Vu Thi Tuyet Lan, Takayasu Motoyama, Sayuri Kitagawa, Yuko Yoshikawa, Ryuji Kato, Yasuaki Kawarasaki. Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. *Nat. Commun.* 2013 4(2502). DOI: 10.1038/ncomms3502.

Aya Hikida, Keisuke Ito\*, Takayasu Motoyama, Ryuji Kato, Yasuaki Kawarasaki. Systematic analysis of a dipeptide library for inhibitor development using human dipeptidyl peptidase IV produced by a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013 430(4) 1217-1222. DOI: doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.073.

Keisuke Ito, Sohei Ito, Tatsuro Shimamura, Simone Weyand, Yasuaki Kawarasaki, Takumi Misaka, Keiko Abe, Takuya Kobayashi, Alexander David Cameron, So Iwata. Crystal structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* 2011 408(2) 177-186. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.02.028.

Keisuke Ito\*, Aya Hikida, Sayuri Kitagawa, Takumi Misaka, Keiko Abe, Yasuaki Kawarasaki. Soy peptides enhance heterologous membrane protein expression during the exponential growth phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012 76(3) 628-631. DOI: 10.1271/bbb.110965

##### [学会発表](計 17 件)

伊藤圭祐, Vu Thi Tuyet Lan, 伊藤創平, 河原崎泰昌: 抗 2 型糖尿病標的 hDPPIV を新たな様式で阻害するオリゴペプチド群の発見、第 15 回静岡ライフサイエ

ンスシンポジウム、2014 年 3 月、静岡  
伊藤圭祐, Vu Thi Tuyet Lan, 木村美香, 本山貴康, 河合駿, 加藤竜司, 河原崎泰昌: プロトン共役型オリゴペプチド輸送体を介した食品ペプチド素材の生体吸収性解析、日本農芸化学会 2013 年度大会 2014 年 3 月、東京

Vu Thi Tuyet Lan, 伊藤圭祐, 石黒正路, 本山貴康, 河合駿, 加藤竜司, 河原崎泰昌: プロトン共役型オリゴペプチド輸送体によるジ・トリペプチドおよび医薬品認識メカニズムの解明、日本農芸化学会 2013 年度大会、2014 年 3 月、東京

伊藤圭祐, 萱嶋泰成, 吉川悠子, 佐久間理英, 石井剛志, 中村順行, 河原崎泰昌: 食薬ペプチド機能研究コンソーシアム分子と生体を繋ぐ包括的な産学官連携研究体制の構築を目指して-、“産・学・民・官”の連携を考えるつどい、2013 年 11 月、静岡

森野智子, 伊藤圭祐: 高齢者の食と楽しみを守る「おいしい訓練飴」の効果の検証、“産・学・民・官”の連携を考えるつどい、2013 年 11 月、静岡

Vu Thi Tuyet Lan, Keisuke Ito, Takayasu Motoyama, Sayuri Kitagawa, Ryuji Kato, Yasuaki Kawarasaki: Multisubstrate recognition mechanism of proton-coupled oligopeptide transporter. THE 18th SHIZUOKA FORUM ON HEALTH AND LONGEVITY, November 2013, Shizuoka

伊藤圭祐, Vu Thi Tuyet Lan, 本山貴康, 加藤竜司, 河原崎泰昌: 食品ペプチド・医薬品の生体吸収性に関する POT ファミリー輸送体の基質多選択性、第 39 回機能性食品用ペプチド研究会、2013 年 10 月、大阪

Vu Thi Tuyet Lan, 伊藤圭祐, 本山貴康, 北川さゆり, 加藤竜司, 河原崎泰昌: Alanine-scanning mutagenesis による酵母ペプチド輸送体 Ptr2p の多基質認識メカニズムの解析、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月、広島

伊藤圭祐, 本山貴康, 加藤竜司, 河原崎泰昌: POT ファミリー輸送体を介した栄養源ペプチド・医薬品の吸収スペクトルの解明、静岡県立大学学術フォーラム、2013 年 9 月、静岡

森野智子, 伊藤圭祐: 在宅で生活する健康な高齢者における「棒付き飴」トレーニングの効果、静岡県立大学学術フォーラム、2013 年 9 月、静岡

伊藤圭祐, 疋田礼, 本山貴康, 加藤竜司, 河原崎泰昌: 全 400 種ジペプチドの網羅的解析により解明された真核生物ペプチドトランスポーターの基質多選択性、日本農芸化学会 2012 年度大会、2013 年 3 月、仙台

疋田礼, 伊藤圭祐, 河原崎泰昌: 抗 2

型糖尿病 DPP-IV 阻害ペプチドの探索と  
吸収特性評価、第 17 回日本フードファ  
クター学会学術集会、2012 年 11 月、静  
岡

疋田礼、伊藤圭祐、本山貴康、北川さゆ  
り、河原崎泰昌：出芽酵母をツールとし  
た迅速・簡便なペプチド輸送活性解析シ  
ステムの開発、第 64 回日本生物工学会  
大会、2012 年 10 月、神戸

疋田礼、伊藤圭祐、本山貴康、北川さゆ  
り、河原崎泰昌：食品ペプチド素材の吸  
収特性解析システムの開発、第 13 回静  
岡ライフサイエンスシンポジウム、2012  
年 3 月、静岡

疋田礼、伊藤圭祐、河原崎泰昌：ペプチ  
ド性培養基は酵母指数増殖期におけ  
る組換えタンパク質生産性を向上する、  
日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年  
3 月、京都

伊藤圭祐、岩田想、河原崎泰昌、伊藤創  
平：虫歯菌由来糖質関連酵素の X 線結晶  
構造解析、静岡県立大学学術フォーラム、  
2011 年 9 月、静岡

伊藤圭祐、伊藤創平、岩田想、河原崎泰  
昌：歯垢形成の原因となるグルカン合成  
酵素の立体構造解析、日本生物工学会、  
2011 年 9 月、東京

〔図書〕(計 4 件)

伊藤圭祐 他、**食品加工技術**、日本食  
品・機械研究会、2014、印刷中

伊藤圭祐 他、**バイオサイエンスとイン  
ダストリー**、バイオインダストリー協会、  
2014、72

伊藤圭祐 他、**化学と生物**、株式会  
社出版センター、2011、49

伊藤圭祐 他、**バイオサイエンスとイン  
ダストリー**、バイオインダストリー協会、  
2011、69

〔その他〕

ホームページ等

[http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/sf  
ns/temp\\_docs/110218GSase/110218.htm  
l](http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/sfns/temp_docs/110218GSase/110218.html)

[http://www.jst.go.jp/pr/announce/20  
110217/index.html](http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110217/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 圭祐 (KEISUKE ITO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：40580460