

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：31201
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792130
 研究課題名（和文） *Fusobacterium*における硫化水素産生機構の分子構造基盤の確立
 研究課題名（英文） Establishment of molecular and structural basis of hydrogen sulfide-producing mechanism in *Fusobacterium*
 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）：

口腔細菌により産生される硫化水素は口臭の主要な原因物質であり、歯周病を進行させる一因としても知られる。本研究課題では、高い硫化水素産生能を持つ *Fusobacterium nucleatum* に着眼し、この細菌における主要な 2 種類の硫化水素産生酵素の立体構造を決定した。さらに、野生型および各種変異体の酵素学的解析の結果と併せて、それらの反応機構を明らかにした。これにより、この細菌における硫化水素産生機構の分子構造基盤が確立できたものとする。

研究成果の概要（英文）：

Hydrogen sulfide produced by oral bacteria is a predominant causative agent of oral malodor and is also known to be a pathogenic factor of periodontal disease. In this research, we determined the structures of two hydrogen sulfide-producing enzymes in *Fusobacterium nucleatum*, a periodontal pathogen that can produce a significant amount of hydrogen sulfide in human oral cavity. Furthermore, we analyzed enzymatic properties of the wild types and site-directed mutants. Based on the results, the reaction mechanisms of the enzymes were elucidated, and molecular and structural basis of hydrogen sulfide-producing mechanism in this oral bacterium could be established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、硫化水素産生、歯周病、酵素、立体構造

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持ち、歯周病を進行さ

せる一因となる。すなわち、口臭と歯周病の間には密接な関連がある（Ratcliff & Johnson, *J. Periodontol.* 1999）。

*F. nucleatum*は歯周病原細菌として知られており、極めて高い硫化水素産生能を持っている（Persson *et al.*, *Oral Microbiol.*

Immunol. 1990; Yoshida *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; Yoshida *et al.*, *J. Priodontol.* 2009)。申請当時、申請者らは、*F. nucleatum* の 3 種類の硫化水素産生酵素遺伝子 (*fn0625*, *fn1055*, *fn1220*) を同定し、それら酵素タンパク質の生化学的および構造生物学的解析を進めていた。また、口腔細菌ではないが、メタン生成古細菌においても硫化水素産生酵素が同定されており (Tchong *et al.*, *Biochemistry* 2005)、*F. nucleatum* のゲノム上にもこのオーソログと考えられる遺伝子 (*fn1147*) が存在する。すなわち、これまでに *F. nucleatum* には少なくとも 4 種類の硫化水素産生酵素が存在すると考えられた。機能未知の Fn1147 を除いては、いずれもピリドキサル 5' -リン酸 (PLP) 依存性酵素で、アミノ酸の生合成に関与する可能性が高く、*F. nucleatum* による硫化水素産生の裏側には、生命維持に直結した一面を併せ持つことが見えつつあった。一方、Fn1147 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 [4Fe-4S] が [3Fe-4S] となることで失活すると推察された。したがって、*F. nucleatum* は歯周ポケットなどの嫌気環境下で分布割合が高いことを考えると、この酵素が歯周病に特に深い関わりを持つ可能性が高いものと思われた。

これまで、口腔細菌の硫化水素産生酵素に関する構造研究は、申請者らの報告 (Kezuka *et al.*, *Acta Crystrogr. F* 2009) を除けば、一例 (Kurpka *et al.*, *EMBO J.* 2000) あるのみであり、硫化水素産生反応の多様性を考えると、その機構解明のためのタンパク質構造情報は不足していると言わざるを得ない状況であった。

2. 研究の目的

本課題では研究対象を *F. nucleatum* に絞り、この細菌の持つ硫化水素産生酵素群を包括的に捉え、それら酵素の反応機構 (硫化水素産生機構) を構造生物学的および生化学的側面から原子レベルで解明することを目的とした。研究を進めて行くと、これまで同定された硫化水素産生酵素の中では、L-システインを基質とした際の硫化水素産生への寄与は、Fn1220 が最も高く (~88%)、次いで Fn1055 が高い (~10%) ことが分かった (Suwabe *et al.*, *Microbiology* 2011)。したがって、特にこの 2 種類の酵素に焦点を絞りつつ研究を進める方針を取った。

3. 研究の方法

(1) 酵素学的解析

野生型および触媒や基質結合に関与すると考えられるアミノ酸を置換した変異体を作製し、その酵素学的性質を調べ、反応機構を検証した。酵素活性測定法は、従来から使用していた比色法に加え、新たに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法を検討した。これにより、より正確な統計値を得ることが期待できた。

(2) X線結晶構造解析

タンパク質の X線結晶構造解析には少なくともミリグラムオーダーの精製試料が必要となる。そのため、試料の大量調製系の最適化を行った。また、良質な結晶を得ることが、X線結晶構造解析による構造決定には肝要である。したがって、大量調製系とともに結晶化条件の最適化を行った。

現有の X線回折装置および大型放射光施設において X線回折強度データを収集し、結晶構造解析を行った。大型放射光施設 (高エネルギー加速器研究機構) を利用するために課題を申請し、採択の後、回折実験を行った。課題番号: 2011G010

課題名: 歯周病菌由来硫化水素産生酵素反応中間体の結晶構造解析

有効期間: 2011 年 4 月より 2 年間

酵素の反応機構を知る上で、反応中間体-酵素複合体の結晶構造を得ることは極めて重要である。酵素単独の結晶を基質溶液にソーキングして反応中間体結晶を作製した。酵素 (野生型あるいは変異体) と基質 (基質アナログを含む) の組み合わせ、基質濃度やソーキング時間を変化させることで、多段階の反応中間体の捕捉を試みた。

(3) 顕微分光測定

PLP 依存性酵素の反応の進行度は、反応中間体固有の吸収から見積もることができる (Karsten & Cook, *Methods Enzymol.* 2002)。理化学研究所播磨研究所において顕微分光測定を行い、結晶中において反応中間体が形成されていることを確認した。

4. 研究成果

F. nucleatum は、L-システインを基質として硫化水素を産生することのできる酵素を少なくとも 4 種類持つことが明らかとなっている。このうち主に 2 種類の酵素 (Fn1220

と Fn1055) について、酵素学および結晶構造解析を行った。

Fn1220

L-システインを基質とした硫化水素産生への寄与が最も高い Fn1220 は、研究開始当初までに酵素単独および基質類似体 (L-セリン) 複合体の立体構造を決定していた。これに加え、基質である L-システインを用いて、新たに基質複合体の立体構造解析に 1.84 Å 分解能で成功した。これらの複合体構造において各々のアミノ酸は、Fn1220 の補因子である PLP と共有結合した状態で観測された。Fn1220 は、2 分子の L-システインから、L-ランチオニンと硫化水素を産生する。この反応は、L-システインの β 置換反応であり、得られた 2 種類の間体は、 β 置換が起こる前後に生成するアルジミン (L-serine and L-lanthionine external aldimine) であることが得られた中間体の電子密度から考えられた。これは、顕微分光測定から得られるスペクトル変化からも支持される結果であった。これにより、L-システインを基質として硫化水素 (と L-ランチオニン) を産生する一連の反応を原子レベルの立体構造に基づいて議論することが可能となった。反応中間体と直接相互作用するアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した酵素の解析により、基質のカルボキシル基を認識する Thr69 と Gln142 が触媒活性に対する寄与が大きいことが示された。

Fn1055

Fn1055 は L-システインを基質として L-セリンを産生する反応を触媒する。この酵素の L-システインに対する酵素学的パラメータを決定した。また、新規結晶化条件の探索に成功し、2.07 Å で立体構造を決定した。この酵素は、同一サブユニットが 2 回回転軸で関係付けられる二量体構造を取っていた。サブユニットは α/β 構造を持つ 2 つのドメインからなっており、補因子である PLP は、これらの作るクレフトの底部で Lys46 と共有結合を形成していた。解析に用いた結晶の非対称単位には 4 つのサブユニットが存在するが、1 つは触媒部位を含むクレフトが開いた形を、他の 3 つは閉じた形をしていた。得られた結晶構造は、Fn1055 による触媒反応が、クレフトの開閉を伴う L-システインの β 脱離反応により進むことを支持するものであった。さらに、この反応において塩基として働くと考

えられるアミノ酸残基を見出し、これが反応に必須であることを酵素活性測定および紫外可視分光法により確かめた。

Fn1055 の全体構造は、Fn1220 やこれらの関連酵素である *o*-アセチルセリンスルフィドリラーゼ (Schneff *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2007) と類似していた。構造の比較から、触媒部位のクレフトを形成し、基質の結合により構造変化が顕著な領域 (ループ) の保存性が低いことが分かった。これら酵素はいずれもアミノ酸を基質とするが、その大きさは異なる。ループ部分の構造および長さにより、基質ポケットの大きさに差が生じ、酵素の基質特異性の相違に及んでいることが推察された。

HPLC を用いた酵素活性測定法 (Fn1055)

従来の酵素活性測定法は、硫化水素の量に依存して生成されるメチレンブルーを定量する系 (Soda, *Anal. Biochem.* 1968) を用いて実施していた。しかし、この系では硫化水素の大気中への拡散により生じる誤差を完全に排除することは困難であった。また、Fn1055 は L-システインの β 脱離反応により硫化水素および L-セリンを産生する。この機構では、(1) PLP と L-システインの共有結合中間体の形成、(2) チオール基の脱離 (ここで硫化水素が産生される)、(3) 水分子による求核攻撃による PLP と L-セリンの共有結合中間体の形成、(4) 反応生成物である L-セリンの放出、という順で反応が進む。したがって、酵素反応の完全なサイクルが進行していることを保証するためには、硫化水素ではなく L-セリンを定量する必要がある。そこで、アミノ酸のラベル化剤であるダブシルクロリド (CAS 番号: 56512-49-3) を用い、ダブシル化 L-セリンを HPLC により定量する系を立ち上げた。オクタデシルシリル (ODS) カラムを用い、移動相には酢酸アンモニウムとアセトニトリルを使用した。アセトニトリルの直線勾配によりダブシル化 L-セリンを溶出させる。この系により、より正確な酵素学的パラメータを決定できることが期待された。

Fn1220 の産生する L-ランチオニンを定量する系も同様の方法に基づき、条件を調整することで可能であると考えられる。

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3件)

1. Kezuka, Y., Abe, N., Yoshida, Y. and Nonaka, T. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of two hydrogen sulfide-producing enzymes from *Fusobacterium nucleatum*. *Acta Crystallogr. F* 68, 1507-1510. (2012) doi: 10.1107/S1744309112042546
査読有り
2. Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T. Structural insights into catalysis by β C-S lyase from *Streptococcus anginosus*. *Proteins* 80, 2447-2458. (2012).
doi: 10.1002/prot.24129
査読有り
3. Yoshida, Y., Suwabe, K., Nagano, K., Kezuka, Y., Kato, H. and Yoshimura, F. Identification and enzymatic analysis of a novel protein associated with production of hydrogen sulfide and L-serine from L-cysteine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology* 157, 2164-2171. (2011).
doi: 10.1099/mic.0.048934-0
査読有り

[学会発表] (計8件)

1. 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌 歯周病原細菌由来硫化水素産生酵素-反応中間体の結晶構造、第12回日本蛋白質科学会年会、2013年6月20日、名古屋市
2. 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌 歯周病原細菌由来硫化水素産生酵素の構造と反応機構、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日、鳥取市
3. Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T. Structure analysis of hydrogen sulfide-producing enzyme complexed with its reaction intermediates from a periodontal pathogen. Federation of Asian and Oceanian Biochemists and

Molecular Biologists (FAOBMB) Mini-Symposium -Molecular Bases for Medical and Pharmaceutical Sciences-, 2013/4/6, Yahaba, Iwate

4. 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌 歯周病原細菌由来硫化水素産生酵素の結晶構造解析、第1回物構研サイエンスフェスタ、2013年3月14日、つくば市
5. Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T. Structure analysis of hydrogen sulfide-producing enzyme complexed with its reaction intermediates from a periodontal pathogen. A Joint Meeting of the Asian Crystallographic Association and Society of Crystallographers in Australia and New Zealand, 2012/12/3, Adelaide, Australia
6. 野中孝昌、毛塚雄一郎、吉田康夫 歯周病原細菌由来硫化水素産生酵素-反応中間体の結晶構造解析、第6回岩手医科大学先端医療薬学研究センター講演会、2012年3月16日、紫波郡矢巾町
7. 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌 歯周病原細菌由来硫化水素産生酵素-反応中間体の結晶構造解析、第29回PFシンポジウム、2012年3月15日、つくば市
8. 野中孝昌 蛋白質のX線構造解析と応用、第45回日本生体医工学会東北支部大会(招待講演)、2011年10月29日、盛岡市

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