

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450138

研究課題名(和文) 種々の病因となるプロリン特異性ペプチダーゼ類に対する新規阻害剤の研究

研究課題名(英文) New inhibitor for proline specific peptidases which cause several

研究代表者

芳本 忠 (Yoshimoto, Tadashi)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：60088870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病菌である *P. gingivalis* が持つプロリルトリペプチジルペプチダーゼ(PTP)は歯周病のキー酵素である。天然物をスクリーニングした結果、米ぬか 高い活性を見出した。この PTP 阻害タンパク質(PTPI)を米ぬか抽出物から精製した。更に、質量分析計と米データベースから PTPI は遺伝子 Os05g0323900 であることを同定した。この遺伝子をチオレドキシン(Trx)との融合タンパク質として大腸菌で発現し、シッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Prolyl tripeptidyl peptidase (PTP) from *P. gingivalis* is a key enzyme of periodontitis. After screening of natural products, rice bran had high inhibitory activity for PTP. The inhibitor protein (PTPI) was purified from rice bran. By MALDI-TOF MS and database of rice, gene Os05g0323900 was identified as the PTP inhibitor. The protein was expressed as fusion protein with thioredoxin, rPTPI-Trx, in *E. coli*, and crystallized by the sitting drop vapor diffusion method

研究分野：生物学

キーワード：歯周病 阻害剤 プロリン 米ぬか プロリルトリペプチジルペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

本申請者らは初めてプロリルオリゴペプチダーゼ (POP) を見出し、ポストプロリン分解酵素として報告した (*Biochemistry*, **16**, 2942-2948 (1977) *JBC*, **253**, 3708-3716 (1978))。その後、図1のような種々のプロリン特異性ペプチダーゼを見出し、プロリルオリゴペプチダーゼ・ファミリーを形成することを明らかにした (*Handbook of Proteolytic Enzymes*, Ed. by Barrett, 2004)。(図1)

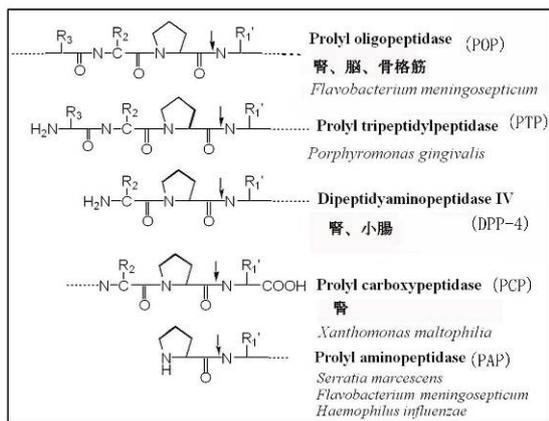


図1 種々のプロリン特異性ペプチダーゼ

これらプロリン特異性ペプチダーゼは種々の疾病と関連する。その中で、歯周病菌の持つプロリルトリペプチジルペプチダーゼ (PTP) に注目した。Porphyromonas gingivalis は歯周病の原因菌とされる。この菌は特殊で、糖を代謝できず、アミノ酸の代謝からエネルギーを得る性質を持つ。そのため歯肉のコラーゲンを分解しアミノ酸を得ていると考えられている。コラーゲンは (Gly-X-Pro)_n の基本構造を持ち、3番目にプロリンがあるときに働く PTP がキラー酵素となり、PTP に特異的な阻害剤が歯周病の治療薬となると考えられる。我々は既に、P. gingivalis の PTP 遺伝子を高発現させ、酵素を結晶化し、構造解析に成功した。更に合成阻害剤を開発し酵素-阻害剤複合体の解析に成功し、触媒機構を明らかにした。

2. 研究の目的

歯周病に焦点をあてた。歯周病は好気性あるいは嫌気性の十数種類の細菌が原因菌として知られており、成人の約60%が感染していると言われている。発症すると歯肉の腫れ、出血、不快感をはじめ、歯を支える歯肉の減少、歯肉の痛み、口臭などの原因となり治療せず放置し、悪化すると歯が抜け落ちる怖い疾患である。これらのうち嫌気性の Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) が主な病原菌と知られている。

本申請で酵素に特異的な阻害作用を天然物に見出し、予防・治療薬に向けた研究である。

表1 歯周病菌 (P. gingivalis) の持つ酵素

	酵素名	特異性と役割
1	コラーゲナーゼ	コラーゲンに働き大きく切断する。
2	ジンジバイン	トリプシン様酵素で、Lys と Arg それぞれ特異的に働く酵素 Lys ジンジバイン (Lys-↓-X--), Arg ジンジバイン (Arg-↓-X--) が存在
③	プロリルトリペプチジルペプチダーゼ (PTP)	本研究の酵素で、N末端から3番目にプロリンがあるとプロリンの後を切る酵素 X-X-Pro-↓-X-
4	ジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4)	N末端から2番目にプロリンがあるとプロリンの後を切る酵素 X-Pro-↓-X-
5	アミノペプチダーゼN (APN)	生体に広く分布し、基質特異性が広いアミノペプチダーゼ X-↓-X-X--

歯周病菌は特殊な代謝系を持ち、エネルギー源として糖を利用することができず、歯肉のコラーゲンを分解してペプチド断片からアミノ酸にして摂取し、TCA回路に入りエネルギーを得ている。

コラーゲンはプロリンを多く含む。そのため一般のプロテアーゼは作用できず、唯一コラーゲナーゼがこの特殊な構造に作用でき、大きく分解する。コラーゲナーゼで分解された断片は初めてプロテアーゼやペプチダーゼで分解可能となるが、プロリンを多く含むためアミノペプチダーゼNでアミノ酸へ簡単には分解できない。そのため、プロリンを除去する目的でプロリルトリペプチジルペプチダーゼやジペプチジルペプチダーゼ I V の作用が必要となる。図2ではそれらの関与によりアミノペプチダーゼNがペプチドを分解しアミノ酸に分解している機構を示している。特に、コラーゲンは Gly-X-Pro の繰り返しが多く、X-X-Pro 単位で切断するプロリルトリペプチジルペプチダーゼの役割が大きいと思われる。

歯周病菌のプロリルトリペプチジルペプチダーゼ (PTP) は Potempa et al によって酵素遺伝子が分離された。我々のグループによって、酵素遺伝子が大腸菌で高発現され、結晶化され、X線結晶回折により立体構造が明らかにされた。酵素は二量体で構成され、その単量体はプロペラドメイン

と触媒ドメインで構成されている。活性部位には Ser、His、Asp の触媒三残基で構成され、一方、基質を認識する機構として、疎水ポケットが存在しプロリンがそのポケットにはまり込み認識される。アミノ末端の認識には2個のグルタミン酸が存在しトリペプチジルペプチダーゼの作用を示す機構が明らかにされた。

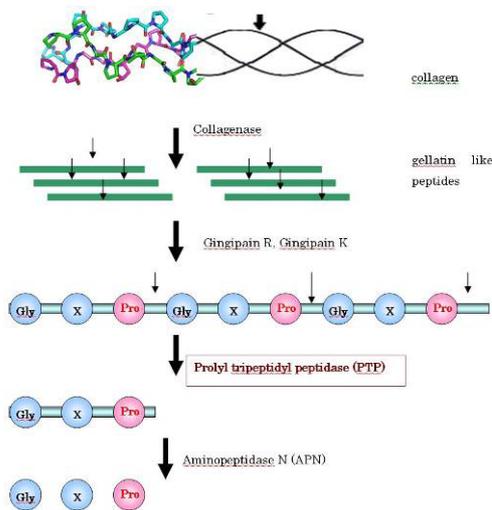


図2 歯肉コラーゲンの分解機構

さらに、酵素に特異的な阻害剤として H-Ala-Ile-pyrrolidin-2-yl boronic acid が化学合成され酵素の複合体構造が明らかにされた。これによって、酵素の触媒機構の詳細も明らかになった。

しかし、この阻害剤は酵素と共有結合するために、医薬品としては向かない。

そのため、前述のごとく、天然から阻害剤を見出し予防薬とするのがこの研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 天然物のサンプル処理法

天然物をホモジネートし、遠心分離したものの上清をサンプル保管用のガラス容器に入れ、 -80°C で保存し、サンプルとして実験に使用した。

(2) 阻害活性実験

96穴プレートを用い、緩衝液(20mM Tris-HCl pH7.2) 70 μl 、基質 2mM (Ala-Phe-Pro- β NA) 10 μl 、サンプル 10 μl 、と酵素 10 μl 加えた後、10分後に Fast Garnet GBC (4M 酢酸緩衝液 pH4.0 に Triton X-100 10%を含む) を 50 μl 加えて、反応を停止し、アゾ発色させた。阻害活性はサ

ンプルの代わりに緩衝液を入れたものを 100%活性とし、上記反応の結果低下した率で示した

4. 研究成果

(1) PTP 阻害活性を有するタンパク質の精製

スクリーニングの結果、米ぬか抽出物に高い PTP 阻害活性を見出した。米ぬか約 500g を用い緩衝液 (20mM Tris-HCl pH7.2) で抽出し、遠心分離上清に硫酸アンモニウムを 40% 飽和から 80% 飽和で分画した。

次いで、40% 飽和硫酸アンモニウムを含む 20mM Tris-HCl pH7.2 の溶液に溶解し、Toyopearl HW-65C を用いた疎水性クロマトグラフィーで精製した。活性分画を脱塩したのち、DEAE Toyopearl でイオン交換クロマトグラフィーで精製した。更に、Sephacryl S-200 でゲル濾過クロマトグラフィーにかけた

得られたタンパク質は、不純物を少し含んでいたため、再度上記と同じ方法により Sephacryl S-200 でゲル濾過クロマトグラフィーを行った。PTP 阻害活性がピークである部分を回収し、常法に従ってサンプルを加熱と非加熱で SDS 電気泳動を行った。共通して 25kDa の分子量を有するバンドが見られた (図3)。

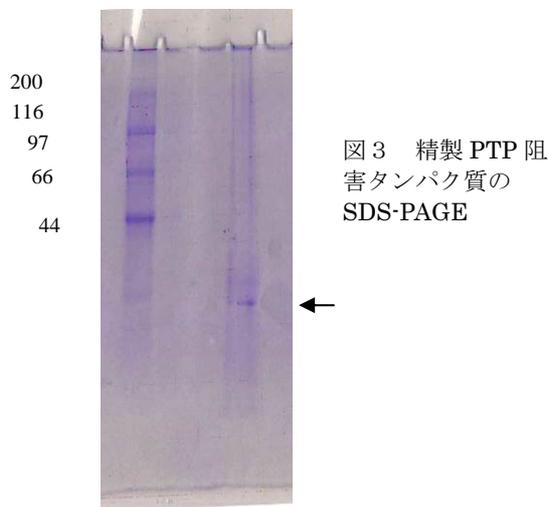


図3 精製 PTP 阻害タンパク質の SDS-PAGE

(2) 阻害剤の基礎的性質

米ぬかからの阻害剤 rPTPI は PTP を強く阻害した。僅かではあるが DPP-4 と PAP を阻害しているが、構造類似からくるものかは今後の研究が必要である。

(3) 阻害剤の歯周病菌の生育への影響

阻害剤の歯周病菌への影響を、トリプティカーゼ大豆血液 (Trypticase Soy blood agar) 培地を用い 37°C で、嫌気培養条件で行った。

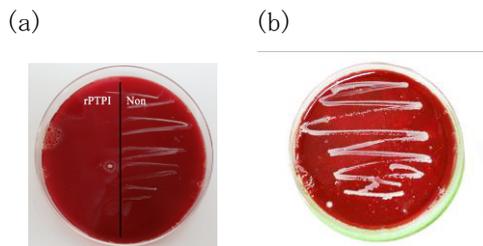


図4 歯周病菌 (*P. gingivalis*) の生育への阻害剤の影響

(a) 左部分に阻害剤を塗布、(b) コントロール

図4で示すごとく、プレート左半分では、歯周病菌の増殖が阻害されており、プレート右半分では、増殖は阻害されなかった。よって、米ぬかから精製した PTP 阻害活性を有するタンパク質は、歯周病菌の増殖を阻止する傾向が確認された。トリプティカーゼ大豆寒天に含まれるタンパク質 (プロリン結合部を含む) の歯周病菌 PTP による分解を、本発明のタンパク質が阻害したことにより、歯周病菌の増殖が抑制されたと考えられた。

(4) 阻害物質のアミノ酸配列決定

SDS-PAGE で得られたバンドから抽出し、トリプシン消化後、質量分析器によりアミノ酸配列を調べた。3つの配列を米データベースを用いて検索した結果、遺伝子の1~693番目の塩基配列によりコードされるものであり、アミノ酸残基数は231個、推定分子量は24998.26である。

(5) 遺伝子組換えによる発現

① 直接発現

米データベースより得た rPTPI の塩基配列 (ID: Os05g0323900) を、大腸菌のコドン利用に合わせた塩基配列に化学合成した。これを用い、プラスミドベクター pET-23d に挿入し、大腸菌 BL21(DE3) に形質転換した。形質転換株の SDS-PAGE を行ったところ、殆どの目的タンパク質は沈殿していた。僅かに可溶性部分にあるタンパク質をニッケルカラムを用い精製したが、不活性であった。この結果は、大腸菌の塩基配列に cDNA を合わせたにもかかわらず、大腸菌内でのフォールディングがうまく行かなかったことを示している。

プラスミドベクター pET-23d による発現でフォールディングがうまく行われなかったため、この様な場合によく用いられるチオレドキシンの融合タン

パク質としての発現に切り換えた。プラスミドベクター pET32a に 25kDa タンパク質遺伝子を挿入した。大腸菌で発現させたところ、SDS-PAGE で 43kDa の位置に融合タンパク質と思えるバンドがみられたが多くの沈殿部分であった、可溶部分にも少ないがバンドがみられたので、ニッケルカラムで精製を試みたところ、精製できた。

同様にコントロールとして、チオレドキシ (Trx) 単独についても発現を行いニッケルカラムで精製した。

② 融合タンパク質の精製と阻害座用

精製した融合タンパク質とチオレドキシを用い阻害活性を調べた。

チオレドキシとの融合タンパク質

(Trx-25K Protein) は阻害活性が見られたが、チオレドキシ (Trx) は阻害活性が見られなかった。これらの結果から、収率は低い融合タンパク質として得ることができた。

③ 阻害剤の精製

チオレドキシとの融合タンパク質として rPTPI が生産可能になったことから、阻害剤の構造や阻害機構の解明のため、タンパク質の構造生物学的研究を目的に阻害剤の精製を行った。

精製は通常の方法で、可溶画分をニッケルカラムを用い精製し、更に DEAE-Toyopearl を用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製した。得られたタンパク質は 43kDa に太いバンドが見られるがまだマイナーバンドが幾つか見られた。ニッケルカラムとイオン交換カラムで精製しマイナーバンドが見られる場合、融合タンパク質にニックが入ったものの存在が推定され、完全に精製が困難な場合が多い。一方、そのようなサンプルを用い結晶化を行うことにより融合タンパク質のみが結晶化する例が見られることから、このサンプルを結晶化に用いた。

④ 阻害剤の結晶化

種々の結晶化用沈殿剤キットを用い、ハンギングドロップやシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて、20°C で結晶化のスクリーニングを行った。

その結果、幾つかの沈殿剤で結晶が見られた。その中で 3 μ l のタンパク質 (28 mg/ml) と 3 μ l の沈殿剤 (20% (w/v) PEG-1000, Tris-HCl pH8.5) を用いた結果、菱面体晶 (rhombohedral) の結晶が得られた (図5)。

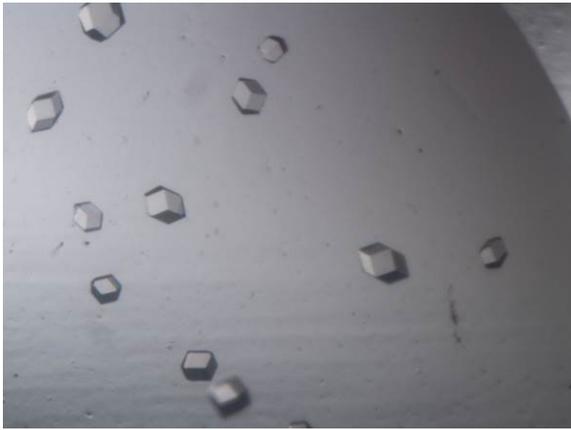


図5 阻害剤複合体の菱面体結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1 Prolyl oligopeptidase inhibition-induced growth arrest of human gastric cancer cells, Kanayo Suzuki, Minoru Sakaguchi, Satoshi Tanaka, Tadashi Yoshimoto, Masanori Takaoka, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 443, 91-96 (2014)
- 2 Prolyl oligopeptidase is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-binding protein that regulates genotoxic stress-induced cell death, Matsuda T., Sakaguchi, M., Tanaka, S., Yoshimoto, T., Takaoka, M., *Int. J. Biochem. Cell Bio.* 45, 850-857 (2013)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1、米ぬか由来の歯周病菌プロリルトリペプチジルペプチダーゼ阻害タンパク質、○安形博菜、西村 仁、中嶋義隆、伊藤 潔、芳本 忠 日本農芸化学会大会 (岡山大学) 平成27年3月27日
- 2、A NEW INHIBITOR FROM RICE FOR PROLYL TRIPEPTIDYL PEPTIDASE FROM *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* Hirona Agata, Hitoshi Nishimura, Yoshitaka Nakajima, Kiyoshi Ito, and Tadashi Yoshimoto International Proteolysis Society Oct. 5 (2015)
- 3、歯周病菌のプロリルトリペプチジルペプチダーゼを阻害する米ぬか由来タンパク質

○安形博菜, 西村仁, 中嶋義隆, 伊藤 潔², 芳本忠 生物工学会大会 鹿児島 平成27年10月26日

- 4、エノキタケ抽出物の歯周病菌由来プロリルトリペプチジルペプチダーゼ阻害作用 ○安形博菜, 中嶋義隆, 伊藤 潔, 芳本忠 日本生物工学会大会 (札幌) (2014)

〔図書〕(計 3 件)

- 1 腎機能検査に用いられるクレアチニナーゼの構造と機能 芳本 忠, 日本の結晶学 (2014)
2. Prolyl oligopeptidase, Ito, K., Nakajima, Y. and Yoshimoto, T. Handbook of Proteolytic Enzymes (Edited by Barrett, Rawlings, and Woessner) P. - Academic Press (2012)
3. Prolyl aminopeptidase, Ito, K., Nakajima, Y. and Yoshimoto, T. Handbook of Proteolytic Enzymes (Edited by Barrett, Rawlings, and Woessner) P. - Academic Press (2012)
- 4 Prolyl tripeptidyl peptidase Ito, K., Nakajima, Y. and Yoshimoto, T. Handbook of Proteolytic Enzymes (Edited by Barrett, Rawlings, and Woessner) P. - Academic Press (2012)

〔総説〕(計 2 件)

- 1、プロリン特異性酵素—生化学・構造生物学的解析と応用の経過—芳本忠 化学と生物 Vol. 50, No. 12, (2012)
- 2、DPP-4の構造と糖尿病治療薬 芳本忠, 池原森男 糖尿病 3、51-55 (2011)

〔新聞等への掲載〕(計 1 件)

- 1、米ぬか抽出物で歯周病予防 日本歯科新聞 9月8日 (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: プロリルトリペプチジルペプチダーゼ阻害剤
 発明者: 芳本 忠, 中嶋 義隆, 西村 仁, 伊藤 潔, 安形 博菜
 権利者: 学校法人 常翔学園
 種類: 特許
 番号: 特願 2015-141260
 出願年月日: 2015年7月15日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳本 忠 (YOSHIMOTO, Tadashi)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：50088870

(2) 研究分担者

米山 雅紀 (YONEYAMA Masanori)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：00411710

(3) 連携研究者

中嶋 義孝 (NAKAJIMA Yoshitaka)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：80372770