

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462897

研究課題名(和文) 硫化水素産生酵素の立体構造と反応機構を基盤とした新規口臭予防薬候補化合物の探索

研究課題名(英文) Screening of novel inhibitors to hydrogen sulfide-producing enzymes -based on enzyme structures and reaction mechanisms- that can prevent oral malodor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 歯周病原細菌である *Fusobacterium nucleatum* の持つ主要な硫化水素産生酵素に対し、立体構造解析や酵素学的解析を適用した。これにより、触媒や基質(反応中間体)結合に関与するアミノ酸残基を同定し、その役割と活性への寄与を明確にすることで、酵素の反応機構を提唱した。これと並行して、硫化水素産生酵素阻害剤を探索するための一次および二次アッセイ系を構築し、公的化合物ライブラリーの提供を受けてスクリーニングを実施した。

研究成果の概要(英文)： Structural and enzymatic analyses of hydrogen sulfide-producing enzymes from a periodontal pathogen, *Fusobacterium nucleatum*, were performed. We identified four important amino acid residues on catalysis and/or substrate (reaction intermediate) binding, and revealed their roles and contributions to the catalytic activity. On the basis of these results, the reaction mechanism of hydrogen sulfide-producing enzyme Fn1055 was proposed. In parallel, we constructed two assay systems for inhibitor screening. Using the assay systems, small molecules from chemical libraries were screened.

研究分野：構造生物学

キーワード：硫化水素産生酵素 酵素 歯周病 口臭 化合物スクリーニング

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は口臭の原因物質となるだけでなく、周辺組織に作用して歯周病を進行させる一因となる。研究代表者らは、歯周病原細菌として知られ、硫化水素産生能が極めて高い *Fusobacterium nucleatum* (Persson *et al.*, *Oral Microbiol. Immunol.* 1990) に着眼し、その硫化水素産生酵素遺伝子をこれまでに 4 種類 (*fn0625*, *fn1055*, *fn1220*, *fn1419*) 同定した (Yoshida, Suwabe, Nagano, Kezuka *et al.*, *Microbiology* 2011; Yoshida, Ito, Kamo, Kezuka *et al.*, *Microbiology* 2010)。さらに、これら酵素群(いずれもピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存性酵素) のキャラクタリゼーションおよび立体構造解析を行い、原子レベルにおける硫化水素産生機構の解明を目指した研究を進めてきている。この一連の研究で、*F. nucleatum* による硫化水素産生は、多様な機構により行われ、アミノ酸の合成や代謝に深い関与がある(後述)など、その裏側には生命維持に直結した一面を併せ持つことが明らかとなってきた。

F. nucleatum における各酵素の硫化水素産生への寄与は、L-システインを基質とした場合、Fn1220 (88%) と Fn1055 (10%) が大部分を占める (Suwabe *et al.*, *Microbiology* 2011)。特に Fn1220 は硫化水素産生の観点から見ると極めて重要であると同時に、ペプチドグリカンの構成成分の一つである L-ランチオニンを生産するという生理的な役割が考えられる。また、Fn1055 は反応生成物として硫化水素の他に L-セリンを与える。通常、微生物において L-セリンは解糖中間体 3-ホスホグリセリン酸から 3 種類の酵素による反応で作られる。全ゲノムの相同性検索を行った結果、*F. nucleatum* には L-セリン生合成に関与するこれら酵素遺伝子が存在しないことが予測された。Fn1055 の触媒する反応が唯一の L-セリン合成経路であるかどうかは未知であるが、Fn1055 が L-セリン合成に深く関与することが強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、上記の研究をさらに発展させる。具体的には、*F. nucleatum* の持つ 2 種類の主要な硫化水素産生酵素に着眼し、その反応機構を X 線結晶構造解析、酵素学的解析および反応速度論的解析を用いて詳細に解明する。これにより、この細菌における硫化水素産生機構を原子レベルで理解した上で、化合物スクリーニングにより硫化水素産生酵素阻害剤候補化合物を探索する。

3. 研究の方法

(1) 反応速度論的解析および酵素学的解析

Fn1220 と Fn1055 の補因子である PLP は特徴的な紫外可視部の吸収スペクトルを示し (Karsten and Cook, *Methods Enzymol.* 2002)、その変化は PLP-基質反応中間体の化学的な

状態を鋭敏に反映する。ストップフロー分光装置を用いて、酵素反応溶液から吸収スペクトルをミリ秒オーダーで測定し、これにより酵素反応の素過程や律速段階を詳細に解析した。

研究開始当初、酵素活性測定は、気体である硫化水素を間接的に定量する系(比色法)を用いてきた。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排除することは困難であった。硫化水素と等量生成する L-セリンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量する系を確立し、より正確な酵素学的な定数を求めた。

(2) Fn1055 の X 線結晶構造解析

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を含むタンパク質結晶を作製した。複数の基質濃度、ソーキング時間や結晶化温度を検討し、作製した。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構において行った。

(3) 化合物スクリーニング

当初の計画では、まず、*in silico* スクリーニングにより阻害剤の探索を進める予定であった。しかしながら、公的化合物ライブラリーや文部科学省の支援事業の充実を考慮して、実際の化合物スクリーニングにより阻害剤の探索を行った方が確実にヒット化合物を得られる可能性が高いと考え、計画を変更した。96 ウェルベースで実施できる一次アッセイ系を構築して実施した。

二次アッセイには、Differential Scanning Fluorimetry (Niesen *et al.*, *Nature protocols* 2007) の手法を適用した。

4. 研究成果

(1) Fn1055 の酵素活性測定法の確立

Fn1055 は基質である L-システインの β 置換反応により L-セリンを生成し、この過程で硫化水素を産生する。一般的な反応機構から考えると、硫化水素は反応の途中で生成されるのに対し、L-セリンは反応サイクルが終結する際に、生成される。正確に酵素学的パラメーターを決定するために、反応溶液に含まれる L-セリンをダブルシル化して HPLC を用いて定量する系を構築した。

カラム: CAPCELL PAK C18 UG-300 (1.5 × 150 mm; 資生堂)

移動相 A: 25 mM 酢酸アンモニウム pH6.0

移動相 B: アセトニトリル

グラジェント: 80% 移動相 A 一定 (0-10 min)、20-60% 移動相 B の直線グラジェント (10-18 min)

検出: 436 nm の吸光度

確立した系により、Fn1055 の酵素学パラメーターを決定した (K_m : 0.28 ± 0.02 mM, k_{cat} : 3.88 ± 0.03 s⁻¹)。この他、4 種類の部位特異的

変異体 (T73A、S74A、Q147A、D232N) を調製し、これらについても、酵素学パラメータを決定した。いずれの変異体も硫化水素および L-セリンの産生能が著しく減少した。特に、Asp232 の活性は定量限界以下であり、Asp232 が β 置換反応に必須であることが明らかとなった。また、すべての変異体は、それぞれ程度は異なるが、野生型酵素では起こらない、 β 脱離反応 (副反応) が起こることが分かった。今回調製した変異体は、いずれも反応中間体と直接相互作用するアミノ酸残基を改変している。そのため、野生型では反応中間体の配向が正しく制御されているのに対し、変異体では、中間体の配向の自由度が増すことにより副反応が起こり易くなっていることが考えられた。

Fn1220 に対しても同様に、反応生成物である L-ランチオンを HPLC で定量する系の構築を進めた。しかしながら、L-ランチオンを、基質である L-システインとダブルシル化の処理中に L-システインから生じるシスチン (正確には、それらがダブルシル化された誘導体) から分離する条件を見つけることができなかった。

(2) Fn1055 の反応速度論的解析

Fn1055 および変異体については、ストップフロー分光装置を用いて取得した酵素反応中の時間変化スペクトル (ミリ秒~分オーダー) を解析した。野生型酵素では、反応開始直後より、補因子である PLP との共有結合を示すピークが減少し、 α -アミノアクリル酸中間体の形成を反映するピークが現れた。30 ms 以降の定常状態では α -アミノアクリル酸中間体の蓄積が見られたことから、この中間体から次の中間体 (L-セリン外アルジミン) への移行に相当する段階が反応の律速になっていることが考えられた。

変異体のデータについては、現在も詳細に解析を進めている。

(3) Fn1055 変異体 D232N と反応中間体の X 線結晶構造解析

D232N 変異体を、L-システイン存在下において、野生型の結晶化剤を用いて結晶化した。なお、結晶化温度は 4°C とした。

得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構のビームライン NW12A において回折実験を実施して結晶構造を解析した。その結果、D232N はクレフトが閉じた構造を取っており、触媒部位には α -アミノアクリル酸中間体の電子密度が観測された (ただし、占有率は約 0.5 であり、残りは反応前の状態である内アルジミンであることが推察された)。

D232N の溶液から紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、野生型と同様に、内アルジミンに起因する 412 nm に極大吸収を示した。この溶液に酵素の 100 倍濃度になるように L-システインを添加したところ、412 nm

の極大吸収が消失すると同時に 470 nm に新たな極大吸収が観測された。470 nm は α -アミノアクリル酸中間体の吸収帯と一致する。前述の複合体の構造解析の結果も踏まえると、D232N は、 α -アミノアクリル酸中間体で反応サイクルが停止している、あるいは次の中間体への移行が著しく遅くなっていると考えられた。次の中間状態へは水分子の求核攻撃が必要であることから、Asp232 は水分子からプロトンを引き抜く塩基として働くことが考えられた。(1)~(3)の結果を、まとめることにより、Fn1055 の反応機構を提唱することができた。

(4) 化合物スクリーニング

F. nucleatum による硫化水素産生に大きく寄与する Fn1220 に対し、酵素阻害活性を評価するための *in vitro* アッセイ系を構築した。この系では、酵素反応により生成した硫化水素を出発物質としてメチレンブルーを形成させ (Lawrence *et al.*, *Electroanalysis* 2000)、それが示す 670 nm の極大吸収をマイクロプレートリーダーにより測定する。したがって、反応溶液に化合物を添加しておき、それが阻害活性を持つ場合、670 nm における吸光度は、ポジティブコントロールと比較して低い値を示す。この系では、96 ウェルプレートとマルチチャンネルピペット (マニュアル分注) を用い、 $Z' = 0.8$ 、 $S/B = 4$ といった良好な評価値を得た。この系を用いて、化合物スクリーニングを実施した。ライブラリーには、富山大学和漢医薬学総合研究所の生薬化合物 (96 種類) および生薬エキスセット (120 種類) と理化学研究所のパイロットライブラリー (373 種類) を使用した。その結果、パイロットライブラリーよりメチレンブルー法を用いた一次アッセイにおいて化合物濃度 10 μ M で 40% 程度の阻害率を示す 2 種類の化合物を見出すことができた。これらは、Differential scanning fluorimetry を用いた二次アッセイ系においても正の変性中点温度変化を示し、化合物の酵素への結合を示唆するデータが得られた。しかしながら、これらは擬陽性である可能性も残しており、化合物による酵素阻害が起こっていることをより詳細に検証していく必要がある。

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 2 件)

- ① Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T. Crystal structure of hydrogen sulfide-producing enzyme from a periodontal pathogen. *Photon Factory Activity Rep. Part B* **31**, 431. (2014), http://pfwww.kek.jp/acr2013pdf/part_b/pf13b0431.pdf

- ② Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T. Crystal structures of β C-S lyase from *Streptococcus anginosus* in complex with its reaction intermediates. *Photon Factory Activity Rep. Part B* **30**, 275. (2013), http://pfwww.kek.jp/acr2012pdf/part_b/pf12b275.pdf

[学会発表] (計 10 件)

- ① 毛塚雄一郎、吉田康夫、野中孝昌、*Fusobacterium nucleatum* 由来硫化水素産生酵素の立体構造と反応機構、2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ、つくば市、2016 年 3 月 15 日
- 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 54 回日本薬学会東北支部大会、矢巾町、2015 年 9 月 26 日
- ③ 鈴木喬介、佐藤裕也、近野平、遠藤彩姫、毛塚雄一郎、野中孝昌、歯周病原細菌メチオニン γ -リアーゼの活性測定と結晶化の検討、第 54 回日本薬学会東北支部大会、矢巾町、2015 年 9 月 26 日
- ④ 藤原茂晃、福谷俊治、植田光彦、毛塚雄一郎、野中孝昌、グルタチオン S-トランスフェラーゼ及びヒスチジンタグを融合したタンパク質の発現と精製、第 54 回日本薬学会東北支部大会、矢巾町、2015 年 9 月 26 日
- ⑤ 鈴木喬介、佐藤裕也、近野平、遠藤彩姫、毛塚雄一郎、野中孝昌、歯周病原細菌メチオニン γ -リアーゼの活性測定と結晶化の検討、第 53 回日本薬学会東北支部大会、いわき市、2014 年 10 月 5 日
- ⑥ Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T., Structure of hydrogen sulfide-producing enzyme from a periodontal pathogen, The 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. Montreal, CANADA, 2014/8/11
- 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の構造と反応機構、第 14 回日本蛋白質科学会、鳥取市、2014 年 6 月 25 日
- ⑧ 佐藤裕也、毛塚雄一郎、野中孝昌、日本生化学会東北支部 第 80 回例会、秋田市、2014 年 5 月 10 日
- ⑨ 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、鳥取市、2013 年 6 月 12 日

- ⑩ Kezuka, Y., Yoshida, Y. and Nonaka, T., Structure analysis of hydrogen sulfide-producing enzyme complexed with its reaction intermediates from a periodontal pathogen, FAOBMB Mini-Symposium、矢巾町、2013/4/6

[その他]

(1) 生薬化合物および生薬エキスセットは富山大学和漢医薬学総合研究所より提供を受け、同研究所の協力研究員として化合物スクリーニングを実施した。
課題名：生薬由来化合物および生薬エキスを用いた硫化水素産生酵素阻害剤の探索
代表者：毛塚雄一郎
以下のホームページ (http://www.inm.u-toyama.ac.jp/jp/collabo/idx_collabo.html) で報告書が公開される予定である。

(2) 構造解析した Fn1055 の結晶構造を Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) に登録した。Accession ID: 5B53、5B54、5B55 (2017 年 4 月まで未公開の予定)

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

(2) 研究分担者

吉田 康夫 (YOSHIDA, Yasuo)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：10315096