

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560405

研究課題名(和文) 歯周病予防に向けた病原菌の生育阻害剤の開発：その基礎的研究

研究課題名(英文) Development of antibacterial agents of periodontal pathogens : a basic study

研究代表者

平岡 行博 (HIRAOKA, Yukihiro)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：20097512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は生活習慣病を惹起し、また悪化させる原因と認識されてきた。そこで、歯周病原菌の一種、*Porphyromonas gingivalis* のサバイバルに必須の酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の阻害剤の開発を目指して特徴的な構造を明らかにすることを目的とした。Pg SODの特徴的な残基と推測されるN末端から155番目にあるGly(Gly-155)、Leu-72およびLeu-76に対し、変異を作製して酵素の化学的性質を検討した。この結果、Leu-72、Leu-76およびGly-155は、いずれもPg SODの金属寛容性を支持する役割を持つアミノ酸残基であると結論付けた。

研究成果の概要(英文)：The anaerobe *P. gingivalis* is one of the organisms most strongly associated with chronic adult periodontitis. Superoxide dismutases (SOD), which are essential for aerobic life, playing an important protective role against oxidative stress. This research is a basic study aiming at the development of inhibitors of *P. gingivalis* SOD (Pg SOD) by structural features. We focused on Leu-72, Leu-76 and Gly-155, which are located near the active-site metal, they were constructed a mutant enzyme by the site-directed mutagenesis and discussed its chemical properties. Based on the results of this study, we herein conclude that the integrity of Leu-72, Leu-76 and Gly-155 are a necessary requisite for the metal-tolerant activity of Pg SOD.

研究分野：生化学

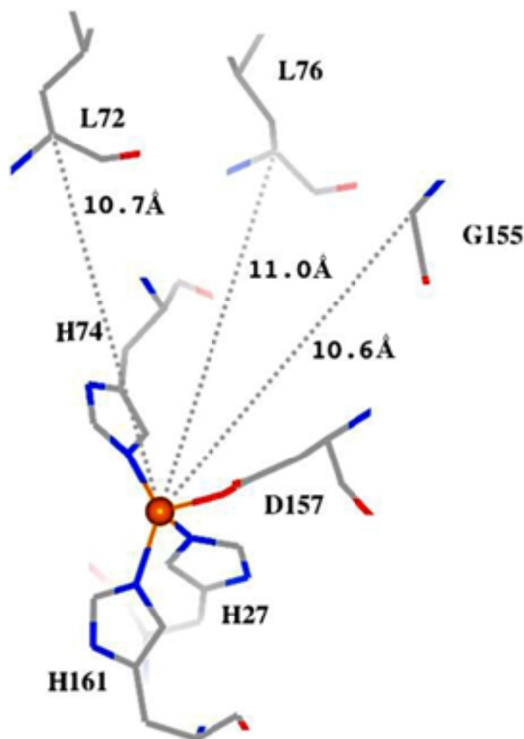
キーワード：SOD 歯周病原菌 金属酵素 部位特異的変異

1. 研究開始当初の背景

歯周病原菌の一種、*Porphyromonas gingivalis* の持つ superoxide dismutase (Pg SOD) の特徴は、金属酵素としては稀な事に活性の金属依存性に寛容で、鉄でもマンガンでも活性を示す。私達は、この性質を支持する構造的な特徴を明らかにすべく、活性中心近傍に局在するアミノ酸残基の役割を検討している(1,2)。先に Gly-155 を Thr に変異させ、活性の金属依存性を Fe 特異的に変換できた(3)。この成果を *E. coli* Mn-SOD の Gly-155 に応用し、同様に活性の金属依存性を変換することもできた(4)。Fe-SOD の一次構造、立体構造の情報は蓄積されているが、構造上の特徴に迫る研究は少なく、本研究を実施する意義があった。

2. 研究の目的

P. gingivalis のサバイバルに必須の酵素である SOD の阻害剤の開発を目指して特徴的な構造を明らかにすべく、活性中心近傍に局在するアミノ酸残基の役割を検討することを目的とした。



今回、N 末端から 72 番目の Leu (Leu-72;

図中 L72、以下同様)、76 番目の Leu (Leu-76) に注目した。本酵素は鉄イオンに依存して活性を示す SOD (Fe-SOD) に相同性の高い一次構造をとっているが、Fe-SOD においてこの位置は Trp と Phe に置き換わっている。そこで、Pg SOD の Leu-72 を Trp に、Leu-76 を Phe に置換した変異酵素を作製し、アミノ酸残基の役割を検討した。また、155 番目の Gly (Gly-155) を Ser および Val に置換した変異酵素を作製し、Gly 残基の生理的異議を検討した。

活性金属(図中赤丸)は His 3 残基(H27、H74、H161)と Asp 1 残基(D157)および水分子と配位している。一方、今回注目した 3 残基は、いずれも金属とは 10 以上離れた位置にあり金属とは直接の関係はないが、Gly-155 の例のように、金属選択性に決定的な役割をもつ残基である可能性がある。

3. 研究の方法

【部位特異的変異酵素の作製】 Pg SOD の Leu-72 を Trp に変異させた(Leu72Trp) 1 残基変異、Leu72Trp および Leu76Phe の 2 残基変異、また Gly155Ser および Gly155Val 変異酵素を作製する。変異は Kunkel の方法 (Methods in Enzymology 154;367-382, 1987) により導入し、塩基配列の決定で標的塩基以外に変異の無い事を確認する。

【酵素の発現と精製】 既報(2)の様に、簡便なアフィニティー精製法を確立したベクター pMAL-c2(New England Biolabs) を用い、酵素タンパク質をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させる。融合タンパク質はトリプシン処理後、イオン交換クロマトにより精製 SOD を得る。

【金属再構成酵素の調整と、構造の研究】

- (1) 精製酵素を 6M グアニジン塩酸で変性させながらキレート剤で金属を除去し、アポ酵素に Fe あるいは Mn を加え、Fe(Mn)-SOD に再構成した酵素を得る。

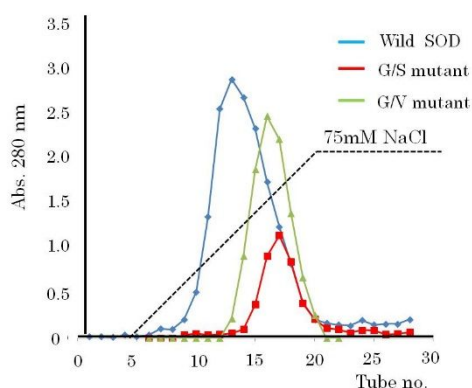
- (2) 再構成酵素中の Fe あるいは Mn 含量は、原子吸光分析で測定する。
- (3) 再構成酵素の吸収スペクトルと比活性を調べ、金属依存性活性の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) *Pg* SOD の Leu72Trp 1 残基変異体、および、これに Leu76Phe 変異を加えた 2 残基変異体を作製した。Leu72Trp 変異酵素は電気泳動的に野生型酵素と同一の挙動を示し、総体の構造が野生型酵素と同等であると考えられた。また、Leu72Trp および Leu76Phe の 2 残基変異体も、電気泳動的に分子の構造が野生型酵素と同等であると考えられた。酵素活性値を比較した結果から、Leu72 と Leu76 は、*Pg* SOD の金属寛容性を支持する役割を持つアミノ酸残基の候補になり得ると結論付けた。

(2) Gly-155 を Ser、Val にそれぞれ単独で部位特異的変異させた変異体を作製し、側鎖の意義を検討した。

精製の最終段階で用いた Q-Sepharose カラムクロマトグラフィー上の展開像を図に示す。野生型酵素に比べ、2 種の変異酵素は何れも高塩濃度で溶出していた。Q-Sepharose は陰イオン交換樹脂であるため、野生型とは異なる酵素表面上の電荷が生じており、総体の構造が変化している事が示唆された。



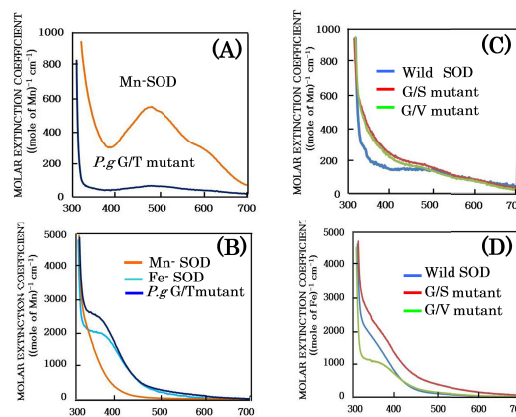
Gly155Ser 変異体は、同一タンパク質量を展開しているにも拘わらず、精製過程で

溶出量が減少した。これは、酵素の変性がおきているものと考えられた。

酵素の金属再構成により、酵素活性の金属に依存する度合いを比較するため比活性を調べたところ、いずれの変異酵素も Fe 依存活性が僅かに上昇し、Mn 依存活性の減少が顕著であった。

また、比活性で 2 点の特徴を指摘できた。まず、Fe 再構成酵素の場合、Ser 変異酵素で 1.1 倍と殆ど変化がなく、Val 変異酵素で 1.4 倍となり、Val 変異酵素で変化が大きかった。次いで Mn 再構成酵素の場合、Ser 変異酵素で約 1/3 に、Val 変異酵素で約 2/3 となり、Ser 変異酵素で変化が大きかった。この結果、金属依存活性の比率 (Fe/Mn) は、野生型で 0.7 倍、Ser および Val 変異酵素でそれぞれ 1.9 倍と 1.4 倍であった。

金属配位環境の相違を評価するため、酵素の可視部吸収スペクトルを比較した。



(A)& (C)、Mn 再構成標品；(B)& (D)、Fe 再構成標品

(A) Mn-SOD : 典型的な Mn-SOD の吸収スペクトル。480nm 付近に吸収がある。

Pg G/T mutant : *Pg* SOD の Gly155Thr 変異酵素。吸収は殆ど認められない。

(B) Fe-SOD : 典型的な Fe-SOD の吸収スペクトル。Fe-SOD の特徴として 350nm 付近に肩が生じる。Mn-SOD : (A) で示した Mn-SOD を Fe で置換した酵素で、350nm

付近の肩が認められないだけでなく、480nm 付近の吸収は消失している。

(C) Wild SOD、Mn で再構成を行なった野生型酵素；G/S mutant、Ser 変異酵素；G/V mutant、Val 変異酵素の吸収スペクトル。Ser 変異酵素、Val 変異酵素では Mn-SOD の特徴は認められず、野生型酵素と大きな変異は見られない。

(D) Fe で再構成を行なった野生型酵素、Ser 変異酵素、Val 変異酵素の吸収スペクトル。Val 変異酵素のスペクトル吸収では吸収は低い肩が生じており、Ser 変異酵素も緩やかな肩が見られた。

以上の結果は、2 種変異酵素の何れも Fe に依存する環境に近付いた事を示唆した。

(3) 結論

Leu72 と Leu 76 が Pg SOD の金属寛容性を支持する役割を持つアミノ酸残基の候補になり得る。

155 位残基は、Gly および Thr の場合に酵素の構造に適合するが、他の残基には置換しにくい可能性が示唆された。

Gly155 の意義は、隣接する 2 残基 Trp の自由度を保証し、金属選択を寛容型にしていると考えられた。

現在、以上の成果を論文として執筆中である。

<引用文献>

- (1) Sugio, S. *et al.* Eur. J. Biochem. 267: 2000, 3487-95.
- (2) Hiraoka, B.Y *et al.* *Biochem. J.* 345: 2000, 345-350.
- (3) Yamakura, F . *et al.* *Biochemistry* 42: 2003, 10790-99.
- (4) Osawa, M. *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 1804 : 2010, 1775-9.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

M.Komachiya, S.Mizoue , M. Mihara, M.Osawa, Y. Kikuchi, S.Uematsu, Hirai,

Y.Okubo, A.Kuroiwa, K.Yamada, F.Yamakura and B.Y. Hiraoka Effect of substituting Trp for Leu at position 72 on the structure of *Porphyromonas gingivalis* superoxide dismutase. 松本歯学 査読有 40巻 (2014) 19-25.

M.Mihara, M.Komachiya, S.Mizoue , M.Osawa, S.Uematsu, Y. Kikuchi, Y.Okubo, K. Hirai, A.Kuroiwa, K.Yamada, F.Yamakura and B.Y. Hiraoka Contribution of the amino acid residues located near the active site metal to the metal-specific activity of *Porphyromonas gingivalis* SOD induced by a double mutation of Leu72Trp and Leu76Phe. 松本歯学 査読有 40巻 (2014) 26-34.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 行博 (HIRAOKA, Yukihiro)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：20097512

(2) 研究分担者

山下 照 仁 (YAMASHITA, Teruhito)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号：90302893

中道 裕子 (NAKAMICHI, Yuko)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：20350829