

講演番号：2C22a07

講演日時、会場：3月27日 10:16～ C校舎22会場

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

Inhibitor from rice for prolyl tripeptidyl peptidase from periodontal pathogen

○安形 博菜¹、西村 仁¹、中嶋 義隆¹、伊藤 潔²、芳本 忠¹ (1摂南大理工、2摂南大薬)

○Hirona Agata¹, Hitoshi Nishimura¹, Yoshitaka Nakajima¹, Kiyoshi Ito², Tadashi Yoshimoto¹
(¹Fac.Sci. Tech., Setsunan Univ., ²Fac. Pharm. Sci., Setsunan Univ.)

〔目的〕日本人の60%が歯周病菌に感染しており、口臭や歯が抜ける病気である。更に脳に感染すると重篤となることが知られており、予防薬が求められている。歯周病菌の主たるものは *Porphyromonas gingivalis* で、嫌気性菌で糖を利用できず、エネルギー源としてアミノ酸を利用する特殊な菌である。そのため同菌は種々のプロテアーゼやペプチダーゼを持っている。歯肉コラーゲンを分解してアミノ酸を栄養とするためにはアミノペプチダーゼによる分解が必要である。一般にコラーゲンは-(Gly-X-Pro)_n-配列で、アミノペプチダーゼはX-Pro結合を切ることはできない。そのため、プロリルトリペプチジルペプチダーゼ (PTP、N末から3番目がプロリンのとき切断する酵素) が分解の律速酵素となり、PTP 阻害剤が兵糧攻めとして働くことが考えられる。これまで *P. gingivalis* の酵素遺伝子が大腸菌で高発現に成功し酵素を結晶化してX線結晶構造解析で酵素の立体構造を明らかにしてきた¹。更に、特異的な化学合成阻害剤を研究してきた²。今回、歯周病の予防薬を目指し天然物に阻害剤を求めた結果、米ぬかに強い阻害作用を見出した。

〔方法〕阻害活性は歯周病菌の PTP を用い Ala-Phe-Pro-β-naphthylamide を基質として測定した。アミノ酸配列はTOF-MSで決定し、コメの遺伝子データベースで検索した。該当した遺伝子のcDNAを大腸菌による発現に適した配列で人工合成した後、pET-23dベクターに連結し、Rosetta-gami B(DE3)pLys株で発現させた。

〔結果〕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。抽出物より硫酸分画、疎水およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGEから分子量は44Kと推定された。この阻害物質はPTPに拮抗阻害するが、他のプロリン特異性ペプチダーゼ(プロリルオリゴペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ4、プロリルアミノペプチダーゼ)には全く阻害を示さなかった。SDS-PAGEゲルから抽出しトリプシン分解の後TOF-MSによるアミノ酸配列決定を行い、データベースから得られたアミノ酸配列を含む組換えタンパク質(His6タグ付き)を大腸菌で産生させた後、Ni-アガロースで精製し、組換えタンパク質が *P. gingivalis* の PTP 活性を阻害することを確認した。

以上、米ぬかから歯周病菌の PTP を阻害するタンパク質を見出し、更に大腸菌で遺伝子を発現させ PTP を阻害したことから、歯周病予防の可能性を開くものである。

1、*J. Mol. Biol.*, 362, 228-240 (2006), 2、*J. Mol. Biol.*, 375, 708-719 (2008)

Prolyl tripeptidyl peptidase, periodontitis, rice inhibitor