

# 白癬菌由来ケラチナーゼの構造解析

## Structural analysis of keratinase from *Arthroderma vanbreuseghemii*

古川那由太\*, 渡邊洗佑, 風間愛, 井深章子

新潟薬科大学応用生命科学部応用生命科学科、〒956-8603 新潟市秋葉区東島 265 番地 1

### 1 はじめに

白癬は白癬菌によって引き起こされる真菌感染症であり、発症部位に応じて足白癬（水虫）、爪白癬、頭部白癬（しらくも）、顔面白癬（はたけ）、体部白癬（ぜにたむし）、股部白癬（いんきんたむし）と呼ばれている。元々高齢者や中年男性に多い疾患ではあったが、近年は生活習慣の変化によって男女問わず若年層でも多く報告されるようになった。我が国の罹患者数は既に 2,000 万人を超えたと言われており、もはや国民病の 1 つといっても過言ではない。白癬の主な症状である猛烈な痒みは肉体的・精神的苦痛をもたらし、我々の Quality of Life を著しく低下させる。したがって「抗白癬菌薬の開発」は健康で社会的な生活を営む上で重要な課題だが、未だ白癬菌の感染・増殖に必須な分子の解析はほとんどなされておらず、抗白癬菌薬は開発されていない。

白癬菌特異的に作用する薬剤の標的分子を探索するために、申請者は白癬菌のケラチン分解能に着目した。ケラチンは皮膚や毛髪などに多く含まれる難分解性繊維状タンパク質だが、白癬菌は感染時にケラチンを分解し、炭素源・窒素源・エネルギー源にする。白癬菌のケラチン分解性プロテアーゼとしてメタロプロテアーゼ (metalloproteinase, MEP) が知られている[1]。白癬菌には 5 種類の MEP 遺伝子ホモログが存在するが、中でも MEP4 はヒト好性白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* において遺伝子を欠損させるとマウスに対する病原性が大幅に低下すると報告されている[2]。さらにヒト好性白癬菌 *Trichophyton rubrum* の MEP4 遺伝子の発現量はケラチン存在下で約 15 倍増加することから[3]、MEP4 がケラチン分解の主要なプロテアーゼである可能性が高い。そこで本研究では、*T. mentagrophytes* の有性世代である *Arthroderma vanbreuseghemii* 由来 MEP4 (AvMEP4) の立体構造を解析し、ケラチン分解メカニズムを解明するための知見を得ることを目的とした。

### 2 実験

AvMEP4 および AvMEP4 の推定糖鎖修飾部位に変異を導入した変異型 AvMEP4 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* で大量発現させた後、陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。また、C 末端側に His タグを付与した AvMEP4-His を同様に発現させた後、Ni アフィニティ精製および陽イオン交換ク

ロマトグラフィー精製を行った。精製標品は蒸気拡散法によって結晶化した。

### 3 結果および考察

AvMEP4 の結晶化を試みたところ、微結晶が得られた。しかし再現性が悪く X 線回折データの取得には至らなかった。また、変異型 AvMEP4 の結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。精製度を向上させるために、AvMEP4-His を精製・結晶化を試みたところ、微結晶が得られた。しかし得られた結晶は有意な回折点を与えなかった。1 次スクリーニング後のドロップを回収して SDS-PAGE に供したところ、結晶化前には見られなかった複数のバンドが確認された。結晶化中に自己分解が起きたと考えられるため、阻害剤存在下で結晶化を行う必要があると考えられる。

### 4 まとめ

AvMEP4 の結晶を得るために様々な条件検討を行ってきたが、期間内に AvMEP4 の良質な結晶を得ることができなかった。引き続き条件検討を行っている。

### 謝辞

X 線回折データ収集をご支援いただいた PF スタッフの方々に感謝致します。

### 参考文献

- [1] F. Brouta, et al., *Med Mycol.* **39**, 269-275 (2001).
- [2] X. Zhang, et al., *Med Mycol.* **52**, 36-45 (2014).
- [3] T. A. Bitencourt, et al., *BMC Genomics* **17**, 249 (2016).

\* furukawa@nupals.ac.jp