

白癬菌由来ケラチン分解関連酵素の構造解析
Structural analysis of keratinolysis-related enzymes from *Arthroderma vanbreuseghemii*

古川那由太*, 渡邊洗佑, 風間愛, 海老名孝道, 山口凌平, 野澤裕介 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

Nayuta FURUKAWA*, Kosuke WATANABE, Ai KAZAMA, Takamichi EBINA, Ryohei YAMAGUCHI, Yusuke NOZAWA, and Akiko SHIMIZU-IBUKA
Faculty of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, 265-1, Higashijima, Akiha-ku, Niigata, 956-8603, Japan

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。

白癬菌の特徴としてケラチン分解能が知られている。ケラチンは皮膚や毛髪などに多く含まれる繊維状タンパク質で、分子間のジスルフィド結合が多く、プロテアーゼ耐性が高い。しかし白癬菌は感染・増殖時にケラチンを主要な炭素源・窒素源・エネルギー源とするため、ケラチン分解関連酵素を阻害すれば白癬菌は増殖が大きく抑制されると考えられている。申請者はケラチン分解性プロテアーゼ（ケラチナーゼ）の 1 つと考えられるメタロプロテアーゼ 4 (MEP4) と、分解したケラチンに含まれる大量のシステインを解毒・代謝するシステインジオキシゲナーゼ 1 (CDO1) に着目した。

MEP4 は *Trichophyton mentagrophytes* において最も病原性に重要で[1]、*Trichophyton rubrum* においてケラチン存在下で MEP3 よりも発現量が大きく増大することが報告されている[2]。さらに申請者は組換え型 MEP4 がケラチンアズールに対して分解活性を示すことを確認しており、MEP4 が主要なケラチナーゼであると考えている。また、CDO1 遺伝子を欠損した白癬菌 *Arthroderma benhamiae* はケラチン分解能が低下するだけでなく、システインに対する感受性が増大することが報告されている[3]。したがっ

て両酵素は薬剤の標的分子として適していると考えられる。そこで本研究では、白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* 由来組換え型 MEP4 と CDO1 の立体構造を解明し、抗白癬菌薬設計の基盤となる知見を得ることを目的とした。

2 実験

MEP4 の推定糖鎖修飾部位に変異を導入した変異型 MEP4 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 MEP4-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。CDO1 の分子間ジスルフィド結合形成部位に変異を導入して N 末端側に His タグを付与した変異型 CDO1-His を大腸菌 BL21(DE3)pLysS で大量発現させた後、Ni アフィニティ精製を行った。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

変異型 MEP4 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、MEP4-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。野生型 CDO1 を解析したところ、分子間ジスルフィド結合によって多量体化していることが明らかになった。本来 CDO1 は細胞内で単量体として存在するため、多量体化にかかわる Cys 残基を全て Ser に置換した変異体 CDO1-His を作成し、精製・結晶化を試みた。その結果、0.1 mm 四方の板状の結晶が得られたが、この結晶から有為な回折点は得られなかった。また、CDO1 の阻害剤である 3-メルカプトプロピオン酸存在下で結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。

4 まとめ

MEP4 と CDO1 の結晶を得るために様々な条件検討を行ってきたが、期間内に良質な結晶を得ることができなかった。

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] Zhang X. *et al.*, *Med Mycol.*, 2014.
- [2] Bitencourt T.A. *et al.* *BMC Genomics.*, 2016
- [3] Grumbt M. *et al.*, *J Invest Dermatol.*, 2013.

* furukawa@nupals.ac.jp