

# 生薬由来化合物および生薬エキスをを用いた 硫化水素産生酵素阻害剤の探索

申請代表者 毛塚雄一郎 岩手医科大学薬学部構造生物薬学講座

助教

## ■背景・目的

歯周病原細菌の産生する揮発性硫化物（硫化水素やメチルメルカプタン）は歯周病患者が示す口臭の主要な原因物質であると同時に、歯周病の病原因子でもある。歯周病に関連する細菌の中でも *Fusobacterium nucleatum* は、極めて高い硫化水素産生能を持つことが知られている (Persson *et al.*, *Oral Microbiol. Immunol.* 1990)。本研究では、この細菌の主要な硫化水素産生酵素（口腔内における硫化水素の産生源）に対して、生薬化合物およびエキスのセットを用いた化合物スクリーニングを実施し、阻害剤候補化合物を得ることを目的とする。硫化水素産生酵素阻害剤は、新規作用機序に基づく口臭予防薬の開発につながる可能性がある。

## ■結果・考察

原理の異なる2種類のアッセイ系により生薬由来化合物および生薬エキスの硫化水素産生酵素に対する阻害効果を評価した。

### 一次アッセイ

硫化水素産生酵素と基質であるL-システインを生薬由来化合物（あるいは生薬エキス）存在下（生薬由来化合物: 100  $\mu$ M、生薬エキス: 100  $\mu$ g/ml）および非存在下で反応させた。次いで反応生成物である硫化水素を出発物質として化学反応によりメチレンブルーを形成させ (Lawrence *et al.*, *Electroanalysis* 2000)、670 nmにおける吸光度を測定した（メチレンブルー法）。同一プレートから得たコントロール（化合物なし）とバックグラウンド（酵素なし、化合物なし）の吸光度を用いて、阻害率を算出して阻害効果を評価した。

### 二次アッセイ

一次アッセイで阻害率30%以上を示した化合物に対して、Differential scanning fluorimetry (DSF) を用い (Niesen *et al.*, *Nature protocols* 2007)、酵素と生薬化合物との相互作用を基質非存在下で検証した。化合物存在下での変性中点温度と非存在下での変性中点温度の差を  $\Delta T_m$  [°C] として算出して評価した。

生薬由来化合物および生薬エキスに対して一次アッセイを  $n = 1$  で実施後、それぞれから阻害率上位20化合物およびエキスを選抜して、再現性試験を実施した ( $n = 4$ )。その結果、再現性試験で平均阻害率が30%を超えた生薬化合物が4種類見つかった（図1、化合物A、B、CおよびG）。一方、生薬エキスでは同基準を満たすものは得られなかった。なお、Z'はいずれでも0.9であり、スクリー

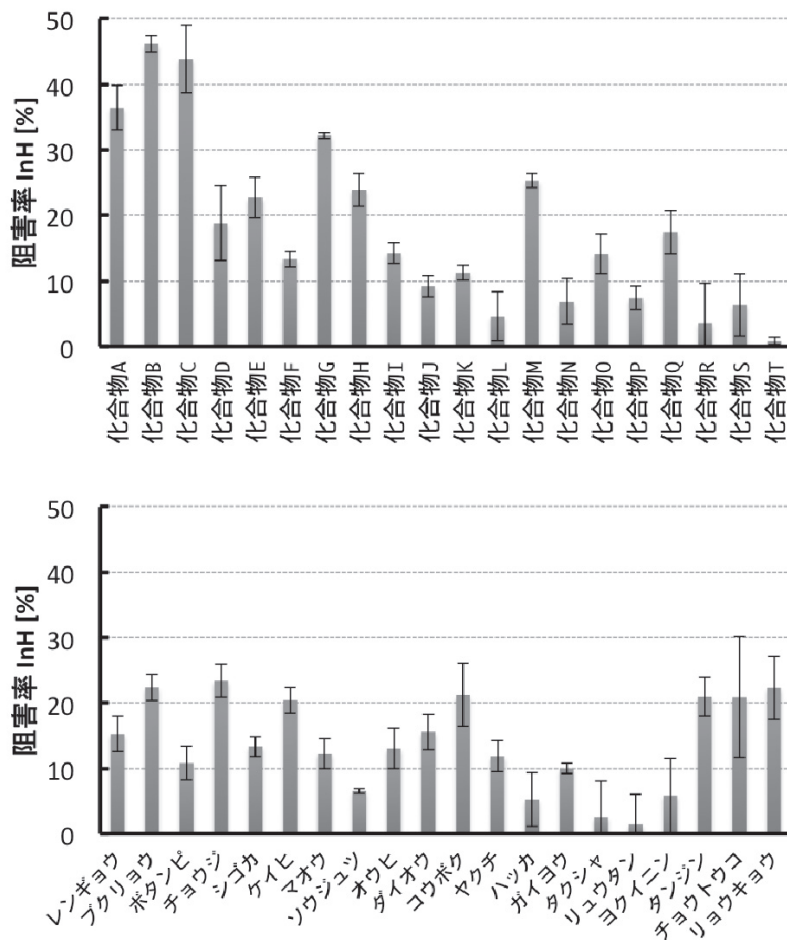


図1 一次アッセイ再現性試験の結果 ( $n=4$ )

$n=1$ での一次アッセイ結果上位から20種類を選抜した後、 $n=4$ で再現性試験を実施した。誤差範囲は、標準偏差を示す。一次アッセイの阻害率順に化合物A~Tとした。

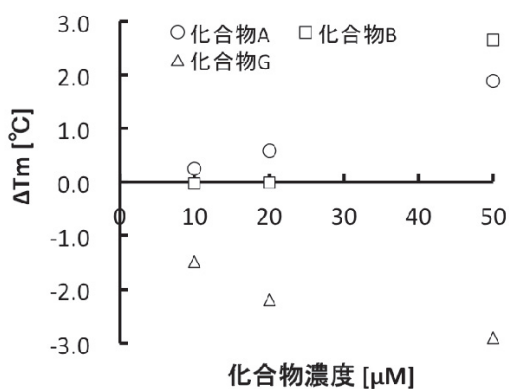


図2 DSFにおける化合物濃度と $\Delta T_m$

ニングの精度に問題はなかった。次に、化合物A、B、CおよびGをDSFで評価した。化合物濃度は、10、20および50  $\mu\text{M}$ の3点とした (図2)。化合物Aは濃度依存的に $\Delta T_m$ が上昇し、化合物Bは10および20  $\mu\text{M}$ では $T_m$ の上昇はなかったが、50  $\mu\text{M}$ で、全4化合物の中で最も高い $\Delta T_m$  (2.7°C)を

示した。これら2種類の化合物は、基質非存在下で硫化水素産生酵素へ結合する可能性が示唆された。一方で、化合物Gは負の $\Delta T_m$ を示した。また、化合物Cでは良好なシグナルが得られなかったため、本アッセイ系で評価することができなかった。

## ■結論

生薬由来化合物（96種類）および生薬エキス（120種類）セットより硫化水素産生酵素阻害剤候補化合物を探索した。一次および二次アッセイにより、化合物セットより化合物AとBの2種類が候補化合物として選抜された。しかしながら、一次アッセイでは、化合物濃度を100  $\mu\text{M}$ と高く設定しているのに対し、阻害率は低く、他の硫化水素産生酵素の既知阻害剤と比較して、阻害活性は低い。今後、更なるアッセイを組み合わせ慎重に評価するとともに改良の必要性も考えられる。