

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06505

研究課題名(和文) *P. endodontalis*におけるジペプチジルペプチダーゼの病原性解析研究課題名(英文) Pathogenic analysis of dipeptidyl-peptidase from *Porphyromonas endodontalis*

研究代表者

西俣 はるか (NISHIMATA, Haruka)

長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号：10755755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児のう蝕は成人のそれと比較すると、急速かつ深部へ進行する穿通性であるのが特徴である。乳歯や幼若永久歯において、炎症がエナメル象牙境を通過し、歯髄や根尖部周囲組織へ波及した際、口腔内では歯肉膿瘍として臨床上観察されることがある。このような根尖病巣部や強い臨床症状を伴う歯の感染根管から分離される菌が、*Porphyromonas endodontalis*である。我々は、同菌及び同属の*P. gingivalis*が如何にしてエネルギー源を獲得しているか探索し、細胞外ペプチドを分解してジペプチドを産生するジペプチジルペプチダーゼ活性を持つことに着目し、生化学的手法を用いて同酵素の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The dental caries in infants progresses rapidly and pulpally, after it penetrates the protective enamel down to the dentin, in comparison with the same in adults. A periapical abscess occurs as the common clinical feature, when inflammation spreads to the pulp and the apical area of a deciduous tooth or an immature permanent tooth, secondary to the tooth decay. *Porphyromonas endodontalis* is the bacterium isolated from endodontic infections such as the root apex and the infected root canal involved with strong clinical manifestations. Our study revealed that *P. endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* have dipeptidyl-peptidase (DPP) which decomposes extracellular oligopeptide into dipeptide as energy source. We found that each bacterium of these showed different activities of DPP.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：歯科 歯周病原細菌 ポルフィロモナス属 ジペプチジルペプチダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 小児のう蝕

小児のう蝕は、成人のそれと比較すると、急速かつ深部へ進行する穿通性う蝕であるのが特徴である。また、乳歯のエナメル質や象牙質の厚みが永久歯の半分程度であったり、乳歯や幼若永久歯の石灰化度が、成熟した永久歯より低かったりする形態的特徴が要因で、炎症が歯髄や根尖部周囲組織へ波及することも多い。

この際、口腔内では歯肉の腫脹として臨床上観察されることがある(写真1)。

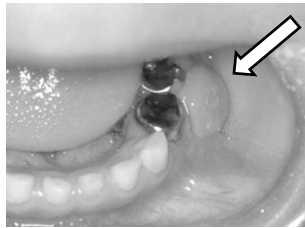


写真1 乳歯の根尖性歯周炎

う蝕が進行した際、このような根尖病巣部や強い臨床症状を伴う感染根管より分離されるのが、*Porphyromonas endodontalis*である。

### (2) 歯周病原細菌 *Porphyromonas* 属

*P. endodontalis* は、糖非発酵性の偏性嫌気性菌で根尖性歯周炎の起炎菌と考えられており、そのエネルギー源と炭素源を細胞外のオリゴペプチドに依存している。また、*P. endodontalis* の近縁種で、慢性歯周炎の原因菌として広く知られている *Porphyromonas gingivalis* も同様の栄養源を持つ。*P. gingivalis* には強力なエンドペプチダーゼである2種類のジンジパイン(Kgp, Rgp)が発現しており、これらは同菌の病原因子である。しかし、*P. endodontalis* においてジンジパイン様活性は認められず、その遺伝子も存在しない。その一方で両菌種は、ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)を持つ点で共通している。

### (3) *P. endodontalis* のエネルギー源

*Porphyromonas* 属は、細胞外ペプチドをジペプチドに分解して菌体内に取り込みエネルギー源にしていると考えられおり、菌体内でさらにアミノ酸に分解した後、これをエネルギー源および炭素源として利用し増殖すると考えられていた。そのため、菌体外のタンパク質分解系とジペプチドおよびトリペプチドの取込み機構は、両菌種の生存に欠かせない。その機構の一端を担うのが、オリゴペプチドをジペプチドへ分解し、細胞内に取り込み可能な型に変換する酵素であるDPP群であるとされた。

### (4) ジペプチジルペプチダーゼ

両菌種におけるDPPは既に、我々の研究などによりPeDPP4, 5, 7, 11とPgDPP4, 5, 7, 11が同定されていた。また、性状解析の結果から個々のDPP活性は異なることが確認されていた。両菌種は、これらの基質特異性を異にするDPPsを利用することで種々のジペプチドを産生出来ると推察された。

特にDPP5活性は*P. endodontalis*で圧倒的であるため、その病原性に関わっている可能性も推測された。

## 2. 研究の目的

本研究は、我々が発見した歯周病原性細菌*P. endodontalis* ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)を中心として、同菌の病原性に関与するジペプチド分解系の全容解明およびその阻害経路確立を目指すものである。同属で慢性歯周炎の病原菌である*P. gingivalis*の様々な菌株とジンジパイン欠損株、DPP遺伝子破壊株の性状について各々比較しつつ検討し、両菌種生育のDPP依存性の評価やDPP酵素群の病原性解析について成果を得ることを目的とした。

近年、歯周病と糖尿病のように、歯周疾患と全身疾患との関連性が強く指摘されている。多くの研究により、その相互間の作用機序は解明途中であるが、歯周炎に罹患した歯周組織からの病原菌や、病原因子が全身的に作用することが一因と考えられている。本研究でDPPの解明が進めば、DPPを阻害することで、生体内での両菌種の生育を阻害し、歯周疾患への罹患や進行を抑制することが可能になる。

研究開始の時点で、歯周病など細菌由来の口腔内疾病に対する予防法は、ブラッシング以外に確立していない。本研究にて得られる成果を、将来的には歯周病原性細菌に由来する歯学・医学分野での疾病予防、治療法の確立や治療薬の開発に繋がれると期待する。

## 3. 研究の方法

*P. gingivalis* ATCC33277 株および *P. endodontalis* ATCC35406 株について、細胞分画法によって菌体画分を分離し、菌体外画分と共に両画分におけるペプチダーゼ活性測定を行った。ペプチダーゼ活性は、各種合成ジペプチジルMCA蛍光基質を用いて測定した。

また、種々の *P. gingivalis* 臨床分離株および *P. endodontalis* のDPP活性を測定しそれぞれの特性を検討した。

#### 4. 研究成果

*P. gingivalis* ATCC33277 株および *P. endodontalis* ATCC35406 株における、菌体画分と菌体外画分のペプチダーゼ活性測定の結果、我々がターゲットとした DPP4, DPP5, DPP7, DPP11 が各々主に分解活性を担うジペプチジル MCA 蛍光基質 Gly-Pro-MCA, Lys-Ala-MCA, Met-Leu-MCA, Leu-Asp-MCA に対して、菌体画分が菌体外画分と比較して高い活性を示した。

続いて *P. gingivalis* 臨床分離株および *P. endodontalis* ジンジパイン (Kgp, Rpg) 活性ならびに DPP 活性を測定し、それぞれの特性を決定した。その結果、*P. gingivalis* 臨床分離株は総じてジンジパイン活性が高い特徴を持つのではないことが明らかとなり、特に *P. gingivalis* W50 株ではその活性の低さが顕著であった。

*P. endodontalis* は同属の *P. gingivalis* が持つジンジパイン活性を持たないが、一方で相反して DPP5 や DPP11 ではその活性が極めて高いことが明らかとなった。しかしながら、DPP 活性が概して向上するという現象は認められず、*P. endodontalis* の DPP7 の活性は *P. gingivalis* W83 株や HNA99 株に近似していた。このことから、同菌のエネルギー源獲得における、DPP5 および DPP11 の重要性が示唆されるとともに、DPP 以外の手法を保持する可能性も推測された。

続いて我々の研究グループでは、N-末端修飾ジペプチドおよびトリペプチドを遊離するエキソペプチダーゼであるアシルペプチジルオリゴペプチダーゼ (AOP) を *P. gingivalis* において新規に発見し、その生化学的および酵素学的特性について報告を行った (Takayuki K Nemoto, *et al.*, 2016)。AOP はそのオルソログが、*Porphyromonas* 属における DPP と同様に、細菌・古細菌・真核生物に分布している。AOP は DPP と同様に局在は共にペリプラスム画分で、菌体外に遊離した形では存在しないことが *P. gingivalis* ATCC33277 株で明らかになった。この特性はその他の臨床分離株においても同様の可能性が高いと考えられる。

以上のことから、同菌は口腔内にて生育する際、タンパク質の N-末端修飾を AOP にて除去し、DPP を用いてジペプチド産生を行い、それを取り込むことで効率的にエネルギー源として活用するという一連の分解系を持つことが推定された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Takayuki K Nemoto, Yuko Ohara-Nemoto, Gustavo Arruda Bezerra, Yu Shimoyama, Shigenobu Kimura. A *Porphyromonas gingivalis* periplasmic novel exopeptidase, acylpeptidyl oligopeptidase, releases N-acylated di- and tripeptides from oligopeptides. *J. Biol. Chem.* 291(11): 5913-5925, 査読有, 2016.

DOI:10.1074/jbc.M115.687566

Takayuki K Nemoto, Yuko Ohara-Nemoto. Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 52(1): 22-29, 査読有, 2016.

DOI: 10.1016/j.jdsr.2015.08.002

[学会発表](計5件)

松崎拓海、西俣はるか、田上直美、藤原卓。

銀および同微粒子の *Streptococcus mutans* に対する抗菌効果の検討。

第34回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会、2016.10.30、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

今村圭吾、釜崎陽子、西俣はるか、近藤好夫、藤原卓。

骨形成不全症に伴う象牙質形成不全症乳歯の形態観察。

第34回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会、2016.10.30、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)

Haruka Nishimata, Yoko Kamasaki, Tomonori Hoshino, Taku Fujiwara. PRG Barrier Coat inhibits biofilm formation by *Streptococcus mutans*.

10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016. 5.27-28, Tokyo Dome Hotel (東京都文京区)

Miyuki Nishiguchi, Keigo Imamura, Haruka Nishimata, Yoko Kamasaki, Kyoko Satoh, Yoshio Kondo, Naomi Tanoue, Taku Fujiwara.

A Case with Disturbances in Tooth Formation caused by Rhabdomyosarcoma.

10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016. 5.27-28, Tokyo Dome Hotel (東京都文京区)

Yoshio Kondo, Yoichi Motomura, Keisuke Murayama, Haruka Nishimata, Kayo

Nishida, Keigo Imamura, Kyoko Satoh,  
Kiyoshi Hidaka, Yoko Kamasaki, Miyuki  
Nishiguchi, Tomonori Hoshino, Kan Saito,  
Taku Fujiwara.

Construction of New Risk Predictive Model  
based on Machine Learning Method.

10th Biennial Conference of the Pediatric  
Dentistry Association of Asia, 2016.

5.27-28, Tokyo Dome Hotel (東京都文京区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西俣 はるか (NISHIMATA, Haruka)

長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号: 10755755

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

根本 孝幸 (NEMOTO, Takayuki K.)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・

教授

研究者番号: 90164665