

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11047

研究課題名(和文) 糖尿病リスクファクターとしての歯周病原性細菌エキソペプチダーゼの解析

研究課題名(英文) Exopeptidases from periodontopathic bacteria as risk factors of type-2 diabetes mellitus

研究代表者

根本 孝幸 (NEMOTO, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：90164665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々はPorphyromonas gingivalis等歯周病細菌の4ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)の構造と機能を明らかにしてきた。本プロジェクトでは2型糖尿病の増悪化に歯周病菌DPPが関わるという仮説の元に、歯周病菌DPPの宿主への役割を明らかにする。

歯周病菌DPP4が2型糖尿病の病態増悪化に関与する可能性が考えられた。マウス耐糖試験において、細菌性DPP4の前投与が活性型インクレチン濃度を低下させ、その結果、血糖値を上昇させることが明らかとなった。さらに歯周病菌DPPの切断できないN末修飾ペプチドを選択的に分解するオリゴペプチダーゼのクローニングに成功した。

研究成果の概要(英文)：We previously identified novel exopeptidases expressed in periodontopathic bacteria, such as Porphyromonas gingivalis. In this project, we synthesized a substrate truly specific for dipeptidyl-peptidase (DPP) 7. Moreover, based on the hypothesis that these exopeptidases are involved to the exacerbation of type-2 diabetes mellitus, we investigated the role of bacterial DPPs.

Mice with pre-injected with DPP4 showed increased blood glucose concentrations and retarded decline during the glucose tolerance test. In consistent to these changes, blood insulin and incretin (GLP-1) concentrations were decreased in DPP4-injected mice. To our knowledge, this is the first study that periodontopathic bacteria can exacerbate type-2 diabetes via bacterial DPP4.

Separately, we identified an oligopeptidase in P. gingivalis that preferentially degrades N-terminally acylated peptides, which are unable to be degraded by DPPs.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周病 歯周病細菌 ジペプチジルペプチダーゼ プロテアーゼ Porphyromonas gingivalis

1. 研究開始当初の背景

Porphyromonas gingivalis を始めとする歯周病原性細菌群は、糖非依存性でもっぱら細胞外のタンパク質代謝によって生育のためのエネルギーと炭素を得る。そのため細胞外やペリプラズム領域に種々のペプチダーゼを発現している。特に *P. gingivalis* においてはシステインエンドペプチダーゼであるジンジパインが大量に発現していることが知られている。

その一方で *P. gingivalis* はアミノ酸ではなく、ジペプチドの形で細菌体内に取り込むと報告されている。そのため、塩基性アミノ酸特異的なジンジパインのみでは、取り込み形であるジペプチドにまで分解することは不可能である。この目的のためにジペプチドを産生するジペプチジルペプチダーゼ(DPP)が発現している。全生物種でみると基質特異性を異にする7種類のDPPが報告されているが、*P. gingivalis* において2011年以前は、Pro 特異的なDPP4と疎水性アミノ酸選択的なDPP7の存在が知られているのみだった。さらにDPPが分解できないN末より3番目にProも持つペプチドを切断することのできるトリペプチジルペプチダーゼ(PTP-A)は報告されていた。

我々は *P. gingivalis* および関連菌である *Porphyromonas endodontalis* の研究から、従来、すべての生物においてこれまで報告のない酸性アミノ酸特異的なDPPを見いだして、DPP11と命名した。その後には、カビなど特殊な真核生物にのみ報告されていたDPP5も、歯周病細菌を始め多くの細菌に発現していることを見いだした。そのため歯周病細菌には、細胞外の基質タンパク質を大まかに切断するエンドペプチダーゼと、その作用の結果生じるオリゴペプチドをジペプチドに変換しうる4種類のDPPが発現していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

ヒトDPP4が、膵臓ランゲルハンス島のインシュリン分布を促進する因子であるインクレチン類(GLP-1、GIP)を分解する事実を考慮し、歯周病患者において歯周病細菌由来の多様なペプチダーゼ群が宿主のホメオスタシスを破壊して、病気を引き起こしているのではなかと推測した。そこでまず疫学研究の結果から歯周病との相関が明らかな2型糖尿病との関連から検索することとした。

その一方で、歯周病細菌にはまだ知られていないペプチダーゼがあると我々は推定している。特にDPPはいずれもN末端が修飾されているペプチドを基質とすることはできず、一方で、歯周病細菌の基質となるのは血しょう由来のタンパク質が多いと考えられるが、その多くがN末修飾を受けていると

されている。そこで歯周病細菌にはN末修飾基質を分解するペプチダーゼが存在すると推定し、これについても検索する。

3. 研究の方法

(1) 菌の培養と酵素活性の測定

最も強く歯周病と関連するため、“red complex”を形成するとされる歯周病細菌3種類のうち2種類(*P. gingivalis*、*Tannerella forsythia*)、次いでかなりの程度関連するとされ、“orange complex”と呼ばれる菌のなかから *Prevotella intermedia* を培養して、それらの発現するペプチダーゼを市販の100種類のペプチド蛍光基質によって推定した。*P. gingivalis* については、さらにDPP4、DPP5、DPP7、DPP11およびジンジパイン各遺伝子および多重遺伝子ノックアウト株を作成して、その残存活性から、未同定ペプチダーゼの活性を推定した。その結果を指標にゲノム情報から可能性のあるペプチダーゼ遺伝子をPCRクローニングして発現し、その基質特異性を決定した。

(2) 歯周病菌リコンビナント DPP の生体内基質への活性の検索

大腸菌で発現した歯周病細菌のリコンビナントDPPの酵素学的なパラメータを決定した。さらに基質としてジペプチジル蛍光基質(MCA)に加えて、生体内の活性ペプチドであるインクレチン(GLP-1およびGIP)で検討した。切断の有無や程度はTOF-MSを用いて決定した。さらに血液凝固系への影響を見るために、APTTとPT法を用いた。これらの方法によって、DPPが血液凝固系因子を分解して不活化するかどうかを検討した。

(3) 歯周病原細菌 DPP のマウス個体への影響の検討

リコンビナントDPPを大量に発現精製して、マウス尾静脈法を用いて耐糖試験を行った。あらかじめDPPを静注した場合と、対照にPBSを投与した場合で、血糖値の上昇と下降のプロファイルが異なるかどうか、また血中インクレチンGLP-1およびインシュリンの濃度がどのように変化するかをモニターした。

4. 研究成果

(1) 新規エキソペプチダーゼの発見

従来より知られていたDPP4、DPP7、PTP-Aおよび我々が見いだしたDPP5、DPP11はいずれもN末端が修飾されているペプチドを切断することはできない。しかしながら歯周病

菌の基質となるタンパク質の多くは血しょう由来し、それらのN末の多くはアシル化されていると推定される。そこで我々は *P. gingivalis* には修飾N末ペプチドを分解できるペプチダーゼが存在すると推定した。S9 ファミリーペプチダーゼファミリーより複数の候補遺伝子を PCR クローニングしたところ、PGN1349 に本活性を認めた。しかも PGN1349 はアシル化末端を持たないものよりもアシル化ペプチドから、極めて選択的にアシル化ジペプチドを遊離することが判明した(雑誌論文 7, 8)。これで歯周病菌のペプチドの一つの謎が解決できたと考えている。

(2) *Bacteroides* 属細菌での新規特異性を有する DPP11 の発見

我々は歯周病原細菌において酸性アミノ酸特異的な新規の DPP である DPP11 を 2011 年に発見した。2013 年には、酸性アミノ酸のうちでもより Asp 特異的なタイプ (*P. gingivalis* 型)と逆に Glu をより強く反応するタイプ (*Shewanella putrefaciens* 型)があることを報告した。今回 *Bacteroides* 属の DPP11 が第一のタイプに近いものの Glu にはほとんど活性を示さないといういわば第 3 のタイプと分類すべきであることを報告した(雑誌論文 3)。

(3) 歯周病菌由来 DPP4 が 2 型糖尿病に及ぼす影響

ヒトの発現する DPP4 が膵臓のインシュリン分泌促進因子であるインクレチン分解を引き起こすこと、そのために DPP4 阻害剤が 2 型糖尿病の保険薬剤として使用されていることは周知の事実である。そこで我々は歯周病菌の発現する DPP4 にも同様の作用があると考えて *in vitro* と *in vivo* で実験を行った。マウスモデル系を用いて歯周病菌 *P. gingivalis* および *Prev. intermedia* DPP4 に強いインクレチン分解作用があることを示すことができた(雑誌論文 4)。この結果は、歯周病と 2 型糖尿病の相関性に DPP が関わることを強く示唆する結果であり、重要であると考えている。

(4) DPP7 特異的かつ高活性基質の作成

これまで歯周病菌の 4 種類の DPP を中心に検討してきた結果、DPP5 と DPP7 の基質特異性がかなりオーバーラップすることが判明した。もっとも重要な P1 部位(N 末から 2 番目の残基)については、DPP5 は Ala または疎水性アミノ酸を好み、DPP7 は疎水性アミノ酸を好む。問題なのは、DPP5 特異的基質としては Lys-Ala-MCA があるが、その一方で DPP7 特異的な基質は存在せず、われわれの従来の検討で最も反応性のよい基質 Met-Leu-MCA でも、実はより DPP5 に強く分解される。そこ

で DPP5 と DPP7 の P1 部位と P2 部位(N 末端)特異的なアミノ酸残基に関して再検討し、DPP7 に対して最も高活性で、かつ DPP5 ではほとんど分解しない基質 Phe-Met-MCA を同定することに成功した。本基質を利用することにより、歯周病菌の発現する 4 種類の DPP の個別定量が初めて可能になった(雑誌論文 1)。現在、企業とともに本基質の製品化を進めている。

(5) DPP11 の酵素反応機構

歯周病菌 DPP11 の酵素学および X 線解析によって、DPP11 の反応機構が極めてユニークな entropy 依存的基質結合反応を行うことを明らかにした。また、基質の側鎖のうち P1 および P2 部位はしっかりと酵素に保持されるが、その一方で P1'、P2' の側鎖はふらついてほとんど酵素との結合には関与しないことが判明した(雑誌論文 5)。

(6) 歯周病菌の新規ペプチダーゼの発見

“Orange complex” 菌である *Prev. intermedia* には Arg 特異的なアミノペプチダーゼが発現していた。これまでに遺伝子の同定とリコンビナントタンパクの発現と成功している(Sarwar ら、第 60 回歯科基礎医学会、福岡、2018、9 月 発表予定)

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 8 件)

1. 中里 菜那美、下山 佑、根本 優子、佐々木 大輔、根本 孝幸、佐々木 実、八重柏 隆 2 型糖尿病のリスクファクターとしての歯周病原細菌 DPP4 岩手歯誌 in press (2018) 査読有
2. Nemoto TK, Ono T, Ohara-Nemoto Y: Establishment of potent and specific synthetic substrate for dipeptidyl-peptidase 7. Anal. Biochem. 548 78-81 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.02.008> 査読有
3. Nemoto TK, Bezerra GA, Ono T, Nishimata H, Fujiwara T, Ohara-Nemoto Y: Identification of a new subtype of dipeptidyl peptidase 11 and a third group of the

- S46-family members specifically present in the genus *Bacteroides*. *Biochimie. pii: S0300-9084(17) 30267-5 (2017) doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.015. PMID: 29080830*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29080830> 査読有
4. Ohara-Nemoto Y, Nakasato M, Shimoyama Y, Baba TT, Kobayakawa T, Ono T, Yaegashi T, Kimura S, Nemoto TK: Infect Immun. (2017) pii: IAI.00277-17. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630069> 査読有
 5. Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Cornaciu I, Fedosyuk S, Hoffmann G, Round A, Márquez JA, Nemoto TK, Djinić-Carugo K.: Bacterial protease uses distinct thermodynamic signatures for substrate recognition *Sci Rep.* 7(1), 2848. (2017) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28588213> 査読有
 6. Shimoyama Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura M, Tanaka M, Kimura S, Nemoto TK: Dominant prevalence of *Porphyromonas gingivalis fimA* types I and IV in healthy Japanese children. *J Dent Sci.* 12(3), 213-219 (2017) doi: 10.1016/j.jds.2017.03.00 査読有
 7. Nemoto TK, Ohara-Nemoto Y, Bezerra GA, Shimoyama Y, Kimura S: A *Porphyromonas gingivalis* periplasmic novel exopeptidase, acylpeptidyl oligopeptidase, releases N-acylated di- and tri-peptides from oligopeptides. *J Biol Chem.* 291(11): 5913-5925 (2016) doi: 10.1074/jbc.M115.687566. 査読有
 8. Nemoto TK, Ohara-Nemoto Y: Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism *Jpn. Dental Sci. Rev.* 52(1), 22-29, (2016) doi:10.1016/j.jdsr.2015.08.00 査読有
- [学会発表](計 11件)
1. 根本優子、小野俊雄、根本孝幸：
*Bacteroides*属菌が有するS46ファミリージペプチジルペプチダーゼ .第90回日本細菌学会総会、仙台市、3月 2017
 2. 中里茉那美、根本優子、下山佑、木村重信、佐々木大輔、伊東俊太郎、佐々木実、八重柏隆：*Porphyromonas gingivalis* および *Tannerella forsythia* のジペプチジルペプチダーゼ4 活性とインクレチン分解能 . 第60回春季日本歯周病学会学術大会、福岡市、5月 2017
 3. 根本孝幸、小野俊雄、根本優子：歯周病原性細菌アシルペプチジルオリゴペプチダーゼ(AOP)のアシルペプチド選択機構 . 第59回歯科基礎医学会学術大会・総会、塩尻市、9月 2016 { *J Oral Biosci* 59(Suppl):488, 2017 }
 4. Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Fedosyuk S, Cornaciu I, Hoffmann G, Marquez JA, Nemoto TK, Djinić-Carugo K.: *Porphyromonas sp.* dipeptidyl peptidases 11 distinguish substrates from end products via distinct thermodynamic signatures. EMBO Conference The biochemistry and chemistry of biocatalysis: From understanding to design 12-15 June 2016 Oulu Finland
 5. Shimoyama Y, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, Nakasato M, Yaegashi T, Ishikawa T, Sasaki M, Kimura S: Degradation of incretin by the prokaryotic dipeptidyl-peptidase 4 from *Porphyromonas gingivalis*. ASM 2016 General meeting, Jun 16, 17-20 2016, Boston, MS, USA
 6. Nakasato M, Shimoyama Y, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, Takahashi S, Ito S, Sasaki D, Yaegashi T, Kimura S: Characterization of dipeptidyl-peptidase 4 from *Tannerella forsythia*. ASM 2016 General meeting, Jun 16, 17-20 2016, Boston, MS, USA

7. 下山佑、根本優子、中里茉那美、根本孝幸、高橋晋平、石河太知、古玉芳豊、八重柏隆、佐々木実、木村重信：歯周病原性細菌 ‘red complex species’ のビルレンス因子としてのプロテアーゼ第89回日本細菌学会総会、大阪市、3月 { Jap J Bacteriol 71 (1) : 129、 2016 }
8. 根本優子、小早川健、馬場友巳、根本孝幸： *Porphyromonas gingivalis* のアミノ酸及びオリゴペプチド輸送系の解析第58回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌市、8月 { J Oral Biosci 58 (Suppl) : 538、 2016 }
9. Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK: Oral bacteria and systemic diseases: Periodontopathic bacteria and type 2 diabetes mellitus. 1st Partnership Symposium of Nagasaki and Islamic Universities. Sep 16, 2015. Kushtia, Bangladesh
10. Nemoto TK, Ohara-Nemoto Y: Identification of exopeptidases expressed in periodontopathic bacteria, *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis*. 1st Partnership Symposium of Nagasaki and Islamic Universities. Sep 16, 2015. Kushtia, Bangladesh
11. Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, DjinoVIC-Carugo K: Towards the structural basis of peptide binding to dipeptidyl peptidases of *Porphyromonas sp.* 2015 Annual Meeting-American Crystallographic Association, Philadelphia, PA, July 25-29, 2015, USA Sheraton Downtown Hotel

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
 根本 孝幸 (NEMOTO, Takayuki)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
 研究者番号： 90164665

(2)研究分担者

根本 優子 (OHARA-NEMOTO, Yuko)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授
 研究者番号： 10164667

木村 重信 (KIMURA, Shigenobu)
 関西女子短期大学・歯科衛生学科・教授
 研究者番号： 10177917

馬場 友巳 (BABA, Tomomi T.)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
 研究者番号： 60189727

下山 佑 (SHIMOYAMA, Yu)
 岩手医科大学・歯学部・講師
 研究者番号： 90453331

小早川 健 (KOBAYAKAWA, Takeshi)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員
 研究者番号： 90164665

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし