

令和元年6月4日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11481

研究課題名(和文) 口腔細菌ペプチダーゼの基質となる全身疾患関連生理活性ペプチド探索の基盤研究

研究課題名(英文) Relations of periodontal diseases to systemic diseases and involvement of degradation of bioactive peptides by oral bacterial peptidases

研究代表者

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

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)：歯周病菌ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)4, DPP5, DPP7の基質特異性と酵素学的パラメーターを決定した。歯周病菌DPP4はヒトおよびマウスインクレチン(GLP-1, GIP)を分解すること、DPP4投与によりマウス血中の活性型GLP-1とインスリン濃度が低下し、食後高血糖値の上昇と標準値への復帰が遅延することを明らかにした。検索の結果、嫌気性バクテロイデス門の菌種のみがdpp4遺伝子を有することから、インクレチン分解を介した歯周病-2型糖尿病関連の新規の分子機序を提唱した。加えて、歯周病-全身疾患関連にDPPによる生理活性ペプチド分解が関与する可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が発見した新規ペプチダーゼ含む口腔細菌ペプチダーゼの基質特異性が確定し、酵素学的パラメーターが決定された。口腔細菌由来DPP4がヒトDPP4と同様にインスリン分泌誘導作用のある生理活性ペプチド(インクレチン, GLP-1, GIP)分解能があること示し、口腔細菌ペプチダーゼと血糖値調節について新たな知見が得られた。概要に記した成果は、歯周病原性細菌に関係する歯学・医学分野での疾病予防と治療の観点から重要であるばかりでなく、ヒトでの新規のペプチド分解による制御系の発見に繋がる可能性があり、極めて意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic parameters and substrate specificities of periodontopathic bacterial dipeptidyl peptidases (DPP)4, DPP5, and DPP7 were determined. Bacterial DPP4 degraded human and mouse incretin hormones (glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide). Administration of bacterial DPP4 to mouse decreased in concentrations of active glucagon-like peptide-1 and insulin in the blood, accompanied by a substantial elevation of postprandial hyperglycemia and delayed reduction of blood glucose. Databases search revealed that anaerobic Bacteroidetes bacteria possess the dpp4 genes, suggesting that a molecular mechanism of degradation of bioactive peptides by periodontopathic bacterial peptidases, which is possibly involved in the association between periodontal and systemic diseases.

研究分野：口腔生化学

キーワード：DPP4 インクレチン 歯周病 2型糖尿病 インスリン ペプチダーゼ 全身疾患 口腔細菌

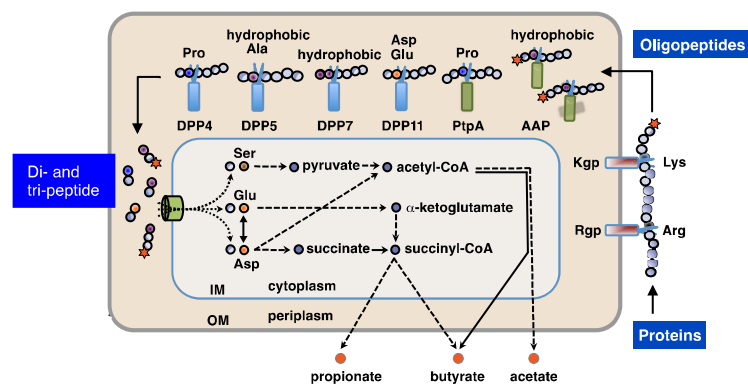
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は偏性嫌気性菌によって起こる炎症性疾患で、*Porphyromonas gingivalis* は成人性歯周炎の主要な起炎菌である。本疾患は成人で永久歯を失う主因となっているおり、高齢者での歯数減少はQOLの低下に繋がる。加えて、歯周病菌は循環器系疾患、糖尿病、呼吸器系疾患や低体重児出産などとも関連があるとされ、*P. gingivalis* を含む歯周病菌由来成分による宿主生理作用修飾機構の解明は関連疾病の治療と予防上の重要課題となっている。

(2) *P. gingivalis* は糖非発酵性で、アミノ酸をエネルギー源および炭素源とする。一方、アルギニンアミノペプチダーゼ活性を除いては、単独アミノ酸を遊離するペプチダーゼ活性が認められないこと(Suido H ら, 1986)、およびアミノ酸は主にジペプチドとして取り込まれること(Takahashi N, Sato T, 2001)から、本菌のジペプチド産生ペプチダーゼ系の発見は代謝の全体像を理解する上で重要であった。我々は、*P. gingivalis* が発現するジペプチジルペプチダーゼ(DPP)活性に着目し、これまでに新規酵素である DPP5, DPP11 および acylpeptidyl oligopeptidase(AOP)を発見した。これらの酵素は既知であった DPP4 および DPP7 とともに、それぞれの異なる基質特異性により N 末端からほぼ全ての組み合わせのジペプチドを遊離することが可能である (Nemoto TK, Ohara-Nemoto Y, 2016) (図1)。

図1 *P. gingivalis* のジペプチド産生ペプチダーゼとアミノ酸代謝



2. 研究の目的

(1) *P. gingivalis* DPP を中心として、口腔細菌由来の各種 DPP の酵素学的パラメーター、基質特異性の詳細と遺伝子分布、分類方法の確立を目的とした。

(2) 基質となる宿主生理活性ペプチドの探索を行い、全身疾患との関連性解明の基盤となる知見の獲得を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペプチド基質および質量分析による解析

P. gingivalis (Pg) DPP4, DPP5, DPP7, DPP11, AOP に加えて、歯周病菌である *Tannerella forsythia* (Tf), *Prevotella intermedia* (Pi) を含む細菌ペプチダーゼタンパク質を大腸菌発現系を用いて発現精製する。蛍光(MCA)標識合成ペプチド基質を用いてペプチダーゼ活性を測定し、生化学および酵素学的性状を明らかにする。

(2) 生理活性ペプチド分解の解析

抗菌薬耐性遺伝子の導入により、*dpp* 遺伝子の単独、二重、三重欠失 Pg 株を作成する。これら Pg 株および組換え DPP 分子によるインクレチン (GLP-1 および GIP) 分解活性を質量分析により検討する。

(3) マウスモデルによる血糖値調節機構修飾の解グルコース経口負荷試験を行い、血糖値の経時変化を測定する。歯周病菌 DPP4 を尾静脈から投与し、血糖値変化におよぼす影響を検討する。さらに、血糖調節因子(活性型 GLP-1, インスリン)の量的変動を ELISA で測定し、歯周病菌 DPP4 の血糖調節機構の修飾について検討する。

(4) 口腔細菌叢データベース解析と口腔検体 DPP 活性の測定

eHOMD, KEGG オルソログデータベース, Blast 他のホモロジー検索を行い、口腔細菌叢における *dpp* 遺伝子分布を決定する。ヒト唾液、歯垢標品を採取し、各 DPP 活性を特異的基質を用いて測定する。

4. 研究成果

(1) DPP7 および DPP11 はペプチダーゼファミリーS46 に分類される。我々はこれまでに全アミノ酸配列による分類では DPP7 と DPP11 を正確に分類できないことを示したが、本研究ではさらに遺伝子情報に基づいて S46 に分類される推定遺伝子組換えタンパク質を発現精製し、それらの酵素活性について検討した。その結果、S46 ファミリーのより正確な分類法を示し、DPP7、DPP11 群に加えて *Bacteroides* 属に特有な基質未知の分子群 (*Bacteroides* DPP) が存在することを明らかにした (図 2)。

(2) DPP7 と DPP5 はともに疎水性アミノ酸残基の C 末側ペプチド結合を加水分解することから、これまでは菌体におけるこれら 2 種類の活性を判別できなかった。そこで、種々のジペプチジル MCA 基質を合成し、DPP7 と DPP5 による分解と P1, P2 残基特異性を検討した。その結果、Lys-Ala-MCA 分解により DPP5 活性が、また、新規合成基質である Phe-Met-MCA により DPP7 活性が分別されることを報告した。

(3) ヒト DPP4 はインクレチン (GLP-1 と GIP) を分解し、血糖調節に関与することが知られている。歯周病菌も DPP4 を有することから、細菌 DPP4 による宿主ペプチド分解について検討した。その結果、PgDPP4, TfDPP4, PiDPP4 のいずれもがヒト DPP4 阻害剤により活性が阻害されること (図 3)、また、*in vitro* で GLP-1 と GIP を分解し、非活性化することを明らかにした。

(4) グルコース経口投与とマウスへの細菌 DPP4 投与により活性型 GLP-1 濃度、および血中インスリン濃度が低下した (図 4)。

これらの血糖調節に関与する宿主因子の分解や分泌低下の結果、食後高血糖の有意な上昇が観察され、また、高血糖状態がよりながく続くことが明らかになった (図 4)。

これらの結果は細菌 DPP によるペプチド分解を介して宿主生理機能が修飾されることを初めて示したものである。

(5) *P. gingivalis* *dpp4*, *dpp5*, *dpp7*, および *dpp11* 遺伝子オルソログの分布を口腔細菌叢を構成する約 750 菌種で検索した結果、*Bacteroides* 属、*Porphyromonas* 属、*Prevotella* 属、*Tannerella* 属、および *Capnocytophaga* 属の 43 菌種のみが *dpp* 遺伝子を有することを見出した。また、実際に主要歯周病菌では 4 種類の DPP 活性が測定できることを示した。

これらの細菌種はいずれも嫌気性菌で歯肉縁下プラーク構成菌であることから、以前より報告のあった糖尿病を含む全身疾患と歯周病との関連には細菌 DPP による宿主因子分解の関与が示唆された。また、それぞれの酵素に特異的な合成基質を用いて歯肉縁下プラーク標品の DPP 活性測定が可能であることを示し、被験者口腔における歯周病菌有無の判定にこれらの活性測定法の使用が可能であることを報告した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

図 2 S46 ペプチダーゼ系統樹

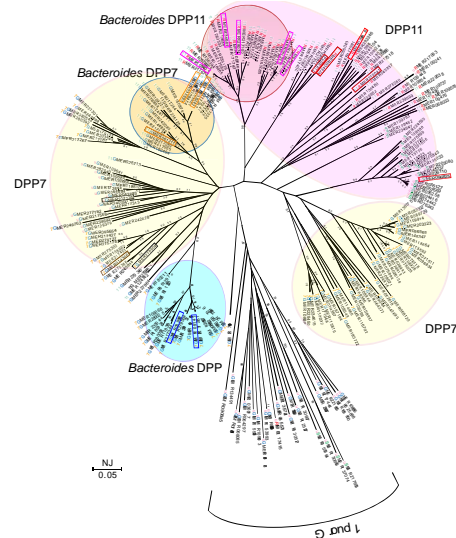


図 3 P32/98 による細菌 DPP4 活性の阻害

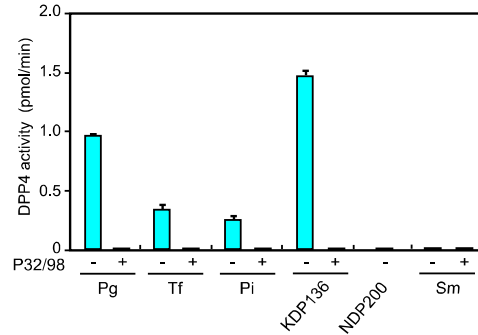
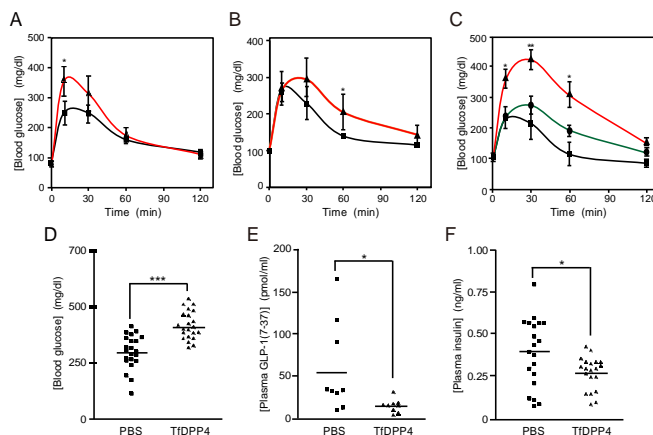


図 4 細菌 DPP4 による血糖調節の修飾



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

Nemoto TK, Ono T, Kobayakawa T, Ohara-Nemoto Y: General properties of bacterial acylpeptidyl-oligopeptidase. *Biochimie* (2019) 163:50-57. doi: 10.1016/j.biochi.2019.05.007 (査読有)

Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Nakasato M, Nishimata H, Ishikawa T, Sasaki M, Kimura S, Nemoto TK: Distribution of dipeptidyl peptidase (DPP) 4, DPP5, DPP7, and DPP11 in human oral microbiota – potent biomarkers indicating presence of periodontopathic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* (2018) 365(22) doi: 10.1093/femsle/fny221 (査読有)

Nemoto TK, Ono T, Ohara-Nemoto Y: Establishment of potent and specific synthetic substrate for dipeptidyl-peptidase 7. *Anal Biochem* (2018) 548: 78-81. doi: 10.1016/j.ab.2018.02.008 (査読有)

中里 茉那美, 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. *岩医大歯誌* (2018) 43:48-60. https://doi.org/10.20663/iwateshigakukaishi.43.1_48 (査読有)

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* (2018) 147:25-35. doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.015 (査読有)

Ohara-Nemoto Y, Nakasato M, Shimoyama Y, Baba TT, Kobayakawa T, Ono T, Yaegashi T, Kimura S, Nemoto TK: Degradation of incretins and modulation of blood glucose levels by periodontopathic bacterial dipeptidyl peptidase 4. *Infect Immun* (2017) 85:e00277-17. doi: 10.1128/IAI.00277-17 (査読有)

Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Fedosyuk S, Cornaciu I, Hoffmann G, Round A, Marquez JA, Nemoto TK, DjinoVIC-Carugo K: Bacterial protease uses distinct thermodynamic signatures for substrate recognition. *Sci Rep* (2017) 7: 2848. doi:10.1038/s41598-017-03220-y (査読有)

Shimoyama Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura M, Kimura S, Tanaka M, Nemoto TK: Genotyping procedure utilizing nested PCR for *P. gingivalis fimA* demonstrates dominant preference of *fimA*-type I and IV in healthy children. *J Dent Sci* (2017) 12: 213-219. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2017.03.006>. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

Sarwar Mohammad Tanvir, 根本優子, 小早川健, 内藤真理子, 根本孝幸: *Prevotella intermedia* の発現するアルギニン特異的アミノペプチダーゼの同定と発現. 第60回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017, 福岡市

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, 2017, 仙台市

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, 2017, 福岡市

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, 2017, 塩尻市

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 Microbe 2016*, Boston, MS, USA

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 Microbe 2016*, Boston, MS, USA

Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Fedosyuk S, Cornaciu I, Hoffmann G, Marquez JA, Nemoto TK, DjinoVIC-Carugo K: *Porphyromonas sp.* dipeptidyl peptidases 11 distinguish substrates from end products via distinct thermodynamic signatures. *EMBO Conference The biochemistry and biocatalysis: From understanding to design.* 2016, Oulu, Finland

下山佑, 根本優子, 石河太知, 佐々木実, 根本孝幸, 木村重信: *Porphyromonas gingivalis* DPP4によるインクレチンの分解. 第70回日本細菌学会東北支部総会, 2016, 十和田市

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, 2016, 札幌市

蒔苗剛, 下山佑, 田中光郎, 石河太知, 古玉芳豊, 佐々木実, 根本優子, 根本孝幸, 木村重信: 小児プラークにおけるミュータンスレンサ球菌定着量と齲蝕罹患率の関連. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016, 札幌市

〔その他〕

国立大学法人長崎大学 HP

(<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/science/science71.html>) 「原核生物で初めてジペプチジルペプチダーゼ5 (DPP5)を発見」

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：根本 孝幸

ローマ字氏名：NEMOTO, Takayuki

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：9 0 1 6 4 6 6 5

研究分担者氏名：下山 佑

ローマ字氏名：SHIMOYAMA, Yu

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：9 0 4 5 3 3 3 1

研究分担者氏名：馬場 友巳

ローマ字氏名：BABA, Tomomi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：6 0 1 8 9 7 2 7

研究分担者氏名：小早川 健

ローマ字氏名：KOBAYAKAWA, Takeshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：技術職員

研究者番号（8桁）：1 0 1 5 3 5 8 7

研究分担者氏名：木村 重信

ローマ字氏名：KIMURA, Shigenobu

所属研究機関名：関西女子短期大学

部局名：その他部局等

職名：教授

研究者番号（8桁）：1 0 1 7 7 9 1 7

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。