

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17336

研究課題名(和文)ポルフィロモナス・エンドドンタリスにおける菌体外ペプチド分解機構の解明

研究課題名(英文) Investigation into degradation of extracellular peptides by Porphyromonas endodontalis

研究代表者

西俣 はるか (NISHIMATA, Haruka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10755755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、歯周病原性菌Porphyromonas属の産生するジペプチジルペプチダーゼ(Dipeptidyl-Peptidase：DPP)に着目し本研究を行った。

本研究にて、dpp遺伝子は全口腔細菌のうち、歯肉縁下プラークの構成細菌であるPorphyromonas属やPrevotella属を含む嫌気性菌に限定的に存在することが示された。ヒト口腔検体のペプチダーゼ活性測定では、その結果から歯周病原性菌の存在有無が予想され、本測定が歯周病の指標の1つとして活用できることが示唆された。マウス実験では、細菌DPP4活性はヒトDPP4阻害剤で阻害され、生理活性ペプチド分解能を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での口腔サンプルを用いたDPP活性測定により、歯周病原性菌の存在の有無が予測されたことから、DPP活性測定は歯周病原性菌のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

また、我々の研究対象であるdpp遺伝子の一部は、ヒトにも存在することが既知であり、ペプチド分解によって惹起される疾患の制御に繋がる可能性を持つ。本研究にて明らかとなったP. gingivalis dpp遺伝子オルソログを有する菌には、全身疾患との関連が示唆されるものが多数あるため、本研究成果は、歯周疾患だけでなくこれら全身疾患への疾患予防・治療法確立への将来的な寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was biochemical analysis of dipeptidyl peptidase (DPP) produced by Porphyromonas gingivalis. Databases search revealed that the genus Porphyromonas and the genus Prevotella possess the dpp genes. These bacteria are anaerobic bacteria and grow in the subgingival plaque. The peptidase activity measurement of the human oral specimen suggested that this measurement should be utilized as the indexes of periodontal disease, because existence of periodontal disease pathogenic bacteria or not is expected by this result. Bacterial DPP4 degraded human and mouse incretin hormones and this activity was inhibited with human DPP4 inhibitor.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Porphyromonas属 ペプチダーゼ活性 ジペプチジルペプチダーゼ DPP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の臨床現場で治療対象となる小児のう蝕は、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、炎症は歯髄や根尖部周囲組織へ波及する。炎症が波及する際、強い臨床症状を伴う感染根管や根尖病巣部より分離されるのが、*Porphyromonas endodontalis*である。

*P. endodontalis*は、同属の *P. gingivalis* には強力なエンドペチダーゼである2種類のジンジパイン (Kgp, Rpg) が発現しない。そこで我々は、本研究開始前において、両菌種に共通して発現するジペプチジルペプチダーゼ (DPP) に着目し、同定し報告を行なった。また、両菌種間で DPP 群の活性差があることも併せて報告した。

近年、歯周疾患と全身疾患との関連が指摘されており、そのメカニズムは解明途中であるが、炎症状態にある歯周組織からの病原菌や、病原因子の侵入に起因すると考えられる。研究対象である *dpp* 遺伝子の一部は、ヒトにも存在することが既知であり、本研究成果はペプチド分解によって惹起される疾患の制御に繋がる可能性を持つと考え研究を開始した。

### 2. 研究の目的

(1)これまでプロテアーゼデータベース MEROPS において、基質特異性やアミノ酸配列相同性などに基つき、DPPのうち DPP4, 5は Clan SC S9 ファミリー、DPP7, DPP11は Clan PA S46 ファミリーに分類されてきた。我々は酸性アミノ酸のうちでもより Asp 特異的なものと Glu により強く反応するものの2タイプがあることを既に明らかにしており、DPPと同ファミリーに属し未知遺伝子であるものについて、その特徴を明らかとすることを目的に本研究を行った。

(2)口腔細菌叢データベース解析による DPP 群を保有する口腔内細菌の探索を行い、*dpp* 遺伝子分布を決定すること、また、歯周病原性菌群および口腔検体における DPP 活性の解析から、DPP と口腔内の細菌性疾患との関連を検討することを目的として行った。

### 3. 研究の方法

(1)Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) Databaseにて、*P. gingivalis*の各 DPP 遺伝子と 30%以上の相同性を持つオルソログ保有菌を選び、これらの細菌でさらに Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) に登録されているものを抽出した。

(2)細菌性 DPP4, DPP5, DPP7, DPP11, AOP を含む細菌ペプチダーゼタンパク質を大腸菌発現系にて発現精製した。さらに歯周病原性菌である、以下7菌種 *P. endodontalis* ATCC 35406, *P. gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Treponema denticola* ATCC 33520, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 の他、対照として *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 を供試菌とし、蛍光 (MCA) 標識合成ペプチド基質 (Nemoto TK *et al*, 2018) を用い各菌の DPP, およびアミノペプチダーゼ活性を測定し、酵素学的性状を解析した。

(3)口腔検体(唾液・歯肉縁下プラーク)を採取し、(2)に記載した供試菌の実験と同様の方法にて検体のペプチダーゼ活性を測定した。

### 4. 研究成果

(1)*Porphyromonas endodontalis* と同じ *Bacteroidetes* 門で、*Bacteroides* 属の以下4菌種 (*Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis*) を選択し、Clan PA S46 ファミリーに属する未知遺伝子を探索し、翻訳産物の基質特異性を検討した結果、従来の DPP11 とは性質の異なるサブタイプが存在することを見出し報告した (Biochimie, 2018)。また、S46 ペプチダーゼ系統樹にて、*Bacteroides* 属に特有な基質道の分子群が存在することを明らかにした (同)。我々の研究対象である *dpp* 遺伝子の一部は、ヒトにも存在することが既知であり、ペプチド分解によって惹起される疾患の制御に繋がる可能性を持つとともに、Clan PA S46 ファミリーの DPP は微生物にのみ存在するため、これを標的分子とした薬剤開発も将来的には期待出来る。

(2)KEGG および eHOMD 検索の結果、全口腔内細菌 (772 taxa) のうち *dpp* 遺伝子は *Porphyromonas* 属および *Prevotella* 属を含む嫌気性菌に限定的に存在することが明らかになった (表1)。これらの細菌は歯肉縁下プラークの構成菌である。そこで、歯肉縁下プラーク中の DPP 活性の測定により歯周病原菌の有無とそれらの活動度が評価できるものと推察された。ゲノム情報に一致し、これまでに DPP 活性を有することが既知であった *P. gingivalis* や *P. endodontalis* の他にも、*Tan. forsythia* や *Prev. intermedia* にも4種類の DPP 活性を認めた。

ヒト唾液サンプルでは顕著な DPP4 活性を、歯肉縁下プラークサンプルでは各 DPP 活性を認め、被験者毎に活性の差異が見られた。唾液にて DPP4 活性が高値であったのは顎下腺由来ヒト DPP4 の寄与が大きいものと考えられたが、一方、歯肉縁下プラークの DPP 活性は細菌叢由来の DPP

活性に近いと考えられ、口腔内細菌に起因する病態との関連の可能性が推測された。以上、口腔サンプルを用いた DPP 活性測定により、歯周病原性菌の存在の有無が予測されることから、DPP 活性測定は歯周病原性菌のバイオマーカーとして有用であることが示唆された(FEMS Microbiol Lett, 2018)。

我々の研究対象である *dpp* 遺伝子の一部は、ヒトにも存在することが既知であり、ペプチド分解によって惹起される疾患の制御に繋がる可能性を持つ。また、口腔内細菌の DPP 活性と歯周疾患との関連が明らかになれば、ヒトに影響する DPP4 を除いた DPP5, 7, 11 をターゲットとした DPP 阻害薬を歯周疾患治療薬として小児～成人まで幅広く応用したり、歯周病との関連が示唆されている糖尿病や関節リウマチなど全身疾患の治療や予防にも活用したり出来るのではないかと考え、今後も本研究に関連した実験系を予定している。

表 1 口腔内細菌における、*P. gingivalis dpp* 遺伝子群オルソログの分布

No.	Property	Species	KEGG code	DPP4	DPP5	DPP7	DPP11
1	Anaerobic	<i>Bacteroidales bacterium CF</i>	bacc	30.9 BRDCF_p911	52.8 BRDCF_p1796	44.1 BRDCF_p63	43.9 BRDCF_p63
2		<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	bcel	50.1 BcellWH2_04067	58.8 BcellWH2_00568	44.9 BcellWH2_02616	46.9 BcellWH2_01041
3		<i>Bacteroides dorei</i>	bdo	47.7 EL88_17320	55.4 EL88_10115	45.0 EL88_01065	47.4 EL88_04195
4		<i>Bacteroides fragilis</i>	bfb	50.9 VU15_04185	56.9 VU15_11640	45.8 VU15_00190	47 VU15_13540
5		<i>Bacteroides helcogenes</i>	bhl	49.4 Bache_1336	58 Bache_2506	44.6 Bache_0623	48.2 Bache_2936
6		<i>Bacteroides ovatus</i>	boa	49.5 Bovatus_04481	57.5 Bovatus_01140	44.5 Bovatus_03382	47.6 Bovatus_00117
7		<i>Bacteroides salanitronis</i>	bsa	49.2 Bacsa_1666	55 Bacsa_0556	43.2 Bacsa_3552	48.9 Bacsa_3553
8		<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	bth	50.1 Cabther_A1882	56.2 BT_0587	45.3 BT_3289	47.2 BT_0236
9		<i>Bacteroides vulgatus</i>	bvu	47.6 BVU_1991	54.9 BVU_3355	45.8 BVU_1292	47.4 BVU_2253
10		<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	bxy	49.7 BXY_33000	57.7 BXY_01510	44.9 BXY_25380	47 BXY_42300
11		<i>Porphyrobacter neustonensis</i>	pns	30.2 A9D12_13280	30.3 A9D12_04605	30.7 A9D12_08420	-
12		<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	pah	55.6 Poras_1656	61.4 Poras_0376	63.2 Poras_0497	54.3 Poras_0411
13		<i>Porphyromonas catoniae</i>	-	60.0 MNR0996852	-	59.3 MER1065355	54.0 MER1065271
14		<i>Porphyromonas endodontalis</i>	-	55.4 MER192286	61.5 MERO236725	65.2 MERO278904	57.9 AB610284 MERO290751
15		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	pgn	100 PGN_1469	100 PGN_0756	100 PGN_1479	100 PGN_0607
16		<i>Porphyromonas uenonis</i>	-	55 MERO192283	60.2 MERO233073	62.3 MERO275386	54.3 MERO217397
17		<i>Prevotella dentalis</i>	pdt	42 Prede_1788	47.9 Prede_0500	-	-
18		<i>Prevotella denticola</i>	pdn	43.4 HMPREF9137_11 31	47.8 HMPREF9137_19 04	35.6 HMPREF9137_06 62	-
19		<i>Prevotella dintalis</i>	pdt	42 Prede_1788	47.9 Prede_0500	-	-
20		<i>Prevotella enoea</i>	peo	42.3 Ccan_05140	48.5 AS203_05860	-	-
21		<i>Prevotella fusca</i>	pfus	43.3 ADJ77_02160	47.6 ADJ77_11435	40.5 ADJ77_05700	-
22		<i>Prevotella intermedia</i>	pit	43.1 PIN17_A1740	48.3 PIN17_A1793	42.5 PIN17_0473*	-
23		<i>Prevotella melaninogenica</i>	pmz	42.8 HMPREF0659_A5 571	48.3 HMPREF0659_A6 994	40.3 HMPREF0659_A5 092	-
24		<i>Prevotella ruminicola</i>	pru	40.7 PRU_0634	50.1 PRU_1443	40.7 PRU_2649	-
25		<i>Tannerella forsythia</i>	tfo	61.1 BFO_1659	43.6 BFO_3080	59.1 BFO_0377	-
26		<i>Tannerella sp. oral taxon HOT-286</i>	toh	57.1 BCB71_01420	43.3 BCB71_01255	61.1 BCB71_09635	-
27	Facultative anaerobic	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	ccm	42.3 Ccan_05140	40.5 Ccan_09440	36.3 Ccan_08540	41.7 Ccan_11580
29		<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	cgh	42.6 CGC50_03250	44 CGC50_00410	38.5 CGC50_08370	41.5 CGC50_05115
28		<i>Capnocytophaga haemolytica</i>	chg	42.5 AXF12_02670	42.7 AXF12_08230	37.0 AXF12_07190	40.8 AXF12_04065
30		<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	clk	42.9 CGC53_04935	41.9 CGC53_10585	37.7 CGC53_07790	41.4 CGC53_07790
31		<i>Capnocytophaga ochracea</i>	coc	43.6 Coch_1057	41.8 Coch_1823	37.5 Coch_1768	41.0 Coch_0404
32		<i>Capnocytophaga sp. oral taxon 3</i>	col	43.6 AM608_08390	41.9 AM608_01605	37.2 AM608_01320	41.0 AM608_05550
33	Aerobic	<i>Pedobacter cryoconitis</i>	pcm	30.5 AY601_0660	-	-	-
34		<i>Pedobacter sp. PACM 27299</i>	pep	30.5 AQ505_07725	-	39.2 AQ505_06390	33.4 AQ505_10325
35		<i>Pedobacter steynii</i>	psty	31.2 BFS30_18605	-	39 BFS30_16700	32.9 BFS30_26025
36		<i>Caulobacter crescentus</i>	ccs	30.2 CCNA_02237	31.7 CCNA_02065	-	-
37		<i>Caulobacter henricii</i>	chq	32.6 AQ619_12080	30.9 AQ619_11240	-	-
38		<i>Caulobacter segnis</i>	cse	32.2 Cseg_1267	31.6 Cseg_1441	-	-
39		<i>Caulobacter sp. K31</i>	cak	31.1 Caul_3418	31.4 Caul_3102	-	-
40		<i>Sphingomonas melonis</i>	smy	30 BJP26_07260	33.8 BJP26_09085	-	-
41		<i>Sphingomonas sp. MM-1</i>	sphm	30.9 G432_00900	33.5 G432_03400	-	-
42		<i>Sphingomonas taxi</i>	stax	32.7 MC45_05965	33.5 MC45_02335	-	-
43		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	sml	32.8 Smit4503	32.8 Smit1246	33.5 Smit0962	-

■ Bacteroidetes 門 ■ Proteobacteria 門

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohara-Nemoto Yuko, Shimoyama Yu, Nakasato Manami, Nishimata Haruka, Ishikawa Taichi, Sasaki Minoru, Kimura Shigenobu, Nemoto Takayuki K	4. 巻 365
2. 論文標題 Distribution of dipeptidyl peptidase (DPP) 4, DPP5, DPP7, and DPP11 in human oral microbiota-potent biomarkers indicating presence of periodontopathic bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fny221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto Takayuki K., Bezerra Gustavo Arruda, Ono Toshio, Nishimata Haruka, Fujiwara Taku, Ohara-Nemoto Yuko	4. 巻 147
2. 論文標題 Identification of a new subtype of dipeptidyl peptidase 11 and a third group of the S46-family members specifically present in the genus Bacteroides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 25 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2017.10.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Yoshio, Nishimata Haruka, Hidaka Kiyoshi, Hasuwa Tomoyuki, Moriuchi Hiroyuki, Fujiwara Taku, Hoshino Tomonori	4. 巻 5
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of a Clinical Isolate of Streptococcus mutans Strain HM	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00826 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00826-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西俣はるか, 藤原 卓
2. 発表標題 歯周病原性菌バイオマーカーとしてのジペプチジルペプチダーゼの有用性
3. 学会等名 日本小児歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福本志保, 今村圭吾, 有田幸太郎, 西俣はるか, 西口美由季, 釜崎陽子, 藤原卓
2. 発表標題 根尖性歯周炎後にアペキソゲネシス様治癒機転となった根末完成歯 2 例
3. 学会等名 第36回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関