

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592070

研究課題名（和文）細胞間接着を分解するグルタミン酸特異的プロテアーゼスーパーファミリーの解析

研究課題名（英文）Study on the Glu-specific protease superfamily mediating dissociation of cell-cell adhesion

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・准教授

研究者番号：10164667

研究成果の概要（和文）：

Glu 特異的プロテアーゼファミリー分子では自己消化によるプロ配列の段階的切断が起こり、この短縮化により活性化過程が効果的に起こることを示した。Glu 特異的 ETA の酵素活性の測定系を初めて開発し、表皮剥奪活性の発現にはプロテアーゼ活性が必須であることを明らかにした。さらに、ジペプチジルペプチダーゼ（DPP）11 と DPP7 の生化学的性質、基質特異性を明らかにし、これらの結果に基づく新たな分子系統分類法を報告した。

研究成果の概要（英文）：

Shortening of the propeptide of Glu-specific serine peptidase (GluV8) family commonly occurred in an auto-catalytic manner. Accompanied with propeptide-shortening, the pro-mature junction became more susceptible toward the maturation enzymes. We demonstrated the *in vitro* Glu-specific endopeptidase activity of exfoliative toxin (ET) A for the first time, which was measured with *Escherichia coli*-expressed recombinant ETAs and synthetic peptidyl substrates. The animal model revealed that the proteolytic activity was indispensable for exfoliation of the skin. In addition, we determined characteristics of DPP11 and DPP7, and proposed a novel phylogenetic system of these family molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学：機能系基礎歯科学

キーワード：セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

細菌性心内膜炎患者からは黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が 30-50% と最も

高頻度に分離されるが、多くの症例でその感染経路は明らかになっていない。口腔通過菌と考えられる *Staphylococcus* 属菌の口腔内

菌量は必ずしも多くないが、それらの病原性は比較的高いことから、*Staphylococcus* 属菌が歯-組織境界を越えて血流に移行した場合、全身感染症の起炎菌となる可能性を見出した。実際、80%以上の健康成人口腔からブドウ球菌属が分離され、それらの中で *S. aureus* は、表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) と共に唾液およびプラーク中に最も高頻度に存在する菌種であった。これらの細菌は *S. aureus* の病原因子であるグルタミン酸 (Glu) 特異的プロテアーゼ (GluV8) ファミリープロテアーゼを産生するが、それらの酵素活性と活性化過程は明らかになっていない。

S. aureus グルタミン酸特異的プロテアーゼ GluV8 は菌の増殖や生存に関与し、*S. epidermidis* 酵素と同様に菌体表層の接着分子や菌体外マトリックスを分解、修飾することが知られている。さらに、水疱性膿痂疹やブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群の原因因子とされる表皮剥奪毒素 (ETA) は、デスモソーム構成タンパク質であるデスモグレイン (Dsg)1 の Glu-Gly 間を切断する Glu 特異的プロテアーゼであることが報告された。しかし、より高いペプチド分解活性を示す GluV8 の *S. aureus* 起炎性表皮剥奪性疾患への関与は明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) ETA 組換え体、および関連する Glu 特異的プロテアーゼの大腸菌発現組換え体を発現・精製し、同プロテアーゼファミリーの活性化過程とプロセシングの普遍性についての知見を得る。

(2) ETA の *in vitro* 酵素活性測定系について検討し、その酵素活性と生物活性、表皮剥奪活性の関連性を明らかにする。

(3) Glu 特異的 DPP11 と疎水性アミノ酸特異的 DPP11 の生化学的性質および基質特異性を明らかにし、それらの分子系統分類法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌タンパク質発現系を用いて *S. aureus*, *S. epidermidis*, コアグララーゼ陰性ブドウ球菌, *Enterococcus faecalis* が産生する Glu 特異的プロテアーゼの野生型、および部分配列欠損変異型組換え体を発現精製する。1 アミノ酸置換変異体を作成し、プロセシング、および酵素活性に影響を及ぼすアミノ酸を特定し、また、プロ酵素からの活性化機構について検討する。酵素活性は MCA ペプチド基質を用いて測定する。自己消化によって発現効率が低い場合には、プロ配列にアミノ酸置換を導入し、自己消化抵抗性の組換え体として発現を行う。これらの分子種について、プロ配列の短縮過程と最終的な活性化過

程の関係についてサーモライシン感受性を指標に測定・評価する。

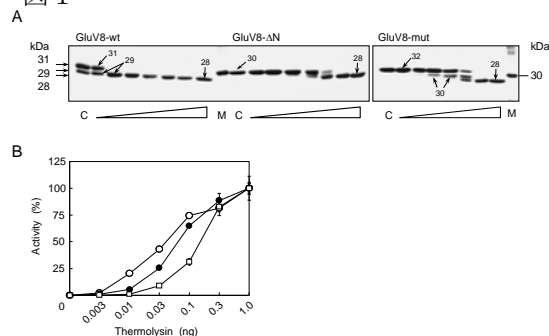
(2) 活性型および種々の変異 ETA 組換え体を作成、発現し、それらの酵素活性を MCA ペプチド基質を用いて測定する。セリンプロテアーゼ阻害剤の効果を測定する。また、酵素活性、基質特異性について GluV8 のそれらと比較検討する。精製 ETA 各分子種および GluV8 を新生仔マウス皮下に投与し (水疱性膿痂疹新生仔マウスモデル)、経時変化肉眼所見と組織学的検討により、ペプチダーゼ活性と表皮剥奪活性の関連性について検討する。

(3) Glu 特異的 DPP11 と疎水性アミノ酸特異的 DPP11 はアミノ酸配列の相同性から S46 ペプチダーゼファミリーに分類される。分子系統分類上の 5 つのクラスターに属する *Bacteroidetes* 門の代表的細菌の DPP 遺伝子を増幅し発現ベクターに組み込み、野生型および変異型組換え体を発現精製する。それらの酵素活性をジペプチド MCA 基質を用いて測定する。また、アミノ酸配列の相同検索を行い、全配列、部分配列等を用いた分子系統分類法の妥当性について知見を得る。

4. 研究成果

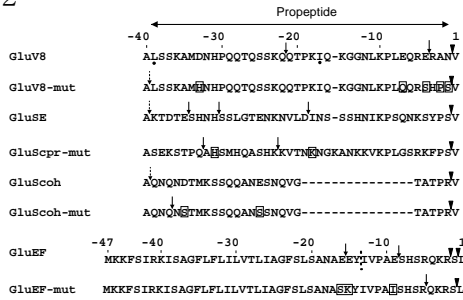
(1) プロ配列の長さを変えた種々の GluV8 分子を発現し、それらの活性化を検討したところ、プロ配列の長さが短くなるにつれてサーモライシンによるプロ-成熟酵素間の切断が容易になり、酵素活性が獲得されることが明らかになった (図 1)。

図 1



このプロ配列の短縮化にともなう酵素の活性化過程について、発現分子のアミノ末端配列の検討と成熟過程についての検討を行い、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌および *E. faecalis* 由来 GluV8 ファミリー分子種においても普遍的に起こることを明らかにした。また、3 残基程度の短縮プロ配列を有する分子種がペプチダーゼ活性を有することは初めて示し、N末端短縮が自己消化によって起こる可能性を示した (図 2)。

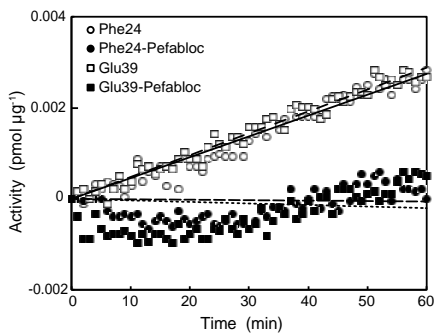
図 2



GluV8 ファミリープロテアーゼのプロ配列の比較. シグナルペプチダーゼによる切断を点線矢印, プロ配列内の切断箇所を矢印, プロ-成熟酵素切断位置を矢尻で示す.

(2)プロ ETA, 成熟 ETA, $\alpha 1$ ヘリックス欠損 ETA, および必須 Ser233Ala 変異体を大腸菌発現系で発現精製し, その酵素活性を Leu-Leu-Glu-MCA を用いて in vitro で初めて測定した. Phe24 および Glu39 を N 末端とする ETA では経時的な基質分解が観測され, 一方, この分解活性はセリンプロテアーゼ阻害剤である Pefabloc の共存により抑制された (図 3).

図 3



また, ETA は Leu-Leu-Glu-, Leu-Glu-, および Ala-Glu- を切断し, P1 アミノ酸が Gln, Asp, Ala であるペプチドは加水分解しないことが明らかになり, この傾向は GluV8 のそれと等しかった.

ETA および GluV8 分子種をマウス新生仔背部皮下に投与し, 表皮剥奪活性について動物モデルで検討した結果, GluV8 投与では発赤は認められたものの有棘層の解離は起こらず, プロテアーゼ活性を有する ETA 分子種ではこの解離が見られること, Glu39ETA は Phe24ETA よりも同活性が高いこと, 必須 Ser とともに $\alpha 1$ ヘリックスが表皮剥奪活性の発現に重要であることを明らかにした (図 4 a, b).

図 4 a

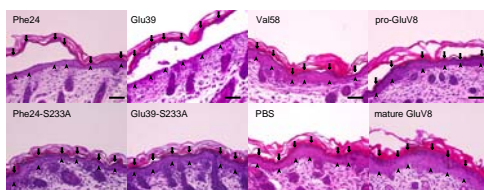
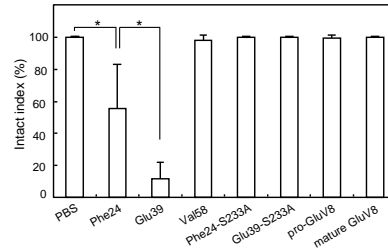


図 4b



有棘層の剥離を Intact index=length of adhesion area/length of total area appearing in a histochemical section x 100 (%) で示す. プロテアーゼ活性が有意に高い Glu38ETA は Phe24ETA よりも有棘層剥離活性が顕著である. また, プロテアーゼ活性を認めないその他の ETA 分子種, および GluV8 では有棘層剥離が観察されなかった.

(3) 5つのクラスターに分類される DPP7 ホモログ遺伝子がコードするタンパク質を発現し, それらの酵素活性をジペプチジル MCA 基質を用いて測定した. いずれの DPP も酵素活性を有し, それらの基質特異性の結果, 未知であったクラスター 1 と 5 が DPP7 であり, クラスター 2 が DPP11 であることを決定した.

表 1

Cluster	Enzyme	Species	Specificity
1	DPP7	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	X-Y- Y=hydrophobic
2	DPP11	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Flavobacterium psychrophilium</i>	X-Asp/Glu-
3	DPP7 (PGN1479)	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	X-Y- Y=hydrophobic
4	DPP11 (PGN0607)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i>	X-Asp/Glu-
5	DPP7	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides vulgatus</i>	X-Y- Y=hydrophobic

さらに, 1 アミノ酸残基置換変異体と基質特異性, アミノ酸配列相同検索, クラスター解析により, 必須 Ser, および酵素活性に関与するアミノ酸残基を含む C 末端側保存領域による分類が全配列による分類よりも妥当であることを示した. これらの検討から, DPP7 は 673 番目のアミノ酸が Gly であり, DPP11 は Arg あるいは Ser であることを明らかにした.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Tachi, M. T., Ohara-Nemoto, Y., Baba, T. T., Kobayakawa, T., Fujita, S., Ikeda, T., Ayuse, T., Oi, K., Nemoto, T. K.: *In vitro* measurement of protease activity

- of exfoliative toxin A using synthetic peptide substrates. *Acta Medica Nagasakiensia*, 査読有, (in press)
- ② Rouf, S.M.A., Ohara-Nemoto, Y., Hoshino, T., Fujiwara, T., Ono, T., Nemoto, T.K.: Discrimination based on Gly and Arg/Ser at Position 673 between Dipeptidyl-peptidase (DPP) 7 and DPP11, Widely Distributed DPPs in Pathogenic and Environmental Gram-Negative Bacteria. *Biochimie*, 査読有, 95, 824-831, 2013
doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.019
- ③ Rouf, S.M.A., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ono, T., Nemoto, T.K.: Propeptide processing and the proteolytic activity of proenzymes of the staphylococcal and enterococcal GluV8-family protease. *Ind J Biochem Biophys*, 査読有 48, 421-427, 2012
doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.019
- ④ Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S., Kon, A., Haraga, H., Nemoto, T.K.: Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* that ensures utilization of proteinaceous energy sources. *J Biol Chem*, 査読有, 286, 38115-38127, 2011
doi: 10.1074/jbc.M111.278572
- ⑤ Ono, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Okawara, H., Kobayakawa, T., Baba, T., Kimura, S., Nemoto, T.K.: Amino acid residues modulating the activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. *Biol Chem*, 査読有 391, 1221-1232, 2010
doi: 10.1515/BC.2010.116
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Rouf, S.M.A., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T.K.: Dipeptide production and assimilation in *Porphyromonas gingivalis* by four dipeptidyl peptidases. Nagasaki University Global COE symposium, The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium Dec 10, 2012, Nagasaki, Japan
- ② Rouf, S.M.A., Ohara-Nemoto, Y., Yanase, A., Ono, T., Nemoto, T.K.: Expression and Characterization of Dipeptidyl-Peptidases of *Porphyromonas gingivalis*. 1st International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species, Aug 27, 2012, Nagasaki, Japan
- ③ Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Hoshino, T., Fujiwara, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ono, T., Nemoto, T.K.: Classification and essential amino acid residues of the dipeptidyl peptidase 7/11 family in the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group. 112th General Meeting of ASM, June 18, 2012, San Francisco, USA
- ④ Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ono, T., Nemoto, T.K.: Auto-catalytic propeptide processing facilitates the final hetero-catalytic maturation of glutamyl endopeptidase GluV8. 111th General Meeting of American Society for Microbiology, May 24, 2011, New Orleans, USA
- ⑤ 達聖月, 小早川健, 根本孝幸, 馬場友巳, 根本優子: 表皮剥脱毒素 ETA の生物活性とプロテアーゼ活性の相関性. 第 85 回日本細菌学会総会, 3月29日, 2012, 長崎市
- ⑥ 根本孝幸, SMAラオフ, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信, 根本優子: *Porphyromonas* 属菌が産生する Asp/Glu 特異的新規ジペプチルペプチダーゼ (DPP) 11 の同定と基質特異性の検討. 第85回日本細菌学会総会, 3月27日, 2012, 長崎市
- ⑦ 根本優子, 下山佑, 木村重信, 根本孝幸: *Porphyromonas* 属菌が産生する Asp/Glu 特異的新規ジペプチルペプチダーゼ (DPP) 11. 第53回歯科基礎医学学術大会, 10月1日, 2011, 岐阜市
- ⑧ 根本孝幸, 木村重信, 下山佑, 木村重信, 根本優子: *Porphyromonas gingivalis* DPP11 の酵素活性と Asp/Glu 特異性を規定する Arg670. 第53回歯科基礎医学学術大会, 10月1日, 2011, 岐阜市
- ⑨ 達聖月, 根本優子, 馬場友巳, 小早川健, 藤田修一, 池田通, 大井久美子, 根本孝幸: 表皮剥脱毒素 ETAN 末端領域の生物活性に及ぼす作用. 第 53 回歯科基礎医学学術大会, 10月1日, 2011, 岐阜市
- [図書] (計 2 件)
- ① Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Nemoto, T.K.: NVS and staphylococci in the oral cavity, a cause of infective endocarditis. In *Endocarditis* InTech pp. 75-96, 2012
- ② Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T., Sasaki, M.: Pathogenic factors of *P. gingivalis*

and the host defence mechanisms. In
Pathogenesis and Treatment of
Periodontitis. InTech pp.3-18, 2012

[その他]

ホームページ等

www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_omb.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 優子 (OHARA-NEMOTO YUKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：10164667

(2) 研究分担者

根本 孝幸 (NEMOTO K. TAKAYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：90164665

木村 重信 (KIMURA SHIGENOBU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：10177917

(3) 連携研究者

馬場 友巳 (BABA T. TOMOMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60189727

小早川 健 (KOBAYAKAWA TAKESHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教務職員
研究者番号：10153587

小野 俊雄 (ONO TOSHIO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
研究員
研究者番号：80050607

下山 佑 (SHIMOYAMA YU)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：90453331