

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592809

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌における新規ペプチド分解機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of novel peptide metabolism system in periodontopathic bacterium

## 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖非発酵性歯周病原性細菌はそのエネルギーや炭素源のすべて外来のタンパク質より得る。タンパク質は最終的にエキソペプチダーゼによってジペプチドやトリペプチドとなり菌体内に取り込まれる。2001年までにこの担当酵素としてジペプチジルペプチダーゼ(DPP)4、DPP7、プロリルトリペプチジルペプチダーゼAが知られていたが、私たちは2011年に、全く新規の酸性アミノ酸特異的DPP(DPP11と命名)を発見した。本研究ではさらに基質特異性の異なるDPP5とアシルペプチジルオリゴペプチダーゼが発現していることを見だし、歯周病原性細菌が細胞外タンパク質をほぼ完全に分解して利用できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An asaccharolytic bacterium *Porphyromonas gingivalis* utilizes extracellular proteins as carbon sources. Since proteins are incorporated into bacterial cell mainly as di- and tri-peptides, exopeptidases including two dipeptidyl peptidases (DPPs) and one propyl tripeptidyl peptidase A (PtpA) are viewed as prerequisite for the metabolism. In 2011, we discovered novel DPP, designated DPP11, which indicated that this process is further mediated by yet-unknown exopeptidases. In this study, we identified that DPP5 and acylpeptidyl oligopeptidase (AOP) are expressed in *P. gingivalis*. DPP5 possessed hydrophobic P1 specificity similar to DPP7, but the two DPPs shared the substrates through the difference in the P2-position specificity. AOP is a novel and unique peptidase, because it is able to release N-terminally blocked oligopeptides unable to be managed by DPPs and PtpA. A line up of various exopeptidases should be beneficial for the survival the nutritionally-limited subgingival environment.

研究分野：口腔生化学

キーワード：Porphyromonas gingivalis 歯周病 エキソペプチダーゼ ジペプチジルペプチダーゼ アシルオリゴペプチジルペプチダーゼ アミノ酸代謝 タンパク質分解 歯周病原性細菌

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* のプロテアーゼについては強力な種特異的なシステインエンドペプチダーゼであるジンジパインの研究が先行しており、強力な歯周病因子であることが判明している。一方、細胞外ペプチドの最終分解過程を司るエキソペプチダーゼに関する研究は遅れていた。そんな状況でも 2001 年までにはジペプチジルペプチダーゼ(DPP)4、DPP7、プロリルペプチダーゼ A(PtpA)の 3 種類が存在することが明らかとなっていた。その結果 Pro が N 末より 2 番目と 3 番目にあるペプチドの場合は DPP4 と PtpA がそれぞれジペプチドとトリペプチドを、それ以外はすべて DPP7 がジペプチドを遊離すると漠然と捉えられてきた。しかしながら DPP7 はその P1 位置(N 末より 2 番目)に疎水性アミノ酸を好むのだが、その DPP7 が Pro 以外の全てのペプチドを実際に分解できるかどうかは議論されてこなかった。

2000 年、2001 年の Takahashi らの代謝研究や 2009 年のバイオインフォマティクス研究によって本菌の細胞内アミノ酸代謝に Ser、Asp、Glu が中心的な役割を果たしていると報告されているが、これらのアミノ酸やアミノ酸を含むペプチドを積極的に取り込む機構については不明だった。

私たちは 2011 年偶然に、従来いかなる生物種でも報告されていない酸性アミノ酸特異的な新規 DPP (DPP11 と命名)を *P. gingivalis* とその類縁菌である *Porphyromonas endodontalis* において発見し、この謎の一端を明らかにすることができた (Ohara-Nemoto, JBC, 2011)。

この結果から、私たちはさらに歯周病原性細菌にはまだ未知の DPP やエキソペプチダーゼが発現しており、より多く、あるいは全ての種類の配列のペプチドを分解吸収することによって、歯肉縁下の限られた栄養条件での生存を可能にしているのではないかと推定するに至った。

## 2. 研究の目的

従来の 4 種類のエキソペプチダーゼの基質特異性では分解できないペプチド結合を念頭に置いて、それらを分解できる未知のエキソペプチダーゼを歯周病原性細菌において同定する。これら結果を含めて *P. gingivalis* が細胞外ペプチドを取り込む仕組みを明らかにする。

## 3. 研究の方法

*P. gingivalis* と *P. endodontalis* のゲノム情報を元に PCR により、各種 DPP 様配列を有する遺伝子を増幅し、大腸菌発現ベクターに組み込んだ。発現分子を精製した後、その

基質特異性と酵素活性を各種蛍光基質を用いて決定した。リコンビナント分子に対するポリクローナル抗体を作成して歯周病原性細菌におけるタンパク質発現量や菌体内分布を免疫化学的方法により、mRNA については RT-PCR によって定量した。また菌の成長などによる影響を測定するために、発見したエキソペプチダーゼの単独あるいは多重遺伝子破壊株を作成して、その成長速度を比較した。

## 4. 研究成果

### 4.1. 細菌 DPP5 の発見

*P. gingivalis* では従来、DPP4、DPP7、DPP11 および PtpA の発現が知られていた。そこで 3DPP すべての遺伝子破壊株を作成した所、疎水性アミノ酸特異的な DPP7 に類似したジペプチド産生活性が残存した。ゲノム情報より DPP 様構造を有する 3 種類の遺伝子が大腸菌で発現したところ、PGN\_0756 がこの残存活性に類似した DPP 活性を示した。その後の検討の結果、この酵素は従来コウジ菌などの真核生物真菌類にのみ分布するとされてきた DPP5 オルソログであると判明した。この発見により DPP5 は真核生物だけではなく細菌や古細菌にも広く分布することが判明した。DPP5 と DPP7 は P1 位置の基質特異性が疎水性アミノ酸を好む点が一致していたが、実は P2 位置の特異性の違いがあり、その結果として両者で基質特異性を広げて対応できる基質を増やしていた。

### 4.2. アシルペプチジルオリゴペプチダーゼの発見

さらに DPP5 遺伝子も破壊した 4 重破壊株を作成したところ、Met-Leu-MCA 分解活性が新たに誘導されることが示された。しかし同時にトリペプチジル-MCA 基質も分解されることからこの活性は DPP によるものではないことが示唆された。可能性のある遺伝子が発現して検討した結果、新規の疎水性アミノ酸を好むオリゴペプチダーゼを見いだした。この分子はジペプチドだけでなくトリペプチドもよく遊離し、さらに興味深いことに、N 末がブロックされたペプチドを非常に効率よく分解した。本酵素は従来知られていなかった酵素であるためアシルペプチジルオリゴペプチダーゼ(AOP)と命名した。歯周病原性細菌が主に利用すると考えられる血清タンパク質の多くは N 末修飾を受けていることを考慮すると本酵素の存在は DPP が利用できる N 末脱修飾ペプチドを産生する上で重要だと考えられる。

### 4.3. その他の成果

さらに *P. gingivalis* と *P. endodontalis* とのエキソペプチダーゼ活性や分子の比較(特に DPP5)によって、共に同じオルソログ分子を有するもののその酵素活性が大きく異なり、その結果菌体レベルでも活性に大きな差が生じることがあることがわかった。

DPP5、DPP11 単独の遺伝子破壊株は成長が遅延するためにそれぞれが成長にある程度の寄与があることが判明した。

本研究で明らかとなった新規エキソペプチダーゼ

の細胞内分布を考慮に入れて、*P. gingivalis* のペプチド-アミノ酸代謝過程を末尾 (Figure 1) に示した。外部環境に存在するポリペプチドは、最初に外膜や細胞外に存在するジンジパインによって塩基性アミノ酸依存性にオリゴペプチドに変換される。一方、各種エキソペプチダーゼは、外膜と内膜間のいわゆるペリプラズム領域に可溶性分子として存在していたが、この分布はジンジパインが生産したオリゴペプチドを速やかに利用することができ、かつ、エキソペプチダーゼが産生したジペプチドやトリペプチドが、オリゴペプチドトランスポーターによってやはり速やかに内膜内に取り込まれるのに適した配置なのだろう。

#### 4. 結論

歯周病原性細菌は従来考えられていたよりも、多数の特異性の異なるエキソペプチダーゼがペリプラズムに発現しており、その結果として外来性のポリペプチドを余すところなく利用することが明らかとなった。

#### 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下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Ohara-Nemoto Y, Rouf SM, Naito M, Yanase A, Tetsuo F, Ono T, Kobayakawa T, Shimoyama Y, Kimura S, Nakayama K, Saiki K, Konishi K, Nemoto TK Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem. 289(9):5436-5448, 2014. 査読有り
2. Nishimata H, Ohara-Nemoto Y, Baba TT, Hoshino T, Fujiwara T, Shimoyama Y, Kimura S, Nemoto TK Identification of dipeptidyl-peptidase (DPP)5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, distinct from those in *Porphyromonas gingivalis*. PLoS One. 2014 Dec 10;9(12):e114221. doi: 10.1371/journal.pone.0114221. 2014.
3. 根本孝幸 新規ジペプチジルペプチダーゼと歯周病原性細菌のタンパク質分解・取り込み機構の解明 Institute for Fermentation, Osaka Research Communications (IFO Res. Commun.) 28, 141, 2014.
4. Rouf SMA, Ohara-Nemoto Y, Hoshino T, Fujiwara T, Ono T, Nemoto TK 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 95(4), 824-832, 2013. 査読有り
5. Rouf SMA, Ohara-Nemoto Y, Ono T, Shimoyama Y, Kimura S, and Nemoto TK Phenylalanine664 of dipeptidyl peptidase (DPP) 7 and phenylalanine671 of DPP11 mediate preference for P2-position hydrophobic residues of a substrate. FEBS Open Bio, 3, 177-181, 2013. 査読有り
6. Tachi MT, Ohara-Nemoto Y, Baba TT, Kobayakawa T, Fujita S, Ikeda T, Ayuse T, Oi K, and Nemoto TK Measurement of protease activity of exfoliative toxin A using synthetic peptidyl substrates and correlation between *in vivo* and *in vitro* activities Acta Med. Nagasaki 58, 41-48, 2013. 査読有り
7. Rouf SMA, Ohara-Nemoto Y, Ono T, Shimoyama Y, Kimura S, and Nemoto TK *In vitro* processing of glutamyl endopeptidase proenzymes from *Enterococcus faecalis* and importance of N-terminal residue in enzyme catalysis. Advances in Biochemistry 1(5): 73-80, 2013. 査読有り  
(<http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ab>) doi: 10.11648/j.ab.20130105.11
8. Ohara-Nemoto Y, Kimura S, and Nemoto TK NVS and Staphylococci in the oral cavity – a case of infective endodontitis InTech Endocarditis ISBN 978-953-307-901-1 Edited by: Francisco Ramón Breijo-Márquez 2012. 査読有り

9. Rouf SMA, Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Kimura S, Ono T and Nemoto TK: Propeptide processing and the proteolytic activity of proenzymes of the staphylococcal and enterococcal GluV8-family protease Indian J. Biochem. Biophys. 48, 421-427, 2012. 査読有り

〔学会発表〕(計 14 件)  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に下線)

1. 根本孝幸, 根本優子, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信: 歯周病原性細菌の新規オリゴペプチダーゼ: 基質特異性と分子集合性. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡市 9月26-27日{J Oral Biosci Suppl, 129, 2014 }
2. 下山佑, 石河太知, 根本優子, 根本孝幸, 佐々木実, 木村重信: SLPI による *Porphyromonas gingivalis* に対する感染抑制作用. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡市 9月26-27日{J Oral Biosci Suppl, 175, 2014 }
3. 根本孝幸, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信, 根本優子: 歯周病原性細菌の新規オリゴペプチダーゼの基質特異性と分子集合分離機構. 第 87 回日本生化学会大会 京都市 10月15-18日{第 87 回日本生化学会大会プログラム [4T10p-07](4P-117) }
4. Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, Djinovic-Carugo K: Towards the structural basis of peptide binding to dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis*. RAMC (Recent Advances in Macromolecular Crystallization) Sep 8-11, 2013, Bischoffsheim, France
5. Ohara-Nemoto Y, Abdur-Rouf S M, Shimoyama Y, Kimura S, Nemoto TK: Dipeptide production in *Porphyromonas gingivalis* mediated by dipeptidyl peptidases and gingipains. 113rd General meeting of ASM, May 18-21, 2013, Denver, Colorado, USA

6. Ohara-Nemoto Y, Rouf SMA, Hoshino T, Fujiwara T, Shimoyama Y, Kimura S, Ono T, Nemoto TK: Classification and essential amino acid residues of the dipeptidyl peptidase 7/11 family in the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group. 112th General Meeting of ASM, San Francisco, USA, June 16-19, 2012 {Abstract No. 1543}
7. Rouf SMA, Ohara-Nemoto Y, Yanase A, Ono T, Nemoto TK: Expression and characterization of dipeptidyl-peptidases of *Porphyromonas gingivalis*. 1st International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species, Nagasaki, Aug 27-28, Japan, 2012 {Abstract, p46}
8. Rouf SMA, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK: 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, Nagasaki, Japan, SS, Dec 10-12, 2012 {Abstract, p77}
9. Rouf SMA, 根本優子, 小野俊雄, 星野倫範, 藤原卓, 根本孝幸: DPP7 と新規 Asp/Glu 特異的 DPP11 を含む S46 ペプチダーゼファミリーの再分類 (Reclassification of the S46 peptidase family containing DPP7 and novel Asp/Glu-specific DPP11) 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 3月27-29日{日本細菌学雑誌 67(1) : p117, 2012 }
10. 根本孝幸, Rouf SMA, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信, 根本優子: *Porphyromonas* 属新規 Asp/Glu 特異的ジペプチジルペプチダーゼの同定 (Identification of a novel Asp/Glu-specific dipeptidyl peptidase 11 from the genus *Porphyromonas*) 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 3月27-29日{日本細菌学雑誌 67(1) : p116, 2012 }
11. 柳瀬絵見 (共同研究者: 哲翁ふみ, ファカルティアドバイザー: 根本孝幸, 根本優子): 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* のジペプチド産生レパートリーと担当ペプチダーゼの解明. 平成 24 年度(第 18 回)日本歯科医師会 / デンツプライ スチューデント・クリニシャン・リサーチ・プログラム日本代表選抜大会, 東京, 8月17日{抄録集: p20} 2012
12. 根本孝幸, Rouf SMA, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信, 根本優子: S46 ファミリーペプチダーゼ (DPP7/DPP11) の分類と DPP11 サブタイプの同定.

第 54 回歯科基礎医学学術大会，郡山，9 月 15-16 日 {J Oral Biosci 54 Suppl : p105, 2012}

13. 柳瀬絵見，Rouf SMA，小野俊雄，根本優子，根本孝幸：4 種の *Porphyromonas gingivalis* ジペプチジルペプチダーゼの基質特異性と産生ジペプチドレパートリー 第 54 回歯科基礎医学学術大会 郡山，9 月 15-16 日 {J Oral Biosci 54 Suppl:p.126, 2012}

14. 哲翁ふみ 柳瀬絵見，アブドゥーラオフ，根本孝幸，根本優子：歯周病原性細菌の生育における新規のペプチダーゼ DPP の重要性．第 22 回日本歯科医学会総会，大阪，11 月 9-11 日 {日本歯科医師会雑誌 65(5) : p164, 2012}

〔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

1) 長崎大学 HP トピックス  
長崎大学医歯薬学総合研究科のグループが酸性アミノ酸特異的な新規ジペプチジルペプチダーゼを発見  
[http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/news/2013\\_1.html](http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/news/2013_1.html)

2) ニュース  
長崎大学 歯周病原細菌で原核生物では初の DPP5 を発見  
[http://www.white-family.or.jp/html/topic/topic\\_683.htm](http://www.white-family.or.jp/html/topic/topic_683.htm)

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 (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

馬場 友巳 (BABA, Tomomi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教  
研究者番号：60189717

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：10153587

伊藤 潔 (ITO, Kiyoshi)  
摂南大学・薬学部・教授  
研究者番号：50201926

(3) 連携研究者

木村 重信 (KIMURA, Shigenobu)  
岩手医大・歯学部・教授  
研究者番号：10177917

Figure 1. Metabolic pathway of extracellular peptides and amino acids in *P. gingivalis*

