

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462893

研究課題名(和文) 歯周病菌ジペプチジルペプチダーゼ遺伝子群の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of dipeptidyl peptidase gene group

研究代表者

小早川 健 (KOBAYAKAWA, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術専門職員

研究者番号：10153587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* のジペプチジルペプチダーゼ(DPP)活性に関連した栄養要求性について検討した。*P. gingivalis* 野生株に比して、4種のDPP遺伝子破壊株では細菌増殖が顕著に遅延し、本菌の増殖にはDPP活性が重要であることが明らかになった。*P. gingivalis*でのアミノ酸、及びオリゴペプチドの取り込み・代謝が蛍光色素レサズリンを用いた代謝測定系により可能であることが判明した。その結果、本菌の栄養源としてはもっぱらジペプチドの形態でアミノ酸が菌体内に取り込まれることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of amino acid-uptake in a periodontopathic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. Bacterial growth was markedly reduced in the 4 dpp genes disrupted strain. This result indicated that the DPP activity plays a crucial role in the bacterial growth and energy metabolism. We revealed that the bacterial metabolic activity and amino acid uptake could be measured by the analysis with Resazurin. By using this procedure, we found that *P. gingivalis* incorporated dipeptides as the nutrient, and that this route is indispensable for the growth of this bacterium.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* レサズリン 蛍光 アミノ酸代謝 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

成人性歯周炎の原因菌と考えられている *Porphyromonas gingivalis* は、菌体外ペプチド分解酵素ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) により分解したジペプチドやトリペプチドを取り込み、菌体内で遊離のアミノ酸にしたのち、これを炭素源エネルギー源として増殖する。従って、菌体外の蛋白質分解系とオリゴペプチド取込み機構は本菌の生存戦略において重要である。

この菌には従来 Pro 特異的 DPP4 と疎水性アミノ酸特異的 DPP7 の 2 種類の DPP の存在が知られており、これらがすべてのジペプチド産生を司ると考えられてきた。しかしこれらの DPP の高い基質特異性からは *P. gingivalis* が産生できるジペプチドは限定的で、ペプチド利用の観点から見ると、きわめて非効率である。そこでそれ以外のアミノ酸配列を持つペプチドに関しては、プラークに共存する別種のペプチダーゼの分解物を取り込んでいる可能性などが漠然と想定されてきた。しかし私たちが 2011 年 Asp/Glu 特異的な新規 DPP (DPP11 と命名) を発見したことから状況は一変した。2012 年の時点で私たちは、さらに DPP11 以外の未同定の DPP 類が共同してジペプチド産生を行っているかと予想していた。

Naito ら (2008) のゲノムデータを元にした網羅的解析から、*P. gingivalis* には、これらの 3 種類の DPP に加え DPP3, DPP5, Ala-DPP 遺伝子の存在が推定された。本研究ではこれらの DPPs が実際に発現し、菌体外タンパク質分解に寄与しているのか、またそれによって全ての種類のジペプチドの産生ができるかどうかを明らかにする。これらの酵素学的特性から DPP 活性の阻害方法を確立することで成人性歯周病疾患の治療法の確立を目指した。

2. 研究の目的

P. gingivalis はそのエネルギー源と炭素源を全て細胞外のペプチドに依存している。そこで、ペプチドを、ジペプチドという細胞内取り込み型に変換する DPP 群を阻害してエネルギー源を絶つことで歯周病を抑制することを当初の目的とした。

(1) *P. gingivalis* の有する 6 種類の DPP 遺伝子産物すべて (Ala-DPP, DPP3, DPP4, DPP5, DPP7, 及び DPP11) の基質特異性の決定を含む詳細な酵素学的解析

(2) DPP 遺伝子破壊株による *P. gingivalis* 生育の DPP 依存性の評価

当初は DPP 遺伝子の発現及び活性の阻害を主たる目的としたが、栄養の取り込み機構も *P. gingivalis* の生育に重要であり、測定が容易な代謝活性測定法を確立し、各種アミノ酸、ジペプチド、オリゴペプチドの要求性についても検討した。

(3) *P. gingivalis* の代謝活性測定法の確立と DPP 関連栄養要求性の決定

3. 研究の方法

P. gingivalis のゲノム情報から PCR 法にて各種 DPP 配列を有する遺伝子を増幅し、大腸菌用発現ベクターに組換えた。大腸菌で発現した各分子を精製し、蛍光基質を用いて基質特異性や酵素活性を測定した。

P. gingivalis ATCC 33277, ジペプチド産生 4 酵素の欠損株 (Δ dpp4-5-7-11), 及び *Escherichia coli*, *Streptococcus anginosus*, *S. mutans* を培養し、前定常期の菌体を調製した。50 mM HEPES (pH7.4), 濁度 (0.25) の菌液に 1-10 mM アミノ酸単体や当量の Gly 含有ジペプチド、オリゴペプチドを添加し、蛍光色素レサズリンを用いて蛍光強度 (Em/Ex=585/550nm) の経時変化を測定することにより、各菌株の代謝活性評価を行った。

PCR 法により各 transporter 遺伝子内にアンピシリン遺伝子カセットを挿入した DNA 断片を調製し、これらを相同組換えにより *P. gingivalis* ゲノムに導入した破壊株 3 種, Ser/Thr transporter 遺伝子破壊株, oligopeptide transporter (OPT) 破壊株, proton-dependent oligopeptide transporter (POT) 破壊株を作成し、上記と同様に、成長速度及び代謝活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) 3 種類の既知の DPP (DPP4, DPP7, DPP11) とゲノム情報から DPP と推定される未同定の遺伝子 (Ala-DPP, DPP3, prolyl-oligopeptidase) 産物の基質特異性等の生化学的、酵素学的解析 及び

(2) *P. gingivalis* 生育における DPP 依存性の評価では、

3 種類の既知の DPP の組換え分子標品について種々の合成ジペプチド蛍光基質を用いて基質特異性を検討したところ、P1 位置は DPP4 が Pro, DPP7 が疎水性アミノ酸、DPP11 が Asp/Glu 特異性を示し、さらに P2 位置については DPP11 では疎水性残基が優位性を示した。DPP7 では P1 及び P2 位置の疎水性度の合計に依存して DPP 活性が上昇することを明らかにした。

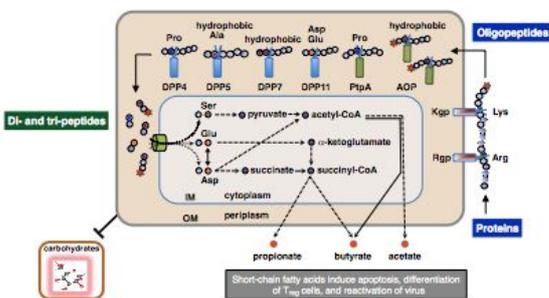
推定 Ala-DPP 及び DPP3 遺伝子を発現精製したところ Ala-DPP はいずれの既存の基質に対しても加水分解活性を示さなかった。DPP3 は Arg 特異的な DPP 活性を有し、これまで報告のあった酵母及び *Bacteroides thetaiotaomicron* オルソログと類似する活性であることを認めた。さらに、prolyl-oligopeptidase 遺伝子はこれまで真菌類のみで報告のあった DPP5 であることが明らかとなった。

P. gingivalis 33277 株と DPP 遺伝子 4 種破壊株 NDP212 および全ジンジパイン遺伝子破壊株 KDP136 をエンリッチ BHI 培地で培養し、その成長速度を測定すると野生株、NDP212 株、KDP136 株の順で増殖に差があ

り、本菌の増殖には DPP 活性が重要であることを認めた。

(3) *P. gingivalis* の代謝活性測定法の確立と DPP 関連栄養要求性の決定

蛍光色素による *P. gingivalis* でのオリゴペプチドの取り込み・代謝効率の評価法を開発するとともに、本法を用いて、菌体内に取り込まれるペプチド種を明らかにした。*S. anginosus*, *S. mutans* ではアミノ酸単体及び種々のジペプチド添加による代謝活性の上昇率に差はなく、*E. coli* では Gly-Glu, Gly-Gly 添加で蛍光強度は上昇した。一方、*P. gingivalis* ではジペプチド(Gly-Gly 等)添加で蛍光強度が顕著に上昇し、より長いオリゴペプチドでは低かった。この現象は、ジペプチドの構成アミノ酸の添加では再現されないことから、*P. gingivalis* がアミノ酸をもらってジペプチドの形態で菌体内に取り込むことが判明した。



P. gingivalis の菌体外ペプチド分解と取り込みの経路

また、今回作成した *P. gingivalis* の Ser/Thr transporter 遺伝子破壊株、OPT 遺伝子破壊株、POT 遺伝子破壊株を用いて成長速度が異なることを見出し、それぞれのトランスポーターが担う輸送分子をさらに検討中である。以上の結果から、*P. gingivalis* がこれらのトランスポーターを介して主にジペプチドの形でアミノ酸を取り込む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は下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Nemoto, T. K., Ohara-Nemoto, Y., Bezerra, G. A., 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, 5913-5925, 2016 (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M115.687566
2. Nemoto, T. K., Ohara-Nemoto, Y.

Porphyromonas gingivalis exopeptidases as crucial factors for its amino acid metabolism. Jap. Dent. Sci. Rev. 52, 22-29, 2016 (査読有) DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2015.08.002

3. Nishimata, H., Ohara-Nemoto, Y., Baba, T.T., Hoshino, T., Fujiwara, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nemoto, T. K. Identification of dipeptidyl-peptidase (DPP) 5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, distinct from those in *Porphyromonas gingivalis*. PLoS ONE 9, e114221, 2014 (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0114221
4. Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Naito, M., Yanase, A., Tetsuo, F., Ono, T., Kobayakawa, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nakayama, K., Saiki, K., Konishi, K., Nemoto, T. K. Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 289, 5436-5448, 2014 (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M113.527333

〔学会発表〕(計 14 件)

国際学会

1. Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Kimura, S., et al. Degradation of incretin by the prokaryotic dipeptidyl-peptidase 4 from *Porphyromonas gingivalis*. ASM 2016 General meeting, Jun 16, 2016, Boston (USA)
2. Nakasato, M., Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Kimura, S. et al. Characterization of dipeptidyl-peptidase 4 from *Tannerella forsythia*. ASM 2016 General meeting, Jun 16, 2016, Boston (USA)
3. Bezerra, G. A., Ohara-Nemoto, Y., Fedosyuk, S., Cornaciu, I., Hoffmann, G., Marquez, J. A., Nemoto, T. K., Djinovic-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 Jun 12-15, 2016, Oulu (Finland)
4. Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K. 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)
5. Nemoto, T. K., 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)
6. Bezerra, G. A., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Djinovic-Carugo, K. Towards the structural basis of peptide binding to dipeptidyl peptidases of *Porphyromonas* sp. 2015 Annual Meeting - American Crystallographic Association, 25-29 July, 2015, Philadelphia (USA)
 7. Ohara-Nemoto, Y., Rouf, Shakh M. A., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nemoto, T. K. Dipeptide production in *Porphyromonas gingivalis* mediated by dipeptidyl peptidases and gingipains. 113rd General meeting of ASM, May18-21, 2013, Denver (USA)

国内学会

8. 下山 佑, 中里 茉那美, 根本 優子, 根本 孝幸, 木村 重信他. 歯周病原性'red complex species'のビルレンス因子としてのプロテアーゼ. 第 69 回日本細菌学会東北支部総会, 2015 年 8 月 22 日, 郡山ビッグアイ (福島県・郡山市)
9. 根本 孝幸, 根本 優子. アシルオリゴペプチジルペプチダーゼ活性を有する歯周病原性細菌の新規ペプチダーゼ. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 13 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
10. 小早川 健, 根本 優子, 馬場 友巳, 根本 孝幸. 非 RI 蛍光試薬による *Porphyromonas gingivalis* のアミノ酸とジペプチドの取り込みの評価. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 13 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
11. 中里 茉那美, 下山 佑, 根本 優子, 根本 孝幸, 木村 重信他. *Tannerella forsythia* のジペプチジルペプチダーゼ 4 の性状解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 12 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)
12. 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, 2014 年 9 月 26 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
13. 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解離機構. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
14. 根本 孝幸, ラオフ シャーク ムハマド アブデュー, 根本 優子, 下山 佑, 木村 重

信. Identification and characterization of dipeptidyl-peptidase V as a member for dipeptide production in *Porphyromonas gingivalis*. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔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) 研究代表者

小早川 健 (KOBAYAKAWA, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
技術専門職員
研究者番号: 10153587

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

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