

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 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：25462894

研究課題名(和文)新規ジペプチジルペプチダーゼ酵素群の発現と細胞内分布の解析

研究課題名(英文) Study of a novel enzymatic group of dipeptidyl peptidases and their cellular localization

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* の病原性に関与するジペプチド分解系酵素群について検討した。その結果、これまで真菌でのみ報告されていた DPP5 が本菌で発現していることを見出し、また、新規の酵素であるアシルペプチジルオリゴペプチダーゼ (AOP) を発見した。これら酵素のオルソログは多くの細菌、古細菌、及び真核生物に分布していること、DPP/AOP はペリプラズム画分に局在すること、また、アミノ酸をエネルギー源とする本菌においてジペプチド産生酵素群が増殖能に深く関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined enzymatic activity and cellular localization of a group of dipeptidyl peptidases (DPP) in a periodontopathic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. This study revealed that DPP5, which had been discovered in fungi, was expressed in the bacterium, and that a novel peptidase, acylpeptidyl oligopeptidase (AOP), was identified. Ortholog search demonstrated wide spreading of the two exopeptidases from bacteria, archaea to eukaryote. DPP5 cleaves X-Ala dipeptides from the N-terminus of oligopeptides and AOP liberates di- and tri-peptides from N-terminally blocked ones. Both peptidases were expressed in the periplasmic space of the bacterium. Consequently, we proposed that dipeptide-producing exopeptidases including DPP4, DPP5, DPP7, DPP11 and AOP are crucial for the growth and pathogenicity of *P. gingivalis*.

研究分野：口腔生化学

キーワード： *Porphyromonas gingivalis* ジペプチジルペプチダーゼ アミノ酸代謝 ペリプラズム 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

*P. gingivalis* は成人性歯周炎の主要な起因菌で、糖尿病や循環器系疾患、呼吸器系疾患などの全身性疾患とも関連があることから、その代謝・増殖機構の理解は関連疾病の治療、及び予防上重要な課題である。

*P. gingivalis* は糖非発酵性で、窒素源・エネルギー源としてアミノ酸を利用するが、アミノ酸取込や代謝機構の詳細は明らかではなかった。我々はこれまでに、オリゴペプチドの N 末端からジペプチドを遊離する新規のジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 11 を発見し、細菌増殖における重要性を明らかにした。また DPP11 を含めた 3 種類の DPP 遺伝子 (DPP4, DPP7, DPP11) 破壊株等の検討から、*P. gingivalis* ではこれら以外のエキソペプチダーゼが発現し、本菌の増殖と病原性に関与する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、DPP11、及びその他の既知及び推定 DPP 酵素群の組換え体を発現し、生化学的性状、酵素学的特性、細胞内分布等について検討し、*P. gingivalis* におけるジペプチド産生系の全容を明らかにする事を目的とした。また、動物モデルによる DPP 酵素群の病原性について検討した。

## 3. 研究の方法

我々のこれまでの研究実績に基づき、*P. gingivalis* DPP4, DPP7, DPP11 に加えて各種の推定 DPP 組換え体 (DPP3, Ala-DPP, PGN\_0756) を発現し精製した。組換え体の活性はジペプチド-MCA 蛍光基質を用いて検討し、ペプチダーゼ活性を認めたものについては、その基質特異性、生化学的性状、及び酵素学的特性を決定した。野生株、単一 DPP 欠損株、及び多重 DPP 欠損株を作成し、種々の培養条件下での菌体のペプチド分解能、細菌増殖能等を測定した。細胞分画法によって菌体画分を分離し、菌体外画分と共に各画分におけるペプチダーゼ活性測定とタンパク質発現量の定量を行った。

マウスを用いたグルコース負荷試験を行い、血糖値及び血糖調節因子の量的変動に及ぼす *P. gingivalis* DPP の作用を検討した。

## 4. 研究成果

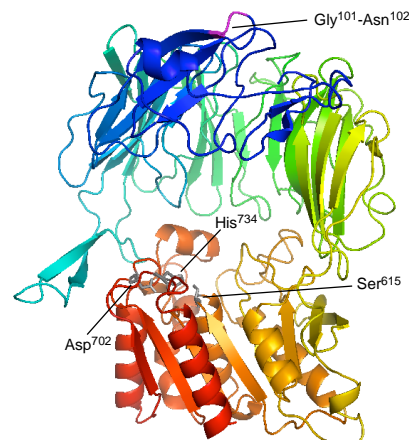
推定 DPP 遺伝子組換えタンパク質の酵素活

性の検討から、Ala-DPP は既存の基質に対する酵素活性がないこと、また、DPP3 は菌体外ペプチド分解には関与しないことが示された。PGN\_0756 は Lys-Ala-MCA 分解活性を示したが、さらに、生化学的、酵素学的特性、及びアミノ酸配列の検討から、これまで真菌でのみ見出されていた DPP5 の細菌オルソログであることが明らかになった (Ohara-Nemoto, Y., *et al.*, 2014, J. Biol. Chem.). *P. gingivalis* DPP5 は細菌で初めて発見された酵素分子である。*P. gingivalis* DPP5 の発見により同オルソログが細菌、古細菌から真核生物に至るまで広く分布する酵素であることが明らかになった。DPP5 は Ala, あるいは疎水性アミノ酸に対する P1 嗜好性を有した。また、既知の DPP と同様に、DPP5 は N 末端修飾ペプチドを基質としなかった。

種々の *P. gingivalis* 臨床分離株、及び *Porphyromonas endodontalis* の DPP 活性を測定し、それぞれの特性を決定した。その結果、*P. endodontalis* では *P. gingivalis* に比して DPP11 活性が極めて高いこと、また、最も活性の高い Lys-Ala-MCA 分解が DPP7 ではなく DPP5 によるものであること等を見出し報告した (Nishimata, H., *et al.*, 2014, PLoS ONE)。

DPP5 を含めた各種 DPP 欠損株の検討から、主に N-末端修飾ジペプチド及びトリペプチドを遊離する新規のエキソペプチダーゼを発見し、アシルペプチジルオリゴペプチダーゼ (acylpeptidyl oligopeptidase, AOP) と命名した。AOP の生化学的性状と酵素学的特性を決定し報告した (図 1 表 1) (Nemoto, T.K., *et al.*, 2016, J. Biol. Chem.)。

図 1. AOP の 3 次構造モデル



AOP は全ての生物種において初めて発見された酵素であり、オルソログ検索から、他の DPP と同様に細菌、古細菌、真核生物に広く

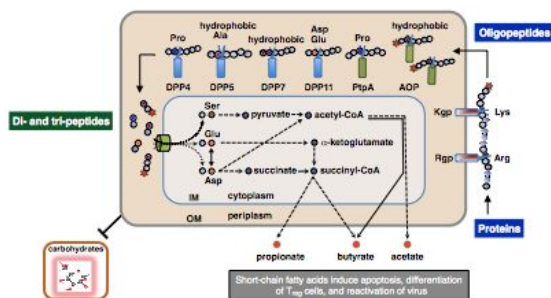
分布することが明らかになった。また、野生株、及び遺伝子破壊株による種々の検討から、全ての DPP 及び AOP はペリプラズム画分に存在し、少なくとも *P. gingivalis* ATCC 33277 株ではこれらのエキソペプチダーゼは菌体外に遊離した形では存在しないことが示された。本研究によって得られた酵素学的パラメーター(表 1)は、DPP 及び AOP が本菌の定着環境において活性を有していることを示唆した。

表 1. 酵素学的パラメーター

Enzyme	$k_{cat}$ (sec <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (μM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )
DPP4	6917 ± 1253	100.9 ± 20.1	66.8 ± 2.0
DPP5	7577 ± 637	687.6 ± 11.0	11.0
DPP7	394 ± 79	39.6 ± 16.0	10.6 ± 2.5
DPP11	10707 ± 140	19.5 ± 0.4	547.4 ± 6.3
AOP	592 ± 40	4.9 ± 1.0	123.3 ± 17.3

口腔という *P. gingivalis* の定着環境を考慮すると、栄養源となるタンパク質の多くは N 末端修飾されているものと考えられる。従って *P. gingivalis* ジペプチド産生系では、まず AOP によって N 末端修飾アミノ酸が除去され、次いで各種アミノ酸残基を基質とする DPP によって効率的にジペプチド産生が起こるものと推定された(図 2)(Nemoto, T.K. and Ohara-Nemoto, Y., 2016, Jap. Dent. Sci. Rev.).

図 2 *P. gingivalis* の菌体外ペプチド分解系



マウスモデルによる検討からは、*P. gingivalis* DPP が生体内においても酵素活性を示し、血糖値調節に関与する宿主因子の分解を通じて血糖値調節系を修飾することが示唆された。

### 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 10 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
5. Rouf, S.M.A., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nemoto, T.K. Phenylalanine 664 of dipeptidyl-peptidase (DPP) 7 and phenylalanine 671 of DPP11 mediate preference for P2-position hydrophobic residues of a substrate. FEBS Open Bio. 3, 177-183, 2013 (査読有) DOI: 10.1016/j.fob.2013.03.004.
6. 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 95, 824-832, 2013 (査読有) DOI: 10.1016/j.biochi.2012.11.019

[学会発表](計 23 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

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

##### (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

木村 重信 (KIMURA, Shigenobu)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号: 10177917