

## 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 24 年 4 月 14 日現在

機関番号： 17301  
研究種目： 基盤研究 (C)  
研究期間： 2009~2011  
課題番号： 21592367  
研究課題名 (和文) コラーゲン分解性プロテアーゼによる歯肉増殖症, 瘢痕治療法の確立  
研究課題名 (英文) Therapeutic Establishment for Gingival Hyperplasia and Scar Formation by Use of Collagen-Digestible Proteases  
研究代表者  
根本 孝幸 (NEMOTO 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

## 研究成果の概要 (和文)

- (1) *Porphyromonas* 属菌は絶対嫌気・糖非発酵性グラム陰性桿菌で、ジペプチドあるいはトリペプチドを取り込み、エネルギー源として利用する。本研究で我々は全く新規の基質特異性を有するジペプチジルペプチダーゼ (DPP) をクローニングし解析した。3種の DPP 7 の遺伝子配列をもとに、縮重 PCR 法とジーンウォーキングにより *Porphyromonas endodontalis* (ATCC35406) の DPP 遺伝子 (DPP11 と命名) を単離した。BLAST 検索により、これまで DPP7 に分類されていた *P. gingivalis* ホモログ (PgDPP11) を見いだした。検討の結果、両菌の DPP11 は P1 位置アミノ酸 (N 末端より 2 番目) が Asp または Glu であるジペプチジル-MCA を加水分解する新規 DPP であった。DPP11 は、Pro 特異的 DPP IV や疎水性アミノ酸選択的 DPP7 を補完して、*P. gingivalis* において効率的なジペプチドの取り込みに寄与していると考えられた。さらに DPP11 の酵素活性の詳細を解析し、基質特異性に関わるアミノ酸残基 Arg<sup>670</sup> を特定した。
- (2) Exfoliative tixin (ET) A は *Staphylococcus aureus* 感染によって発症するブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS, 一般名とびひ) の病原因子とされ、細胞間接着装置であるデスマソームタンパク質デスマグレイン 1 (Dsg1) の Glu381-Gly382 間を切断するプロテアーゼであることが示されている。しかし、合成基質を含めて Dsg1 以外への分解活性は認められておらず、解析が進んでいない。我々は ETA wt, N 末端欠失分子 ( $\Delta 38$ ,  $\Delta 57$ ) 及び Sse233Ala ETA を大腸菌で発現し、蛍光基質である LLE-MCA を用いてプロテアーゼ活性を測定するとともに、ETA を 1 日齢マウスの背部皮下に投与し、生物活性を評価した。ETA-wt,  $\Delta 38$ -ETA には LLE-MCA 分解活性が認められたが、第 1 $\alpha$ ヘリックス ( $\alpha 1$ ) 欠失  $\Delta 57$ -ETA 及び S233A 変異分子ではプロテアーゼ活性が消失した。これらを皮下投与した結果、プロテアーゼ活性を有する ETA でのみ全身の表皮剥離が見られ、組織観察では有棘層からの顆粒層の分離を認めた。その結果 ETA の生物活性にはプロテアーゼ活性が必須であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis*, asaccharolytic black-pigmented anaerobes, are predominant pathogens of human chronic and periapical periodontitis, respectively. They incorporate di- and tri-peptides from the environment as carbon and energy sources. In the present study, we cloned a novel dipeptidyl peptidase (DPP) gene of *P. endodontalis* ATCC 35406, designated as DPP11. A homology search revealed the presence of a *P. gingivalis* orthologue, *PGN0607*, which has been categorized as an isoform of authentic DPP7. DPP11 specifically removed dipeptides from oligopeptides with the penultimate N-terminal Asp and Glu. Arg<sub>670</sub> is a unique amino acid completely conserved in all DPP11 members, whilst this residue is converted to Gly in all authentic DPP7 members. Substitution analysis suggested that Arg<sub>670</sub> interacts with an acidic residue of the substrate. Considered to preferentially utilize acidic amino acids, DPP11 ensures efficient degradation of oligopeptide substrates in these gram-negative anaerobic rods.

In order to investigate the mechanism of Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) caused by exfoliative toxin A (ETA), we expressed and purified ETA and its N-terminally truncated ( $\Delta 38$  and  $\Delta 57$ ) and inactive (Ser233Ala) derivatives in *E. coli*. Recombinant ETA (wt) showed the peptidase activity for LLE-MCA. This is the first report that ETA showed the peptidase activity other than Dsg1. ETA and its derivatives exerted toxin activity to newborn mice, if ETA derivatives (wt and  $\Delta 38$ ) possessed the peptidase activity, while ETAs with no peptidase activity ( $\Delta 57$  and Ser233Ala) did not cause the disease. This finding indicated that the peptidase activity of ETA was indispensable for the toxin activity.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・機能系基礎学

キーワード：ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群，とびひ，歯周病，*Staphylococcus aureus*，*Porphyromonas gingivalis*

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) *Staphylococcus aureus* 感染によって発症するブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群は，表皮内棘融解・水疱形成により，全身の皮膚が脱落する疾患で，表皮剥脱毒素 ETA はその病原因子として発見された。その作用機序は永らく不明であったが，最近，ETA がセリンプロテアーゼ様 3 次構造をとることが示され，さらに，皮膚組織の細胞間接着装置であるデスモソーム構成タンパク質デスモグレイン 1 の Glu<sub>381</sub>-Gly<sub>382</sub> を特異的に切断することが示された。しかし合成基質も含めてデスモグレイン以外の基質は見つかっていない。

(2) 歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* は糖非発酵性生物であるためにその成長にタンパク質の分解により得られたジペプチドやトリペプチドをもっぱらの炭素源，エネルギー源としている。しかしそれまで知られていた本菌の DPP は Pro 特異的な DPPIV と主に疎水性アミノ酸を認識する DPP7 だけだった。そのため Pro-X 結合は DPPIV が，それ以外の結合は DPP7 が切断することで細胞内取り込み可能なジペプチドにまで分解するのだろうと漠然と思われてきた。しかしこれは上記の DPP7 の基質特異性から見てもかなり無理のある考えであった。まだ見つかっていない新規 DPP が存在すると予想した。

## 2. 研究の目的

- (1) リコンビナント ETA を発現してこの基質を見いだす。特に蛍光ペプチド基質を見出すことによって、ETA の酵素活性と *in vivo*での表皮剥離毒素活性との相関を明らかにする。さらに ETA の活性に必須の領域を解明する。
- (2) *P. gingivalis* に存在する可能性のある新規のペプチダーゼを見いだす。

## 3. 研究の方法

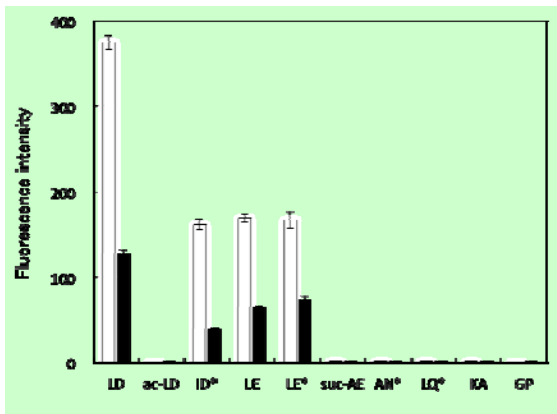
- (1) ETA とその一部領域欠失分子を大腸菌で発現し、プロテアーゼ活性と表皮剥離毒素活性を比較した。
- (2) これまでにその存在が知られている DPP7 等の配列を元に退縮プライマーを用いて PCR を行い、近縁種である *P. endodontalis* 等から遺伝子をクローニングした。この遺伝子を大腸菌発現系で発現した後、その基質特異性を決定する。類似の配列を *P. gingivalis* より見出し、同様に発現する。

## 4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌の産生す ETA 全長分子と その一部領域欠失分子を大腸菌で発現し、プロテアーゼ活性と表皮剥離毒素活性を比較した。その結果、蛍光基質 (LLE-MCA) で初めて ETA のプロテアーゼ活性が認められ、その表皮剥離毒素活性発現にはプロテアーゼ活性が必須であることが明らかとなった。

(2) *P. endodontalis* より DPP をクローニングした。当初、DPP7 である可能性も考慮して DPP7 の特異的な基質である KA-MCA 分解活性を検討したが、まったく分解活性を示さなかった。遺伝子配列の比較により、この分子は *P. gingivalis* の DPP7 とは相同性を示すものの、DPP7 アイソフォームとされている遺伝子により類似していることがわかった。そこでこれらを DPP11 と命名し、その活性を検索したところ、最終的に Asp および Glu を 2 番目に有するペプチドからジペプチドを遊離させる新規 DPP であることが判明した (図 1)。DPP11 は *P. gingivalis* にも存在しており同様の基質特異性を示した。DPP11 は歯周病原性細菌類だけでなく、多くの細菌類に存在していながら、これまで全く知られていない酵素であることが判明した。歯周病原菌をはじめ多くの細菌類は、基質特異性の異なる複数種の DPP を持つことで分解できるペプチドを増やし、効率的に分解していることが明らかとなった。

図 1. DPP11 の基質特異性



*P. endodontalis* DPP11 (白), *P. gingivalis* DPP11 (黒) \*はプロテアーゼの前処理によって作成したジペプチド基質を示す。

## 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. Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Kimura Y, Kon A, Haraga H, Ono T, and Nemoto TK: Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* that ensures utilization of proteinaceous energy sources. J. Biol. Chem. 286, 38115-38127 (2011) 査読有
2. Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Rokutanda S, Yonezawa H, Kawakita A, and Nemoto TK: Overexpression of CRKII increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma. Cancer Lett. 303, 84-91 (2011) 査読有
3. Yamada S, Yanamoto S, Yoshida H, Yoshitomi I, Kawasaki G, Mizuno A and Nemoto TK: RNAi-mediated down-regulation of  $\alpha$ -actinin-4 decreases invasion potential in oral

- squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 39(1), 61-67 (2010) 査読有
4. Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A and Nemoto TK: Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 16(4), 523-531 (2010) 査読有
  5. Ono T, Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Okawara H, Kobayakawa T, Baba TT, Kimura S, and Nemoto TK: Amino acid residues modulating the activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. *Biol. Chem.* 391, 1221-1232 (2010) 査読有
  6. Kishi M, Abe A, Kishi K, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Yonemitsu M: The relationship of the salivary quantitative levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to the caries status and the colonization in plaque of mutans streptococci in their 2.5-year-old children. *Comm Dent Oral Epidemiol* 37(3): 241-249 (2009) 査読有
  7. Ichinohe N, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, Kimura S, Ichinohe S: Influences of fosfomycin on Shiga toxin gene expression from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 58(7): 971-973 (2009) 査読有
  8. Kobayakawa T, Yamada S, Mizuno A, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK: Single nucleotide polymorphism that accompanies a missense mutation (Gln488His) impedes the dimerization of Hsp90. *Protein J* 28(1): 24-28 (2009) 査読有
  9. Nemoto TK, Ono T, Shimoyama Y, Kimura S, Ohara-Nemoto Y: Determination of three amino acids that caused the alteration of proteolytic activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. *Biol Chem* 390(3): 277-285 (2009) 査読有
  10. 永海多恵, 根本優子, 広田 剛, 石崎美智子, 多田讓治: 幼若マウスにおける実験的水疱性膿痂疹作成と表皮剥奪毒素による角化細胞障害の顕微鏡的観察. *化学療法の領域* 25(8): 109-116 (2009) 査読有
- [学会発表] (計 21 件)
1. 根本孝幸, シャーク ラオフ, 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. 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 3月27日 2012
  2. シャーク ラオフ, 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. 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 3月27日 2012
  3. 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関係. 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 3月29日 2012
  4. 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ジルペ

- チダーゼ(DPP)11. 第 53 回歯科基礎医学学術大会, 岐阜, 10 月 1 日 2011
5. 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 ETA N 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, 岐阜, 10 月 2 日 2011
  6. 馬場友巳, 宮崎敏博, 達聖月, 根本優子, 根本孝幸: 骨芽細胞に発現するアクアポリン. 第 53 回歯科基礎医学学術大会, 岐阜, 10 月 2 日 2011
  7. 根本孝幸, 小野俊雄, 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 Arg<sup>670</sup>. 第 53 回歯科基礎医学学術大会, 岐阜, 10 月 1 日 2011
  8. Nemoto TK, Ono T, Rouf SMA, Shimoyama Y, Kimura S, Tetsuo F, and Ohara-Nemoto Y: Biochemical characterization of DPP11: Importance of arginine<sup>670</sup> for the enzymatic activity specific for the P1-position acidic residue. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 9 月 24 日 2011
  9. Tetsuo F, Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Kimura S, and Nemoto TK: A novel Asp and Glu specific dipeptidyl peptidase from *Porphyromonas endodontalis*. 38th Asia Pacific Dental Students Association Congress, Scientific Research Competition, Babcock, Thailand, 8 月 17 日 2011
  10. Ohara-Nemoto Y, Rouf SMA, Shimoyama Y, Kimura S, Ono T, and Nemoto TK: Autocatalytic propeptide processing facilitates the final hetero-catalytic maturation of glutamyl endopeptidase GluV8. 111th General Meeting of American Society for Microbiology, New Orleans, Louisiana, USA, 5 月 24 日 2011
  11. Shimoyama Y, Sasaki M, Ohara-Nemoto Y, and Nemoto TK, Ishikawa T, Kimura S: Rapid identification of *Abiotrophia/Granulicatella* species using by 16S rRNA based PCR and RFLP. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, Sendai, Japan, 3 月 2011
  12. Ohara-Nemoto Y, Rouf SMA, Shimoyama Y, Kimura S, Nemoto TK: Structural chemistry of *Staphylococcal aureus* glutamyl endopeptidases. 88th General Session of International Association for Dental Research, Barcelona, Spain, 2010
  13. Ishikawa T, Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Sasaki M, Kimura S: SLPI production from gingival epithelial cells against *Porphyromonas gingivalis* infection. 88th General Session of International Association for Dental Research, Barcelona, Spain, 2010
  14. Kishi M, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Aizawa F, Kishi K, Takahashi M, Yonemitsu M: Prediction of colonization of periodontopathogens in plaque by VSC measurement. 88th General Session of International Association for Dental Research, Barcelona, Spain, 2010
  15. Ohara-Nemoto Y, Ono T, Shimoyama Y,

- Kimura S, Nemoto TK: Three amino acid residues define the proteolytic activities of Staphylococcal Glu-specific proteases. 109th General Meeting of American Society for Microbiology, Philadelphia, USA, 5月 2009
16. Ishikawa T, Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Sasaki M, Kimura S: The production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from gingival epithelial cells in response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides. 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, Sendai, Japan, 2009
17. Haraga H, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, Shimoyama Y, Sasaki M, Kimura S: A novel aspartate-specific dipeptidylpeptidase produced from *Porphyromonas endodontalis*. 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, Sendai, Japan, 2009
18. Miyazaki T, Moriishi T, Izumi S, Baba TT, and Komori T: Ultrastructural analysis of osteoblasts, osteocytes and odontoblasts in Runx2 transgenic mice. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology (6th ISEM09), Kobe, Japan, 2009
19. 根本孝幸, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信, 大河原久実, 根本優子: 新規 V8 プロテアーゼファミリー遺伝子のクローニングと 8 プロテアーゼ活性に重要な N 末バリオンと 185-195 領域の同定. 第 52 回歯科基礎医学学術大会, 松戸, 9 月 2010
20. Shakh M. A. Rouf, 根本優子, 小野俊雄, 下山佑, 木村重信, 根本孝幸: Autocatalytic processing of prosequence prior to maturation of Staphylococcal glutamyl endopeptidases. 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12 月 2010
21. 根本孝幸, 小野俊雄, 根本優子: Staphylococcus 属 Glu-プロテアーゼの発現と酵素活性を決定する 3 アミノ酸の同定. 第 51 回歯科基礎医学学術大会, 新潟, 9 月 11 日 2009
- [その他]
- ホームページ等  
<http://naosite.ib.nagasaki-u.ac.jp/dspace/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 根本 孝幸 (NEMOTO 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
- (2) 研究分担者  
 根本 優子 (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  
 馬場 友巳 (BABA 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・助教  
 研究者番号: 80050607
- (3) 連携研究者  
 なし