

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09557

研究課題名(和文) 歯肉縁下プラークでの細菌共生関係解明に向けた歯周病原性細菌生育機構の解析

研究課題名(英文) The growth mechanism of Porphyromonas gingivalis, a member of periodontopathic bacteria, via incorporation of dipeptides.

研究代表者

下山 佑 (Shimoyama, Yu)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90453331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌である*P. gingivalis* は糖代謝能を欠き、エネルギー産生と菌体構成成分の生合成はDPP群とトランスポーターによる菌体内へのジペプチド・トリペプチドの取り込みとそのアミノ酸代謝に依存する。しかし、それらの局在やジペプチドの取り込みに関わるトランスポーターも明らかではなかった。

本研究結果により、H⁺/peptide symporter (Pot)がジペプチドの取り込みに関与すること、またその局在は、DPP群がperiplasmであるのに対し、内膜上であった。このことから、本菌の特異な生育機構の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の罹患率は高く、この主たる原因菌である*P. gingivalis* は口腔だけでなく全身の疾患と強く関連することが複数報告されているため、本菌の感染予防は重要な課題である。しかしながら、*P. gingivalis* の生育機構は明確になされていなかった。本研究結果は、*P. gingivalis* の生育機構の一端を明らかにしたもので、この成果は本菌を標的とした創薬のターゲットとなり得るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis, a Gram-negative anaerobes, is important pathogen associated with chronic periodontitis. This bacterium has no ability to metabolize carbohydrate, and its growth depends on peptide metabolism. These utilized peptides are uptake into bacterial cells as dipeptides or tripeptides. Therefore, it is presumed that several proteases and peptidases that efficiently cleave extracellular proteins and peptides are required. In this study we demonstrated proton-dependent oligopeptide transporter (Pot) was the major transporter to incorporate of dipeptides released by DPPs. In immunoelectron microscopy analysis, the DPPs were located in periplasmic space. On the other hand, Pot was located in inner membrane. These results explain the metabolism pathway that oligopeptides are converted to dipeptides by DPPs in the periplasmic space, and then, dipeptides are readily transported through the inner membrane via dipeptide transporter Pot for nutrition source of *P. gingivalis*.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：P. gingivalis ジペプチジルペプチダーゼ 歯周病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病原性細菌は全身疾患のリスクファクターとなる可能性が示唆され、特に重度歯周炎に関連する ‘red complex species’ の1菌種である *P. gingivalis* は、2型糖尿病、急性冠症候群血栓、慢性関節リウマチのリスクファクターとなることが挙げられている。*P. gingivalis* は糖代謝能を欠くことから、エネルギー産生と菌体構成成分の生合成は菌体内へのジペプチド・トリペプチドの取り込みとそのアミノ酸代謝に依存するという極めて特異な細菌で、基質特異性の異なる複数のジペプチジルペプチダーゼ (DPP) を発現していることが明らかにされている。しかし、これら DPP 群の局在や、これらにより産生されるジペプチドの取り込みに関わるトランスポーターの機能と局在についても明確にはなされておらず、*P. gingivalis* の歯肉縁下プラーク内での生育機構は明確ではない。

2. 研究の目的

本研究では、糖代謝能を欠き、エネルギー産生を嫌気的条件下でアミノ酸代謝にのみ依存するという極めて特色のある代謝系を有する *P. gingivalis* の生育機構解明に必須な DPP 群とジペプチドの取り込みに関わるトランスポーターの局在について検討し、*P. gingivalis* の生物学的特性・歯周病原性細菌としての病原性および歯肉縁下プラークにおける細菌共生関係の解明を目的とした。

3. 研究の方法

各トランスポーター (ナトリウム依存性 Ser/Thr トランスポーター (SstT), Oligopeptide transporter family (Opt), H⁺/peptide symporter (Pot)) を大腸菌に発現させ、合成ペプチドの取り込みに関わるトランスポーターをアラマーブルーの取り込み量から検討した。さらに、*P. gingivalis* の増殖に関わるトランスポーターについては遺伝子破壊株を用いて行った。

DPP 群およびトランスポーターの局在について、各種抗 DPP 抗体ならびに抗 Pot 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察から検討を行った。

4. 研究成果

合成ペプチド (Ser, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly) とアラマーブルーを用いたペプチド、アミノ酸取り込みに関わる検討を行った結果、SstT が Ser, Pot が Gly-Gly, Opt が Gly-Gly-Gly の取り込みに関与するトランスポーターであった (図1)。このことから、*P. gingivalis* の DPP により産生されたジペプチドの取り込みには Pot が関与していることが明らかとなった。

図1

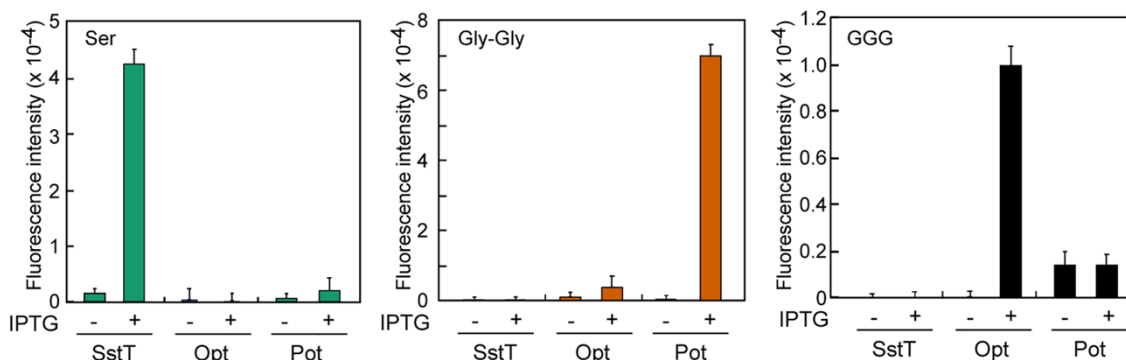
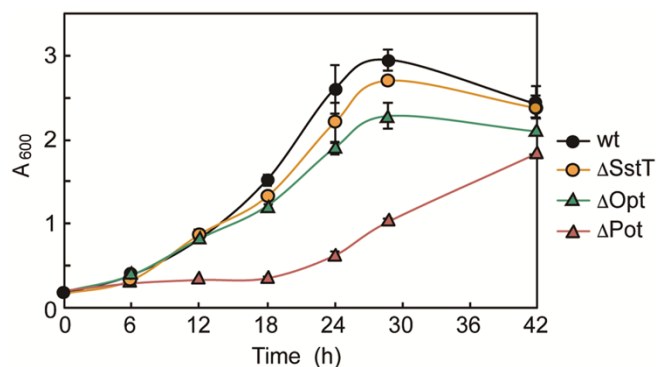


図2



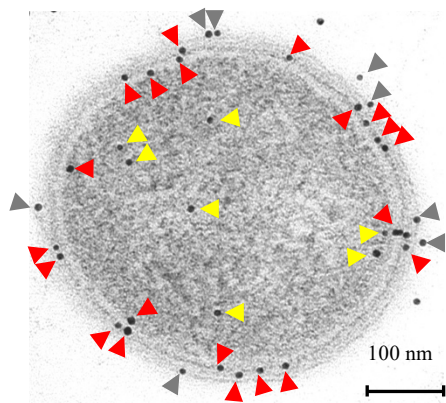
また、各トランスポーター遺伝子破壊株の増殖能について検討した結果、*P. gingivalis* Pot 遺伝子破壊株が SstT 遺伝子破壊株および Opt 遺伝子破壊株と比較して増殖能が低下していることが明らかとなった (図2)。以上の結果から、*P. gingivalis* はジペプチドを主たる栄養源として増殖し、その菌体内への取り込みは Pot により行われていることが強く示唆された。

これら *P. gingivalis* の増殖に必要なジペプチド産生系と取り込みに

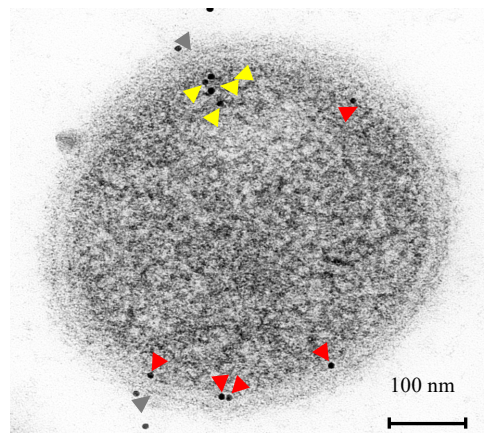
関わる DPP 群と Pot の局在は、それぞれ periplasm と内膜であることは予想されるが明確ではない。そこで、各種抗 DPP 抗体ならびに抗 Pot 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察によりこれらの局在を検討した。その結果、DPP4, DPP5, DPP7, DPP11 は有意に赤に示した periplasm 領域に発現していることが明らかとなった (図 3A, DPP5 のみ示す)。また、ジペプチドの取り込みに関わる Pot は赤で示した periplasm と細胞質の境界に有意に発現していた (図 3B)。

図 3

(A) DPP5



(B) Pot



このことから、*P. gingivalis* は外界のオリゴペプチドを periplasm の DPP を用いて切断、ジペプチドを産生し、内膜上の Pot を用いて取り込み増殖していることが明らかとなった。この成果は歯周炎の主たる原因細菌である *P. gingivalis* の生育機構が明らかとなるばかりでなく、本菌を標的とした予防薬の開発の一助となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohara-Nemoto Yuko, Sarwar Mohammad Tanvir, Shimoyama Yu, Kobayakawa Takeshi, Nemoto Takayuki K	4. 巻 367
2. 論文標題 Preferential dipeptide incorporation of Porphyromonas gingivalis mediated by proton-dependent oligopeptide transporter (Pot)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnaa204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimoyama Yu, Ishikawa Taichi, Kodama Yoshitoyo, Kimura Shigenobu, Sasaki Minoru	4. 巻 367
2. 論文標題 Tyrosine tRNA synthetase as a novel extracellular immunomodulatory protein in Streptococcus anginosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnaa153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Nakasato M, Nishimata H, Ishikawa T, Sasaki M, Kimura S, Nemoto TK.	4. 巻 22
2. 論文標題 Distribution of dipeptidyl peptidase (DPP) 4, DPP5, DPP7 and DPP11 in human oral microbiota-potent biomarkers indicating presence of periodontopathic bacteria.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiol. Lett.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fny221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yu Shimoyama, Yuko Ohara-Nemoto, Takayuki K. Nemoto, Taichi Ishikawa, Daisuke Sasaki, Yoshitoyo Kodama, Shigenobu Kimura and Minoru Sasaki
2. 発表標題 Localization of DPPs and dipeptide transporter Pot in Porphyromonas gingivalis defined by IEM
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	根本 優子 (Ohara-Nemoto Yuko) (10164667)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	木村 重信 (Kimura Shigenobu) (10177917)	関西女子短期大学・その他部局等・教授 (44419)	
研究分担者	石河 太知 (Ishikawa Taichi) (10569247)	岩手医科大学・歯学部・講師 (31201)	
研究分担者	佐々木 大輔 (Sasaki Daisuke) (30453327)	岩手医科大学・歯学部・准教授 (31201)	
研究分担者	佐々木 実 (Sasaki Minoru) (40187133)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------