

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10045

研究課題名(和文) 歯周病細菌の完全ジペプチド産生を保證するシステインペプチダーゼの同定

研究課題名(英文) Identification of cysteine peptidases that assure complete dipeptide production in periodontopathic bacteria

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)・客員研究員

研究者番号：90164665

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)：歯周病菌ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)7がインクレチン類ペプチドのAla2-Glu3結合を効率よく分解することを発見した。従来DPP7はAla2-Xaa3結合を分解するとされていたが、実際にはDPP4やDPP5の数%の活性しかなく、その矛盾が説明できなかった。我々は合成基質と違い、実際のペプチドはC末側にもペプチド鎖があることが原因だと仮定し、C末側にもペプチド鎖を有する基質を合成した。その結果、DPP7はHis-Ala-MCAには活性はないが、HAED-MCAには高い活性を示した。今後プロテアーゼ研究に頻繁に用いられる蛍光基質の使用にあたっては十分な注意が必要であろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトには存在せず、歯周病菌が発現するDPP7が効率よくヒトインクレチンを分解不活化することを発見した。その基質特異性に関して検討し、切断部位のC末側が活性に重要であることを示した。これらの結果は、2つの点で重要である。その第1は、歯周病と2型糖尿病をつなぐ直接の因子がDPP7である可能性である。DPP7はヒトには存在しないのでその阻害剤が、2型糖尿病の治療薬になりうる。第2は、従来ほとんど蛍光基質を用いて研究されたプロテアーゼの酵素化学的な性質が、実際のペプチドを分解する際の性質と違っているという可能性である。今後ペプチダーゼを臨床や応用に用いる場合に十分に考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We found that *P. gingivalis* DPP7 efficiently degraded incretins with N-terminal sequence of His-Ala-Glu-Gly-, which was not consistent to the previous report that DPP7 poorly degraded His-Ala-MCA. According to an assumption that natural peptide substrates possess C-terminal side residues of a cleavage site is responsible for this phenomenon, we synthesized such substrates, e.g., HALD-MCA. Interestingly, DPP7 did not degraded His-Ala-/MCA, but efficiently degraded HA-/LD-MCA. This finding solved the puzzle on protein metabolism in *P. gingivalis*, and set an alert on adapt the data of synthetic substrates for native polypeptides.

研究分野：Biochemistry

キーワード：ジペプチド ジペプチジルペプチダーゼ 歯周病菌 糖尿病 トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* は細胞外の糖質を利用できず、その栄養とエネルギー源を全て細胞外タンパク質に依存している。本菌に外膜に特有のアルギニン(Arg)とリジン(Lys)に特異的なエンドペプチダーゼであるジンジパイン(RgpとKgp)を大量に発現しており、細胞外栄養タンパク質の主要な分解過程を担っている。

我々は2011年に全生物で未知であったタイプのジペプチジルペプチダーゼ(DPP)を発見し、DPP11と命名した。2014年にはカビなどの真核生物に報告されていたDPP5が、本菌を含めて口腔細菌や腸内細菌に広く分布していることを明らかにした。その結果、従来報告されていたDPP4とDPP7とを合わせて、*P. gingivalis*のペリプラズムには基質特異性の異なる4種類のDPPが発現していることが明らかとなった。

2016年にはN末端がアシル化されたペプチドを優先的に分解するエキソペプチダーゼを発見してアシルペプチドオリゴペプチダーゼ(AOP)と命名した。AOPはDPPが分解できないN末端修飾ペプチドを遊離して、 $\alpha$ -アミノ末端を有するペプチドを生産する。さらに従来から報告されていたプロリルトリペプチジルペプチダーゼ-A(PTP-A)も、DPPが分解できないN末端より3番プロリン(Pro)を有するペプチドをDPP分解可能な基質ペプチドに変換する。つまり、PTP-AとAOPはDPP補助成分として機能すると考えられる。プロリン(Pro)特異的なPTP-A以外のトリペプチジルペプチダーゼが存在しないという事実も間接的にこの考えを支持する。これらの事実はDPPがジンジパインによる細胞外タンパク質の分解ステップ以降の分解の中心を担っていることを強く示唆している。

DPPは各々が特徴的な基質特異性を持つことで、ペプチドのアミノ末端より、配列の異なるジペプチドを生じることができる。しかし、Thr、His、Gly、Ser、Glnという低分子量の中性アミノ酸や親水性アミノ酸であるAsnがN末端から2番目にあるペプチドの場合は、これらのDPPでも分解することはできない。実際に歯周病菌でも合成基質 Thr-Ser-4-methylcoumaryl-7-amide(MCA)やGly-Gly-MCAの分解活性を測定しても極めて低い活性しか示さない。もしジペプチドに分解できない配列が存在するならば、それに続くC末端側のペプチドも利用できないことになる。これは歯周プラーク深部という貧栄養環境に生息する歯周病菌の生存にとって極めて不利だと考えられる。

当初我々は還元剤存在下で一部のペプチドの分解が高まる現象を見だし、システインペプチダーゼに属する新たなDPPの存在を想定して本研究を開始した。しかしながら還元状態でも中性アミノ酸であるSerやGlyのC末端側を切断するDPP活性を見いだすことはできなかった。

ところで天然のペプチド基質は合成基質とは異なり、切断位置のC末端側にもペプチドを有する。このことが、これまで中性アミノ酸をターゲットするDPPが見つからなかった理由ではないかと考えるに至った。そこで本研究では途中から視点を変えて、従来の4種類のDPPにこれまで知られていない基質特異性を見いだすために、基質に工夫を加えることとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は歯周病菌 *P. gingivalis* における栄養摂取経路を明らかにすることである。外膜局在ジンジパインが外来性の栄養タンパク質を大まかに切断してオリゴペプチドを生じる。次いでペリプラズムのDPPがジペプチドに変換してから、トランスポーターが内膜内に取り込むというスキームが想定される。そこで問題は、N末端より2番目に中性のアミノ酸(Thr, His, Gly, Ser, Gln)および親水性アミノ酸Asnがある場合には、それらをジペプチドに分解するDPPが存在しないという事実だった。我々の以前の実験より、歯周病菌はThr-Ser-MCAやGly-Gly-MCAを分解する活性がないことが判明していたので(Ohara-Nemoto et al., 2014)、当初はこれまでのセリンプロテアーゼ活性測定条件ではEDTA等の金属プロテアーゼ阻害剤が含まれているためではないかと考えた。そこで、還元剤を添加したシステインプロテアーゼ活性条件や金属イオンを添加した条件でメタロプロテアーゼの活性を測定する条件を検討することで、新たなDPP活性を検出できると予想していた。

### 3. 研究の方法

#### (1) セリンプロテアーゼ以外の DPP の存在の可能性の検討法

システインプロテアーゼを検出するために還元剤添加条件で、あるいはメタロプロテアーゼを検出するために種々の金属イオン添加条件で歯周病菌のペプチド分解活性を測定した。

#### (2) 従来より知られている 4DPP の新たな基質特異性の検討法

天然の生理活性ペプチドは合成基質とは異なり、切断位置の C 末端側にもペプチドを有する。一方で蛍光基質ペプチジル MCA や発色基質、ペプチジル-*p*-nitrophile (pNA) は切断部位の C 末端側は非ペプチド性の合成化合物である。C 末端側の構造は MCA や pNA は本来の基質であるペプチドとは異なるため DPP に対して阻害的に機能している可能性がある。このことがこれまで中性アミノ酸をターゲットする DPP が見つからなかった理由ではないかと推測した。そこで本研究では途中から視点を変えて、従来の 4DPP にこれまで知られていない基質特異性を見いだすために、合成基質に工夫を加えることとした。

DPP の場合、もっとも重要な特異性は N 末端より 2 番目 (P1 位値) のアミノ酸である。例えば DPP4 に対しては Gly-Pro-MCA が DPP4 特異的な基質として使われる。我々も DPP11 に最適な基質として Leu-Asp-MCA を (Ohara-Nemoto et al., 2011) DPP7 には Phe-Met-MCA を報告している (Nemoto et al., 2018)。さらに我々は DPP5 と DPP7 による生理活性ペプチドとジペプチジル MCA の分解活性には食い違いがあることに気づいた。その違いは基質の切断部位の C 末端側の影響にあるのではないかと推定するようになった。そこで歯周病菌の DPP が中性アミノ酸特異的な切断ができないのは、C 末端側のアミノ酸配列の効果が捉えられていないからと考えた。

これを検討するために、本研究では合成基質に工夫を加えた。すなわち DPP の活性測定に用いる基質をジペプチジル MCA ではなく、テトラペプチジル MCA とした。第一の DPP の反応によって本基質より生じるジペプチド短縮したジペプチジル MCA が DPP11 のみで切断できる形 (Leu-Asp-MCA) とする。最初の DPP を限定量、第二の DPP である DPP11 を過剰量加えることで、実質的に一次反応となる。この 2 酵素切断法を用いることで、第一の DPP 反応に及ぼす影響を、切断点の N 末端側のアミノ酸だけではなく、C 末端側のアミノ酸の影響も決定することが可能となった。当初は生理活性ペプチドであるインクレチン GLP-1 の N 末端配列を元に、テトラペプチジル MCA の His-Ala-Glu-Asp-MCA を用いた。その後、P1'アミノ酸の影響を検討するために、His-Ala-Leu-Asp-MCA も作成した。また、3 番目のアミノ酸の影響だけを検討するために、トリペプチジル MCA (His-Ala-Arg-, His-Ala-Glu-MCA) も合成した。この場合は DPP によってアミノアシル MCA (Arg-, Glu-MCA) が生じるので、これを分解できるジペプチダーゼ A を第 2 のペプチダーゼとして用いた。ジペプチダーゼ A は我々が *Prevotella intermedia* で発見し発現したりコンピナント酵素を用いた (Sarwar et al., 2021)。

### 4. 研究成果

#### (1) システインプロテアーゼとメタロプロテアーゼ型 DPP の検討

還元剤存在下 (10–100 mM ジチオスライトール) EDTA 無添加条件、10 mM Ca、Mg、Zn イオン存在下で、*P. gingivalis* が中性アミノ酸である Ser や Gly の C 末端側を切断する DPP 活性を有するかどうかを検討したが、十分な DPP 活性を見いだすことはできなかった。

#### (2) 4 種類の DPP で全ての基質ペプチドを分解できる

DPP7 の基質特異性を検討する過程で、切断位置よりも C 末端側にもアミノ酸が存在することで活性が非常に上昇することが判明した。そのため我々は「研究の方法」で記した 2 酵素切断法を用いて、DPP7 は切断部位の C 末端側にもアミノ酸配列がある場合には、その活性が飛躍的に上昇することを発見した。具体的には、DPP7 は His-Ala-MCA を切断はできないが、His-Ala-/Glu-Asp-MCA を効率よく切断できることを証明した。この結果は、DPP7 が生理活性ペプチドである GLP-1 の N 末端配列 (NH<sub>2</sub>-His-/Ala-Glu-Gly----) を効率よく分解できる理由を説明した。

### ( 3 ) 細胞内膜内に取り込まれたジペプチドをアミノ酸に転換する酵素の同定

歯周病菌 *Prev. intermedia* に蛍光基質 Arg-MCA を切断するアミノペプチダーゼ活性があることを見いだした。その遺伝子を同定してリコンビナントペプチダーゼを発現精製した結果、当初考えられていたアミノペプチダーゼではなく、ジペプチドを 2 アミノ酸に変換するジペプチダーゼであった。N 末端には分泌されるためにプロ配列がないため、細胞質局在であると考えられた。つまり本酵素は歯周病菌が内膜内に取り込んだジペプチドを 2 アミノ酸に変換する酵素であることが明らかとなった。本酵素と類縁構造を有する遺伝子はもう一つあったが、それにはペプチダーゼ活性は検出できなかった。*Prev. intermedia* のジペプチダーゼ類縁遺伝子は、*P. gingivalis* にも一つ存在したが、それは *Prev. intermedia* のジペプチダーゼではなく、酵素活性のない分子のオルソログであった。そのため *P. gingivalis* におけるジペプチダーゼの同定は今後の課題である。

### ( 4 ) ペリプラズムで産生されたジペプチドを取り込むジペプチドトランスポーターは Pot である。そしてジペプチド取り込みが本菌の主要な経路である

内藤ら(2006)の *P. gingivalis* の全ゲノム解析の結果から、本菌には 3 つのアミノ酸・ペプチドトランスポーター遺伝子が存在することがわかっていった。さらに各遺伝子 ( SstT、Opt、Pot ) はそれぞれ複数遺伝子を持つ大腸菌などとは異なり、それぞれ単一遺伝子として存在していた。各遺伝子を大腸菌で発現して組み換え菌のアミノ酸とペプチド取り込み活性を測定した結果、SstT、Pot、Opt がそれぞれ、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド以上の取り込みを担うトランスポーターであることが明らかとなった。さらに *P. gingivalis* ATCC 33277 において、各遺伝子破壊株を作成した。これらの遺伝子破壊株のうち、Pot 遺伝子破壊株でもっとも増殖が遅延することから、ジペプチド取り込みが本菌のペプチド利用の中心経路であることを証明した。

### ( 5 ) 4 種類の DPP(DPP4、DPP5、DPP7、DPP11)以外に、我々が同定した細胞質に局在すると想定される DPP3 およびジペプチドトランスポーターPot の細胞内局在

DPP およびジペプチドトランスポーターPot のポリクローナル抗体を作成した。免疫電験法により、DPP4、DPP5、DPP7、DPP11 のペリプラズム、DPP3 の細胞質、そして Pot の内膜局在が明らかとなった。その結果、*P. gingivalis* における上記のタンパク質分解経路と合致する関与タンパク質の細胞内トポロジーが確認できた。

### ( 6 ) 歯周病菌 DPP によりどのような生理活性ペプチドが不活化されるかを TOF MS で同定する

リコンビナント DPP4、DPP5、DPP7 によるヒトインクレチン(GLP-1、GIP)分解実験により、DPP4 だけでなく、予想外に DPP7 のインクレチン分解活性を発見した。しかもその活性は DPP4 よりも高く、しかも DPP4 とは異なり、インクレチン分子を N 末端ジペプチドの遊離にとどまらず、順次ジペプチドを遊離した。さらに DPP7 はニューロペプチド、ケモカインなど多くの基質を分解した。つまり歯周病菌 DPP7 には DPP4 よりも広範かつ強力に宿主のホメオスタシスを攪乱する因子である可能性が示唆された。DPP 7 が真核細胞ではまったく存在しないことを考慮し、DPP7 阻害剤が糖尿病をはじめとする疾患に対して副作用の少ない治療薬になることを提案した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Ono T, Sarwar MT, Nakasato M, Sasaki M, Nemoto TK.   | 4. 巻<br>298(3)        |
| 2. 論文標題<br>Expanded substrate specificity supported by P1' and P2' residues enables bacterial dipeptidyl-peptidase 7 to degrade bioactive peptides                  | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>J Biol Chem.  | 6. 最初と最後の頁<br>101585  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jbc.2022.101585.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Ohara-Nemoto Y, Sarwar MT, Shimoyama Y, Kobayakawa T, Nemoto TK.  | 4. 巻<br>367(24)       |
| 2. 論文標題<br>Preferential dipeptide incorporation of Porphyromonas gingivalis mediated by proton-dependent oligopeptide transporter (Pot)                             | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>FEMS Microbial Lett   | 6. 最初と最後の頁<br>fnaa204 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/femsle/fnaa204.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Nemoto TK, Ohara Nemoto Y.  | 4. 巻<br>36            |
| 2. 論文標題<br>Dipeptidyl-peptidases: Key enzymes producing entry forms of extracellular proteins in asaccharolytic periodontopathic bacterium Porphyromonas gingivalis | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Mol Oral Microbiol  | 6. 最初と最後の頁<br>145-156 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/omi.12317  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Sarwar MT, Ohara-Nemoto Y, Kobayakawa T, Naito M, Nemoto TK.  | 4. 巻<br>401           |
| 2. 論文標題<br>Characterization of substrate specificity and novel autoprocessing mechanism of dipeptidase A from Prevotella intermedia                                 | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Biol Chem   | 6. 最初と最後の頁<br>629-642 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1515/hsz-2019-0387  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Sarwar Mohammad Tanvir, Ohara-Nemoto Yuko, Kobayakawa Takeshi, Naito Mariko, Nemoto Takayuki K.                                  | 4. 巻<br>401           |
| 2. 論文標題<br>Characterization of substrate specificity and novel autoprocessing mechanism of dipeptidase A from <i>Prevotella intermedia</i> | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>629-642 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1515/hsz-2019-0387  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Baba TT, Miyazaki T, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK.   | 4. 巻<br>37            |
| 2. 論文標題<br>Suppressive effects of N-bisphosphonate in osteoblastic cells mitigated by non-N-bisphosphonate but not by sodium-dependent phosphate cotransporter inhibitor. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Cell Biochem Funct  | 6. 最初と最後の頁<br>400-407 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/cbf.3418.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Nemoto TK, Ono T, Kobayakawa T, Ohara-Nemoto Y.             | 4. 巻<br>163         |
| 2. 論文標題<br>Characterization of bacterial acylpeptidyl-oligopeptidase. | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Biochimie   | 6. 最初と最後の頁<br>50-57 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.biochi.2019.05.007.             | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sarwar Mohammad Tanvir, 根本優子, 小野俊雄, 根本孝幸  |
| 2. 発表標題<br>歯周病細菌 <i>Prevotella intermedia</i> のジペプチダーゼの同定: C69.001 ファミリージペプチダーゼAのN末特異性の再定義 |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会・総会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>根本優子, Sarwar Tanvir, 小早川健, 根本孝幸             |
| 2. 発表標題<br>Porphyromonas gingivalisのH+依存性ジペプチドトランスポーター |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会・総会                          |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

歯周病菌ジペプチジルペプチダーゼ7は広範な基質特性を有し、この活性により血糖調節に関与する  
<https://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/science/science261.html>  
 歯周病菌が作る酵素が血糖調節を行う生理活性ペプチドを分解することを発見  
<https://research-er.jp/articles/view/106965>

#### 6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                        | 備考            |
|-------|---|--|---------------|
| 研究分担者 | 小早川 健<br><br>(Kobayakawa Takeshi)<br><br>(10153587) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員<br><br><br>(17301)  | 削除：2022年8月26日 |
| 研究分担者 | 根本 優子<br><br>(Ohara-Nemoto Yuko)<br><br>(10164667)  | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員<br><br><br>(17301) |               |
| 研究分担者 | 佐々木 実<br><br>(Sasaki Minoru)<br><br>(40187133)      | 岩手医科大学・歯学部・教授<br><br><br>(31201)             | 削除：2022年8月26日 |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 下山 佑<br><br>(Shimoyama Yu)<br><br>(90453331) | 岩手医科大学・歯学部・准教授<br><br><br><br><br>(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 |
|---------|---------|
|         |         |