

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462872

研究課題名(和文) 歯周病原菌由来ペプチド分解酵素に関する構造機能相関研究

研究課題名(英文) Structural and functional studies of dipeptidyl aminopeptidases from periodontal pathogen.

研究代表者

阪本 泰光 (SAKAMOTO, YASUMITSU)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：00349036

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)：歯周病は、細菌感染症の中でもっとも患者数の多い疾患である。歯周病を引き起こす細菌の多くは、糖非発酵グラム陰性菌であり、糖や炭水化物ではなくタンパク質やペプチドをジペプチジルアミノペプチダーゼ(DPP)によって、ジペプチド単位に切断して吸収することが知られている。2004年にDPP7、2012年にDPP11というヒトには存在しない、糖非発酵グラム陰性菌に特有なDPPが見出された。歯周病原菌におけるこれらの酵素の遺伝子欠損株は、増殖能の低下を示し、これらの酵素の阻害剤は抗菌薬となる可能性が示されている。本研究による歯周病菌由来DPP11の立体構造は新規抗菌薬の探索・設計に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：The morbidity of periodontal disease is reported to be 50% above in population worldwide. Some Non-Fermenting Gram-Negative Rods (NFGNR) may cause periodontal disease, such as *Porphyromonas gingivalis*. NFGNR is well known as that utilize peptides as energy and carbon sources instead of carbohydrates. DPPs (Dipeptidyl aminopeptidase) are peptide degradation enzymes that play a key part in intake of peptides. Bacterial DPPs are divided into two categories (Clan SC S9, Clan PA S46). Interestingly, DPPs of Clan PA S46 are only found in bacteria. Our X-ray crystallographic studies of *Pseudomonas mexicana* W024 DAP B11 and *Porphyromonas gingivalis* DPP11 revealed that catalytic mechanism and substrate recognition mechanism. These findings are useful in the development of specific inhibitors for S46 peptidases.

研究分野：構造生物薬学

キーワード：DPP11 S46 ペプチダーゼ 抗菌薬 結晶構造解析 歯周病

1. 研究開始当初の背景

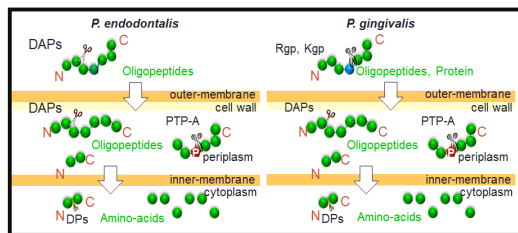
なぜ、歯周病病原菌に注目したのか？

歯周病は、世界で最も感染者の多い疾患として知られ、日本では推定で6000~8000万人以上の患者がいる。しかも、歯周病は口腔疾患に留まらず、心筋梗塞・動脈硬化・肺炎・早産の危険因子であることが知られている。日本における歯周炎治療では、プラークコントロールを中心とする歯周基本治療が行われているが、治療抵抗性歯周炎、重度慢性歯周炎や侵襲性歯周炎には抗菌薬を併用した治療が行われる(日本歯周病学会編: *経口抗菌薬療法*のEBM 2009)。しかしながら、抗菌薬の使用による耐性菌出現の観点から、原因菌に特異的な抗菌薬の使用が望まれるが、現時点では *Porphyromonas gingivalis* や *Porphyromonas endodontalis* を標的とした特異的な抗菌薬はなく、多剤耐性菌に対する切り札とも言われるアジスロマイシンの利用には慎重さが求められている(金子明寛 *日歯医学会誌* 27, 25 (2008).)。

2. なぜ、ジペプチド代謝経路に注目したのか？

慢性歯周炎と根尖性歯周炎の原因菌として *P. gingivalis* と *P. endodontalis* がそれぞれ知られている。これらの菌は糖非発酵性であり、菌が産生するペプチダーゼ群が歯周組織などのタンパク質をアミノ酸に分解し、栄養源として利用している (Versalovic J. *et al. Manual of clinical microbiology 10th ed.* 51, 858(2011).)。

P. gingivalis と *P. endodontalis* に共通して存在し、タンパク質、ペプチド代謝経路に関与すると考えられる酵素として、基質特異性が異なるがプロテアーゼデータベース



MEROPS で、共に Clan PA S46 に分類される *P. gingivalis* 由来 DPP7 (Banbula A. *et al., J. Biol. Chem.* 276, 6299 (2001).) と *P. gingivalis* 由来 DPP11、*P. endodontalis* 由来 DPP11 が見出されている。DPP11 は、栄養物の代謝産物のうち、酸性ジペプチドを産生する唯一の酵素であることが明らかにされ、DPP11 を標的とした阻害剤が、新規抗菌薬となる可能性が示唆されている (Ohara-Nemoto Y. *et al., J. Biol. Chem.* 286, 38115 (2011).)。また、Clan PA S46 の酵素はヒトには存在しない。

2. 研究の目的

多剤耐性菌や歯周病菌の多くは糖の代わりにペプチドをエネルギー源として利用す

るグラム陰性糖非発酵性病原菌である。これらの細菌は、外膜と内膜の間にあるペリプラズムに、ペプチドからジペプチドを産生するジペプチジルアミノペプチダーゼ(DPP)群を有する。内膜は、アミノ酸単体よりもジペプチドを選択的に透過し、DPP 群の阻害により病原菌の生育・増殖が低下することから、DPP 群は新規抗菌薬の標的酵素として有望であると考えられている。本研究では、これら DPP 群の中でも特に歯周病菌に特有に存在する DPP11 の立体構造を解明し、その立体構造から、化合物探索・設計に必要な構造機能相関情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

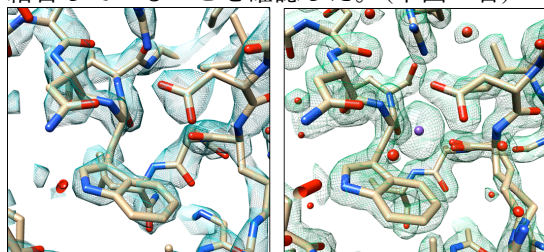
Porphyromonas gingivalis 由来 DPP11、*Stenotrophomonas maltophilia* 由来 Clan PA S46 酵素を大腸菌により大量発現させ、クロマトグラフィにより、結晶化用サンプルを得る(連携研究者・小笠原博士)。各種基質・基質類似体・阻害剤存在下で結晶化を行い、放射光施設(フォトンファクトリー、SPring-8)での回折強度データ収集実験を行い、立体構造を決定する。

4. 研究成果

研究開始当初は、歯周病原菌由来 DPP11 類縁酵素である *Pseudoxanthomonas mexicana* 由来 DAP BII の結晶構造解析を手がけた。野生型 DAP BII の結晶がなかなか得られなかったため、DAP BII の推定触媒残基(H86, D224, S657)をアラニンへと置換した複数の置換体(H86A, D224A, S657A, 三重アラニン置換体)を作製した。さらにいくつかの阻害剤を加えて結晶化条件の探索を行い、阻害剤である塩化亜鉛を加えた条件で、D224A 置換体から 6Å 分解能程度の回折能を示す結晶が得られた。その後、セレノメチオニン化 DAPBII(S657A)で再度結晶化スクリーニングを実施したところ、これまでと全く異なる形状の結晶が得られた。そして、この結晶から 2.2Å での SAD データ収集に成功し、SHARP/autoSHARP による位相決定、モデル構築、Refmac5 による精密化を経て MEROPS Clan PA S46 ファミリーの DPP の立体構造として、世界で初めて PmDAP BII の構造決定に成功した。また、分解能の向上を目指して、宇宙航空研究開発機構の高品質蛋白質結晶生成プロジェクト(JAXA-PCG)制度を活用し、微小重力下でカウンターディフュージョン法による結晶化実験を国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟にて実施し、これまで得られた形状と異なる薄板状の結晶から、1.95Å 分解能の回折強度データ収集に成功した。その後、野生型および触媒残基三重置換体と各種ペプチドの共結晶からデータを収集し、ペプチド複合体の構造解析にも成功した。これらの成果により Clan PA S46 ファミリーのペプチド分解機構や基

質認識機構の分子レベルでの解明に結びつき、2014年に *Scientific Reports* 誌に2報掲載される成果となった。

さらに、*P. gingivalis* 由来 DPP11 の発現系の構築・精製・結晶化に成功した。得られた結晶の大きさは 0.06 mm³ と非常に小さいものであったが高エネルギー加速器研究機構放射光施設を利用し、結晶学的パラメータの決定と 2.7Å 分解能のデータセットの収集に成功した。このデータセットを用いて、類縁酵素である DAP BII の構造を用いて分子置換法による立体構造解析を行ったが、構造決定には至らなかった。その後、セレノメチオンを導入した PgDPP11 を用いることで、多波長異常分散法による構造決定に成功した。その結果、DPP11 は、DAP BII と同様に触媒ドメインと α ヘリカルドメインから構成される構造を持つものの、その α ヘリカルドメイン中の各ヘリックスの長さが DAP BII よりも長いものが多く、ヘリカルドメインの構造は DAP BII に比べ、大きく歪んでいた。一方、キモトリプシン様触媒ドメインは、非常によく保存され、DAP BII の触媒ドメインとほぼ同じ構造であった。PgDPP11 について DAP BII と同様に、基質等との共結晶化の試みは成功しなかったが、微小重力下結晶化実験により得られた 1.66Å 分解能のデータから得られた電子密度により、結晶化溶液に含まれるカリウムイオンが S2 サブサイトに結合していることを確認した。(下図：右)



このカリウムイオンと W219 のベンゼン環の平面中心までの距離は 3.3Å、DAP BII における W216 と基質アミノ末端までの距離は 3.8Å であり、共に Cation- π 相互作用とみなされる距離であることが示唆され、基質結合における Cation- π 相互作用の重要性が示唆された。従って、DAP BII とジペプチド複合体の結晶構造では、P2 位の基質アミノ酸と N330, N215, D674 による水素結合ネットワークに加えて W216 の cation-Pi 相互作用によって基質ペプチドの位置が厳密に規定されることによってジペプチド単位で基質が切断されていると考えられたが、DPP11 においても、同様の水素結合ネットワークの形成により、ジペプチド単位で基質が切断されることが示唆された。この成果は 2015 年に *Scientific Reports* 誌に掲載された。

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 5 件)

1. 微生物ペプチド代謝系に關与する新規ペプチダーゼの構造と機能 (2015) *生化学* **6**, 762-765
阪本泰光、野中孝昌
2. Structural and mutational analyses of dipeptidyl peptidase 11 from *Porphyromonas gingivalis* reveal the molecular basis for strict substrate specificity. (2015) *Scientific Reports*, **5**, 11151
Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Roppongi S, Fujimoto M, Inaka K, Tanaka H, Yamada M, Ohta K, Gouda H, Nonaka T, Ogasawara W, Tanaka N.
3. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of dipeptidyl peptidase 11 from *Porphyromonas gingivalis*. (2015) *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* **71**:206-210.
Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Roppongi S, Fujimoto M, Gouda H, Nonaka T, Ogasawara W, Tanaka N.
4. S46 peptidases are the first exopeptidases to be members of clan PA. (2014) *Scientific Reports*, **4**:4977.
Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Roppongi S, Fujimoto M, Inaka K, Tanaka H, Masaki M, Ohta K, Okada H, Nonaka T, Morikawa Y, Nakamura KT, Ogasawara W, Tanaka N.
5. Identification of the catalytic triad of family S46 exopeptidases, closely related to clan PA endopeptidases. (2014) *Scientific Reports*, **4**:4292
Suzuki, Y., Sakamoto, Y., Tanaka, N., Okada, H., Morikawa, Y. and Ogasawara, W.

[学会発表] (計 17 件)

1. 歯周病菌由来酸性アミノ酸特異的 DPP (ジペプチジルペプチダーゼ) の構造生物学的研究 (日本薬学会第 136 年会、横浜市、2016 年 3 月 28 日)
○六本木沙織、鈴木義之、飯塚一平、館岡千佳、藤本真友、伊中浩治、田仲広明、太田和敬、山田貢、合田浩明、野中孝昌、小笠原渉、田中信忠、阪本泰光
2. 歯周病菌由来 DPP11 の構造生物学的研究 (2015 量子ビームサイエンスフェスタ、つくば市、2016 年 3 月 15 日)
○六本木沙織、鈴木義之、飯塚一平、伊中浩治、田仲広明、太田和敬、山田貢、小笠原渉、田中信忠、野中孝昌、阪本泰光

3. Structural and mutational studies of dipeptidyl peptidase 11 from *Porphyromonas gingivalis* (9th General Meeting of The International Proteolysis Society, ペナン、2015年10月7日)
○阪本泰光、鈴木義之、飯塚一平、館岡千佳、六本木沙織、藤本真友、伊中浩治、田仲広明、太田和敬、山田貢、合田浩明、野中孝昌、小笠原渉、田中信忠
 4. First structure of Family S46 peptidase reveal exo-peptidase activity in Clan PA peptidases (9th General Meeting of The International Proteolysis Society, ペナン、2015年10月7日)
○飯塚一平、阪本泰光、鈴木義之、館岡千佳、六本木沙織、藤本真友、伊中浩治、田仲広明、正木美佳、太田和敬、岡田宏文、野中孝昌、森川康、中村和郎、小笠原渉、田中信忠
 5. 糖非発酵グラム陰性細菌由来ペプチド分解酵素の構造と機能(第54回日本薬学会東北支部大会、矢巾町、2015年9月26日)
○阪本泰光、鈴木義之、飯塚一平、館岡千佳、六本木沙織、藤本真友、伊中浩治、田仲広明、太田和敬、岡田宏文、野中孝昌、森川康、中村和郎、小笠原渉、田中信忠
 6. 微生物由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の構造生物学的研究(第54回日本薬学会東北支部大会、矢巾町、2015年9月26日)
○六本木沙織、館岡千佳、鈴木義之、藤本真友、森澤さおり、飯塚一平、小笠原渉、田中信忠、阪本泰光、野中孝昌
 7. Clan PA S46 ファミリーに属する DAP BII の結晶構造解析(第54回日本薬学会東北支部大会、矢巾町、2015年9月26日)
○飯塚一平、鈴木義之、館岡千佳、六本木沙織、藤本真友、伊中浩治、田仲広明、太田和敬、岡田宏文、野中孝昌、森川康、中村和郎、小笠原渉、田中信忠、阪本泰光
 8. 微生物由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の結晶構造解析(日本生化学会東北支部第81回例会、仙台市、2015年5月9日)
○六本木沙織、館岡千佳、鈴木義之、藤本真友、森澤さおり、飯塚一平、小笠原渉、田中信忠、阪本泰光、野中孝昌
- Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来ジペプチジルアミノペプチダーゼの構造解析(第135回日本薬学会年会、神戸、2015年3月28日)
○六本木沙織、館岡千佳、森澤さおり、飯塚一平、藤本真友、鈴木義之、小笠原渉、田中信忠、阪本泰光、野中孝昌
9. Clan PA に属する Exopeptidase family S46 の構造機能相関の解明(日本農芸化学会2015年度年会、岡山、2015年3月27日)
○鈴木義之、阪本泰光、田中信忠、小笠原渉
 10. Structural basis of exopeptidase activity of a dipeptidyl aminopeptidase BII, a member of the family S46 peptidases. (15th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules. ハンブルグ、2014年9月17日)
Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Roppongi S, Fujimoto M, Inaka K, Tanaka H, Masaki M, Ohta K, Okada H, Nonaka T, Morikawa Y, Nakamura KT, Ogasawara W, ○Tanaka N.
 11. Crystal structure analysis of dipeptidyl amino peptidase from *P. mexicana* WO24. (The 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. モントリオール、2014年8月9日)
○Roppongi S, Tateoka C, Suzuki Y, Fujimoto M, Morisawa S, Iizuka I, Ogasawara W, Tanaka N, Sakamoto Y, Nonaka T.
 12. Crystal Structure analyses of dipeptidyl aminopeptidase BII from *P. mexicana* WO24. (The 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. モントリオール、2014年8月11日)
○ Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Roppongi S, Fujimoto M, Inaka K, Tanaka H, Masaki M, Ohta K, Okada H, Nonaka T, Morikawa Y, Nakamura KT, Ogasawara W, Tanaka N.
 13. Crystal Structures of Dipeptidyl aminopeptidases from *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24. (New York Structural Biology Discussion Group Summer Meeting. ニューヨーク、2014年8月5日)
○ Roppongi S, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Fujimoto M, Inaka K, Tanaka H, Masaki M, Ohta K, Okada H, Morikawa Y, Nakamura KT, Ogasawara W, Tanaka N, Sakamoto Y, Nonaka T.

Pseudoxanthomonas mexicana WO24 由来ジペプチジルアミノペプチダーゼの

14. Crystal structure studies of dipeptidyl aminopeptidase BII from *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 (The 28th Symposium of the Protein Society サンディエゴ、2014年7月27日)
○ Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I, Tateoka C, Roppongi S, Fujimoto M, Inaka K, Tanaka H, Masaki M, Ohta K, Okada H, Nonaka T, Morikawa Y, Nakamura KT, Ogasawara W, Tanaka N.
15. 微小重力環境を利用したジペプチジルアミノペプチダーゼ結晶化(第14回日本蛋白質科学会、横浜市、2014年6月26日)
○ 阪本泰光 (招待講演)
16. *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 dipeptidyl aminopeptidase 複合体の結晶構造(第14回日本蛋白質科学会年会、横浜市、2014年6月25日)
○ 六本木沙織、館岡千佳、鈴木義之、藤本真友、森澤さおり、飯塚一平、小笠原渉、田中信忠、阪本泰光、野中孝昌

〔その他〕

受賞

9th General Meeting of The International Proteolysis Society Travel Award
First structure of Family S46 peptidase reveal exo-peptidase activity in Clan PA peptidases.
飯塚一平

第54回日本薬学会東北支部大会優秀ポスター賞
微生物由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の構造生物学的研究
六本木沙織

報道

研究成果(多剤耐性菌類縁菌由来 DAP BII の立体構造解明)に関する報道、取材
2014/5~2015/3
毎日新聞(5/29)、読売新聞、日刊工業新聞(5/21)、岩手日報(5/17)、新潟日報、盛岡タイムス、時事通信、きぼうマンズリーニュース(5/28)、JSTサイエンスニュース(7/31)、国立科学博物館季刊誌 milsil(3/1)

研究成果(歯周病菌由来 DPP11 の立体構造解明)に関する報道、取材、イベント
2015/6~2016/3

読売新聞(6/22)、中国新聞(8/30)、科学新聞(6/26)、新潟日報(6/11)、岩手日報(6/11)、化学工業日報(6/26)、共同通信(6/10)、日本歯科新聞社(6/23)、きぼうマンズリーニュース(6/24)、高エネルギー

ー加速器研究機構物構研 News14号、ラヂオ盛岡(2/29)、油井亀美也宇宙飛行士ミッション報告会トークショー(3/13)

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪本泰光 (SAKAMOTO, Yasumitsu)

岩手医科大学薬学部・助教

研究者番号：00349036

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

田中信忠 (TANAKA, Nobutada)

昭和大学薬学部・准教授

研究者番号：00286866

小笠原渉 (OGASAWARA, Wataru)

長岡技術科学大学工学部・教授

研究者番号：40292172