

西俣 はるか 論文内容の要旨

主 論 文

Identification of Dipeptidyl-Peptidase (DPP) 5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, Distinct from Those in *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis とは性質の異なる *Porphyromonas endodontalis* のジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 5 および 7 の同定

西俣 はるか, 根本 優子, 馬場 友巳, 星野 倫範, 藤原 卓,
下山 佑, 木村 重信, 根本 孝幸

PLOS ONE, in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
(主任指導教員: 藤原 卓 教授)

緒 言

糖非発酵性グラム陰性偏性嫌気性桿菌である *Porphyromonas endodontalis* およびその近縁種の *Porphyromonas gingivalis* は、それぞれ根尖性歯周炎および慢性歯周炎の起炎菌であり、共に瘻孔や膿瘍の形成とも関連している。両菌は、菌体内外にプロテアーゼを産生するが、その中でも *P. gingivalis* の持つジンジパインは歯周病原因子として既知であり、同菌の病原性の主因でもあると考えられている。

しかし、*P. endodontalis* はジンジパイン様活性を持たない。一方で同菌は、*P. gingivalis* の持つ dipeptidyl-peptidase (DPP) 活性、つまりオリゴペプチドのアミノ基側末端からジペプチドを遊離する性質は有しており、*P. gingivalis* よりも特に強力な Lys-Ala-4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) 分解活性を示す。同菌が DPP4 と DPP11 を保有することは既に明らかになっているが、DPP4 はアミノ基側末端より 2 番目 (P1 位置) のアミノ酸が Pro の場合に、DPP11 は Asp もしくは Glu である場合にのみ特異的に加水分解するため、Lys-Ala-MCA に対する分解能はなく、別の DPP による作用であると考えられた。

まず *Porphyromonas* 属菌の菌体における MCA ジペプチド分解活性の比較と、Lys-Ala-MCA 分解活性について比較検討した。その結果、我々が *P. gingivalis* にて最近見出した DPP5 が、*P. endodontalis* において高い Lys-Ala-MCA 分解活性を担っていることが判明した。さらにこれまで未知だった *P. endodontalis* DPP7 についても同定した。

対象と方法

(1) *P. endodontalis* ATCC 35406 (標準株), *P. gingivalis* ATCC33277 (標準株), 16-1, HW24D1, HG1690, ATCC49417, W83, W50, および HNA99を36°Cにて嫌気培養後, 菌液をTryptic Soy Agarプレートに敷いた半透膜上に播種し培養を行い, 膜上の菌液を回収した. この菌液を超遠心にて菌体と培養上清とに分離し, 菌体をPBSに懸濁しMCAジペプチドに対する分解活性を測定した.

(2) *P. endodontalis* ATCC 35406 ゲノム DNA より推定 DPP5 (MER236725)および推定 DPP7 (MER278904) 遺伝子領域をそれぞれ PCR クローニングにより単離し, 大腸菌発現系で発現精製し, その基質特異性について MCA ジペプチドを用いて解析した.

結 果

P. gingivalis 16-1, HG1690, ATCC49417, HNA99 は高い Kgp と Rgp 活性を示したが, W50 は両活性とも最も低かった. また以前の報告にある通り *P. endodontalis* は同活性を持たないことが確かめられた. また, Leu-Asp-, Gly-Pro-, Met-Leu-, Lys-Ala-MCA に対する分解活性を比較すると, 何れも *P. endodontalis* が *P. gingivalis* より高く, 特に Lys-Ala-MCA 分解活性において顕著であった.

その基質特異性から MER236725 が Lys-Ala-MCA 分解を担当する *P. endodontalis* DPP5 であると同定した. 両菌種由来の組換えタンパク質は, 共に Gly-Phe-, Lys-Ala-, Met-Leu-, Ser-Tyr-MCA を分解するが, *P. endodontalis* DPP5 ではより活性が高く, 特に Lys-Ala-MCA に対する k_{cat}/K_m は 18 倍であった. また, *P. endodontalis* の DPP5 タンパク発現量は *P. gingivalis* ATCC33277 およびジンジパインを発現しない KDP136 株の各々 1.9 倍および 4.4 倍であった.

さらに, これまで帰属未知であった MER278904 はその基質特異性より *P. endodontalis* DPP7 と同定された. 他の DPP と比較すると, *P. endodontalis* DPP7 は 818 残基と長く, カルボキシル基側末端に延長部を有していた. また, その遺伝子より予想される 100 kDa 分子の発現もイムノブロット法にて確認した.

考 察

P. gingivalis の菌株における Kgp および Rgp 活性の多様性が明らかとなった. また, *P. gingivalis* と比較し *P. endodontalis* で観察された Lys-Ala-MCA 分解活性の優位性は, *P. endodontalis* DPP5 活性とタンパク発現量の差に起因することが示された. 多くの DPP7 が 700-720 アミノ酸残基なのに対し, *P. endodontalis* DPP7 は 818 残基とカルボキシル基側末端に 108 残基の付加配列を持つ, ユニークなアミノ酸配列を持つことが判明した.