SHAKH MOHAMMAD ABDUR ROUF 論文内容の要旨

主 論 文

Discrimination based on Gly and Arg/Ser at position 673 between dipeptidyl-peptidase (DPP) 7 and DPP11, widely distributed DPPs in pathogenic and environmental gram-negative bacteria

病原性細菌及び自然環境に広く分布するグラム陰性細菌が発現するジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 7 と DPP11 の 673 番目のグリシンとアルギニン/セリンによる識別

Shakh M. A. Rouf, 根本優子, 星野倫範, 藤原卓, 小野俊雄, 根本孝幸

Biochimie in press

[9 ページ]

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：根本 孝幸 教授)

緒 言

成人性歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* は糖非発酵性で、エネルギー源としてアミノ酸を利用する。本菌の主たるプロテアーゼであるジンジパインによって生成された細胞外オリゴペプチドは、Pro 特異的なジペプチジルペプチダーゼ (DPP) IV と疎水性アミノ酸特異的な DPP7 によってジペプチドに分解されてから菌体内に取り込まれると考えられてきた。一方、代謝量の多い Glx および Asx 特異的な DPP は、原核および真核生物を通じて存在しなかった。最近、当分野では Asp/Glu 特異的な新規の *P. gingivalis* DPP11 を発見した。DPP11 の遺伝子構造により、従来 S46/DPP7 ペプチダーゼファミリーに分類されていた *Bacteroidetes* 門, *Proteobacteria* 門細菌由来の 264 遺伝子の相同検索が行われ、同ファミリーは S46.001 (DPP7), S46.002 (DPP11), およびどちらにもアノートできない S46.003 に再分類された。一方、S46 ファミリーのうち *Bacteroidetes* 門は分子系統樹上、5 クラスターに分枝し、*P. gingivalis* DPP7 と DPP11 を含むクラスター3 と 4 以外は基質特異性が不明であった。

そこで本研究では、S46 ファミリー全クラスターの基質特異性を決定し、これらの特異性が一義的には 673 番目のアミノ酸残基により決定し、DPP7 では Gly, DPP11 では Arg/Ser であることを明らかにした。得られた結果を基に C 末端保存領域による系統解析を行い、この分類が全領域を用いた分類よりも妥当であることを示した。

対象と方法

Capnocytophaga gingivalis JCM12953, *Flavobacterium psychrophilum* JCM8519 菌株, 及び *Bacteroides fragilis* strain Onslow JGD06283, *Bacteroides vulgatus* JGD06281, *Shewanella putrefaciens* JCM20190T ゲノム DNA は理研 BRC より得た。*F. psychrophilum* および *C. gingivalis* のクラスター1 および 2 DPP, *B. fragilis* および *B. vulgatus* のクラスター5 DPP, *S.*

putrefaciens DPP, *P. gingivalis* DPP7(クラスター3), *P. gingivalis* と *P. endodontalis* DPP11(クラスター4), 及びこれらの 1 残基アミノ酸置換体を大腸菌発現系を用いて発現精製した. 酵素活性は MCA-ジペプチドを基質として測定し, Clustal X により系統解析を行った.

結 果

DPP リコンビナント体の酵素活性と基質特異性を検討した結果, いずれの分子種も酵素活性を有し, その基質特異性からクラスター 1, 3, 5 が DPP7, また, クラスター 2 と 4 が DPP11 に相当することが明らかになった. また, 多くの細菌種は DPP7 と DPP11 に相当する各々 1 種類の遺伝子を保有すること, *Bacteroidetes* 門のうち *Bacteroides* 属細菌ではこれらに加えてクラスター 5 に第 2 の DPP7 遺伝子を有することが判明した.

DPP11 では Arg673 が基質特異性に必須であることがすでに報告されているが, 再分類と全メンバーのアミノ酸配列の比較検討から DPP7 では Gly673 が必須であることが示唆され, 実際, Gly673Arg 置換により DPP11 様の基質特異性に転換した. 従って, S46 ファミリー分子は 673 番アミノ酸 1 残基によって DPP7, あるいは DPP11 であるかを判定できることが示唆された.

一方, *Proteobacteria* 門細菌の一部で Ser673 を有する分子種が認められたが, *S. putrefaciens* DPP の検討より, Ser673 を有する DPP が, 基質親和性が従来の Asp>Glu タイプではなく, Glu>Asp 型である DPP11 であることをつきとめた. 実際, *S. putrefaciens* DPP11 の Ser673Arg 置換により, 基質特異性が Asp>Glu 型に転換した.

考 察

活性に必須の Ser655 や基質特異性を決定する Arg673/Gly673 を含む C 末側保存領域による系統解析から, DPP7 と DPP11 はそれぞれ同じ祖先分子から進化したと考えられた. その結果, *Bacteroidetes* 門においては, S46 ファミリーの祖先遺伝子は一度の遺伝子重複により DPP7 と DPP11 を生じ, その後 *Bacteroides* 属において 2 度目の遺伝子重複を起こして 2 つの DPP7 遺伝子を獲得したものと推定された.