

# Mohammad Tanvir Sarwar 論文内容の要旨

主 論 文

**Characterization of substrate specificity and novel autoprocessing mechanism of dipeptidase A from**

***Prevotella intermedia***

*Prevotella intermedia* ジペプチダーゼAの基質特異性の決定と新規オートプロセッシング機構

Mohammad Tanvir Sarwar, 根本 優子, 小早川 健, 内藤 真理子, 根本 孝幸

Biological Chemistry in press (2019)

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

歯周病菌の1つである *Prevotella intermedia* は歯周病患者の歯肉縁下プラークにしばしば観察されるグラム陰性桿菌である。歯周病原細菌の発現するプロテアーゼ・ペプチダーゼはタンパク質を分解して、栄養物としてのアミノ酸を産生するとともに、歯周組織や宿主防御機能を破壊することから、歯周病の病原因子の一つであると考えられている。我々は *Pre. intermedia* OMA14 株において、4種類あるジペプチジルペプチダーゼ(DPP)のうち DPP11 が欠損していることを見いだした。さらに本菌において Arg-4-methycoumaryl-7-amide (MCA) を分解するペプチダーゼ活性が高いことを発見した。本研究ではこの Arg-MCA 分解活性を担うペプチダーゼの遺伝子クローニングを試みた。

対象と方法

*Pre. intermedia* OMA14 株は 37°C にて ABCM 培地で培養した。*Pre. intermedia* ゲノムより遺伝子 BAU17746 と BAU18827 を、*Lactobacillus helveticus* よりジペプチダーゼ(dipeptidase A) 遺伝子を、*Tannerella forsythia* より C69 ファミリージペプチダーゼ遺伝子を PCR クローニングし、その全長を pQE60 ベクターに挿入して C 末 His<sub>6</sub>

タグ分子として発現した。BAU17746 についてはさらに、複数の変異分子と pGEX-4T-1 を用いた N 末 GST 融合タンパク質を発現した。ペプチダーゼ活性は各種合成蛍光基質で測定し、ジペプチダーゼ活性は各種ジペプチドを基質に用い、ニンヒドリン法によって定量した。

## 結 果

*Pre. intermedia* 菌体の Arg-MCA 分解活性の特性から、本活性は C69 ファミリーペプチダーゼである *Streptococcus gordonii* Arg-アミノペプチダーゼ類縁酵素であると推測された。そこで *Pre. intermedia* ゲノム情報に基づき、2 種類の C69 ファミリー (MEROPS code BAU17746 と BAU18827) のリコンビナント分子を発現したところ、BAU17746 が Arg-MCA 分解活性を示し、その生化学的性質や基質特異性が菌体のものと一致した。

精製リコンビナント BAU17746 の N 末端解析の結果、大部分の分子は N 末端 Cys<sup>15</sup> の 54 kDa 分子であり、一部、N 末がプロセシングされていない 56-kDa 分子が存在することが明らかになった。種々の検討の結果、56-kDa から 54-kDa 分子への変換は、プロペプチダーゼ自体による Glu<sup>14</sup>-Cys<sup>15</sup> 間のオートプロセシングであり、Cys<sup>15</sup> が N 末端に露出することにより活性型となることが判明した。

BAU17746 は S69.001 サブファミリーの *S. gordonii* Arg-アミノペプチダーゼよりもむしろ C69.001 の *L. helveticus* ジペプチダーゼ A とアミノ酸配列相同性が高いため、ジペプチドを基質として検討したところ、BAU17746 が本来はジペプチダーゼであり、通常アミノペプチダーゼの基質とされている Arg-MCA は、ここではジペプチドとして認識されると考えられた。

C69.001 サブファミリーの代表分子の *L. helveticus* ジペプチダーゼ A は Arg ではなく、疎水性アミノ酸特異的だと報告されており、BAU174446 とは異なっていた。実際に *L. helveticus* ジペプチダーゼ A を発現したところ、以前の報告が誤っており、Arg 特異的であった。しかし *T. forsythia* ジペプチダーゼ A は Leu 特異的であったので、全ての C69.001 分子が Arg 特異的ではなく、多様性があることが明らかになった。

## 考 察

歯周病菌 *Pre intermedia* の発現する Arg-MCA 分解活性を担う分子が C69.001 サブファミリーに属するシステインペプチダーゼ BAU17746 あることを明らかにした。本酵素の実体はジペプチダーゼであった。当初、これに気づかなかったのは、C69.001 サブファミリーの代表分子である *L. helveticus* ジペプチダーゼ A が、N 末端疎水性アミノ酸特異的と誤って報告されていることによる。*L. helveticus* ジペプチダーゼ A の基質特異性の再定義を踏まえ、全ての C69.001 ジペプチダーゼ A が N 末端 Arg 特異性である可能性を検討したが、C69.001 サブファミリーには複数の N 末端特異性を持つメンバーが存在することが判明した。大腸菌発現 BAU17746 はほとんどが N 末端の 14 アミノ酸部分をプロセシングした状態で回収されるが、その切断は大腸菌のシグナルペプチダーゼではなく、プロエンザイムの自己切断活性によっていた。

(1999 文字) (2000 字以内)