歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* が 産生するシステインプロテアーゼの機能

山本健二・門脇知子・岡元邦彰・安部直子*¹⁾、中山浩次*²⁾

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Arginine- and lysine-specific gingipains from Porphyromonas gingivalis as major virulence factors of progressive periodontal disease

The anaerobic oral bacterium *Porphyromonas gingivalis* is thought to be a major etiologic agent of progressive periodontal disease. Recently, two major cysteine proteinases responsible for trypsin-like activity from the organism were purified from the culture supernatant of various *P. gingivalis* strains, termed "Arg-gingipain (RGP) and Lys-gingipain (KGP)". The secretory RGP and KGP were shown to be associated with periodontal tissue breakdown and disruption of the normal host defense mechanisms. To further clarify their virulence, RGP- and KGP-deficient mutants were constructed by gene disruption using suicide plasmid systems. The RGP-null mutant showed a remarkable loss of both the suppressive activity of PMN functions and the hemagglutinating activity observed with the wild-type strain, suggesting that RGP is responsible for these activities of the organism. The RGP-null mutant also showed the defect in fimbriation and processing of prefimbrialin and the 75-kDa surface protein precursor, suggesting that RGP is involved in processing and translocation of certain cell surface proteins of the organism. On the other hand, the KGP-deficient mutant, like the wild type strain, strongly retained the abilities to suppress the PMN bactericidal activity and to hemagglutinate, but it could not form the black pigmentation of colonies when grown in blood agar plate. *P. gingivalis* is known to stockpile heme from hemoglobin in blood agar, resulting in the black pigmentation. Therefore, KGP appeared to be involved in the adsorption and degradation of hemoglobin and the heme accumulation in the organism.

Rec. 3/3/1998, Acc. 3/20/1998, pp 259~264

Kenji Yamamoto・Tomoko Kadowaki・Kuniaki Okamoto・

Naoko Abe*¹⁾, Koji Nakayama*²⁾

key words : Arg-gingipain, Lys-gingipain, *Porphyromonas gingivalis*,
cysteine proteinase, periodontitis

超高齢化社会を迎えた今日、歯の喪失は食生活を含めた生活の質全般の低下を招くばかりでなく、心循環系疾患、糖尿病、精神神経疾患などの種々の重要疾患のリスクファクターとなりうるな

ど、これまで考えられていた以上に深刻な問題となっている。そうした意味で、歯の喪失を引き起こす歯周病は歯科領域のみならず他の臨床分野においても重要視されており、その病因の解明と的確な治療と予防に向けた方法論の確立が急がれている重要疾患である。

一般に、歯周病は歯周組織(歯肉、歯根膜、歯槽骨、セメント質)の代謝系に異常が生じたときに発症する病態と考えられており、歯肉上皮ならびに

*¹⁾ Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Kyushu University 九州大学歯学部歯科薬理学教室

*²⁾ Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, Kyushu University 九州大学歯学部口腔細菌学教室

Offprint requests to : Kenji Yamamoto, Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

結合組織などの比較的表層に存在する歯周組織の破壊と、それに引き続いて起こる歯槽骨の破壊を特徴としている。多くの歯周病は歯周局所の常在微生物によって惹起される一種の感染症と考えられており、とくにグラム陰性嫌気性細菌群が本疾患の発症や進行に深くかかわっていることが明らかにされている。

本稿では、歯周病の病因菌としてもっとも重要視されているグラム陰性嫌気性桿菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するユニークなシステインプロテアーゼの特性と病原性について、筆者らの研究室で得ている最近の知見を紹介する。

Arg-gingipain(RGP)およびLys-gingipain(KGP)の性状

本菌が産生する強力なトリプシン様プロテアーゼ活性は二つの主要なシステインプロテアーゼによって担われていることが最近明らかにされた¹⁾。それらはペプチド結合の切断の特異性から Arg-gingipain(RGP)およびLys-gingipain(KGP)と命名されている。両酵素は大部分が菌体結合型で、一部が培養上清中に分泌型として存在する。分泌型の RGP および KGP については、筆者らを含めて国内外のいくつかの研究室において本菌株の培養上清から精製されており、それらの性状が報告されている²⁾。それぞれの酵素の生化学的性質などについては最近の総説^{2~6)}を参照していただくこととし、ここではとくに両酵素の歯周病原性を推定させる重要な性質についてのみ記述する。

分泌型酵素として精製された RGP および KGP は SH 還元剤によって強力に活性化され、ロイペプチンやヨードアセトアミドで阻害される典型的なシステインプロテアーゼであるが、通常のシステインプロテアーゼとは異なり、内在性プロテアーゼインヒビターであるシスタチンには阻害されない。さらに、両酵素はセルピンおよび tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs) および $\alpha 2$ マクログロブリンなどの他の内在性プロテアーゼインヒビターにも影響されない。このことは、菌体から遊離した両酵素が生体組織や細胞

内に侵入・拡散した後に、宿主側のプロテアーゼ活性制御系に影響されることなく活性を発現しうることを示唆している。

筆者らは、① 歯周炎患者の歯肉溝浸出液(gingival crevicular fluid: GCF)中に含まれる RGP および KGP 量が病勢に比例して増大すること、② 両酵素をモルモットやラットの皮内に注射すると炎症が惹起されること、③ 両酵素がともにタイプ I コラーゲンなどの主要な歯周組織蛋白質を強力に分解する能力を有すること^{7,8)}、さらに、④ 両酵素が pH 6.5~9.5 の範囲内(至適 pH はともに 7.5)で強い活性を有していることなどを明らかにし、それぞれの酵素が歯周ポケット内で強力な活性を発揮し歯周組織を直接破壊する可能性を示唆した。さらに、両酵素はヒト免疫グロブリン(IgG と血清型ならびに分泌型 IgA)に対して強い分解能を示すことから^{7,8)}、生体の体液性免疫機構の一部を破壊する可能性も示唆している。

両酵素の歯周病原性に関連したもう一つの重要な性質として好中球に対する強い傷害活性がある。両酵素は、オプソニン化ザイモサンで刺激した好中球のケミルミネセンス反応をシステイン存在下で濃度依存性に低下させる。ケミルミネセンス反応は活性酸素産生量に比例することから、好中球の殺菌能の指標とされている。したがって、RGP や KGP によるケミルミネセンス反応の強い抑制は好中球に対する傷害活性を表すものであり、生体防御系の破壊を意味している。

これらの結果をもとに、筆者らは、本菌から分泌された RGP や KGP が宿主側のプロテアーゼ活性制御系の捕捉から逃れ、強力なプロテアーゼ活性を発揮して歯周組織を直接破壊し、同時に広く生体防御系を破壊して歯周病原性を発揮することを示唆している。

Arg-gingipain(RGP)およびLys-gingipain(KGP)遺伝子欠損変異体を用いた機能解析

つぎに、菌体結合型の RGP ならびに KGP が本菌にとってどのような機能を担っているのが検討された。すなわち、それぞれの酵素が本菌全体の病原性にどのような形でどの程度寄与している

図 1 Effect of the disruption of RGP- and KGP-encoding genes in *P. gingivalis* on the chemiluminescence response of polymorphonuclear leukocytes (A) and the hemagglutinating activity (B)

のか等々を、それぞれの遺伝子を欠損させた変異体を作成して解析した。これまでに、*P. gingivalis* の染色体上には RGP をコードする二つの異なる遺伝子 (*rgpA* と *rgpB*)⁹⁻¹²⁾ と KGP をコードする一つの機能的な遺伝子 (*kgp*)¹³⁻¹⁵⁾ が存在することが明らかにされ、各遺伝子のヌクレオチド配列とそれに基づくアミノ酸配列の解析から、いずれの酵素も四つのドメイン構造(シグナルペプチド部、N末端プロペプチド部、プロテアーゼ活性ドメイン、C末端血球凝集素ドメイン)から構成されていることが示されている。

RGP 遺伝子については、小さいほうの遺伝子 *rgpB* は大きいほうの遺伝子 *rgpA* の C 末端領域の大部分を欠失していることを除けば、*rgpA* と本質的にはまったく同じである。RGP と KGP 遺伝子の間では、N 末端プロペプチド部やプロテアーゼ活性ドメインには相同性はほとんど認められないが、C 末端血球凝集素ドメインに相対的に高い相同性が認められている。これは、C 末端領域において両遺伝子間に遺伝子変換が生じている可能性を示唆している。筆者らは、クローン化された RGP 遺伝子および KGP 遺伝子の内部領域 DNA 断片をもつ suicide プラスミドを用いて、相同組換え法によってそれぞれの遺伝子欠損変異体を作成した^{5,10)}。

RGP 変異体については、二つの遺伝子のうちいずれか一つを欠いた一重変異体と、二つとも欠損した二重変異体を作成された。RGP の二重変異体ではその細胞抽出液や培養上清中の RGP 活性は完全に失われているのに対し、一重変異体ではそ

れらの活性は著しく減少するものの依然として野生株の 10% 程度の活性を保持していた。これと呼応する形で、二重変異体は好中球に対する傷害活性や血球凝集素活性のほとんどを消失しているのに対し、一重変異体はそれらの活性を一部残していた(図 1)。また、二重変異体では野生株で見られる細胞表層の線毛構造が著しく減少しており、これらを構成する菌体表層蛋白質の細胞内輸送になんらかの欠陥を生じていることが示唆された¹⁶⁾。

そこで、線毛を構成する主要な蛋白質であるフィンブリリンと宿主細胞への接着に同様に関与すると考えられている免疫原性の 75 K 表層蛋白質のプロセッシングと細胞内輸送機構に RGP が関与しうのか否かを、ウェスタンブロッティング法と N 末端アミノ酸シーケンス解析によって調べた。その結果、二重変異体では野生株や一重変異体とは異なり、それぞれの前駆体蛋白質(45 K プレフィンブリリンおよび 78 K 表層蛋白質)が成熟型分子に変換するために行われる限定的な蛋白質分解が、本来の切断部位(プレフィンブリリン: Arg46-Ala47, 78 K 表層蛋白質: Arg44-Ala45 の間)で起こらず、それぞれがさらに上流の N 末端側(プレフィンブリリン: Lys40-Thr41, 78 K 表層蛋白質: Lys17-Gly18 の間)で起こっていることがわかった⁵⁾。すなわち、二重変異体ではこれらの表層蛋白質は RGP による正常なプロセッシングを受けることができないので細胞内輸送に障害をきたし、菌体表層へ局在できないものと思われる。このことは、RGP がそれ自身の直接的な病原性機能に加えて、本菌に必須のこれら菌体表層蛋白質

図2 Location of HGP15 domain in *rgp1*, *kgp*, and *hagA* genes(A) and nucleotide and amino acid sequences around the HGP15 region of *rgp1*

Arrows in the panel A indicate the location of amino acid sequences identical to the N-terminal sequence of the 19 K protein. Solid and intermittent lines under the amino acid sequence in the panel B indicate the N-terminal sequences of the 19 K proteins obtained from the wild type strain and the RGP-null mutant respectively. The sequence around HGP 15 is according to Pavloff et al.(1995).

のプロセッシングを介して本菌の病原性に間接的な形で寄与していることを示唆している。

一方、KGP の欠損変異体では、KGP 活性が細胞内および培養上清で完全に消失しているにもかかわらず、RGP 二重変異体でみられたような好中球傷害活性や血球凝集素活性の低下はほとんど認められなかった(図1)。すなわち、KGP はこれらの機能を担う病原性因子の産生に直接的には関与しないと考えられる。ところが、KGP 変異体では、野生株やすべての RGP の変異体でみられたような血液寒天平板上での黒色コロニーの形成が観察されなかった^{5,17)}。黒色コロニーの形成は、菌体表面への赤血球の結合と菌体表面層でのヘモグロビンの蓄積を反映すると考えられており、この形成能の欠如によって、本菌の増殖や成長に必須のヘムの菌体内への取込みの不足が生じることになる。つまり、KGP は *P. gingivalis* におけるヘムの

取込みや蓄積に関与することによって本菌の病原性に寄与するものと想像される¹⁷⁾。このことは以下のような実験によってさらに検証された。

血液寒天培地上で培養した野生株を SDS ゲル電気泳動で調べると、分子量 19 K の位置に強い蛋白バンドが検出される¹⁸⁾。この蛋白質は N 末端アミノ酸シーケンス解析から、KGP および RGP、ならびに血球凝集素(*hagA* 遺伝子産物)の C 末端領域に含まれ、HGP15 に相当するサブドメイン蛋白質であることがわかった(図2)。そこで HGP15 を過剰発現させた大腸菌から蛋白質を精製してヘモグロビン結合能を調べてみた。

実験は、ヘモグロビンをリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーや表面プラズモン共鳴を用いたバイオセンサーによって行われた。その結果、HGP15 は先に報告された *P. gingivalis* 表面のヘモグロビン結合蛋白質(HbBP)¹⁹⁾

図3 Binding of HGP15 to hemoglobin immobilized on a BIAcore biosensor(A) and SDS-PAGE and immunoblot analysis using anti-HGP15 antiserum(B)

In the panel A, plotted in overlay is the resonance signal(RU) as a fraction of a time for several concentrations of HGP15($\mu\text{g/ml}$) injected into the system. Linear lines above the horizontal axes indicate injection periods of HGP15-containing buffer. In the panel B, HGP15 purified from HGP-overproducing *E. coli* and HbBP purified from *P. gingivalis* were subjected to SDS-PAGE and stained with CBB(a). Proteins on the gels were further subjected to immunoblot analysis with anti-HGP antiserum(b). lane 1: HGP15, lane 2: a mixture of HGP15 and HbBP, lane 3: HbBP

と同一のもので、ヘモグロビンを弱酸性下で強力に結合することが証明された(図3)。また、HGP15は黒色色素を産生しない *P. gingivalis* 変異体ではほとんど検出されないことなどから¹⁸⁾、本菌にとってのヘモグロビン受容体蛋白質(HbR)として機能していると考えられる。HbR蛋白質はRGPをコードする遺伝子 *rgp1*, KGPをコードする遺伝子 *kgp*, および血球凝集素をコードする遺伝子 *hagA* の初期遺伝子産物に含まれていること

から、これらからプロテオリシスによって切り出されて産生されるものと考えられているが、この分解にKGPがどのように関与しているのかは現在のところ明確ではない。ただ、HbR蛋白質のC末端がLys残基であることから、KGPはこの部位の切断を担っている可能性がきわめて高い。

さらにKGP欠損変異体では、野生株やRGP変異体で観察されるフィブリノーゲン分解活性の著しい低下がみられた。フィブリノーゲンが血液凝固系の重要な因子であることを考えると、KGPがフィブリノーゲンの分解を介して歯周炎局所の出血傾向を惹起している可能性が考えられ、KGPのもう一つの重要な病原性機能と考えられる。

文 献

- 1) Potempa J, Pike R, Travis J: The multiple forms of trypsin-like activity in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect. Immun.* 63: 1176-1182, 1995.
- 2) Yamamoto K, Kadowaki T, Okamoto K: Arg-gingipain and Lys-gingipain. A novel class of cysteine proteinases. In: *Proteases; Molecular and Cellular Biology Updates*. (ed. Turk V), Birkhäuser, Basel, 1998. (in press)
- 3) 山本健二: 歯周病原性プロテアーゼの構造と機能. *日薬理誌* 105: 299-355, 1995.
- 4) Yamamoto K., Kadowaki T, Okamoto K, Abe N, Nakayama K: Biological roles of a novel class of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease progression. In: *Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors*. (ed. Katunuma N, Kido H, Fritz H, Travis J), IOS Press, Amsterdam, 1997, p 139-149.
- 5) 山本健二, 門脇知子, 岡元邦彰, 中山浩次: 歯周病原性プロテアーゼの構造と機能の解析. *プロテオリシス—蛋白質分解の分子機構とバイオロジー*. 鈴木紘一, 木南英紀, 田中圭司編, 共立出版, 1997, p 299-306.
- 6) Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J: *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J. Periodont. Res.* 32: 120-125, 1997.
- 7) Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K: Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 269: 21371-21378, 1994.
- 8) Abe N, Kadowaki T, Okamoto K, Nakayama K, Ohishi M, Yamamoto K: Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase(Lys-gingipain) as a virulence factor of

- Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. J. Biochem. 123 : 301-312, 1998.
- 9) Okamoto K, Misumi Y, Kadowaki T, Yoneda M, Yamamoto K, Ikehara Y : Structural characterization of argingipain, a novel arginine-specific cysteine proteinase as a major periodontal pathogenic factor from *Porphyromonas gingivalis*. Arch. Biochem. Biophys. 316 : 917-925, 1995.
 - 10) Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K, Yamamoto K : Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase(Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis* : evidence for significant contribution of argingipain to virulence. J. Biol. Chem. 270 : 23619-23626, 1995.
 - 11) Nakayama K : Domain-specific rearrangement between the two Arg-gingipain-encoding genes in *Porphyromonas gingivalis* : possible involvement of nonreciprocal recombination. Microbiol. Immunol. 41 : 185-196, 1997.
 - 12) Pavloff N, Potempa J, Pike R, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J, Barr PJ : Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 270 : 1007-1010, 1995.
 - 13) Okamoto K, Kadowaki T, Nakayama K, Yamamoto K : Cloning and sequencing of the gene encoding a novel lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) in *Porphyromonas gingivalis* : structural relationship with arginine-specific cysteine proteinase(Arg-gingipain). J. Biochem. 120 : 398-406, 1998.
 - 14) Barkocy-Gallagher GA, Han N, Patti JM, Whitlock J, Progulske-Fox A, Lantz MS : Analysis of the *prtP* gene encoding porphypain, a cysteine proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 178 : 2734-2741, 1996.
 - 15) Pavloff N, Pemberton PA, Potempa J, Chen W-C A, Pike RN, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J, Barr PJ : Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain. J. Biol. Chem. 272 : 1595-1600, 1997.
 - 16) Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T, Yamamoto K : Involvement of arginine-specific cysteine proteinase(Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 178 : 2818-2824, 1996.
 - 17) Okamoto K, Nakayama K, Kadowaki T, Abe N, Ratnayake DB, Yamamoto K : Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 273 : 1997. (in press).
 - 18) Nakayama K, Ratnayake DB, Tsukuba T, Kadowaki T, Yamamoto K, Fujimura S : Haemoglobin receptor protein is intragenetically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*. Mol. Microbiol. 27 : 51-61, 1998.
 - 19) Fujimura S, Shibata Y, Hirai K, Nakamura T : Binding of hemoglobin to the envelop of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. Infect. Immun. 64 : 2339-2342, 1996.