歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* システインプロテアーゼ(gingipains)

—構造, 病原作用および歯周炎予防・治療への有用性—

今村隆寿*

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Cysteine proteinases (gingipains) from Porphyromonas gingivalis, the causative bacterium of periodontitis : Structure, pathogenic functions and availability for periodontitis control

Periodontitis results in degradation of periodontal connective tissue and subsequent detachment of the tissue to teeth, and is the main cause of teeth loss. Preventive and therapeutic methods, however, have not been established against the dental disease. *Porphyromonas gingivalis* is the major causative bacterium of adult periodontitis and the bacterial “trypsin-like” proteinases attract attention as virulence factors. As the “trypsin-like” proteinases, two arginine-specific (gingipain R) (50 kDa and 95 kDa) and one lysine-specific (gingipain K) (105 kDa) cysteine proteinases are purified from the bacterium, the larger proteinases being complexed with adhesin/hemagglutinin domains. Gingipain pathogenic functions were introduced, especially on vascular permeability enhancement induction through prekallikrein activation and subsequent release of bradykinin, fibrinogen degradation and thrombin production through factor X activation. These gingipain functions are closely associated with gingival crevicular fluid production, neutrophil accumulation, bleeding tendency, connective tissue and alveolar bone degradation, etc. at periodontitis sites. Thus, gingipains are likely to play a crucial role in the pathogenesis and development of periodontitis, therefore, possible targets in periodontitis control. Immunization using gingipains or their fragments and gingipain specific inhibitor administration will be available for periodontitis prevention and therapy.

Rec. 3/9/1998, Acc. 3/23/1998, pp 335~340

Takahisa Imamura*

key words : *Porphyromonas gingivalis*, periodontitis, cysteine proteinase, pathogenesis, therapy

歯周組織の炎症にはじまり結合組織の分解, 剥離とこれに引き続く歯槽骨の破壊という経過をたどる歯周炎は, 成人の罹患率が30%以上と著しく高く, 齲歯が減少した今日歯牙喪失の主要な原因と

なっている。歯は食物の咀嚼のみならず発音にも不可欠であり, 日常生活と密接に結びついた重要な器官である。しかし, 歯牙喪失が死と直接結びつかないためか, 日本での歯周炎に対する関心は欧米に比べてきわめて低い。ところが, 歯周炎罹患が heart attack の high risk factor (通常の2.7倍) であるという疫学調査の結果が Science (1997年4月11日号) に掲載されてから, 内外の研究者は本疾患の重大性を一層認識するようになった。

* Division of Molecular Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University 熊本大学大学院医学研究科脳・免疫統合系分子病理学講座
Offprint requests to : Takahisa Imamura, Division of Molecular Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan

A. Gingipain polypeptide のアミノ酸配列とドメイン構造

B. 分泌型 gingipain の構造

図 1 Gingipain の構造的特徴

老齢まで歯を健全に保持することは“quality of life”の大事な要素であり、高齢化社会への移行が急激に進行する日本では歯周炎の治療法の開発は緊急の課題となっている。

歯周炎の原因として細菌感染が従来より推測されてはいたが、本疾患が寛解と増悪を繰り返しながら長い経過をたどることと宿主の免疫反応が組織破壊の主因と考えられていたことなどから長い間原因菌の同定に至らなかった。最近になり、患部より高頻度に検出されかつ菌接種によって病態が再現されることから、*Porphyromonas gingivalis* が成人型歯周炎のもっとも有力な原因菌とみなされている¹⁻³⁾。*P. gingivalis* はグラム陰性、偏性嫌気性、無芽胞、無鞭毛の球桿菌であるが、この菌が多量に産生するプロテアーゼ、特にトリプシン様プロテアーゼがこの菌の病原性と強い相関を示すことから重要な病原因子として注目されている⁴⁾。

本総説では、*P. gingivalis* トリプシン様プロテアーゼ(gingipains)のほかに類をみない独特の構造と歯周炎病態に関連するさまざまな機能を紹介し、gingipains に対するワクチンや特異的インヒビターによる歯周炎予防と治療の可能性について述べる。

P. gingivalis プロテアーゼの構造的特徴

筆者らのグループは、病原性 *P. gingivalis* 株から Arg 残基の C-末端側を切断する gingipain R 二つと Lys 残基の C-末端側を切断する gingipain K 一つを精製し^{5,6)}、“トリプシン様”プロテアーゼ活性がこの 2 種類のシステインプロテアーゼによることを示した⁷⁾。その後、遺伝子クローニングにより三つの gingipains のアミノ酸配列が解明されると、gingipains が今まで報告されたシステインプロテアーゼとは異なる新たなプロテアーゼであることがわかった⁸⁻¹⁰⁾。

図2 RGP-2による正常および欠損血漿からの血管透過性亢進活性の産生

RGP-2 50 μ l を 1,10-phenanthroline 2 mM を添加した血漿 50 μ l に加えて 25°C, 5 分間温置した後, 1,10-phenanthroline 2 mM を添加した 10 mM トリスバッファー pH 7.3, 150 mM NaCl(TBS) 400 μ l を加えた。その 100 μ l をエバンスブルー (30 mg/kg 体重) を静注した直後のモルモットに皮内注射し, 10 分後に脱血死させ皮膚を採取した。Nor. Pla. は正常血漿, HF-def., PK-def., HMWK-def. はおのおのハーゲマン因子, プレカリクレイン, 高分子キヌノーゲン欠損血漿を示す。モル濃度は温置時の RGP-2 濃度, TBS は RGP-2 の代わりに希釈に用いた TBS を加えたことをあらわす。(文献¹²⁾参照)

50 kDa-gingipain R(RGP-2), 95 kDa-gingipain R(RGP-1), gingipain K(KGP)はおおの 736 個, 1704 個, 1723 個のアミノ酸からなる蛋白質として合成される(図1)。RGP-2 は pre-propeptide と catalytic domain よりなるが, RGP-1 と KGP はさらに adhesin/hemagglutinin domains が存在する polyproteins である。Catalytic domain を比較すると, RGP-1 と RGP-2 のアミノ酸配列は 360 番目までの相同性が 98% ときわめて類似しているが, RGP-1 と KGP の相同性はわずか 22% である⁸⁻¹⁰⁾。一方, adhesin domains は基質特異性がまったく異なるにもかかわらず RGP-1 と KGP 間で高い相同性がみられ, この部分のほぼ 6 割を占める HGP15, HGP17, HGP27 はまったく同じである。異なる HGP44 と HGP27/44 でさえ N 末端から 166 番目までは HGP27 の N 末端部分の配列と同じで, 残りは HGP44 の C 末端部分の配列である。

興味深いことに, RGP-2 は一本鎖蛋白質だが, RGP-1 と KGP は catalytic domain と adhesin domain が非共有結合で結合した複合体としておのおの 3 種類が分泌される(図1)。したがって, prepropeptide が切断されたあと, RGP-1 と KGP ではさらに各 domain 間に切断が起こり分泌されるまでの間に catalytic domain と adhesin domain との再結合が起こると推定される。

Hemagglutinin 活性を合わせ持つプロテアー

ゼはきわめて特殊であり, *Vibrio cholerae* のメタロプロテアーゼ¹¹⁾が唯一報告されているだけでシステインプロテアーゼは RGP-1 と KGP が最初である。Hemagglutinin 活性に携わる adhesin domains は, プロテアーゼ機能との関係がいまだ十分解明されておらず, 今後の興味深い課題である。

Gingipains の病態生理学的機能と歯周炎における役割

(1) プラディキニン産生

RGP-1, 2) と反応させた正常ヒト血漿をモルモットに皮内注射すると, 1 nM からプロテアーゼ活性に依存して血管透過性亢進活性が認められる¹²⁾。この血管透過性亢進活性は抗ヒスタミン剤では抑制されず, プレカリクレインやキヌノーゲンの欠損血漿からは産生されない(図2)ので, RGP-1, 2) がプレカリクレインをカリクレインに変換し, カリクレインが高分子キヌノーゲンから強力な血管透過性亢進因子プラディキニンを産生していること¹²⁾がわかる。RGP-1 と RGP-2 間でこの作用の差はみられない。*P. gingivalis* 粗抽出液や分泌小胞のもつ血管透過性亢進活性は RGP-1, 2) に対する特異的なインヒビターでほとんど抑制されるので, RGP-1, 2) は本菌の主要な血管透過性亢進因子である^{12,13)}。

特記すべきことに, 単独では正常血漿から血管

表 1 Gingipains の病原作用と関連病態

病原作用	Gingipain	作用機序	関連病態
ブラディキニン産生	RGPs>HGP+KGP	プレカリクレイン活性化 キニノーゲンからの放出	歯肉溝滲出液増加, 歯肉浮腫, 歯槽骨吸収
フィブリノーゲン/フィブリン分解	KGP>RGP-1 >RGP-2	adhesin domains を介した結 合と分解	易出血性, 炎症進展
凝固第X因子(FX)活性化	RGP-1>RGP-2	adhesin domains を介したリ ン脂質結合とFX 限定分解	歯槽骨吸収, 炎症進展, DIC 発症(?), heart attack(?)
C5a 産生	RGPs	補体第5因子限定分解	白血球浸潤, 組織破壊
オプソニン C3b 産生阻害	RGPs	補体第3因子分解	白血球貪食能抑制
マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-1, -3, -9 活性化	KGP	MMP 前駆体の限定分解	間質結合組織破壊, 歯周ポケッ ト形成
間質蛋白質結合・分解	RGP-1, KGP	adhesin domains を介した結 合と分解	間質破壊, 歯周ポケット形成

透過性亢進活性を産生しない KGP は RGPs が共存するとプレカリクレイン欠損血漿からも血管透過性亢進活性を産生した¹³⁾。KGP と RGPs とが高分子キニノーゲンの Lys₃₆₂ と Arg₃₇₁ の C 末端側をおのおの切断することによりブラディキニンを遊離させると考えられ, gingipains の共同作用として注目に値する。こうして産生されたブラディキニンの血管透過性亢進作用により, RGPs は歯周炎局所でみられる歯肉溝滲出液の増加や歯肉浮腫を引き起こしていると推察される。また, ブラディキニンは破骨細胞による骨吸収を誘導作用¹⁴⁾もあるので, RGPs は歯槽骨吸収にもかかわっている可能性がある。

(2) フィブリノーゲン/フィブリン分解作用

精製したフィブリノーゲンに対して, KGP はプラスミンに比肩する分解活性を示すが, RGPs の活性はさらに強い¹⁵⁾。ところが, ヒト血漿トロンビン時間の延長で測定した血漿中でのフィブリノーゲン分解活性では, RGP-2 と比較して RGP-1 の活性は 2~3 倍であり KGP は 13 倍であった¹⁵⁾。これは, adhesin domains によってフィブリノーゲンに対する結合性が高まっていること¹⁶⁾と, 血漿中では KGP が RGPs よりフィブリノーゲン親和性が高いことによる。しかも, KGP は α_2 -マクログロブリンを含めた血漿プロテアーゼインヒビターの抑制をほとんど受けないので *in vivo* においてはもっとも強力なフィブリノーゲン分解酵素であろう。Gingipains はさらにフィブリン溶解活性もあることから, 歯周炎病変部の易出血性への

関与は十分考えられる。フィブリン分解産物が種々の起炎作用をもつこと¹⁷⁾や歯肉溝滲出液中の分解を受けていないフィブリン量と歯周炎の臨床パラメーターとは負の相関がみられること¹⁸⁾から, gingipains によるフィブリノーゲン/フィブリン分解作用は歯周炎の進展にもかかわっていると推測される。

(3) 血液凝固第X因子(FX)活性化作用

RGPs はヒト血漿の凝固時間を短縮するので凝固誘導作用があることがわかる¹⁹⁾。しかし, FX 欠損血漿を用いた場合だけは短縮がみられなかった¹⁹⁾。そこで, ヒト FX 活性化作用を調べてみると, 凝固誘導活性とよく相関して RGP-1 のほうが RGP-2 よりも約 5 倍の活性型 FX(FXa)を産生した¹⁹⁾。さらに, カルシウムイオンとリン脂質が共存すると RGP-1 の FX 活性化作用は 7~8 倍亢進した¹⁹⁾。しかし, リン脂質と結合しない RGP-2 では亢進はみられなかった。カルシウムイオンは RGP-1 のリン脂質への結合にも活性作用にも関係しない。この現象には adhesin domains のリン脂質への結合とカルシウムイオンによる FX 構造変換との両方が関与していると思われる。

RGPs の凝固誘導作用とフィブリノーゲン/フィブリン分解作用は一見相反するようにみえる。しかし, FXa によってプロトロンビンから産生されるトロンビンには, フィブリノーゲンをフィブリンに変えて血液凝固を起こす作用だけでなく, 血管透過性亢進作用や白血球遊走作用を含めた多彩な起炎作用がある²⁰⁾。なかでも, 骨吸収²¹⁾

や骨芽細胞のプロスタグランディン合成刺激作用²²⁾は、歯牙喪失を起こす歯槽骨の破壊につながる作用として歯周炎への関与が考えられる。さらに、トロンビンやFXaには血管内腔狭小化に関係する血管内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞増殖誘導作用²⁰⁾があり、歯周炎患者の高いheart attack率との関連をうかがわせる。また、*P. gingivalis*が属する *Bacteroidaceae* に起因する敗血症でDIC発症がみられたこと^{23,24)}から、RGPのFX活性化はDIC発症の一機序としても想定される。

(4) その他の作用

RGPは、補体因子C5から強力な白血球遊走因子C5aを産生する一方C3を分解してオプソニンC3bの産生を妨げる²⁵⁾。これらの作用は、*P. gingivalis*が自らは白血球からの貪食を免れながら白血球浸潤を起こして白血球のプロテアーゼなどによる歯周囲組織破壊を誘導することにつながる。RGP-1とKGPはフィブリノーゲン、フィブロネクチン、ラミニンに対して強い親和性(解離定数は4~8 nM)と分解能を示し¹⁶⁾、また宿主細胞膜表面にあるリン脂質に結合する。これらの複合体gingipainsはadhesin domainsで間質蛋白質に結合しその分解を効果的に行うのみならず、*P. gingivalis*の宿主細胞との付着に重要な役割を果たしているのかもしれない。

KGPはmatrix metalloproteinase-1(MMP-1)、MMP-3、MMP-9を活性化し、MMP-3によるMMP-1の活性化を促進する²⁶⁾。この作用により、KGPは間接的に結合組織を破壊し、歯周ポケット形成や歯肉の退縮を促していると推察される。

Gingipains をターゲットにした歯周炎治療法の開発

表1に総括されるように、gingipainsのさまざまな機能は歯周炎の病態およびその進展と密接に結びついている。特に、RGPは、その遺伝子を不活化したミュータント *P. gingivalis* の病原性が野生型と比較して減弱する^{27~29)}ことでも明らかである。それゆえ、gingipainsの機能抑制は、歯周炎に対する有効な治療法として期待される。

そこでまず考えられるのが抗体による抑制である。RGP-1で免疫したマウスに *P. gingivalis* を感染させると、未免疫マウスに比較して死亡率や体重減少などに改善がみられワクチンの効果が確かに認められた。しかし、gingipainsが抗体分解作用をもつこととcatalytic domainに対する抗体ができにくいいため、産生された抗体でプロテアーゼ活性は十分には抑えられずgingipainsの病原作用抑制は完全ではなかった。そこで、RGP-1 catalytic domain部分のペプチドによる免疫を行ったところ、マウスを *P. gingivalis* 感染から完全に防御する抗体産生が得られた。この結果は、gingipain ペプチドワクチンによる歯周炎治療さらには予防が将来有望であることを示唆する。

つぎに考えられるのは特異的なインヒビターによる抑制である。現在開発されているインヒビターのなかで、D-Phe-Pro-Arg-CH₂ClとD-Phe-Phe-Arg-CH₂ClがRGPに対して、Cbz-Phe-Lys-CH₂OCO-2, 4, 6-Me₃-PhがKGPに対して特異性が高く、 K_{ass} が $10^6 \sim 10^7$ /M/secで通常の合成インヒビターの100~1000倍の値を示す³⁰⁾。ただし、これらのインヒビターは毒性があり *in vivo* への応用にはさらに改良が必要であるが、gingipains構造の特殊性から高度の特異性をもつインヒビター開発の可能性は非常に高い。このようにgingipainsをターゲットにした免疫療法やインヒビター開発は歯周炎予防・治療法確立に多大な貢献をするのは間違いなく、今後の発展が大きいと期待される。

文 献

- 1) Spiegel CA, Hayduk SE, Minah GE, Krywolap GN: Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. J. Periodont. Res. 14: 376-382, 1979.
- 2) Zambon JJ, Reynolds HS, Slots J: Black-pigmented *Bacteroides* Spp. in the human oral cavity. Infect. Immun. 32: 198-203, 1981.
- 3) Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornmann KS: Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. Science(Wash. DC) 239: 55-57, 1987.
- 4) Marsh PD, McKee AS, McDermid AS, Dowsett AB: Ultrastructure and enzyme activities of a virulent and an avirulent variant of *Bacteroides*

- gingivalis* W50. FEMS Microbiol. Lett. 59 : 181-186, 1989.
- 5) Chen Z, Potempa J, Polanowski A, Wirkstrom M, Travis J : Purification of a 50-kDa cysteine proteinase (Gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 267 : 18896-18901, 1992.
 - 6) Pike R, McGraw W, Potempa J, Travis J : Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 269 : 406-411, 1994.
 - 7) Potempa J, Pike R, Travis J : The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. Infect. Immun. 63 : 1176-1182, 1995.
 - 8) Pavloff N, Potempa J, Pike RN, Pochazka 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.
 - 9) Pavloff N, Pemberton PA, Potempa J, Chen W-CA, Pike RN, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J, Barr PJ : Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* lysin-specific gingipain. J. Biol. Chem. 272 : 1595-1600, 1997.
 - 10) 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.
 - 11) Booth BA, Boesman-Finkelstein M, Finkelstein RA : *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme. Infect. Immun. 42 : 639-644, 1983.
 - 12) Imamura T, Pike RN, Potempa J, Travis J : Pathogenesis of periodontitis : A major specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. J. Clin. Invest. 94 : 361-367, 1994.
 - 13) Imamura T, Potempa J, Pike RN, Travis J : Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 63 : 1999-2003, 1995.
 - 14) Lerner UH, Jones IL, Gustafson GT : Bradykinin, a new potential mediator of inflammation-induced bone resorption. Studies of the effects on mouse calvarial bones and articular cartilage in vitro. Arthritis Rheum. 30 : 530-540, 1987.
 - 15) Imamura T, Potempa J, Pike RN, Moore JN, Barton MH, Travis J : Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation : Implications for bleeding tendency at periodontitis sites. Infect. Immun. 63 : 4877-4882, 1995.
 - 16) Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer THT, Travis J : Characterization of the binding activities of proteinase-adhesion complexes from *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 178 : 2876-2882, 1996.
 - 17) Kazura JW, Wenger JD, Salata RA, Budzynski AZ, Goldsmith GH : Modulation of polymorphonuclear leukocyte microbicidal activity and oxidative metabolism by fibrinogen degradation products D and E. J. Clin. Invest. 83 : 1916-1924, 1989.
 - 18) Talonpoika JT, Söderling E, Paunio K : Characterization of fibronectin and fibrin(ogen) fragments in gingival crevicular fluid. Scand. J. Dent. Res. 101 : 26-32, 1993.
 - 19) Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J : Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 272 : 16062-16067, 1997.
 - 20) 今村隆寿 : 血液凝固反応と炎症・免疫. 日本血栓止血学会誌 7 : 268-285, 1996.
 - 21) Lerner UH, Gustafson GT : Blood coagulation and bone metabolism : Some characteristics of the bone resorptive effects of thrombin in mouse calvarial bones *in vitro*. Biophim. Biophys. Acta 964 : 309-318, 1988.
 - 22) Feyen JHM, Van der Wilt G, Moonen P, Di Bon A, Nijweide PJ : Stimulation of arachidonic acid metabolism in primary cultures of osteoblast-like cells by hormones and drugs. Prostaglandins 28 : 769-781, 1984.
 - 23) Currie WJR, Ho V : An unexpected death associated with and acute dentoalveolar abscess—report of a case. Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 31 : 296-298, 1993.
 - 24) Yoshikawa TT, Chow AW, Guze LB : Bacteroidaceae bacteremia with disseminated intravascular coagulation. Am. J. Med. 56 : 725-728, 1974.
 - 25) Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE : Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (Gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. J. Biol. Chem. 267 : 18902-18907, 1992.
 - 26) DeCarlo AA, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H : Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. J. Dent. Res. 76 : 1260-1270, 1997.
 - 27) Schenkein HA, Fletcher HM, Bodnar M, Macrina FL : Increased opsonization of a prTH-defective mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83 is caused by reduced degradation of complement-derived opsonins. J. Immunol. 154 : 5331-5337, 1995.
 - 28) Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K, Yamamoto K : Construction and characterization of arginine-specific cyateine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis* : Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. J. Biol. Chem. 270 : 23619-23626, 1995.
 - 29) Fletcher HM, Schenkein HA, Morgan RM, Bailey KA, Berry CR, Macrina FL : Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W83 mutant defective in the prTH gene. Infect. Immun. 63 : 1521-1528, 1995.
 - 30) Potempa J, Pike R, Travis J : Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (Gingipains) using peptidyl chloromethane. Biol. Chem. H-S 348 : 223-230, 1997.