

Porphyromonas endodontalis が産生する 新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼの解析

原賀 裕

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任 : 木村 重信 教授)

(受付 : 2008年11月16日)

(受理 : 2008年12月 5 日)

Abstract : *Porphyromonas endodontalis*, a black-pigmented anaerobe, is a predominant pathogen of human periapical periodontitis. In contrast to *P. gingivalis*, a major pathogen of chronic periodontitis, the pathogenic factor(s) of *P. endodontalis* has been poorly characterized. In this study, the protease activities in the *P. endodontalis* extracellular fraction were examined using various MCA polypeptides. The results indicated that the extracellular fraction had a spectrum of proteolytic activities distinct from that of *P. gingivalis*, and that Ala- and Asp-specific proteolytic activities were substantially present in the extracellular fraction. Then, the extracellular fraction was subjected to ion-exchange chromatography. The Asp-specific proteolytic activity was eluted from a DEAE-Sephacel column separately from the Ala-specific one, and the fraction was designated as the DEAE-purified fraction. The further experiments on the effects of protease inhibitors also suggested that the DEAE-purified fraction contains a novel Asp-specific dipeptidylpeptidase. It was confirmed by the MALDI-TOF MS analyses on the substrate preference using neuromedin B and a series of synthetic neuromedin B analogues. Taken together, *P. endodontalis* possesses a novel Asp-specific dipeptidylpeptidase in the extracellular fraction, which could be involved in an important etiologic process in the specific pathological potential of this organisms in human periapical periodontitis.

Key words : *Porphyromonas endodontalis*, protease, Asp-specific dipeptidylpeptidase

緒 言

Porphyromonas endodontalis は, 1984 年, van Winkelhoff らの研究グループによりヒトの歯根膿瘍病巣部から分離・同定された細菌¹⁾である。当初, 本菌は *Bacteroides* 属に分類され

ていたが, 類縁の *P. gingivalis* とともに, 後に *Porphyromonas* 属に再分類された²⁾。*P. endodontalis* は, 特異的に, 急性症状(痛み, 腫脹, 排膿等)をともなう感染根管/根尖性歯周炎から分離される³⁾ことから, 根尖性歯周炎の主要な原因菌の一つと考えられている⁴⁾。一方,

A novel Asp-specific dipeptidylpeptidase produced from *Porphyromonas endodontalis*

Hiroshi HARAGA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuodori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

慢性（成人性）歯周炎の原因菌である *P. gingivalis* は、感染根管／根尖性歯周炎からの分離頻度は低いことが示されている^{5,6)}。細菌学的には *P. endodontalis* はグラム陰性桿菌で、黒色色素産生性、糖非発酵性という点では *P. gingivalis* と一致するが、トリプシン様活性とヒツジ赤血球凝集能を欠き、また最終生産物としてフェニル酢酸を産生しない点で異なると報告されている^{7,8)}。宿主細胞への病原性という点では、*P. endodontalis* の培養上清が歯髄由来の線維芽細胞や骨芽細胞に対して炎症を誘導／進展させる作用を有すること⁹⁻¹¹⁾、代謝産物である酪酸が歯髄線維芽細胞に対して細胞毒性を示すこと¹²⁾、また、*P. endodontalis* の LPS (lipopolysaccharide) が、大腸菌の LPS より活性は弱いものの、歯髄細胞あるいは好中球に対して炎症性サイトカインの産生を誘導することも報告されている^{13,14)}。しかし、これらの病原活性のほとんどが *P. gingivalis* あるいは *Prevotella intermedia* にも認められていることから、根尖性歯周炎の原因菌としての本菌の病原特異性と直接的に関連する可能性は低い。

我々の研究グループでは、*P. endodontalis* の病原特異性に関わる病原因子について、臨床的に明確な病原性の違いがある *P. gingivalis* のそれと比較検討を行ってきた。その結果、*P. endodontalis* は歯肉上皮細胞、GE1 への付着能を有するものの、付着率は *P. gingivalis* に比して有意に低いことが明らかとなった。また、電子顕微鏡観察では線毛様構造は認められず、さらに、*P. gingivalis* 線毛の主要な構成タンパク質であるフィンブリリンをコードする遺伝子 (*fimA*) を対象とした PCR および DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析でも、*P. endodontalis* ゲノム DNA 上には *fimA* 様遺伝子の存在は認められなかった¹⁵⁾。さらに、種々の MCA ペプチド合成基質を用いてプロテアーゼ活性について検討した結果からは、*P. endodontalis* のプロテアーゼ活性スペクトラムが *P. gingivalis* のそれとは大きく異なることが明らかとなり、*P. endodontalis* が、*P. gingivalis*

とは異なるプロテアーゼ（群）を産生している可能性が強く示唆された。糖非発酵性の *P. endodontalis* や *P. gingivalis* にとってプロテアーゼは、血漿や歯周組織由来のタンパク質をペプチドやアミノ酸に分解し、これらを菌体内に取り込んで栄養源として利用するための重要な因子であるが、同時に、宿主組織／細胞を傷害する病原因子となる^{16,17)}。*P. gingivalis* の産生するプロテアーゼとしては、gingipain と呼ばれる一群のプロテアーゼが知られており、歯周組織の破壊との関連性が示唆されている^{18,19)}。さらに *P. gingivalis* は複数のペプチダーゼ^{20,21)} も産生することが示されており、gingipain を含むこれらのプロテアーゼ活性が *P. gingivalis* の病原特異性の一面を規定していることが示唆される。

そこで本研究では、これまでの我々の研究グループの研究成果をもとに、*P. endodontalis* が特異的に産生するプロテアーゼの同定を試みた。その結果、*P. endodontalis* の菌体外画分中にこれまで報告のない新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼ (dipeptidylpeptidase) が存在することが明らかとなった。

材料および方法

供試菌株の培養および粗プロテアーゼ画分の調製

P. endodontalis ATCC 35406 株、*P. gingivalis* ATCC 33277 株は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入し実験に供した。菌株を、Suzuki らの方法²²⁾ を一部改変し、メナジオン (1.0 µg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を添加した ABCM ブイヨン培地 (栄研化学、東京) に播種し、嫌気培養システム (日本ベクトン・ディッキンソン、東京) を用いて嫌気的条件下 (90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂) で 37°C、72 時間前培養した。培地成分の混入を排除して *P. endodontalis* が産生するプロテアーゼを回収する目的で、既報²³⁾ に従って、前培養した菌液を 72 時間、嫌気的条件下

下で透析膜上培養した。得られた透析膜 (cut-off 値 = 12,000 - 14,000 Da, 三光純薬, 東京) 上の菌体を Na リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を用いて回収した後, さらに PBS を添加して PBS 菌懸濁液 ($A_{600} = 1.0$) を調製した。PBS 菌懸濁液を 4°C, 6,300 x g, 15 分間遠心し, 得られた上清を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析し, *P. endodontalis* の菌体外粗プロテアーゼ画分を得た。粗プロテアーゼ画分は -80°C で保存した。

4-Methylcoumaryl-7-amid (MCA) ペプチド合成基質, neuromedin B と変異型 neuromedin B およびプロテアーゼ阻害剤

Table 1 に示した基質 #1 から #6 を含む 71 種類の MCA ペプチド合成基質は市販 (ペプチド研究所, 大阪) のものを購入し使用した。

Neuromedin B は市販 (ペプチド研究所) のものを用いた。また, 変異型 Asp₁, Asp₂, Asp₃, Asp₅-neuromedin B (Table 3) はベックス株式会社 (東京) に合成依頼した。

プロテアーゼ阻害剤としては, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 和光純薬, 大阪: メタロプロテアーゼ阻害剤), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma: セリンプロテアーゼ阻害剤), N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, Sigma: セリンプロテアーゼ阻害剤), N- ρ -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, Sigma: セリンプロテアーゼ阻害剤), leupeptin (ペプチド研: セリンおよびチオールプロテアーゼ阻害剤) および E-64 (ペプチド研: システインプロテアーゼ阻害剤) を用いた。

P. endodontalis 粗プロテアーゼ画分の DEAE-Sephacel クロマトグラフィーによる部分精製

すべての操作は 4°C で行った。*P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分 50 ml を, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sephacel (GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, England) カラ

ム (2 x 15 cm) に添加した。非吸着画分は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で溶出し, 次に 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0 - 0.6 M の NaCl グラジエント (各々 100 ml) で吸着タンパク質を溶出し, 1 フラクションあたり 3 ml ずつ分取した。各フラクションは, A_{280} でタンパク質量を測定するとともに, 基質 #1 および #3 に対するプロテアーゼ活性を測定した。基質 #3 に最も強い反応を示したフラクション #10 を回収し, *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分とした。

プロテアーゼ活性の測定とプロテアーゼ阻害剤の効果

プロテアーゼ活性の測定は既報¹⁵⁾に従った。即ち MCA ペプチド合成基質 (20 μ M) を含む反応液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) を調製し, 30°C で 2 分間加温した反応液に *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分あるいは *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を添加 (最終容量 200 μ l) し, 30°C で反応後, 蛍光分光光度計 (F-2000, HITACHI, 東京) を用いて, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm で 7-amino-4-methylcoumarin の蛍光強度を測定した。

プロテアーゼ阻害剤の効果は, プロテアーゼ阻害剤による前処理後のプロテアーゼ活性の変動から検討した。すなわち, *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分あるいは *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分に, 5 mM EDTA, 5 mM PMSF, 1 mM TLCK, 0.1 mM TPCK, 0.1 mM leupeptin あるいは 0.1 mM E-64 を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加え, 0°C で 30 分間静置, 反応させた。前処理後, 30°C, 2 分間加温後, MCA ペプチド合成基質 (20 μ M) を添加して, 基質 #3 に対するプロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ阻害剤の効果は, Tris-HCl での前処理試料 (陰性対照) の値に対する百分率で示した。

飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) によるプロテアーゼ活性の測定

MALDI-TOF MS 分析によるプロテアーゼ活性の測定は Thiede ら²⁴⁾ および Samyn ら²⁵⁾ の方法を改変して行った。すなわち、野生型 neuromedin B, 変異型 Asp₁-, Asp₂-, Asp₃-, あるいは Asp₅-neuromedin B (20 μM) を含む 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 47.5 μl に 2.5 μl の *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を添加して反応させた。30°C, 1 時間の反応後, 反応液 10 μl に 1 μl の 1% trifluoroacetic acid (メルク, 東京) を加えて反応を停止させた。試料を ZipTip_{C18} チップ (Millipore, Billerica, MA, USA) に吸着させ, 0.1% trifluoroacetic acid で洗浄後, 5 mg/ml の a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Applied Biosystems Co., Foster City, CA, USA) /50% アセトニトリルと混和してペプチド標品を溶出した。反応後のペプチド基質の分子量を Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) を用いて, MALDI-TOF MS 分析を行った。反応はいずれも 3 回以上行い, 分解効率の平均値を算出した。

結 果

P. endodontalis 粗プロテアーゼ画分の基質特異性

透析膜上培養により調製した *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分の基質特異性を明らかにする目的で, 71 種類 (現時点で入手可能なすべて) の MCA ペプチド合成基質を用いて, プロテアーゼ活性を測定した結果, *P.*

Table 1. The MCA* polypeptides hydrolyzed by the *P. endodontalis* extracellular fraction

No.	Compound
1	Lys-Ala-MCA
2	Suc-Ala-Ala-Ala-MCA
3	Ac-Asp-Asn-Leu-Asp-MCA
4	Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA
5	Boc-Leu-Gly-Arg-MCA
6	Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA

* 4-Methylcoumaryl-7-amid

endodontalis 粗プロテアーゼ画分は, Table 1 に示した 6 つの MCA ペプチド合成基質 (基質 #1 から基質 #6) に対して, 反応時間 2 時間で, 有意のプロテアーゼ活性を示した。そこで, この基質 #1 から基質 #6 を用いて, 反応時間を延長するとともに, *P. gingivalis* の同画分の活性と比較検討した (Fig. 1)。その結果, *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分は, 反応時間 2 時間では基質 #1 (Lys-Ala-MCA) に対して, 反応時間 24 時間では基質 #1, 基質 #2 (Suc-Ala-Ala-Ala-MCA) および基質 #3 (Ac-Asp-Asn-Leu-Asp-MCA) に対して高い活性を示した。一方, *P. gingivalis* の画分では, 反応時間 2 時間から基質 #4, 基質 #5 および基質 #6 に対して高い分解活性を示し, 反応時間 24 時間に

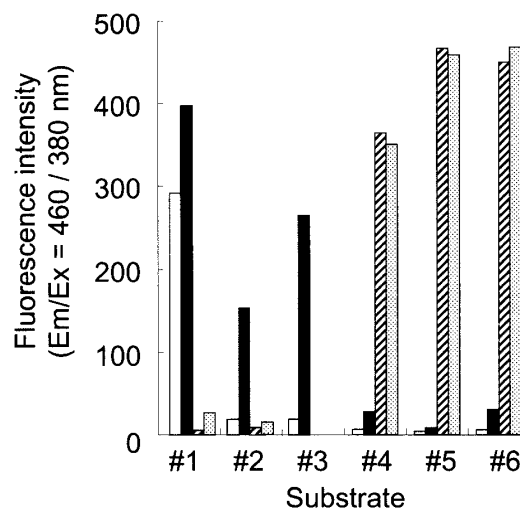


Fig. 1. Proteolytic activities of the *P. endodontalis* extracellular fraction.

Proteolytic activities of the *P. endodontalis* extracellular fraction (open and closed columns) and the *P. gingivalis* one (hatched and dotted columns) were measured using the six MCA polypeptides (substrate #1 to #6). The proteolytic activities of *P. endodontalis* extracellular fraction toward substrate #2 and #3 after 2 hours of incubation (open column) were significantly increased after 24 hours of incubation (closed column). In contrast, *P. gingivalis* fraction after 2 hours of incubation (hatched column) showed the similar activities toward all 6 of the substrates to those after 24 hours of incubation (dotted column). The results are expressed as the arithmetic mean (duplicates/experiment) of three separate experiments.

においてもその活性は持続していた。

P. endodontalis 粗プロテアーゼ画分のプロテアーゼ活性の至適反応時間が、基質により異なることが示唆されたことから、つぎに、基質 #1, 基質 #2 および基質 #3 に対する *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分のプロテアーゼ活性の経時変化について検討した。その結果、基質 #1 に対する分解活性は反応時間 12 時間でプラトーに達し 24 時間まで持続したのに対し、基質 #2 および基質 #3 に対する活性は反応時間 24 時間で最大値を示した (Fig. 2)。これらの結果より、*P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分のアラニン特異的プロテアーゼは *P. gingivalis* で報告されているジペプチジルペプチダーゼ VII²⁰⁾ 類似の酵素で、アスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性はジペプチド X-Asp を真の基質とする新規のジペプチジルペプチダーゼである可能性が強く示唆された。

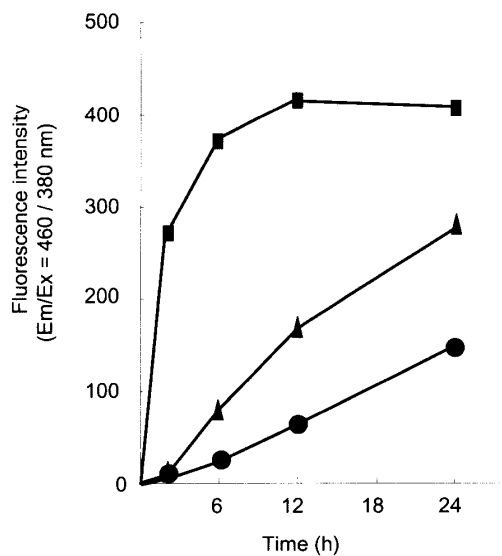


Fig. 2. The time-course of the proteolytic activities of *P. endodontalis* extracellular fraction toward substrate #1 to #3.

The proteolytic activity of the *P. endodontalis* extracellular fraction toward substrate #1 (■) increased rapidly in 12 hours of incubation and reached plateau. In contrast, the proteolytic activities toward substrate #2 (●) and substrate #3 (▲) increased gradually in 24 hours of incubation and reached plateau. The values are representative ones of three different experiments.

P. endodontalis 粗プロテアーゼ画分の部分精製 (*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分の調製)

基質 #3 に対するプロテアーゼ活性, すなわちアスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性を有する画分を精製する目的で, DEAE-Sephacel クロマトグラフィーを用いて *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分の部分精製を行った (Fig. 3)。その結果, 基質 #3 に対する分解活性のピークはフラクション #10 に, 基質 #1 に対するプロテアーゼ活性 (アラニン特異的プロテアーゼ活性) のピークはフラクション #13 付近に認められた。そこで, フラクション #10 を *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分として以下の実験に供した。

P. endodontalis DEAE 精製プロテアーゼ画分のアスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の効果

つぎに, 種々のプロテアーゼ阻害剤による阻害/抑制効果という面から, *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分のアスパラギン

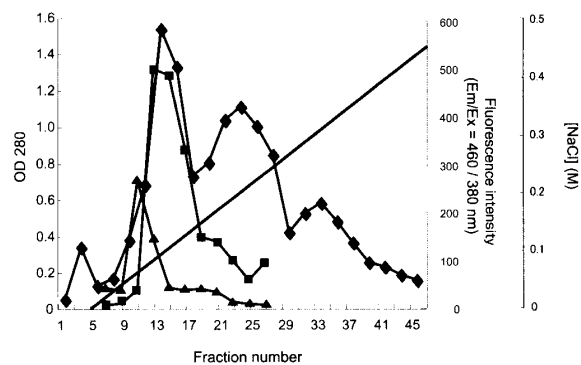


Fig. 3. DEAE-Sephacel chromatography for *P. endodontalis* extracellular fraction.

The *P. endodontalis* extracellular fraction was subjected to DEAE-Sephacel column chromatography, and the proteolytic activities toward substrate #1 (■) and substrate #3 (▲) in each fraction were measured. The result indicated that the Asp-specific activity was eluted just before the major protein peak (◆), and the Ala-specific one was on the protein peak.

Table 2. The effects of the protease inhibitors on the enzyme activities of the crude and DEAE-purified fractions

Protease inhibitor	Dose	Proteolytic activity	
		Crude fraction ¹⁾	DEAE-purified fraction ¹⁾
—	—	100 ²⁾	100 ²⁾
EDTA	5 mM	86.1	124.9
PMSF	5 mM	2.5	6.1
TLCK	1 mM	3.2	3.8
TPCK	0.1 mM	0.6	1.0
Leupeptin	0.1 mM	24.7	32.2
E-64	0.1 mM	6.1	14.7

¹⁾ The crude fraction was prepared from the culture supernatant of *P. endodontalis* ATCC 35406. The crude fraction was subjected to DEAE-sephacel chromatography, and the fraction that showed the proteolytic activity for the substrate #3 (Ac-Asp-Asn-Leu-Asp-MCA) was designated as the DEAE-purified fraction.

²⁾ The results are expressed as the percentage to the enzyme activity without the inhibitors that measured for the substrate #3 (duplicates/experiment; three separate experiments).

酸特異的プロテアーゼ活性の特異性について検討した。Table 2 にその結果をまとめて示した。*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分および *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分のアスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性は、メタロプロテアーゼ阻害剤である EDTA では抑制されなかったが、PMSF, TLCK, TPCK, leupeptin および E-64 で抑制されることが明らかとなった。

P. endodontalis DEAE 精製プロテアーゼ画分中のアスパラギン酸特異的プロテアーゼの MALDI-TOF MS 分析による解析

MCA ペプチド合成基質を用いた解析から強く示唆された、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中の新規のアスパラギン酸特異的プロテアーゼが、真にジペプチジルペプチダーゼであるかどうかを検討するために、生理活性ペプチドである neuromedin B およびその変異型合成ペプチドを基質として MALDI-TOF MS 分析を行った (Table 3)。すなわち、N 末端から 2 番目のアミノ酸がアスパラギンで、他にアスパラギンおよびアスパラギン酸、さらにグルタミン、グルタミン酸を含まない 10 アミノ酸残基からなるペプチドである neuromedin B、ならびに neuromedin B の N 末端から 2 番目の

アミノ酸をアスパラギンから他のアミノ酸に置換するとともに、N 末端から 1, 2, 3 および 5 番目のアミノ酸をアスパラギン酸に置換した変異型 neuromedin B (それぞれ Asp₁-, Asp₂-, Asp₃-および Asp₅-neuromedin B) を基質として、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を反応させ、その反応物の分子量を MALDI-TOF MS を用いて測定した。その結果、野生型 neuromedin B (Asn₂) を基質とした場合には弱い活性が、2 番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した Asp₂-neuromedin B では強い分解活性が認められた (Fig. 4 および Table 3)。また、N 末端から 1, 3 および 5 番目のアミノ酸をアスパラギン酸に置換した Asp₁-, Asp₃-および Asp₅-neuromedin B では活性は認められなかった (Fig. 5 および Table 3) ことから、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中の主要プロテアーゼがアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼであることが明らかとなった。

考 察

根尖性歯周炎の原因菌としての *P. endodontalis* の病原特異性についての我々の研究グループでのこれまでの検討結果からは、*P. endodontalis* の産生するプロテアーゼの活性ス

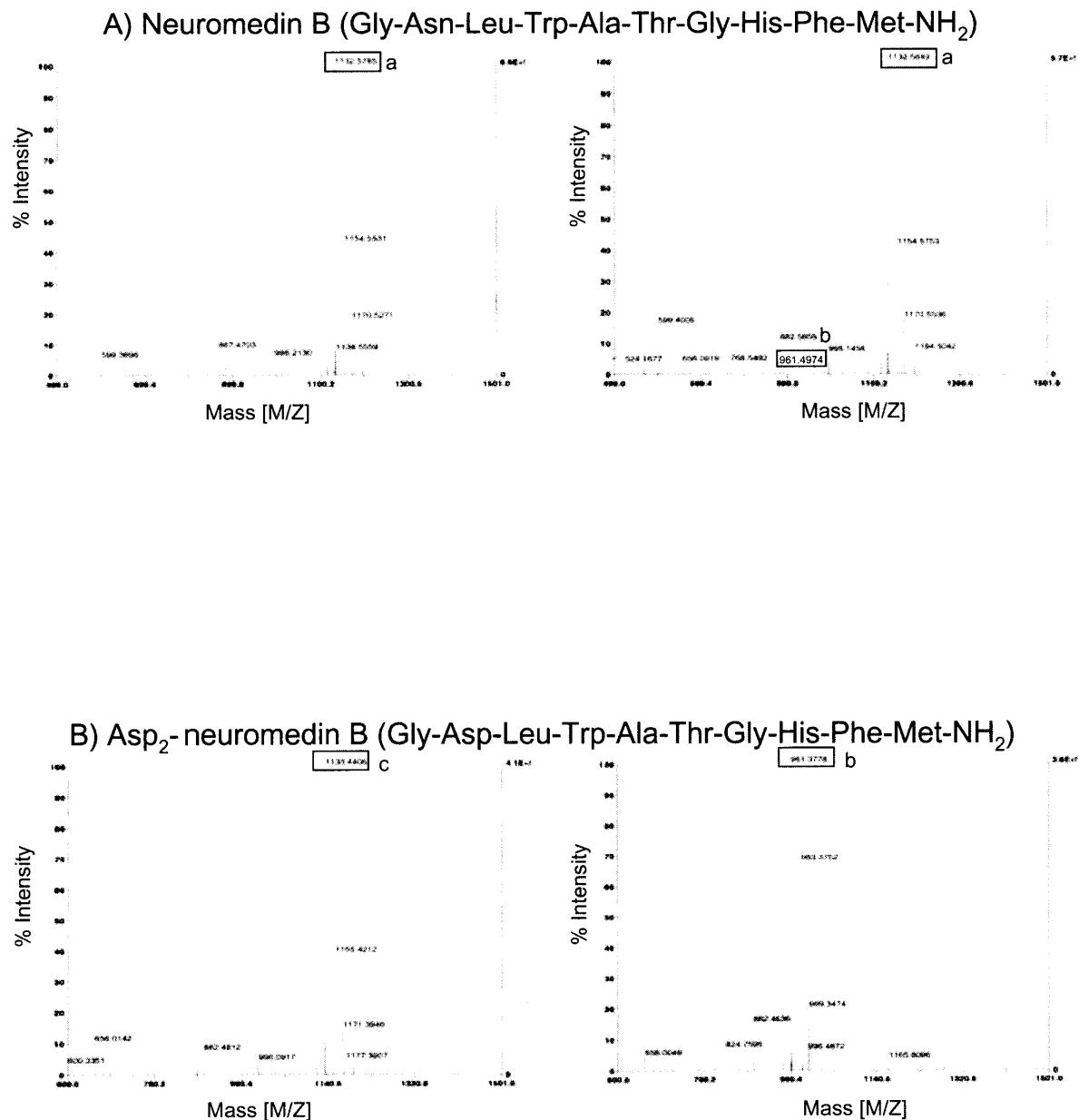


Fig. 4. Mass spectrums of the enzymatic digestion of wild-type neuromedin B and an analogue generated by the *P. endodontalis* DEAE-purified fraction. Nuromedin B and/or an analogue (Asp₂-nuromedin B) were incubated with the *P. endodontalis* DEAE-purified fraction for one hour at 30°C, and the molecular masses of the digested peptides were measured by MALDI-TOF MS (a: neuromedin B, b: Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂, c: Asp₂-nuromedin B). The values are representative ones of three different experiments.

ペクトラムが *P. gingivalis* のそれとは大きく異なることが示唆されている。*P. endodontalis* の産生するプロテアーゼについては、43 kDa および 41 kDa の 2 分子からなる 88 kDa のプロテアーゼについての Rosen ら²⁶⁾ の報告があるものの、その他に報告はない。そこで本研究で

は、まず、現時点で入手可能なすべての (71 種類の) MCA ペプチド合成基質を用いて、*P. endodontalis* の透析膜上培養により調製した菌体外画分中のプロテアーゼ活性の基質特異性を検討した結果、*P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分は 6 つの MCA ペプチド合成基質 (Table

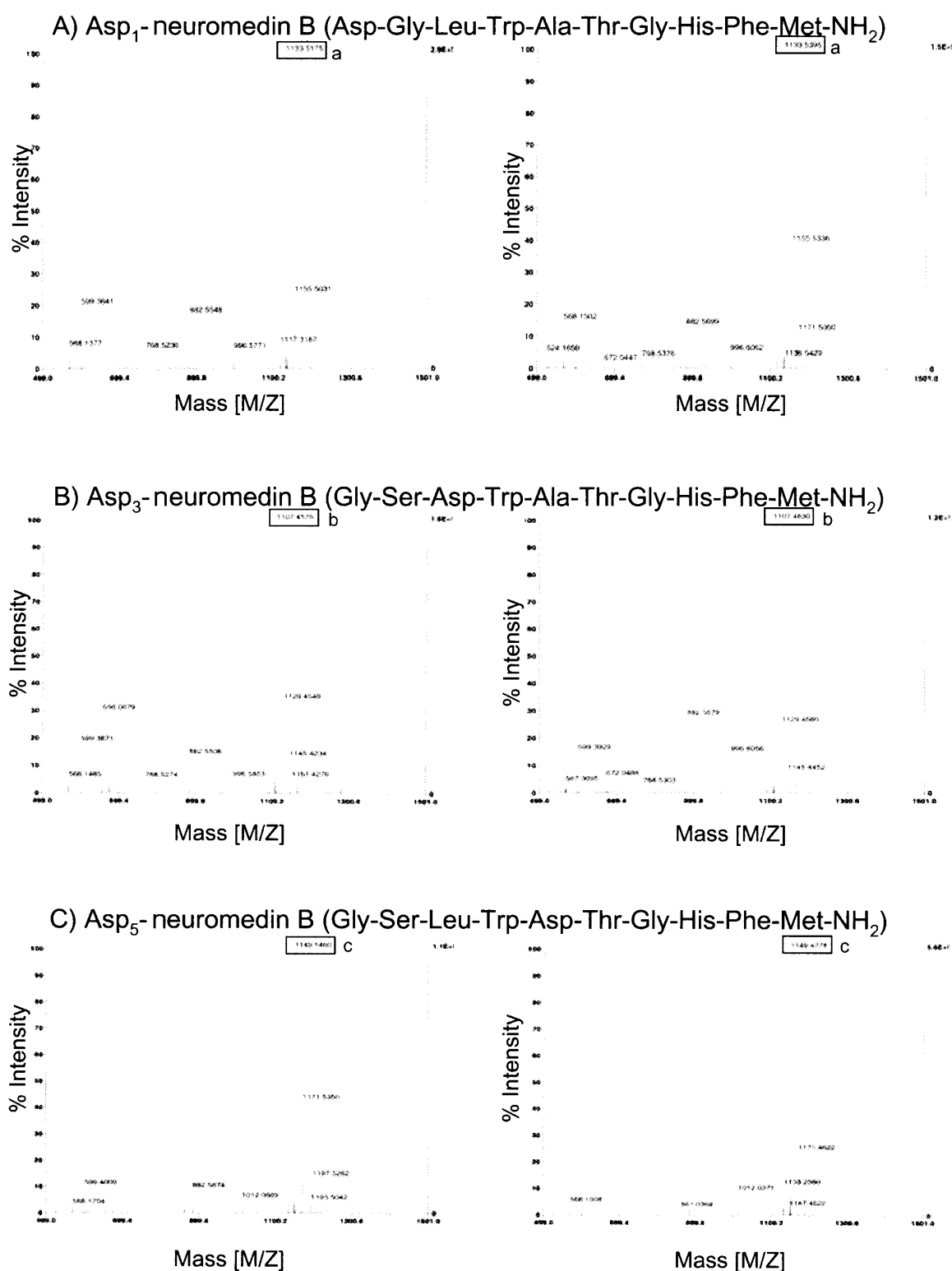


Fig. 5. Mass spectrums of the enzymatic digestion of a series of neuromedin B analogues generated by the *P. endodontalis* DEAE-purified fraction.

A series of neuromedin B analogues (Asp₁-, Asp₃- and Asp₅-neuromedin B) were incubated with the *P. endodontalis* DEAE-purified fraction for one hour at 30°C, and the molecular masses of the digested peptides were measured by MALDI-TOF MS (a: Asp₁-neuromedin B, b: Asp₃-neuromedin B, c: Asp₅-neuromedin B). The values are representative ones of three different experiments.

Table 3. The degradation of the synthetic peptides by the DEAE-purified fraction

Compound	Sequence	% degradation*
Neuromedin B	Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂	5%
Asp ₁ -neuromedin B	Asp-Gly-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂	< 5%
Asp ₂ -neuromedin B	Gly-Asp-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂	100%
Asp ₃ -neuromedin B	Gly-Ser-Asp-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂	< 5%
Asp ₅ -neuromedin B	Gly-Ser-Leu-Trp-Asp-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂	< 5%

* The percent degradation was calculated from the percent increase of the desired dipeptidyl fragments in the mass spectrums.

1) に対してのみ有意のプロテアーゼ活性を示した (Fig. 1)。なお、同様に作製した *P. gingivalis* 粗プロテアーゼ画分もこの基質 #1 から基質 #6 に対する分解活性を示したが、*P. endodontalis* のプロテアーゼスペクトラムとは大きく異なっていた。すなわち、*P. gingivalis* 粗プロテアーゼ画分では、Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA (基質 #4)、Boc-Leu-Gly-Arg-MCA (基質 #5) および Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (基質 #6) に代表されるアルギニンの C 末端側を加水分解する Arg ジンジパイン活性 (gingipain R) および Lys ジンジパイン活性 (gingipain K)^{18,19)} が観察されたが、基質 #1 から基質 #3 に対する活性は低いことが明らかとなった。そこで、*P. endodontalis* に特徴的なこの基質 #1 から基質 #3 に対するプロテアーゼ活性、すなわちアラニンおよびアスパラギン酸特異的なプロテアーゼ活性についての経時変化を検討したところ、アラニン特異的なプロテアーゼ活性については、ジペプチドである Lys-Ala-MCA (基質 #1) の分解は速やかに起こるものの、Suc-Ala-Ala-Ala-MCA (基質 #2) に対してはラグタイムの後、緩やかに分解された (Fig. 2) ことから、真の基質がジペプチド X-Ala であり、アラニン残基の C 末端側のペプチド結合を加水分解する、*P. gingivalis* で報告されているジペプチジルペプチダーゼ VII²⁰⁾ 類似の酵素がその本体であることが強く示唆された。一方、アスパラギン酸特異的なプロテアーゼ活性については、テトラペプチド、Ac-Asp-Asn-Leu-Asp-MCA (基質 #3) に対する分解反応速度が遅かったことから、基質 #2 の場合と同様、二

段階の分解過程を経て活性を示しているものと推定され、ジペプチド X-Asp を真の基質とする新規のジペプチジルペプチダーゼがその本体である可能性が強く示唆された。これらはいずれも、Rosen ら²⁶⁾ の報告した 88 kDa プロテアーゼとは異なり、*P. endodontalis* が産生するプロテアーゼとしては新規のもので、特に、ジペプチド X-Asp を基質とするジペプチジルペプチダーゼについては他菌種においても報告はない。

そこで、*P. endodontalis* の産生する、基質 #3 の分解活性を示すプロテアーゼについてより詳細に解析するために、DEAE-Sephacel クロマトグラフィーを行い、アスパラギン酸特異的なプロテアーゼ活性を示す *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を得た (Fig. 3)。DEAE-クロマトグラフィーでの溶出位置の相違から、アラニン特異的なプロテアーゼ活性とアスパラギン酸特異的なプロテアーゼ活性を示すプロテアーゼとは異なる分子であることが推定された。

つぎに、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中のアスパラギン酸特異的なプロテアーゼ活性の特異性について種々のプロテアーゼ阻害剤を用いて検討した (Table 2)。その結果、これらのプロテアーゼ阻害剤の特異性 (材料と方法に記載) からすれば、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中のアスパラギン酸特異的なプロテアーゼはセリンプロテアーゼであること、また、その活性にはシステイン残基も関与する可能性のあることが示唆された。

新規のアスパラギン酸特異的なジペプチジルペプチダーゼが *P. endodontalis* DEAE 精製プロ

テアーゼ画分中に存在することを明確にするため、本研究では、生理活性ペプチドである neuromedin B およびその変異型合成ペプチドを基質として MALDI-TOF MS 分析を行った (Figs. 4 および 5, Table 3)。その結果、野生型 Asn₂-neuromedin B では 30°C, 1 時間の反応で約 5% の分解が見られたのに対し、アスパラギンをアスパラギン酸に置換した変異型 Asp₂-neuromedin B では同条件で 100% の分解が認められた。従ってこの結果から、MCA ペプチド基質で観察されたアスパラギン酸特異的活性はジペプチジルペプチダーゼ活性を有し、さらにその基質特異性の優先度はアスパラギン酸 > アスパラギンであることが示された。さらに、加水分解されるアスパラギン酸ペプチド結合の位置について検討した結果、N 末端から 1, 3 および 5 番目のアミノ酸をアスパラギン酸に置換した Asp₁-, Asp₃- および Asp₅-neuromedin B では活性は認められなかった (Fig. 5 および Table 3) ことから、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中の主要プロテアーゼがアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼであることが明らかとなった。さらに、結果には示さなかったが、Ac-Leu-Asp-MCA を新規に合成し検討した結果からも、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中の主要プロテアーゼがアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼであることが確認されている。

感染根管/根尖性歯周炎から分離される根管細菌のうち、*P. endodontalis* は強い臨床症状をともなう根管あるいは歯根膿瘍病巣部から分離されることから、急性症状との関連が示唆されている⁴⁾。しかし、これまでのところ、慢性 (成人性) 歯周炎の原因菌で細菌学的には類縁の *P. gingivalis* とは異なり、その病原特異性を担う病原因子の解析はほとんど行われてこなかった。本研究では、我々の研究グループのこれまでの研究成果をもとに、*P. endodontalis* が特異的に産生するプロテアーゼの同定を試みた。その結果、*P. endodontalis* は菌体外画分に *P. gingivalis* とは異なるスペクトラムのプロ

テアーゼ群を産生していること、また、その主要プロテアーゼの一つとして、これまでに報告のない新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼが存在することが明らかとなった。今後、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を用いてアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼのアミノ酸配列の検索、さらにその遺伝子クローニングを行い、*P. endodontalis* が産生するアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼを同定するとともに、*P. endodontalis* の病原特異性との関連性を明らかにする予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会をあたえていただき、御懇篤なるご指導、御校閲を賜りました口腔微生物学講座 木村重信 教授に深く感謝いたします。また、本研究に際し、終始ひとかたならぬご指導、御助言をいただき、御懇篤な校閲を賜りました長崎大学医歯薬学総合研究科 根本優子 博士に深甚なる謝意を表します。最後に、絶えず暖かい御支援ならびに御協力を頂きました口腔微生物学講座の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) van Steenberg, T. J. M., van Winkelhoff, A. J., Mayrand, D., Grenier, D., and de Graaff, J. : *Bacteroides endodontalis* sp nov., an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 118-120, 1984.
- 2) Shah, H. N., and Collins, M. D. : Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 128-131, 1988.
- 3) van Winkelhoff, A. J., Carlee, A. W., and de Graaff, J. : *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect. Immun.* 49: 494-497, 1985.
- 4) Mayrand, D., and Holts, S. C. : Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 52: 134-152, 1988.
- 5) Sundqvist, G., Johansson, E., and Sjögren, U. : Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species

- in root canal infections. *J. Endod.* 15: 13-19, 1989.
- 6) Sunde, P. T., Tronstad, L., Eribe, E. R., Lind, P. O., and Olsen, I. : Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Dent. Traumatol.* 16: 191-196, 2000.
 - 7) van Winkelhoff, A. J., van Steenberg, T. J. M., Kippuw, N., and Graaff, J. : Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral S cavity. *J. Clin. Microbiol.* 22: 75-79, 1985.
 - 8) van Steenberg, T. J. M., and Graaff, J. : Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 219-222, 1986.
 - 9) Yang, L. C., Huang, F. M., Lin, C. S., Liu, C. M., Lai, C. C., and Chang, Y. C. : Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *Int. Endod. J.* 36: 774-779, 2003.
 - 10) Yang, L. C., Tsai, C. H., Huang, F. M., Su, Y. F., Lai, C. C., Liu, C. M., and Chang, Y. C. : Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. *Int. Endod. J.* 37: 588-592, 2004.
 - 11) Huang, F. M., Chen, Y. J., Chou, M. Y., and Chang, Y. C. : Examination of the signal transduction pathways leading to upregulation of tissue type plasminogen activator by *Porphyromonas endodontalis* in human pulp cells. *Int. Endod. J.* 38: 860-865, 2005.
 - 12) Ho, Y. C., and Chang, Y. C. : Effects of a bacterial lipid byproduct on human pulp fibroblasts in vitro. *J. Endod.* 33: 437-441, 2007.
 - 13) Murakami, Y., Hanazawa, S., Tanaka, S., Iwahashi, H., Yamamoto, Y., and Fujisawa, S. : A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol. Immunol.* 16: 321-325, 2001.
 - 14) Ko, H. J., and Lim, S. S. : Production of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J. Endod.* 28: 754-757, 2002.
 - 15) 昆麻子 : *Porphyromonas endodontalis* の病原因子の解析。岩医大歯誌 27: 187-196, 2002.
 - 16) Pike, R., McGraw, W., Potempa, J., and Travis, J. : Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J. Biol. Chem.* 269: 406-411, 1994.
 - 17) Kontani, M., Ono, H., Shibata, H., Okamura, Y., Tanaka, T., Fujiwara, T., Kimura, S., and Hamada, S. : Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect. Immun.* 64: 756-762, 1996.
 - 18) Kadowaki, T., Yoneda, M., Okamoto, K., Maeda, K., and 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.
 - 19) Curtis, M. A., Kuramitsu, H. K., Lantz, M., Macrina, F. L., Nakayama, K., Potempa, J., Reynolds, E. C., and Aduse-Opoku, J. : Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* 34: 464-472, 1999.
 - 20) Banbula, A., Yen, J., Oleksy, A., Mak, P., Bugno, M., Travis, J., and Potempa, J. : *Porphyromonas gingivalis* DPP-7 represents a novel type of dipeptidylpeptidase. *J. Biol. Chem.* 276: 6299-6305, 2001.
 - 21) Banbula, A., Mak, P., Bugno, M., Silberring, J., Dubin, A., Nelson, D., Travis, J., and Potempa, J. : Prolyl tripeptidyl peptidase from *Porphyromonas gingivalis*. A novel enzyme with possible pathological implications for the development of periodontitis. *J. Biol. Chem.* 274: 9246-9252, 1999.
 - 22) Suzuki, K., Ikeda, T., Nakamura, H., and Yoshimura, F. : Isolation and characterization of a nonpigmented variant of *Porphyromonas endodontalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 12: 155-161, 1997.
 - 23) Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., and Kimura, S. : Characterization and molecular cloning of glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathogenesis* 33: 33-41, 2002.
 - 24) Thiede, B., Wittmann-Liebold, B., Bienert, M., and Krause, E. : MALDI-MS for C-terminal sequence determination of peptides and proteins degraded by carboxypeptidase Y and P. *FEBS Lett.* 357: 65-69, 1995.
 - 25) Samyn, B., Sergeant, K., and van Beeumen, J. : A method for C-terminal sequence analysis in the proteomic era (proteins cleaved with cyanogen bromide). *Nat. Protoc.*, 1: 318-323, 2006.
 - 26) Rosen, G., Shoshani, M., Naor, R., and Sela, M. N. : The purification and characterization of an 88-kDa *Porphyromonas endodontalis* 35406 protease. *Oral Microbiol. Immunol.* 16: 326-331, 2001.