

〔原 著〕

*Porphyromonas gingivalis*のRgp (arginine specific cysteine proteinase)発現に対するquorum sensingの影響鎌口 有秀*, 中村 麗子*, 大山 徹**,
渡部 俊弘**, 岡本 公彰***, 馬場 久衛**北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室
**東京農業大学生物産業学部食品科学科生物化学研究室
***鶴見大学歯学部口腔細菌学教室

(主任: 馬場 久衛教授)

Effect of quorum sensing on production of Rgp (arginine specific cysteine proteinase) of *Porphyromonas gingivalis*Arihide KAMAGUCHI*, Reiko NAKAMURA*, Tohru OHYAMA**,
Toshihiro WATANABE**, Masaaki OKAMOTO*** and Hisae BABA*

*Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

**Department of Food Science and Technology, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture.

***Department of Oral Bacteriology, School of Dental Medicine, Turumi University.

(Chief: Prof. Hisae BABA)

Abstract

Regulation of gene expression in response to cell density is considered to be caused by quorum sensing and quorum sensing systems based on bacterial extra cellular signaling molecules, the so-called autoinducers(AI). *Porphyromonas gingivalis* secrete autoinducer 2(AI2). The purpose here was to examine whether AI2 influenced protein production of *P. gingivalis*. The *luxS* gene, one of the genes for AI2 production, mutant(N3) was constructed and the protein production of *P. gingivalis* ATCC 33277(parent strain) and *P. gingivalis* N3 was compared using two dimensional gel electrophoresis. No differences in spot number were observed between the parent strain and N3, but the spot volume of one spot was larger in the parent strain than N3. With N-terminal amino acid sequence analysis, this spot was shown to be Rgp, a major pathogenic factor of *P. gingivalis*. The Rgp activity of cells of the parent strain was also higher than that of N3.

From these results it is suggested that AI2 may be involved in regulation of Rgp production and in increasing the pathogenicity of *P. gingivalis* in oral biofilms.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, quorum sensing, Rgp.

受付: 平成15年 9月26日

緒 言

細菌の菌濃度に依存して遺伝子発現が調節を受ける機構は quorum sensing と呼ばれている⁽¹⁾。これについての最初の報告はイカの発光現象についてである⁽²⁾。イカの発光現象は、イカの体内に存在する細菌数が増加することにより、細菌が発光して起こる。この現象を起こす細菌は *Vibrio fischeri* でイカの体内に寄生し、菌数の増加に伴い産生する acyl-homoserine lactones (AHLs) がある閾値を超えると、これが *V. fischeri* の regulatory proteins に作用する。その結果、その情報によりシグナル伝達が生じ、luciferase 遺伝子の転写が開始され発光することが報告された^(3,4,5)。この現象の解明により細菌において化学物質を介して cell to cell コミュニケーションをしていること、また、この quorum sensing の系は細菌間において広く存在していることが次第に明らかになった⁽¹⁾。グラム陽性菌では主にペプチドを介して quorum sensing が行われている。*Lactococcus lactis* の産生する抗菌ペプチドはこの抗菌ペプチドの濃度がある閾値に達すると、さらに抗菌ペプチドの産生が増加すると報告されている^(6,7)。グラム陰性菌では *V. fischeri* において最初に示された AHLs が関与する系があり、AHLs は autoinducer 1 (AI1) と呼ばれている。AI1 の作用は菌種特異的であり、その作用範囲が限られる性状がある⁽⁸⁾。*Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィルムの形成に AI1 が作用することが AI1 の産生に関与する遺伝子 (*lasI* 遺伝子) 変異株の実験で示された。*lasI* 遺伝子変異株においてはバイオフィルム成熟時の厚さが薄く、また、detergent によりはがれやすくなることが報告された。このことより、AI1 が *P. aeruginosa* のバイオフィルムの成熟に重要であり、間接的に *P. aeruginosa* の病原性にも関与することが示唆された⁽⁹⁾。これに対して、成分は不明であるが、グ

ラム陽性、グラム陰性菌において広く産生され、また、菌種を問わず広く作用するシグナル物質は AI2 と呼ばれている⁽¹⁾。AI2 産生に関与する酵素群の 1 つの遺伝子が *luxS* 遺伝子である。この遺伝子は多くの細菌間でホモロジーがあり、多くの細菌で AI2 を産生することが報告されている⁽¹⁾。AI2 の病原性に関与する例としては病原性大腸菌のタイプ III 分泌機構の発現に関与する報告等がなされている⁽¹⁰⁾。また、*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus gordonii* 等の口腔細菌も AI2 を産生することが報告された^(11,12,13,14)。*P. gingivalis* が AI2 によりどのような遺伝子の転写が促進されるかを検索する目的で differential display PCR による報告⁽¹²⁾、およびターゲットを arginine specific cysteine proteinase (Rgp) 等の活性に限定した報告がなされた⁽¹⁵⁾。しかし、両実験における Rgp の産生誘導は低下するとする結果と、増加するとする異なった結果が報告されている。このように *P. gingivalis* は quorum sensing によりどのような遺伝子発現が誘導され、またどのような蛋白質が生成されるかは不明な点が多い。我々は、AI2 により *P. gingivalis* の蛋白質発現がどのように変化するかを検討するため、*P. gingivalis* の *luxS* 変異株を作製し、親株とのタンパク質発現の相違を 2 次元電気泳動を用い、プロテオーム的に解析し、AI2 による影響を検討した。

実験方法

1. 供試菌株と培養方法

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 株、N3 株 (*luxS* 変異株) は 5 $\mu\text{g/ml}$ hemin, 1 $\mu\text{g/ml}$ menadione, 5 % yeast extract 添加 Tryptic soy broth (TYHM 培地) または GAM 寒天培地にて 37°C で嫌氣的に培養した。*Escherichia coli* JM109 株, DH5 α 株, pKD355 株は LB broth また

はLB寒天培地にて37°Cで好氣的に培養した。また、抗生物質は必要時に *E. coli* に対しては Ampicillin (100 μ g/ml) または Erythromycin (300 μ g/ml) を培地に添加した。 *P. gingivalis* に対しては必要時に Erythromycin (10 μ g/ml) を培地に添加した。

2. *P. gingivalis*からの染色体DNAの抽出方法

Simthらの方法⁽¹⁶⁾にほぼ準じて行った。すなわち、培養菌液1,000 μ lをチューブにとり、遠心後、上清を捨て、菌体に567 μ lのTEバッファーと30 μ lの10%SDS溶液を加えて溶菌した。ついで、3 μ lのproteinase K (20mg/ml) 溶液を加え、37°Cで60分反応した。さらに、Cetyltrimethyl ammonium bromideを加え、65°Cで20分加熱処理した。この液に同量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) 液を加え、振とう後、15,000 g, 10分遠心し、上清を新しいチューブにとり、これに1,000 μ lの100%エチルアルコールを加え、-80°Cで20分放置後、15,000 gで10分遠心し、沈殿を70%エチ

ルアルコールで洗浄した。沈殿をMicro Vac MV-100 (TOMY) で乾燥し、これに、2 μ lのRNase (10mg/ml) を含む300 μ lのTEバッファーを加え、37°Cで30分反応した。ついで、これに同量の phenol/chloroform/isoamyl alcoholを加え振とうした。これを15,000 g, 10分遠心後、上清を新しいチューブにとり、これに30 μ lの3 M酢酸ナトリウム溶液を加えた。さらに、100%エチルアルコールを750 μ l加え、-80°Cで20分放置後、15,000 gで10分遠心し、沈殿を70%エチルアルコールで洗浄した。沈殿をMicro Vac MV-100で乾燥後、これに20 μ lのTEバッファーを加え、 *P. gingivalis*の染色体DNA液とした。

3. *luxS*変異株の作製

*P. gingivalis*のAI2産生に關与する酵素群の1つであるLuxSの遺伝子 *luxS*はChungらの報告⁽¹²⁾をもとにTIGRで公開している *P. gingivalis* W83ゲノムのシーケンスを参考にし、 *luxS*遺伝子を含む領域を増幅するプライマーペ

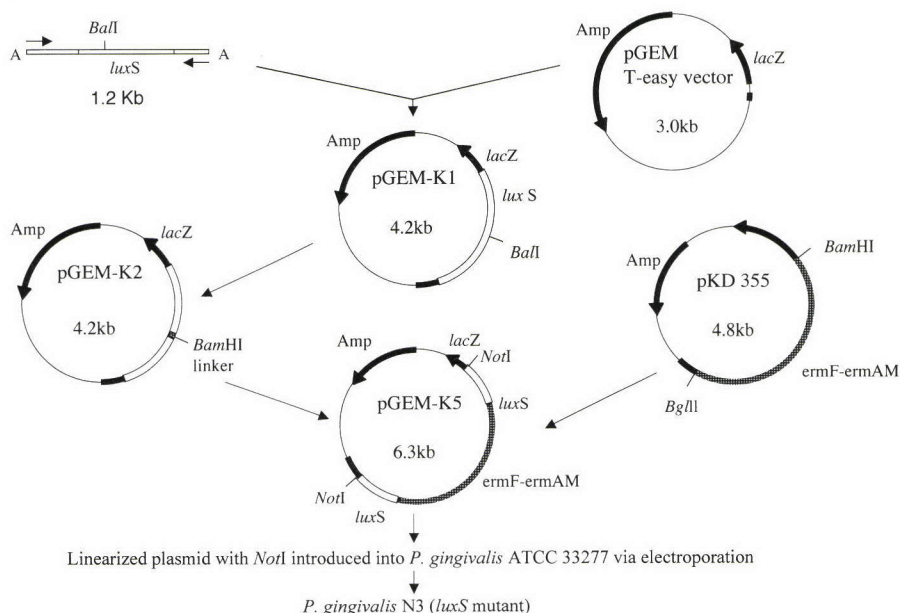


Fig. 1. Construction of a site specific mutant by allelic exchange. The pGEM-K5 containing *luxS* gene interrupted by an *ermF-ermAM* cassette. The plasmid was linearized with *Not*I and introduced into *P. gingivalis* ATCC 33277 by electroporation. *P. gingivalis* was incubated on GAM agar containing erythromycin (10 μ g/ml) for 7 days at 37°C.

アを設計した。このプライマーペアを用いて *P. gingivalis* 染色体DNAをテンプレートとしてPCRを行いpGEM T-easy vector (Promega) にligationした。これを *E. coli* DH5 α 株に形質転換し、得られたプラスミドをpGEM-K1とした。このプラスミドを *Bal*Iで処理して、*Bam*HI linkerをligationし、*E. coli* DH5 α 株に形質転換して、得られたプラスミドをpGEM-K2とした。このプラスミドを *Bam*HIで処理後、プラスミドpKD355 (長崎大学歯学部中山浩次先生より分与を受けた) を *Bam*HIと *Bgl*IIで切断した *ermF-ermAM*とligationして、*E. coli* DH5 α 株に形質転換し、プラスミドpGEM-K5を得た。これを *Not*Iで切断後、*P. gingivalis* ATCC 33277株にエレクトロポレーションにより挿入し、エリスロマイシン含有GAM寒天培地に摂取して、7日間培養後、得られたコロニーを *luxS* 変異株とした (Fig. 1)。

4. 菌体からの2次元電気泳動用の試料の調整方法

Pridmoreらの方法⁽¹⁷⁾にほぼ準じて行った。すなわち、*P. gingivalis*の菌液1 mlをチューブにとり、15,000 gで10分遠心し、菌体を得た。菌体に4 mg TLCK添加溶解バッファーを500 μ l添加し、100°Cで10分加熱後、尿素を285mg添加した。さらにIPGバッファー添加膨潤化バッファーを500 μ l添加し、超音波処理した。ついで、室温に1時間静置後、100,000 gで1時間超遠心した。この遠心上清を試料とした。

5. 2次元電気泳動の条件

試料125 μ lをストリップホルダーに添加し、これにImmobiline DryStrip (pH 4-7, 7cm) を挿入した。これをEttan IPGphor IEF system (Amersham Bioscience) を用いて膨潤化を12時間、500 Vにて500Vhr、1,000 Vにて1,000 Vhr、8,000 Vにて20,000Vhrの泳動条件で等電

点電気泳動を行った。ついで、Immobiline DryStripをSDS-平衡化バッファーにて平衡化後、12.5%のゲルにてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、ゲルをクマーシーブリリアントブルーにてタンパク質染色をした。

6. 2次元電気泳動ゲルの解析

2次元電気泳動後のゲルのスポット数、スポットボリュームの解析はPDQuest (Bio-RAD) を用いて行った。

7. N末端アミノ酸配列の解析

スポットのN末端アミノ酸配列の解析は2次元電気泳動後のゲルをPVDF膜に転写後、クマーシーブリリアントブルーにて染色した。ついで、目的のスポットを切り出しプロテインシークエンサー (Procise492, Applied Biosystems) を用いてアミノ酸配列を決定した。また、この配列よりBLAST searchにて遺伝子とタンパク質を検索した。

8. Rgp活性の測定方法

菌体のRgp活性は1 mM N α -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide HClと10mM cysteine HCl含有0.1M Tris-HCl (pH 7.4) 液800 μ l、水1,700 μ lおよび試料20 μ lを加え10分反応後のOD405nmを測定し、 Δ 405nm/min/mg proteinで活性を表した。タンパク質量の測定はDCprotein assay kit (Bio-RAD) を用いて測定した。

9. HA活性の測定方法

菌液50 μ lをU字底の96穴プレートにて2倍希釈系列をPBSにより作製し、これに50 μ lの2%羊血液を添加した。室温で30分振とう後、室温に3時間静置し、血球凝集を起こしている最大希釈数を活性値とした。

10. 共凝集活性の測定方法

*P. gingivalis*と*P. intermedia*との共凝集は*P. gingivalis*菌体を共凝集バッファーにてOD600 nmでの吸光度を0.6にし、*P. intermedia*菌体の吸光度を1.8に調整した菌液を用いて行った。つまり両菌液を200 μ lずつ試験管(13mm x 100 mm)に添加し、150rpmにて60分振とう後、共凝集活性を一から4+で表した。

11. 統計処理の方法

統計処理はstudent's t testにて行った。

結 果

1. *luxS*変異株の作製

P. gingivalis ATCC 33277株の*luxS*遺伝子に*ermF-ermAM*遺伝子を挿入後、*luxS*変異株をerythromycin含有GAM寒天培地にてスクリーニングしたところ、培養7日で、30個のコロニーを得た。そのうちの12コロニーを分離培養し、各菌体よりDNAを抽出して、*luxS*遺伝子を検索するプライマーペアによりPCRを行った。その結果、2.5kbに1本のバンドと、2.5kbと0.4kbに2本のバンドが検出されるコロニーがあった(Fig. 2)。2.5Kbに1本のバンドが検出されたものは目的の遺伝子がdouble cross overにて組み換えが起きた株で、2.5kbと0.4kbに2本のバ

ンドが検出されたものは目的の遺伝子がsingle cross overにて組み換えが起きたものと考えられた。double cross overにて遺伝子組み換えが行われた4株をそれぞれ、K3, N1, N3, N5株とした。今回はN3株を以降の実験に供試した。

2. *P. gingivalis* ATCC 33277株とN3株との2次元電気泳動パターンの比較

P. gingivalis ATCC 33277株とN3株の16時間、20時間および24時間培養菌の菌液の吸光度をOD600nmで1.5に調整し、その2次元電気泳動後のタンパク質染色パターンを比較した。

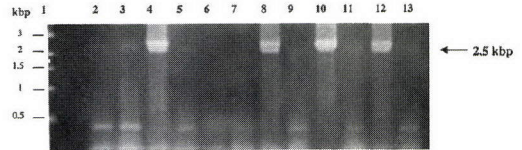


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR product of *luxS* mutant of *P. gingivalis*. Twelve erythromycin-resistant colonies from *P. gingivalis* ATCC 33277 that had been transferred with pGEM-5K were analyzed by PCR using the *luxS* primer. lane 1, Mw maker; lane 2, *P. gingivalis* K1; lane 3, *P. gingivalis* K2; lane 4, *P. gingivalis* K3; lane 5, *P. gingivalis* K4; lane 6, *P. gingivalis* K5; lane 7, *P. gingivalis* K6; lane 8, *P. gingivalis* N1; lane 9, *P. gingivalis* N2; lane 10, *P. gingivalis* N3; lane 11, *P. gingivalis* N4; lane 12, *P. gingivalis* N5; lane 13, *P. gingivalis* N6.

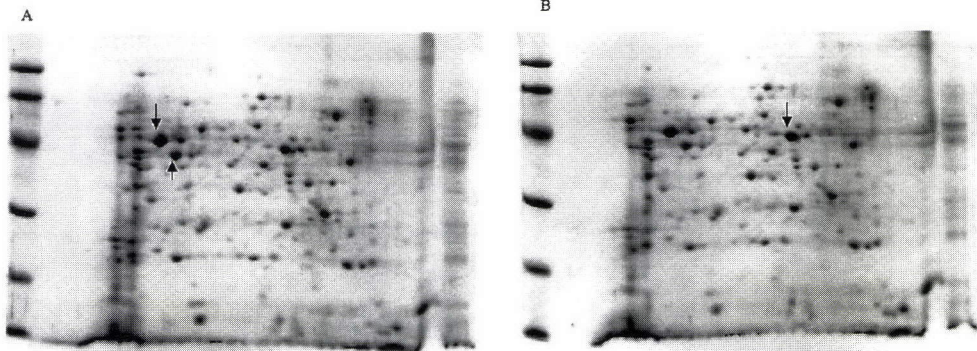


Fig. 3. Two dimensional electrophoresis pattern of cells of *P. gingivalis* ATCC33277 and N3. A : *P. gingivalis* N3 was incubated at 37°C for 16 hr. B : *P. gingivalis* ATCC33277 was incubated at 37°C for 16 hr. After incubation, both cells were prepared for sample of two dimensional gel electrophoresis. The arrows indicate the spot where spot volume increased in either gel.

PDQuestにて各ゲルの解析をした結果, スポット数の相違は見られなかったが (data not shown), *P. gingivalis* ATCC33277株の方がスポットボリュームの大きいスポットが1つ見られた (Fig. 3 (B)). このスポットをPDQuestにて定量的に解析した結果, 親株の方が約1.8倍スポットボリュームが大きいことがわかった (Fig. 4). このタンパク質はN末端アミノ酸配列の解析とBLAST searchの結果より, Rgpと同定された (Table 1). 一方, *P. gingivalis* N3株の方がスポットボリュームの大きいスポット

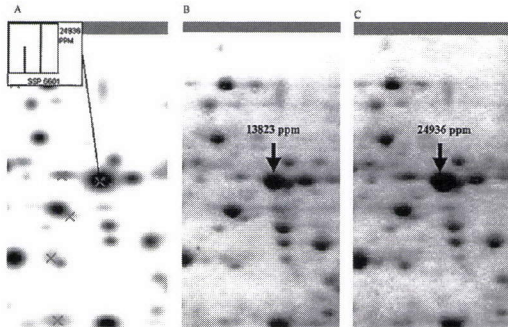


Fig. 4. Quantitative analysis of the spot which increased in spot volume in the parent strain using PDQuest.

A : Master gel. B : *P. gingivalis* N3 (*luxS* mutant). C : *P. gingivalis* ATCC33277 (parent strain). Arrows indicate the spot with increased spot volume in the gel of the parent strain.

が2つ見られた (Fig. 3 (A)). これらのスポットはN末端のアミノ酸配列の解析とBLAST searchの結果より, NAD-specific glutamate dehydrogenase, alanine dehydrogenaseであった (Fig. 5.と Table 1). この現象は20時間, 24時間培養の菌体においても同じ傾向を示した.

3. *P. gingivalis* ATCC 33277株とN3株のRgp活性の比較

2次元電気泳動のスポットの比較より, *P. gingivalis* ATCC 33277株の方がN3株に比較してRgpのスポットボリュームの増加傾向がみられたことより, Rgp活性の比較を行った. *P.*

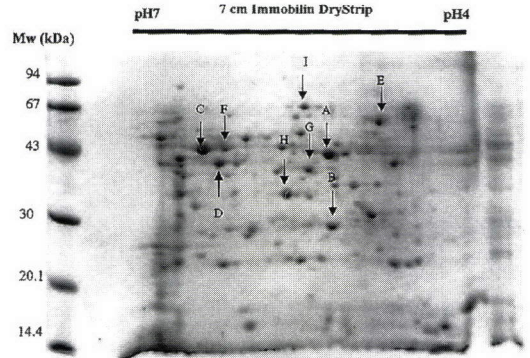


Fig. 5. Two dimensional electrophoresis pattern of cells of *P. gingivalis* ATCC33277. Spots indicated with arrows were analyzed for the N-terminal amino acid sequence.

Table 1. N-terminal amino acid sequence of protein spots by two dimensional electrophoresis of *P. gingivalis* ATCC33277 cell and the result of the BLAST search

Protein spot	N-terminal amino acid sequence determined	Protein	Gene
A	Y T P V E E K Q N G	Rgp	<i>rgpA</i>
B	A V T I Q D I A K L	translation elongation factor Ts	<i>tsf</i>
C	M K T Q E I M T M L	NAD-specific gultamate dehydrogenase	<i>gdh</i>
D	M I I G I P K E I M	alanine dehydrogenase	<i>ald</i>
E	A K E I K F D M E S	60kDa chaperonin(gro EL)	<i>groEL</i>
F	M K T Q E I M T M L	NAD-specific gultamate dehydrogenase	<i>gdh</i>
G	A F G V G D D E S K	fimbrillin	<i>fimA</i>
H	M N K E Q L Q Q M R	fructose-bisphosphate aldolase, class I	<i>fbaB</i>
I	A G D G Q D Q A N P	67kDa major outer membrane protein	<i>pga67</i>

gingivalis ATCC 33277株とN3株のearly log phase (OD600nm 約0.5), middle log phase (OD600nm 約0.9), late log phase (OD600nm 約1.8)における菌体のRgp活性の測定をした。その結果、いずれにおいても *P. gingivalis*

ATCC 33277株のRgp活性が高い傾向を示した (Fig. 6)。また、培養上清にはlate log phaseまではRgp活性は殆どみられず、Rgpはlate log phaseまでは殆ど菌体表面層に結合しているものと考えられた。(data not shown)

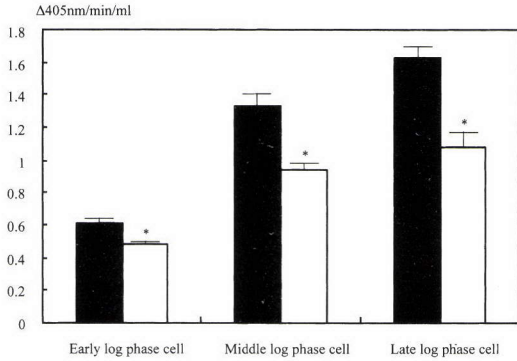


Fig. 6. Comparison of Rgp activity between *P. gingivalis* ATCC33277 (parent strain) and N3 (*luxS* mutant) at each growth phase. The results are expressed as mean ± SD from the different experiments with triplicate cultures. * : P < 0.05 as compared with *P. gingivalis* ATCC33277. ■ parent strain, □ N3 (*luxS* mutant)

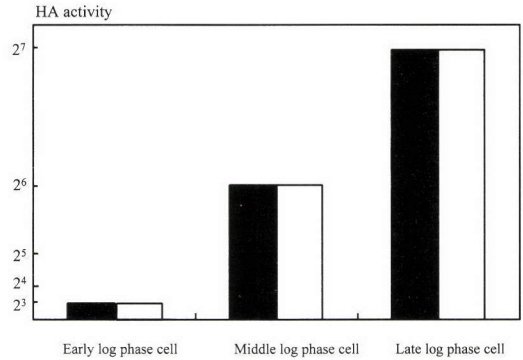


Fig. 7. Comparison of HA activity between *P. gingivalis* ATCC33277 (parent strain) and N3 (*luxS* mutant) at each growth phase using 2% sheep red blood cell. ■ parent strain, □ N3 (*luxS* mutant)

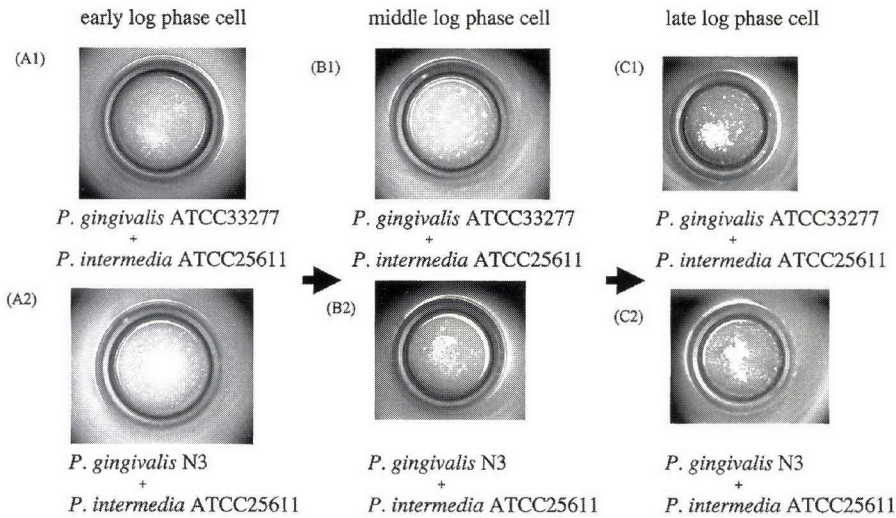


Fig. 8. Comparison of coaggregation of each growth phase cell of *P. gingivalis* ATCC33277, N3 and *P. intermedia* ATCC25611. (A1): Coaggregation between early log phase cells of *P. gingivalis* ATCC33277 and *P. intermedia* ATCC25611. (A2): Coaggregation between early log phase cells of *P. gingivalis* N3 and *P. intermedia* ATCC25611. (B1): Coaggregation between middle log phase cells of *P. gingivalis* ATCC33277 and *P. intermedia* ATCC25611. (B2): Coaggregation between middle log phase cells of *P. gingivalis* N3 and *P. intermedia* ATCC25611. (C1): Coaggregation between late log phase cell of *P. gingivalis* ATCC33277 and *P. intermedia* ATCC25611. (C2): Coaggregation between late log phase cell of *P. gingivalis* N3 and *P. intermedia* ATCC25611.

4. *P. gingivalis* ATCC 33277株とN3株のHA活性の比較

*P. gingivalis*のHA活性はRgpのC末に存在するadhesin domainが関与する可能性が強く示唆されていることより⁽¹⁸⁾, 各培養過程における*P. gingivalis* ATCC 33277株とN3株のHA活性を比較した. 培養時間の経過と共にHA活性の増加は見られたが, 両菌株間でのHA活性の違いは見られなかった (Fig. 7).

5. *P. gingivalis* ATCC 33277とN3の*P. intermedia*との共凝集の比較

*P. gingivalis*と*P. intermedia*との共凝集はRgpのadhesin domainのHGP17が強く関与している可能性が示唆されていることより⁽¹⁹⁾, *P. gingivalis* ATCC33277株とN3株の*P. intermedia*との共凝集を比較した. これらの菌株における共凝集の活性の相違は見られなかった. しかし, *P. gingivalis*の両菌株の培養時間の経過と共に共凝集の増加する傾向が見られた (Fig. 8).

考 察

P. gingivalis ATCC 33277とその*luxS*変異株であるN3株の培養菌体のプロテオーム的解析により, 両菌株間でのタンパク質スポット数には変化は見られなかった. しかし, 親株の方にタンパク質発現が増加したスポットが見られた. それはN末端アミノ酸配列の結果とBLAST searchの結果よりRgpであった. さらに, 菌体のRgp活性も親株の方が増加していた. これは親株の産生した自己のAI2の影響を受けた結果と考えられた. Chungらは⁽¹²⁾*P. gingivalis*と*luxS*変異株間のdifferential display PCRによる比較より, *luxS*変異株の方がRgpとhemin acquisition proteinの遺伝子の発現が増加したと報告している. このことはAI2によりRgpの発現が減少したことであり, 我々の結果

とは相違している. また, Burgessらは⁽¹⁵⁾RgpとKgpを対象を絞り親株と*luxS*変異株間の活性の比較をしているが, Rgp, Kgp活性とも親株の方が増加したと報告した. これは我々の結果と一致している. 我々はAI2の影響をプロテオーム的に検討し, AI2により影響を受ける遺伝子とそれにより発現に変化の見られるタンパク質について網羅的に解析し, AI2によりRgpのタンパク質発現量と菌体のRgp活性の増加が起こることを明らかにした.

Rgpは*P. gingivalis*の主病原因子の1つであり, Rgpはヒトコラーゲン・タイプIやフィブロネクチン等を分解する作用があり, 歯周組織を直接的破壊する可能性^(20,21), ヒト免疫グロブリン^(20,21)やサイトカイン⁽²²⁾を分解する作用や好中球傷害作用があり^(20,21)宿主生体防御系を破壊する可能性, カリクレイン・カスケードの活性化⁽²³⁾, 補体の破壊作用があり⁽²⁴⁾炎症反応を亢進させる可能性, フィブリノーゲン・フィブリンの分解作用があり^(25,26), 歯周組織で易出血性を誘発する可能性, 血液凝固第X因子に対する活性化能があり⁽²⁷⁾, 汎発性血管内凝固症状を起こす可能性などが想定されている. さらにRgpはprotease activated receptorsを切断し, Rgp自身がIL-6の産生に関与するとの報告もある⁽²⁸⁾. このことよりAI2によりRgpの産生が増加することは口腔内バイオフィーム中において*P. gingivalis*の病原性の増加にも何らかの関与をしているものと推測された. AI2はAI1と異なり, 菌種を超えて広く作用する事が示されている⁽¹⁾. 我々も*luxS*遺伝子のframe shift変異によりAI2を産生出来ない*E. coli* DH5株に*luxS*遺伝子をligationしたプラスミドをtransformationすることにより産生されたAI2においても*P. gingivalis* N3株のRgpのタンパク質発現量が増加することを見ている. (data not shown) このように菌種の異なる菌からのAI2も広く作

用することが考えられる。また、口腔細菌においても既に幾つかの菌においてはAI2を産生することも報告されている⁽¹¹⁾。また、口腔内には500種程の細菌が存在するとされていることより⁽²⁹⁾、口腔内ではまだ検討されていない多くの細菌もAI2を産生する可能性がある。このことは口腔バイオフィーム中において*P. gingivalis*の菌数が少なくても他の菌が産生するAI2によりRgpの産生が増強され、強いては病原性の増大にも関係する可能性も十分考えられる。口腔バイオフィーム中において細菌相互にどの様に影響し合っているか不明な点が多い。これらを解明する糸口の1つとしてquorum sensingの作用を検討することも重要なことと思われる。

Rgpは病原因子としての役割のみならず、*P. gingivalis*の生育やタンパク質のプロセッシングにおいても重要な役割をしている^(30,31,32)。*P. gingivalis*は糖をエネルギー源として利用できず、アミノ酸をエネルギー源として利用する⁽³³⁾。*P. gingivalis*の主要なproteinaseはRgpとlysine specific cysteine proteinase (Kgp)の2つである⁽³⁴⁾。この2つの酵素の遺伝子が種々の研究室でとられ、それぞれ独自に命名され、活発に研究がなされてきた。その結果*P. gingivalis*において類似の性状を示す多くのproteinaseが存在することになった。1999年にこれらは詳細に比較され、遺伝子としては*rgpA*、*rgpB*、*kgp*と統一することが提唱され、酵素名はRgpとKgpとに統一することが提唱された⁽³⁵⁾。*P. gingivalis*はこの2つのproteinaseによりタンパク質をarginineおよびlysineのC末で切断したペプチドを形成し、その後*P. gingivalis*の産生する種々のペプチダーゼにより、アミノ酸まで分解し、利用するものと考えられている。また、RgpはRgp自身やKgpのプロセッシングをはじめ、線毛の成分であるfimbrillinや菌体表層成分である75kDaタンパク質のプロセシ

ングを行い、これらの活性のある成分形成に寄与していることも報告されている⁽³¹⁾。このことより、本実験におけるAI2によるRgpの増加は*P. gingivalis*の生育においても重要な因子になるものと想定される。

Rgpは*rgpA*遺伝子からなるRgpAと*rgpB*遺伝子よりなるRgpBからなり、RgpAはRgpのC末にadhesin domainと称されるHgp44、Hgp15、Hgp17、Hgp27と結合した形で発現され、それぞれがRgpとKgpによりプロセッシングを受ける^(26,36,37)。また、RgpBはRgpAと異なりC末にadhesin domainを結合しない形で発現される。Kgpは*kgp*遺伝子より発現され、KgpとそのC末にHgp(K)44、Hgp(K)15、Hgp(K)14、Hgp(K)30よりなるadhesin domainを結合した形で発現され、Rgp、Kgpによりプロセッシングを受け完成する。RgpおよびKgpは菌体から遊離するmonomeric formも存在するが、多くはRgp、Kgpとadhesin domainの各タンパク質がcomplex formを形成して外膜上に結合しているものと考えられている。Adhesin domainの一部はhemagglutininとして働いていることが示唆されている。本実験では親株と*luxS*変異株間においてHA活性の差異は見られなかったが、培養経過に伴いRgp活性が増加すると、HA活性も増加することが観察された。このことは外膜に結合しているRgpおよびadhesin domainのcomplex formの増加による可能性が考えられた。また、adhesin domainのHgp15はヘモグロビン結合に関与することが報告されている⁽³⁸⁾。*P. gingivalis*はシドロフォアを産生せず、鉄イオンの獲得が他の細菌とは異なる機構であるとされている⁽³⁹⁾。その1つとしてadhesin domainのHgp15がヘモグロビンと結合することにより鉄イオン獲得に関与しているとされている⁽³⁸⁾。このことはAI2により鉄獲得も亢進している可能性が示唆された。このこともRgpが

*P. gingivalis*の生存および発育に強く関与していることを示している。

以上のことより *P. gingivalis* は AI2 により Rgp の発現が増加する傾向があり, これは口腔バイオフィーム中における *P. gingivalis* の発育促進および病原因子発現に影響している可能性が強く示唆された。

謝 辞

変異株作製にあたりプラスミドの分与ならびに種々ご指導していただきました長崎大学歯学部, 庄子幹郎先生, 中山浩次教授に心より感謝申し上げます。2次元電気泳動についてご指導していただきました名古屋大学医学部, 中野みよ先生, 太田美智男教授に心より感謝申し上げます。2次元電気泳動後のタンパク質のスポットのN末端アミノ酸配列解析にご協力していただきました東京農業大学, 相根義昌先生に心より感謝申し上げます。

文 献

1. Bassler BL : How bacteria talk to each other : regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, **2** : 582-587, 1999.
2. Neilson KH, Platt T and Hastings JW : Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, **104** : 313-322, 1970.
3. Engebrecht J, Neilson K and Silverman M : Bacterial bioluminescence : isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, **32** : 773-781, 1983.
4. Engebrecht J and Silverman M : Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81** : 4154-4158, 1984.
5. Engebrecht J and Silverman M : Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res*, **15** : 10455-10467, 1987.
6. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ et al. : Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur J Biochem*, **216** : 281-291, 1993.
7. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PGGA et al. : Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*, **270** : 27299-27304, 1995.
8. Surette MG and Bassler BL : Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** : 7046-7050, 1998.
9. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP et al. : The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, **280** : 295-298, 1998.
10. Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W et al. : Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** : 15196-15201, 1999.
11. Frias J, Olle E and Alsina M : Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Infect Immun*, **69** : 3431-3434, 2001.
12. Chung WO, Park Y, Lamont RJ et al. : Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *J Bacteriol*, **183** : 3903-3909, 2001.
13. McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A et al. : LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii* : autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, **185** : 274-284, 2003.
14. Fong KP, Chung WO, Lamont RJ et al. : Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitance* LuxS. *Infect Immun*, **69** : 7625-7634, 2001.
15. Burgess NA, Kirke DF, Williams P et al. : LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology*, **148** : 763-772, 2002.
16. Smith GLF, Socransky SS, and Smith CM :

- Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*, **4** : 47-51, 1989.
17. Pridmore AM, Devine DA, Bonass WA et al. : Influence of sample preparation technique on two-dimensional gel electrophoresis of proteins from *Porphyromonas gingivalis*. *Letters in Applied Microbiology*, **28** : 245-249, 1999.
 18. Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K et al. : Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis* : construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp* and *hagA*. *J Biol Chem*, **274** : 17955-17960, 1999.
 19. Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E et al. : Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiology*, **149** : 1257-1264, 2003.
 20. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K et al. : 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.
 21. Abe N, Kadowaki T, Okamoto K et al. : Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J Biochem*, **123** : 305-312, 1998.
 22. Calkins CC, Platt K, Potempa J et al. : Inactivation of tumor necrosis factor- α by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, **273** : 6611-6614, 1998.
 23. Imamura T, Pike RN, Potempa J et al. : Pathogenesis of periodontitis : a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest*, **94** : 361-367, 1994.
 24. Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z et al. : Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bactroides) gingivalis*. *J Biol Chem*, **267** : 18902-18907, 1992.
 25. Imamura T, Potempa J, Pike RN et al. : 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.
 26. Okamoto K, Nakayama K, Kadowaki T et al. : Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, **273** : 21225-21231, 1998.
 27. Imamura T, Potempa J, Tanase S et al. : Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, **272** : 16062-16067, 1997.
 28. Loubakos A, Potempa J, Travis J et al. : Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*, **69** : 5121-5130, 2001.
 29. Moore WE and Moore LV : The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol*, **5** : 66-77, 2000.
 30. Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T et al. : Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol*, **178** : 2818-2824, 1996.
 31. Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F et al. : Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, **273** : 29072-29076, 1998.
 32. Nelson D, Potempa J, Kordula T et al. : Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human alpha1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem*, **274** : 12245-12251, 1999.
 33. Takahashi N, Sato T and Yamada T : Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*,

- 182 : 4704-4710, 2000.
34. Pike R, McGraw W, Potempa J et al. : 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.
35. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M et al. : Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, **34** : 464-472, 1999.
36. Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K et al. : Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem*, **270** : 23619-23626, 1995.
37. Okamoto K, Kadowaki T, Nakayama K et al. : Cloning and sequencing of the gene encoding a novel lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) in *Porphyromonas gingivalis* : structural relationship with the arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain). *J Biochem*, **120** : 398-406, 1996.
38. Nakayama K, Ratnayake DB, Tsukuba T et al. : Haemoglobin receptor protein is intragenically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microbiol*, **27** : 51-61, 1998.
39. Bramanti TE and Holt SC : Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol*, **173** : 7330-7339, 1991.