
学位論文

歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 HtrA のプロテアーゼ活性 および局在性について

本那 智昭

キーワード: *Porphyromonas gingivalis*, HtrA, セリンプロテアーゼ, 外膜小胞

Cloning, Expression and Characterization of HtrA of *Porphyromonas gingivalis*

Tomoaki HONNA

Abstract : HtrA (high-temperature requirement A) was initially described in *Escherichia coli* as a housekeeping protease in 1983. It is highly conserved in evolution, that is present in bacteria, yeast, plants and humans. In several microorganisms, HtrA is considered an important virulence factor that plays a regulatory role in high temperature and oxidative stress. HtrA also possesses chaperon activity at lower temperature. To investigate the role of HtrA in *Porphyromonas gingivalis*, a putative periodontopathogen, the gene of *htrA* was cloned from *P. gingivalis* W83 chromosomal DNA by polymerase chain reaction (PCR). The expression vector pGEX-*htrA* was constructed, and was transferred into *E. coli* BL21. A fusion protein, Glutathione S-transferase (GST)-HtrA was expressed under an atmosphere of isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), and then purified by Glutathione Sepharose 4B affinity chromatography. Recombinant HtrA (rHtrA), was then obtained by using PreScissionTM protease to remove the GST region. The purified rHtrA was recognized by an anti-HtrA antiserum. Partial amino acid sequencing of rHtrA showed Ser-Gly-Ala-Ser-Ala-Ala-Leu, which was identical to a part of the reported deduced amino acid sequence of *P. gingivalis* HtrA. Proteolytic activity of rHtrA was examined, using α -casein and β -casein as the substrates. Purified rHtrA degraded β -casein, however, was unable to degrade α -casein and the other proteins tested. Proteolytic activity was inhibited by serine protease inhibitors, such as *N* α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Therefore, *P. gingivalis* HtrA is considered to belong to the family of serine proteases. The localization of HtrA in bacterial cells was investigated by immunoblot analysis with an anti-HtrA antiserum, and it was suggested that HtrA existed in the outer membrane vesicles of *P. gingivalis*, which is involved in the virulence. The results thus suggest the possibility that HtrA contributes to the pathogenicity of *P. gingivalis*.

緒 言

HtrA (high-temperature requirement factor A) は、1983年に *Escherichia coli* において初めて報告された熱ショック誘導性のタンパク質であり、他に DegP, Protease Do の名前でも知られている¹⁾。HtrA は生物の種を超えて高度に保存されており、細菌、真菌、植物、ヒトなどで多くの相同タンパク質が同定されている²⁻⁴⁾。これまでに報告された HtrA ファミリーの主な機能は、熱ショックや酸化的ストレス等の環境ストレスに暴露されることによってダメージを被ったタンパク質や、折れ畳み障害を起こしたタンパク質を分解することであると考えられている⁵⁻⁸⁾。また、HtrA は低温では分子シャペロンとして機能することが知られている^{9,10)}。これまでの報告によると、HtrA ファミリーに共通な構造として、トリプシン様のプロテアーゼ領域を1つ持つことと、カルボキシ末端側にタンパク質結合機能を有する PDZ (PSD-95/Discs-Large/Zo-1) 領域¹¹⁻¹³⁾を少なくとも1つ以上持つことが挙げられる¹⁴⁾。PDZ 領域は高温ストレス等で変性したタンパク質を認識するのに重要な役割を果たしていると考えられている¹⁵⁾。*E. coli* をはじめとする種々の病原性細菌において、*htrA* を欠失させた変異株が作製され、野生型と比較することにより、その性状が検討されてきた。*E. coli* において HtrA は、42℃以上の高温ストレス環境下での生存に必須であることが示唆されている⁶⁾。*Salmonella* 属においては、*htrA* を欠失させることによって病原性を失わせた菌株がワクチン用に開発され、その有用性が唱えられている¹⁶⁾。食中毒の原因菌として知られる *Salmonella enterica serovar Typhimurium* では、HtrA は高温ストレスに対する抵抗性に必須ではないが、酸化的ストレスに対する抵抗性やマクロファージによる貪食後の内部での生存能に深く関与していると考えられている¹⁷⁾。また、*Brucella abortus* や *Yersinia enterocolitica* の *htrA* 変異株では、高温ストレス、酸化的ストレスの両方で野生型よりも高い感受性を示すことが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。*Listeria monocytogenes* では、44℃の高温、過酸化水素による酸化的ストレス、そして高濃度の NaCl に対する抵抗性に HtrA が必須であることが報告されている²¹⁾。また、*Salmonella* 属以外でも、*B. abortus*, *Y. enterocolitica* などの多くの病原性細菌において、*htrA* 変異株は野生型に比べて毒力が低下するという報告がある²²⁻²⁷⁾。環境ストレスに対する抵抗性だけでなく、う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* や、前述の *L. monocytogenes* では、そのバイオフィーム形成能に HtrA が関与する可能性が示唆されている^{21,22)}。このように、種々の病原性細菌において HtrA は、環境ストレスに対する抵抗性や、病原性に重要な役割を果たしている。

歯周炎の発症・進行に強く関わっていると考えられている *Porphyromonas gingivalis*^{30,31)} は、グラム陰性の小桿菌であり、偏性嫌気性細菌で、血液寒天培地上で黒色集

落を形成する。赤血球凝集性、ヘモグロビン吸着性、糖非発酵性などの性状を示し、また、宿主細胞への定着因子として機能する線毛を菌体表層に有している。さらに、細胞傷害や歯槽骨吸収を惹起する内毒素性リポ多糖体 (LPS) を菌体表層に有することや、強力なトリプシン様システインプロテアーゼとして知られる gingipain 類などの種々のタンパク質分解酵素を産生・分泌すること等が知られている^{30,32)}。この、*P. gingivalis* のゲノム DNA 中にも HtrA をコードする遺伝子が存在する³³⁾。しかしながら、*P. gingivalis* の HtrA の機能や、生理・病理学的な役割に関してはほとんど報告がない。他の病原性細菌において HtrA が環境ストレスに対する抵抗性や病原性に重要な役割を果たしているのと同様に、*P. gingivalis* の HtrA も重要な役割を演じている可能性が考えられる。本研究では *P. gingivalis* の HtrA をリコンビナントタンパク質として単離し、その性状を検索するとともに、本菌の歯周病原性に寄与する可能性について検討を行った。

方法と材料

1. 使用菌株およびプラスミド

本研究で使用した菌株およびプラスミドベクターを表1に示した。*P. gingivalis* W83株は、1950年に Werner によって初めて分離・同定されたもので、*P. gingivalis* のゲノム解析に採用された株である³³⁾。今回用いたものは、奥田克爾教授 (東京歯科大学) より恵与された。*E. coli* BL21 (Novagen, Darmstadt, Germany) および、*E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) は宿主細胞として使用した。*P. gingivalis* W83株は0.5% yeast extract, 0.0001% vitamin K₁, 0.0005% hemin を含む Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地を用いて37℃にて嫌気培養した³⁴⁾。*E. coli* 両菌株については、必要に応じて最終濃度 50 µg/ml の ampicillin (ナカライテスク社, 京都) を含む Luria-Bertani (LB) 培地を用いて培養した。Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質発現用プラスミドベクターとして pGEX-6P-1 (GE Healthcare UK Ltd., 以下 GE 社と略す, Amersham Place, Buckinghamshire, UK) を使用した。

表1 使用菌株とプラスミド

菌株	由来
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	H. Werner ^{a)}
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene 社
<i>Escherichia coli</i> BL21	Novagen 社
プラスミド	
pGEX-6P-1	GE ヘルスケア (株)

a) 文献33を参照

2. GST 融合タンパク質 GST-HtrA の発現

1) GST 融合タンパク質発現用ベクターの構築

P. gingivalis W83 のゲノム DNA の抽出は, Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Co., Madison, WI, USA) を用いて行った。これを鋳型とし, 制限酵素 *XhoI* 切断部位を認識する配列を付与したプライマー, *htrA-XhoI* sense および *htrA-XhoI* antisense (表 2) を用いて, *htrA* 遺伝子を PCR 法にて増幅した。PCR 産物とプラスミドベクターである pGEX-6P-1 をそれぞれ精製した後, 制限酵素 *XhoI* (Promega 社) を用いて消化した。制限酵素消化後の pGEX-6P-1 は, セルフライゲーション抑制のために, *E. coli* C75 由来アルカリフォスファターゼ (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて 5' 末端の脱リン酸化処理を行った。図 1 に示すように, PCR 産物を DNA ライゲーションキット (Mighty Mix, タカラバイオ社) を用いて pGEX-6P-1 に組み込み, 融合タンパク質 GST-HtrA 発現用ベクター pGEX-*htrA* とした³⁵⁾。発現用ベクター構築の各行程の確認のために, 1% アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。泳動済みのゲルを 10 mg/ml のエチジウムブロマイドに 10 分間浸漬した後, ゲル撮影装置プリントグラフ (AE-6911FXFD 型, アトー株式会社, 大阪) によって観察し, 評価した。

2) コロニー PCR による *htrA* 遺伝子挿入の確認とシーケンシング

精製した pGEX-*htrA* を用いて *E. coli* XL-1 Blue を塩化カルシウム法により形質転換し, 最終濃度 50 µg/ml の ampicillin を含む LB 寒天培地上で 18 時間培養してコロニーを得た。得られたコロニーについて, *htrA* の挿入の有無を確認するために, pGEX 5' sequencing プライ

マー, および pGEX 3' sequencing プライマー (表 2) を用いたコロニー PCR を行った (図 2 A)。次に, *htrA* 遺伝子の挿入方向を確認するために, 図 3 A, および表 3 に示すように, pGEX 5' sequencing, pGEX 3' sequencing, *htrA-XhoI* sense, *htrA-XhoI* antisense の 4 種類のプライマーを組み合わせてコロニー PCR を行い, 増幅の有無を評価した。正方向に挿入が確認されたコロニーを 5 ml の LB 液体培地に単離培養し, Quantem Prep® Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc. 以下 Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA) を用いてプラスミドを抽出した。エタノール沈殿を行って精製した後, プラスミドの DNA 塩基配列を調べた。すなわちシーケンシング用の各プライマーを用いて, 挿入された *htrA* 遺伝子について PCR を行い, 各 PCR 断片について, Big Dye Terminator Ver. 3 (Applied Biosystems, Inc., 以下 ABI 社, Foster City, CA, USA) を用いてシーケンシング反応後, DNA シーケンサー PRISM 3100 (ABI 社) を用いて塩基配列の確認を同定した。設計通りの塩基配列が確認されたプラスミド pGEX-*htrA* を用いて *E. coli* BL21 株を形質転換し, タンパク質発現用の遺伝子組換え大腸菌 pGEX-*htrA*/BL21 とした。

3) タンパク質の発現誘導

LB 液体培地 100 ml にて 37°C で 18 時間培養した pGEX-*htrA*/BL21 を, 50 µg/ml の ampicillin を含む新鮮な LB 液体培地 400 ml に 100 分の 1 以下に希釈して接種し, 30°C で 6 時間振盪培養した。濁度 (OD₅₅₀) が 0.5 に達した時点で培養器の温度を 18°C に調整し, 最終濃度 0.1 mM の Isopropyl-thio-β-D-galactopyranoside (以下 IPTG, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を添加して 15 時間培

表 2 PCR および DNA 塩基配列決定に使用したプライマー

プライマー	塩基配列	アニーリング温度(°C)
PCR		
<i>htrA-XhoI</i> sense	5'-CCG CTCGAG CGGATGAACAAAGTGTGGAAA-3'	66
<i>htrA-XhoI</i> antisense	5'-CCG CTCGAG CGGTTATAGTTCTACTTCGAA-3'	64.6
DNA 塩基配列決定		
<i>htrA</i> -301	5'-TTCGGAGGCGAATCCAGAACTT-3'	58.7
<i>htrA</i> -661	5'-CAGGTGGCCAGAGGCGGTTTCGCT-3'	67.6
<i>htrA</i> -1021	5'-AAGGGGGATGTGATCACCGCCGT-3'	64
<i>htrA</i> -1381	5'-GGTGCCGATGTCAGCGACATCGT-3'	64
<i>htrA</i> -1200 antisense	5'-GGTGATTACCGAAGTACTTCTCCA-3'	58.8
<i>htrA</i> -840 antisense	5'-GGAAATAGGTACGGCAAATGAGTAG-3'	58.8
<i>htrA</i> -480 antisense	5'-ACCGATCAGATTGGCCTTGAAGGTA-3'	60.5
<i>htrA</i> -120 antisense	5'-GGAGGCTCCGATGTCGTTGTGTA-3'	63.8
pGEX 5' sequencing	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	65.8
pGEX 3' sequencing	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'	65.5

下線部: 制限酵素 *XhoI* 認識配列

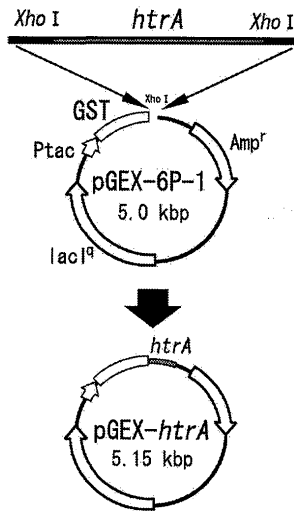


図1 クローニングの概要
プラスミドベクター pGEX-6P-1 の XhoI による切断部位に htrA 断片を挿入した。

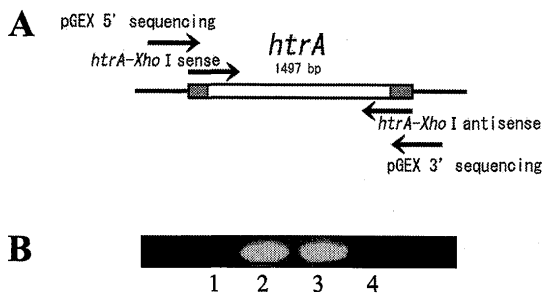


図3 htrA 挿入方向確認の為のコロニー PCR
A 模式図：4 種類のプライマーの組み合わせにより htrA の挿入方向を確認した。
B アガロースゲル電気泳動による評価の結果 (表3 参照)。htrA が正方向に挿入されているコロニーではレーン 1, 4 (表3 ①, ④と対応) の組み合わせでは増幅されず、レーン 2, 3 (表3 ②, ③と対応) の組み合わせで増幅が見られる。

養し、組み換えタンパク質の発現誘導を行った。10,000 ×g, 10分, 4℃で遠心分離して集菌し、20 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に再懸濁後、氷浴中で、超音波細胞破碎装置 Bioruptor UCD-200T (コスモバイオ株式会社, 東京) を用いて、最高出力にて30秒超音波破碎し、30秒冷却する操作を3回繰り返した。これを15,000 ×g, 25分, 4℃で遠心分離した上清を、可溶性 GST-HtrA 粗抽出画分とした。

4) リコンビナント HtrA (rHtrA) の精製

rHtrA の精製には RediPack GST Purification Modules

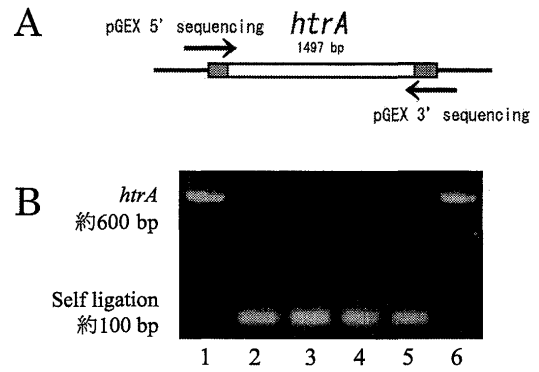


図2 htrA 挿入確認の為のコロニー PCR
A 模式図：pGEX 5' sequencing プライマーおよび pGEX 3' sequencing プライマーを用いて LB 寒天培地上に得られたコロニーから直接 htrA を PCR 増幅した。
B アガロースゲル電気泳動による評価。htrA が挿入されているコロニー (レーン 1, 6) では約 1600 bp, 挿入されていないコロニー (レーン 2 ~ 5) では約 100 bp の増幅産物が確認された。

表3 htrA 挿入方向確認の為のコロニー PCR に用いたプライマーの組み合わせ

	プライマー	正方向	逆方向
①	pGEX 5' sequencing htrA-XhoI sense	×	○
②	pGEX 5' sequencing htrA-XhoI antisense	○	×
③	htrA-XhoI sense pGEX 3' sequencing	○	×
④	pGEX 3' sequencing htrA-XhoI antisense	×	○

正方向で htrA が挿入されている場合、②, ③の組み合わせで増幅が認められる。逆方向で挿入されている場合は①, ④で増幅が認められる。

(GE 社) を使用した。20 ml の超音波破碎上清 (可溶性画分) 中に含まれる GST-HtrA と、200 μl の Glutathione Sepharose 4B を 4℃, 16時間振盪して結合させた後、専用カラム内へ充填した。融合タンパク質が結合した Glutathione Sepharose 4B を 2 ml の PBS で 3 回洗浄後、さらに 2 ml の Cleavage buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 以下 DTT を含む 50 mM トリス緩衝液, pH 7.0) で 2 回洗浄した。カラム内へ 16 units の PreScission™ プロテアーゼ (GE 社) を含む Cleavage buffer 200 μl を添加し、4℃で16時間反応させた。Glutathione

Sepharose 4B に結合した GST 部分と HtrA との間で切断することにより目的の rHtrA を回収した。rHtrA 精製の各行程の評価のために、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (SDS-PAGE) 分析を行った。泳動後のゲルを Coomassie® Brilliant Blue R-250 (以下 CBB, Bio-Rad 社) を用いて染色した。また、SDS-PAGE により分離したタンパク質をニトロセルロース膜 (No. 162-0115, Bio-Rad 社) に転写し、ウェスタンブロット法による解析を行った。すなわち、転写した膜を 3% BSA を含む PBS でブロッキングした後、0.1% Tween-20 を含む PBS (PBST) で 10,000 倍希釈したペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗 GST 抗体 (GE 社) を用いて、25°C で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、ECL-plus 化学発光検出キット (GE 社) を用いて GST-HtrA のバンドを検出した。

5) N-末端アミノ酸シーケンス

単離した rHtrA を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離し、PolyScreen® PVDF Transfer Membrane (NENTM Life Science Products, Inc., Boston, USA) に転写用緩衝液 (10 mM CAPS, 10% メタノール, pH 11.0) を用いて、90 V (300 mA), 90 分の条件で転写した。転写後の膜を CBB にて染色後、単一バンドを切り出し、N-末端 7 残基についてアミノ酸配列を Edman 分析法にて解析した³⁶⁾。

3. rHtrA のタンパク質分解活性

α カゼインおよび β カゼイン (ともに Sigma, St. Louis, MO, USA) を基質として用い、rHtrA のタンパク質分解活性を評価した。2% α カゼイン、あるいは β カゼインを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) 70 μ l に 200 μ g/ml の rHtrA を 10 μ l 添加し、37°C の恒温槽内で反応させた。1 時間、3 時間、6 時間、9 時間、18 時間反応させた各試料に、10% SDS と 5% β -mercapto ethanol を含む 0.1% トリス緩衝液 (pH 6.8) を等量添加した後、100°C、10 分間加熱処理して反応を停止させた。これらを SDS-PAGE で電気泳動した後 CBB 染色を行い、タンパク質分解の程度を評価した。さらに、定量的な活性の評価は、蛍光物質 Fluram® (Fluka chemie AG, Buchs, Germany) を用いて行った^{37,38)}。すなわち、37°C で一定時間の反応後の溶液 80 μ l に対して 15% トリクロロ酢酸溶液 (TCA) を 40 μ l 加えて反応を停止させ、12,000 \times g、10 分間遠心分離した上清 50 μ l に 1.2 ml の 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) と 0.03% Fluram® を含むアセトン 50 μ l を添加し、室温で十分攪拌の後、励起波長 390 nm、測定波長 480 nm の条件で分光蛍光光度計 FP-6200 LST (日本分光株式会社, 東京) で各試料の蛍光強度を測定した。

4. rHtrA の人工基質に対する分解能試験

N α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BApNA, Sigma 社), *N* α -benzoyl-DL-lysine *p*-nitroanilide (BLpNA, Sigma 社), *N*-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BTpNA, ナカラ

イテスク社), *N*-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine *p*-nitroanilide [Suc(Ala)₃pNA, ナカライテスク社], *N*-benzoyl-propyl-phenylalanyl-arginine *p*-nitroanilide (Pro-Phe-Arg pNA, Sigma 社), glycyl-proline *p*-nitroanilide (Gly-Pro pNA, Sigma 社), *N*-carbobenzoyl-glycyl-glycyl-L-Arginine β -naphthylamide (N-CBz-Gly-Gly-Arg β -NA, Sigma 社) を基質として分解能試験を行った。各人工基質は、それぞれ 100% の Dimethyl Sulfoxide (DMSO, ナカライテスク社) に溶解させた後、等量の滅菌蒸留水で希釈して使用した。10 mM の各人工基質 20 μ l を 240 μ l の 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.4) に加え、さらに 100 μ g/ml の rHtrA を 40 μ l 添加し、合計 300 μ l の反応液を 37°C で 1 時間反応させた。次いで 100 μ l の 4 M の酢酸を加えて反応を停止し、U-2000 A 型日立ダブルビーム分光光度計 (株式会社日立製作所, 東京) を用いて 410 nm の吸光度を測定した³⁹⁾。

5. rHtrA の β カゼイン分解活性に対する各種酵素阻害剤の影響

セリンプロテアーゼ阻害剤として phenylmethylsulfonyl fluoride (以下 PMSF, Sigma 社) および *N* α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (以下 TLCK, Sigma 社) を、システインプロテアーゼ阻害剤として *N*-ethylmaleimide (以下 NEM, Sigma 社) を、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤として pepstatin A (ペプチド研究所, 大阪) を、メタロプロテアーゼ阻害剤として 1,10-phenanthroline (ナカライテスク社) をそれぞれ使用した。TLCK は滅菌蒸留水に、PMSF と NEM は 100% エタノールに、pepstatin A は 100% DMSO に、1,10-phenanthroline は 100% メタノールに溶解した後、滅菌蒸留水で希釈して用いた。60 μ l の 2% β カゼインを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) に 200 μ g/ml の rHtrA 10 μ l と、種々の濃度に調整した各酵素阻害剤 10 μ l を添加し、37°C の恒温槽内で 15 時間反応させた。15% TCA 溶液を 40 μ l 加えて反応を停止し、12,000 \times g、10 分間遠心分離した上清 50 μ l に 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 1.2 ml と 0.03% Fluram® を含むアセトン 50 μ l を添加し、励起波長 390 nm、測定波長 480 nm の条件で分光蛍光光度計 FP-6200 LST (日本分光社) で測定した^{34,39)}。

6. *P. gingivalis* の外膜小胞の調製

0.5% yeast extract, 0.0001% vitamin K₁, および 0.0005% hemin を含む 1,000 ml の BHI 液体培地にて 37°C で 2 日間嫌気培養した *P. gingivalis* W83 株を、10,000 \times g、15 分間遠心分離し、上清を回収した。この上清に 240 g の硫酸アンモニウム (ナカライテスク社) を 2 時間以上かけて徐々に加え 40% 飽和とし、24 時間攪拌後、10,000 \times g、40 分間遠心分離して上清を取り除き、沈渣を 0.5 mM DTT を含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 9.5) 30 ml で再懸濁した。同じ緩衝液に対し、48 時間透析を行った (液

交換3回)。透析が終わった試料を10,000×g, 40分で遠心を行い、その上清を回収し、これをさらに27,000×g, 40分、超遠心を行った。その沈渣を0.5 mM DTTを含む10 mM トリス緩衝液 (pH 7.2) 10 ml で再懸濁後、再度27,000×g, 40分間の超遠心により沈渣を洗浄し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.2) に懸濁したものを外膜小胞画分とした⁴⁰⁾。試料は使用するまで-20℃で冷凍保存した。

7. rHtrA の検出

rHtrA の検出のために、*P. gingivalis* W83 HtrA の15アミノ酸残基を認識する特異抗血清 (以下抗 HtrA 抗血清と略す) を作製した。遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX version 7 (ゼネテイクス, 東京) を用い、*P. gingivalis* の HtrA のアミノ酸配列より、親水性部位を選択し、Chou-Fasman のタンパク質二次構造予測結果よりターン構造を確認し、タンパク質分子表面に存在する部位を推定した。選択した15アミノ酸残基 (133-TNNHVVKGAKEMTVT) のN-末端にCysを配置した、計16アミノ酸残基を抗原ペプチドとして合成し、キーホールリンペットヘモシアニンに結合させた。これを家兎 (日本白色種) に2週おきに免疫し、免疫後11週目に全採血し、血清を分離したものを抗 HtrA 抗血清とした。ニトロセルロース膜に転写した rHtrA を、PBST で1,000倍希釈した抗 HtrA 抗血清と25℃で18時間反応させ、PBST で洗浄後、2次抗体として3,000倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (Bio-Rad 社) を25℃で1時間反応させた。PBST で十分に洗浄後、HRP 発色キット (No. 170-6431, Bio-Rad 社) を用いて rHtrA を検出した。

8. HtrA の局在性の検索

抗 HtrA 抗血清を用いて、HtrA の局在性をドットプロット法により分析した。試料としては、精製した rHtrA、全菌体を超音波破碎した遠心分離上清、および外膜小胞画分を用いた。Bio-Dot® SF Apparatus (Bio-Rad 社) にニトロセルロース膜をセット後、総タンパク質量 20 µg の各抗原 100 µl をウェルに添加し、自然濾過した。3% BSA を含む PBST でブロッキング後、PBST を用いて洗浄した。1次抗体として PBST にて1,000倍希釈した抗 HtrA 抗血清を用い、25℃で15時間反応させた。PBST で十分に洗浄後、2次抗体として PBST にて3,000倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) を用い、25℃で1時間反応させた。PBST で十分に洗浄した後、HRP 発色キット (Bio-Rad 社) を用いて検出した。1次抗体として非免疫血清を用いたものを陰性対照とした。

結 果

1. クローニングベクター pGEX-htrA の構築

PCR による増幅産物は、アガロースゲル電気泳動の結果、*P. gingivalis* W83 の htrA 遺伝子のサイズ (約

1,500 bp) に一致する単一バンドとして検出された (図4)。PCR 産物とプラスミドベクター pGEX-6P-1 を制限酵素 *XhoI* で消化した後ライゲーションし、これを用いて *E. coli* XL-1 Blue 株を形質転換した。寒天培地上に得られたコロニーについて、htrA の挿入の有無をコロニー PCR で確認し、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物のサイズを見ることにより htrA が挿入されているコロニーを検索した (図2B)。次に、htrA の挿入を確認したコロニーについて、表3に示す4種類のプライマーの組み合わせによるコロニー PCR を行い、増幅産物の有無によって htrA 遺伝子が正方向で挿入されているコロニーだけを抽出した (図3B)。DNA 配列を決定した上で、*P. gingivalis* W83 htrA (NCBI accession: NP_904880) が pGEX-6P-1 に正しく挿入されていることが確認されたプラスミドを GST-HtrA 融合タンパク質発現用ベクター pGEX-htrA として選択した。

2. リコンビナント HtrA の精製

構築した発現用ベクター pGEX-htrA を用いて *E. coli* BL21 株を形質転換し、pGEX-htrA/BL21 とした。予備実験として、IPTG によるタンパク質発現誘導の条件について、IPTG の添加濃度、誘導時の培養温度、誘導時間、誘導後の超音波破碎の条件等を検討した。その結果、GST-HtrA 融合タンパク質は、pGEX-htrA/BL21 の培養密度が OD₅₅₀ で0.5の時に、最終濃度 0.1 mM の IPTG を添加し、18℃で15時間発現誘導を行った場合に、最も効率よく可溶性画分に回収することができた。SDS-PAGE による分析と、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、融合タンパク質 GST-HtrA は 73 kDa のバンドとして確認された (図5A)。可溶性画分 20 ml 中より、GST-HtrA を Glutathione Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーを用いて単離した。カラム内で PreScission™ プロテアーゼを用い、融合タンパク質の GST 部分を切断し、目的の rHtrA を回収した。得られた rHtrA は SDS-PAGE 分析の結果、48 kDa のほぼ単一なバンドとして確認された (図5B)。また、ウェスタンブロッティングの結果、48 kDa のバンドは抗 HtrA 抗血清と反応した (図5C)。

3. N-末端アミノ酸シーケンス

48 kDa の rHtrA について N-末端7残基についてアミノ酸シーケンス分析を行った結果、Ser-Gly-Ala-Ser-Ala-Ala-Leu のアミノ酸配列であった。National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースを利用し、得られた7アミノ酸残基について、*P. gingivalis* W83 の HtrA のアミノ酸配列データと比較した結果、57-Ser から始まるアミノ酸7残基と一致した。また、この7残基を NCBI で Blast Search を用いて検索した結果、一致する配列は *P. gingivalis* の HtrA のみであり、他に該当する配列は存在しなかった。

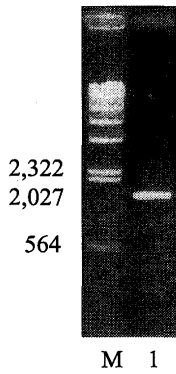


図4 htrA PCR 増幅産物
M : DNA サイズマーカー (DNA MW Standard Marker λ -Hind III digest), レーン 1 : PCR で増幅した *htrA*。約1,500 bp。

4. rHtrA のタンパク質分解活性

rHtrA を α カゼインおよび β カゼイン に37°Cで9時間反応させた場合の分解能を SDS-PAGE によって検討した結果, rHtrA は β カゼインのみを分解し, α カゼインに対しては分解活性を示さなかった (図6)。同様の方法で1, 3, 6, 9, 18時間後の分解能を分析した結果, rHtrA が時間の経過とともに β カゼインを分解していることが確認された (図7)。また, 蛍光物質 Fluram[®] を使用し, rHtrA の β カゼイン分解活性の経時的な変化を蛍光強度を測定することによって定量的に評価した実験においても同様の結果が得られた (図8)。

5. rHtrA の β カゼイン分解能に対する各種酵素阻害剤の影響

rHtrA と β カゼインを37°Cで15時間反応させた時の分解活性に, 各種酵素阻害剤が及ぼす影響を蛍光強度測定によって評価した。酵素阻害剤を加えない時の rHtrA の β カゼイン分解活性を100%と定義した。各種酵素阻害剤を添加した場合の残存活性を表4に示した。rHtrA の β カゼイン分解活性は, セリンプロテアーゼ阻害剤の一つである PMSF を 0.1mM 加えた場合, 50.9%, 1.0 mM 加えた場合, 60.3%阻害された。同じくセリンプロテアーゼ阻害剤の TLCK を加えた場合においても43.5%~49.4%の阻害が見られた。システインプロテアーゼ阻害剤である NEM では 33%~57.7%の阻害が見られた。アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の pepstatin A およびメタロプロテアーゼ阻害剤の 1,10-phenanthroline ではほとんど影響が認められなかった。

6. rHtrA の人工基質に対するプロテアーゼ活性

7種類の人工基質に対する rHtrA の分解活性を評価した。各種人工基質と rHtrA を37°Cで15時間反応させた

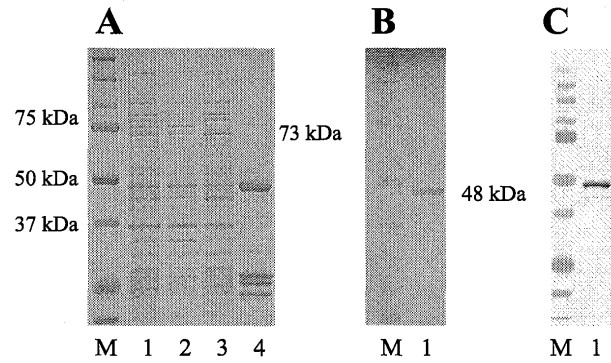


図5 rHtrA の発現と精製
A rHtrA 発現と精製の行程を SDS-PAGE で評価。M : 分子サイズマーカー, レーン 1 : pGEX-HtrA/BL21全菌体, レーン 2 : pGEX-HtrA/BL21 不溶性画分, レーン 3 : pGEX-HtrA/BL21可溶性画分, レーン 4 : pGEX-HtrA が結合した Glutathione Sepharose 4B ゲル
B 単離した rHtrA を SDS-PAGE で評価。M : 分子サイズマーカー, レーン 1 : Pre-Scission[™] プロテアーゼで切断した rHtrA
C 抗HtrA 抗体を用いたウェスタンブロッティング。M : 分子サイズマーカー, レーン 1 : rHtrA

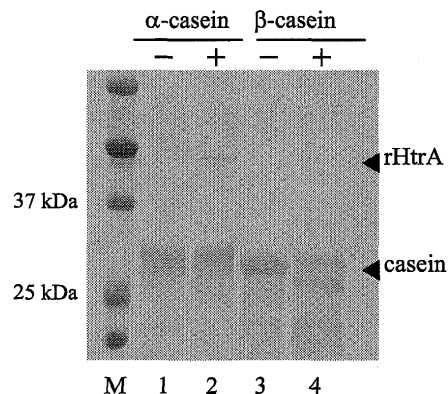


図6 rHtrA のカゼイン分解能
 α カゼインおよび β カゼインと rHtrA を37°C, 9時間反応させた時の分解能を SDS-PAGE で評価した。
 α カゼイン (レーン 1, 2), β カゼイン (レーン 3, 4)
+ : rHtrA 添加, - : rHtrA 無添加

時の分解活性を 410 nm の吸光度を測定することによって評価した。rHtrA は, 試験した BApNA, BLpNA, BTpNA, Suc(Ala)₃pNA, Pro-Phe-Arg pNA, Gly-Pro pNA, N-CBz-Gly-Gly-Arg β -NA の7種類全ての人工基質に対して分解活性を示さなかった。

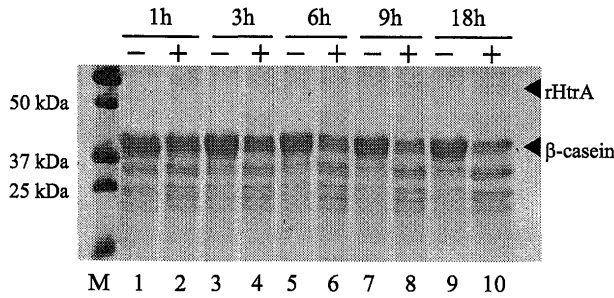


図7 rHtrA のβカゼイン分解能の経時的評価
βカゼインとrHtrAをそれぞれ1時間(レーン1, 2), 3時間(レーン3, 4), 6時間(レーン5, 6), 9時間(レーン7, 8), 10時間(レーン9, 10)反応させた時の分解能をSDS-PAGEで評価した。
+ : rHtrA 添加, - : rHtrA 無添加

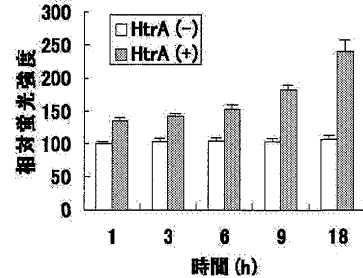


図8 rHtrA のβカゼイン分解能 蛍光強度測定による評価
rHtrA をβカゼインと1, 3, 6, 9, 18時間反応させた時の蛍光強度を測定した。
HtrA (-) : 無添加, HtrA (+) : 添加
HtrA 無添加で0時間の時の蛍光強度を100%とし, 各条件の時の蛍光強度の相対値をy軸に示す。データはトリプリケート・アッセイの平均と標準偏差で示している。

表4 rHtrA のβカゼイン分解活性に対する各種酵素阻害剤の影響

阻害剤	濃度 (mM)	残存活性 ^{a)} (%)
無添加	-	100
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	0.1	49.1
	1.0	39.7
Nα-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	0.1	56.5
	1.0	50.6
N-ethylmaleimide (NEM)	0.1	67
	1.0	42.3
Pepstatin A	0.1	100
	1.0	97.5
1,10-Phenanthroline	0.1	100
	1.0	100

a) 酵素阻害剤無添加の時のrHtrAのβカゼインに対する分解能を100%とし, 各種酵素阻害剤添加時の影響を残存活性 (%) で示した。

7. HtrA の局在性

抗HtrA抗血清を用いたドットプロット分析の結果, 外膜小胞画分には精製したrHtrA画分と同様に抗体の結合が認められた(図9)。非免疫血清を用いた対照実験では反応が見られなかった。これによりHtrAが*P. gingivalis*の外膜小胞中に存在することが示唆された。

考 察

本研究では, 種々の病原性細菌において環境ストレスに対する抵抗性や, 毒力の発揮に重要な役割があると考えられているHtrAをコードする遺伝子が, 歯周病原性細菌*P. gingivalis*のゲノムDNA中に存在することに注目した。HtrAは, 生物の種を超えて高度に保存され

たタンパク質であり, とくに哺乳類のHtrAでは, 牛, 兎, モルモットのHtrAとヒトのHtrAとが98%以上の非常に高い相同性を示すことが報告されている⁴¹⁾。また, *E. coli*のHtrAとヒトのHtrAでは, アミノ酸配列で42%の高い相同性を示し, とくにプロテアーゼ活性領域とPDZ領域の, 機能的に主要な領域では高い相同性を示す⁴¹⁾。*P. gingivalis*のHtrAのアミノ酸配列と他の病原性細菌のHtrAのアミノ酸配列についての相同性検索を行った結果, *E. coli*のHtrAとは39%, *S. typhimurium*のHtrAとは40%の相同性を示した。また, ヒトで報告されているHtrA1, HtrA2, HtrA3とはそれぞれ36%, 34%, 36%の相同性を示した。*P. gingivalis*のHtrAの性状や, 生理学的役割を理解する上で, これらの相同タン

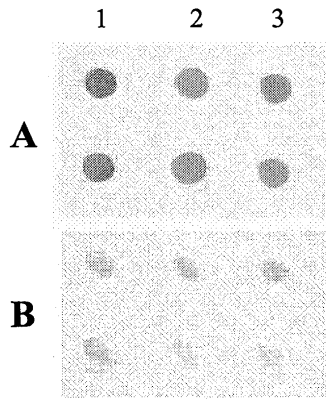


図9 HtrA の *P. gingivalis* 菌体内における局在性の分析
ドットプロット分析による評価。レーン 1 :
rHtrA, レーン 2 : *P. gingivalis* 菌体, レーン 3 :
超音波破碎した外膜小胞。A : 抗 HtrA 抗体を 1
次抗体として使用, B : 非免疫血清を 1 次抗体と
して用いた対照実験。

パク質で報告されている機能を理解することは非常に大きな意味を持つと考えられる。*P. gingivalis* の HtrA のアミノ酸配列中には、他の HtrA ファミリーでこれまでに報告があったのと同様、トリプシン様の領域が 1 箇所と、カルボキシ末端側に PDZ 領域が 2 箇所保存されている。PDZ 領域とは、最初にこの領域が発見された 3 つのタンパク質の名前 (PSD-95, DLZ, ZO-1) の頭文字に由来しており、他に DH 領域, GLGF リピートの名前でも知られている。PDZ 領域は、ヒトの HtrA1 ではプロテアーゼ活性の調節因子としても機能することが示唆されているが⁴²⁾, *E. coli* の HtrA 相同体である DegS の PDZ 領域は、ミスフォールドを起こした外膜のポーリンのカルボキシ末端の短いアミノ酸配列 (-YYF-COOH) を認識し、結合に関与することが示唆されている¹⁵⁾。*P. gingivalis* HtrA における PDZ 領域の役割ははまだ不明であるが⁴²⁾, *E. coli* の HtrA の PDZ 領域と同様に、基質を認識する機能を担っているのではないかと推察する。

本研究では、*P. gingivalis* の HtrA の性状を検索するために、GST 融合タンパク質発現用ベクター pGEX-6-1 を利用してリコンビナントタンパク質として単離した。得られたタンパク質 rHtrA を PVDF 膜に転写し、N-末端 7 残基についてアミノ酸シーケンス分析を行った結果、57-Ser から始まる *P. gingivalis* W83 HtrA のアミノ酸 7 残基と一致した。Blast Search による検索の結果、この 7 残基の配列は *P. gingivalis* の HtrA のみに存在するものであり、単離したリコンビナントタンパク質が *P. gingivalis* 由来の HtrA の一部であることが確認された。この結果を受けて、N-末端の 56 アミノ酸が脱落した理由について検討を行った。結果には示していないが、IPTG による発現誘導を行うと、弱い 73 kDa のバンド (GST-HtrA) が出現すると同時に 48 kDa の強いバン

ドが出現し、またこの 2 本のバンドは IPTG と挙動をとともにした。融合タンパク質を Glutathione Sepharose 4B に結合させたものを SDS-PAGE で分離すると、同じく 48 kDa の位置に明瞭なバンドが認められる (図 5 A)。この結合ゲルから還元型グルタチオンを用いて融合タンパク質を溶出させたものでも同じく 48 kDa の強いバンドが認められる。さらに、還元型グルタチオンを除去し、PreScission™ プロテアーゼで処理して GST と HtrA を切断後、再度アフィニティークロマトグラフィーを行うと、約 26 kDa の GST 部分は Glutathione Sepharose 4B に吸着し、カラム通過画分として得られるサンプルは酵素処理前と同じ 48 kDa であった。PreScission™ プロテアーゼ処理の前後で Glutathione Sepharose 4B に対する親和性に変化があるにも関わらず、SDS-PAGE による分析の結果検出されるのは同じ 48 kDa のバンドであり、この結果は切断された GST 分の分子サイズを反映していない。これらの結果から、SDS-PAGE での分析のための処理を行うことによって、N-末端 56 残基が切断されている可能性が考えられる。すなわち、泳動前のサンプルでは PreScission™ プロテアーゼ認識配列から始まる全ての配列が含まれており、これが電気泳動のために行われた前処理により、あるいは泳動中に受ける負荷により 56-Thr, 57-Ser 間で切断されている可能性が高い。*E. coli* HtrA では、翻訳後、不安定な 51 kDa の前駆体から 48 kDa に修飾されることが知られている⁴¹⁾。また、この 48 kDa の活性型の一部は 2 種類の 43 kDa ペプチドに自己消化されることが知られている⁴²⁾。しかしながら、今回 GST 融合タンパク質として発現した試料において、そのような自己消化が起きたということは、上述の Glutathione Sepharose 4B に対する親和性の分析結果から否定される。*P. gingivalis* HtrA でも *E. coli* と同様の翻訳後修飾、自己消化が行われるかどうかは不明であり、今後、さらに検討する必要がある。

得られた 48 kDa の rHtrA の性状を検討するために、他の HtrA ファミリーで報告があるタンパク質分解活性を有するかどうかを検討した。 α カゼインと β カゼインに対する分解能を SDS-PAGE を用いて評価した結果、rHtrA は β カゼインのみを特異的に分解した (図 6)。 β カゼインに対する rHtrA の分解能を経時的に評価した結果、rHtrA は時間の経過とともに緩やかに β カゼインを分解していることが認められた (図 7)。結果には示さないが、rHtrA は $\alpha 1$ anti-trypsin やウシ血清アルブミン (以下 BSA) は分解しなかった。この β カゼインに対する基質特異性は、*E. coli* 由来の精製された HtrA によるタンパク質分解能試験の結果⁷⁾ と類似していた。すなわち *E. coli* 由来の HtrA は β カゼインを特異的に分解し、 α カゼインや BSA, ovalbumin, globulin などの他のタンパク質に対してはほとんど分解活性を示さないことが報告されている⁷⁾。また、人工基質に対するプロテアーゼ活性を検討した結果、rHtrA は試験したすべての

人工基質を分解することができなかったが、この結果もまた *E. coli* で試験された人工基質分解能試験の結果⁷⁾と一致している。rHtrA のタンパク質分解活性の性状を検討するために、rHtrA と β カゼインの反応液中に各種酵素阻害剤を添加した場合の影響を検討した結果、 β カゼイン分解活性は、セリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF、および TLCK によって40~60%の阻害が認められた。また、システインプロテアーゼ阻害剤である NEM でも30%~60%の阻害が見られた。アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤およびメタロプロテアーゼ阻害剤ではほとんど影響が認められなかった。この結果は *E. coli* HtrA で試験された酵素活性阻害実験の結果と類似している。活性型 48 kDa の *E. coli* HtrA は、既知のセリンプロテアーゼの活性セリン残基周辺の配列 Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Ala-Lys と非常に類似した、208-Gly-Asn-Ser-Gly-Gly-Ala-Lys のアミノ酸配列を有しており、210-Ser は115-His、135-Asp とともに触媒三残基を形成していると考えられている。210-Ser と115-His をそれぞれ Ala、Arg に置換した HtrA では、タンパク質分解活性が著しく減弱することが報告されている⁴⁵⁾。今回、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX version 7 を用いて *E. coli* と、*P. gingivalis* の HtrA のアミノ酸配列についての相同性を検索した結果、*P. gingivalis* の HtrA のアミノ酸配列中にも、この触媒三残基が保存されていることが明らかとなった(図10)。rHtrA の β カゼイン分解能が、セリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF と TLCK で阻害されることから、*P. gingivalis* HtrA はセリンプロテアーゼの一種であることが示唆された。哺乳動物のセリンプロテアーゼでは、まず活性のない前駆体ポリペプチドとして産生された後に、アミノ末端部分が切断されてから活性型になることが一般的に知られているが、*E. coli* の HtrA でも翻訳後 51 kDa の不安定な前駆体から N-末端 26 アミノ酸残基が離れ、48 kDa の活性型に修飾される⁴³⁾。ただし、哺乳動物のセリンプロテアーゼの切断部位のアミノ酸配列と、*E. coli* の切断部位とは共通性は認められない。今回の研究で、*P. gingivalis* の HtrA はアミノ末端側領域を全て含む形でプロテアーゼ活性の評価を行って、上述の結果を得た。*P. gingivalis* の HtrA のアミノ酸配列においては、*E. coli* の切断部位 (25A-26AETS) と哺乳動物のセリンプロテアーゼの切断部位 (R-IVGG, R-VVGG) とも相同性のある配列は見いだされず(図10)、プロセッシングがプロテアーゼ活性の発揮に必須ではないと思われる。しかしながら、適当な部位で N-末端領域を欠失することによって、活性が上昇したり、基質特異性が変化する可能性は十分に考えられるので、この点についても今後の検討が必要であると考えている。

次に、*P. gingivalis* の病原性と深く関連すると考えられている外膜小胞⁴⁶⁾中に HtrA が局在するかどうかを、抗 HtrA 抗血清を用いたイムノプロット分析により検索

```

1' MKKTT LALSALSL GLALSPLSAT AETSATTA QMPSLAPML EKVMPSVYSI
1" MNKVWVYVTF AFGIAAVSAV ASVATVAALG HYRGESFITD GTENEFGFKQ TSYTTTSGAS
56' NVEGSTTVNT PRMPRNFQF FGDSSPFCQE GSPFQSSPFC QGGQGGN-GG QQQKFMALG
61" AALPHLVGAA EASVHAVVHI KVSEQRMSD QYFDFPEFF FGGSERNFQR PQRTRQVYVG
115' SGVIIDADKQ YVVTNNHVVD NATVIKVLQ DGRKFDKAMV GEDRSDIAL IQIQNPKNLT
121" SGVIISTD-G YI TNNHVYK GAKEMVTLN DNRTFKAKLI GEDTDDIAL LKV-DAKGLP
175' AIKMADSDAL RVGDYTVAI G NPFGLGETVT SGIVSALGRS -----GLNAE NYENFIQTDA
179" TIFPGSDSKL RVGEWVLA G NPFNLTSTVT AGIVSAKGRS TQQVARGSSL QIESFIQTDA
230' AINIGNSGGA LVNNGELIG INTAIIAPDG GNIGIGFAIP SNMVKNLTSQ MVEYQVQKRG
239" AVNIGNSGGA LVNDRGELIG INTMIYSQTG NYAGYSFAVP ISIAAKVYAD IKQYGTVQRA
290' ELGIMGTELN SELAKAMKVD AQRGAFVSQV LPNSSAAKAG IKAGDVTSL NGKPISSFAA
299" VLGIAAGDIS DEAVKEYDLK VREGALVADF AEVSAIISAG MQKGDVITAV EGKQIKSFPQ
350' LRAQVGTMPV GSKLTLGLLR DG--KQVNVN LELQQSSQNG V-----DS SSIFNGIEGA
359" LQEAISRYRP GDKVLTINR KGATKELTIV LKNNEGTSV TIGESTGNVL GASFKDLSAE
401' EMSNKGKDGQ VVVNVNKTGT PAAQIGLKKG DVIIGANQQA VKNIAELRKV LDSKPSVVAL
419" QMRSYGVSYG VEVTSVSSGK -FKDAGIKKG FIIISINRQP VSSGAOVSDI VREAGQSRSG
461' NIQRGDSTIY LLMQ
478" RLIIVRGFYP DGNIRTFEVE L

```

図10 Genetyx によるアミノ酸配列相同性の分析
上段：*E. coli* HtrA (474残基)
下段：*P. gingivalis* W83 HtrA (498残基)

した。ドットプロット分析の結果、HtrA は *P. gingivalis* の外膜小胞中に存在することが証明された。データには示さないが、ウェスタンブロッティングでも同様の結果を確認した。*P. gingivalis* の外膜小胞表層には、本菌の歯周病原性に深く関連すると考えられている gingipain 類や、LPS などが大量に存在する⁴⁷⁾。gingipain は強力なトリプシン様システインプロテアーゼであり、切断部位の特異性から Arg-X を切断する Arg-gingipain (Rgp) と、Lys-X を切断する Lys-gingipain (Kgp) に分類され、これらが同菌の歯周病原性と深く関わっていることは多く報告されている⁴⁸⁾。HtrA は、これらの病原因子とともに外膜小胞中に存在することが明らかとなった。最近、*P. gingivalis* の *htrA* 変異株を用いて HtrA の役割が検索され、野生型と比較して、*htrA* 変異株では熱ショック時の gingipain の酵素活性が減弱することが報告された⁴⁹⁾。すなわち HtrA が、gingipain の活性発揮に何らかの役割を演じている可能性が考えられる。また、同研究において作製された *htrA* 変異株は、野生型に比べて高温ストレスや酸化的ストレスに対して高い感受性を示した。このことから、他の病原性細菌と同様、*P. gingivalis* においても HtrA が環境ストレスに対する抵抗因子として役割を果たしていることが示唆されている。

本研究では、*P. gingivalis* 由来の HtrA をリコンビナントタンパク質として単離し、その性状を検討した。その結果、rHtrA はセリンプロテアーゼの一種であり、 β カゼインに対して基質特異性を示した。また、本菌の病原性に関与する構成成分として重要な、外膜小胞中に存在することが証明された。これらの結果は HtrA が、前述したような環境ストレスに対する抵抗因子としてだけで

はなく、歯周組織に対する直接的な攻撃因子として機能する可能性を含んでいる。今後、タンパク質分解活性の性状をさらに検討するとともに、宿主の細胞に対する為害性をさらに検討していく必要がある。

結 論

P. gingivalis 由来 HtrA をリコンビナントタンパク質として精製し、その性状を解析し、抗 HtrA 抗血清を利用したイムプロット分析により、*P. gingivalis* 菌体中における HtrA の局在性を検討した結果、以下の結論を得た。

1. *P. gingivalis* 由来リコンビナント HtrA は、 β カゼインを特異的に分解するセリンプロテアーゼの一種であった。
2. HtrA は *P. gingivalis* の外膜小胞中に存在し、本菌の歯周病原性に関連する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる御指導と御高閲を頂戴しました予防歯学分野 伊藤博夫教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御高閲、ご助言を賜りました口腔感染症学分野 三宅洋一郎教授、歯周歯内治療学分野 永田俊彦教授に深謝いたします。また本研究の実施に際し、御指導と御助力を下さいました口腔感染症学分野 村上圭史博士、分子薬理学分野 水澤典子博士、分子医化学分野 三好圭子博士に感謝の意を表します。さらに、本研究を通じて御指導と御協力を頂戴しました日野出大輔助教授、および予防歯学分野 (旧予防歯科学講座) の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に、4年間私の我が儘を聞いてくれた妻と、温かく見守ってくれた両親、そして親友に心から感謝します。

参考文献

- 1) Swamy KH, Chung CH and Goldberg AL: Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits. Arch Biochem Biophys 224, 543-544 (1983)
- 2) Zumbrun J and Trueb B: Primary structure of putative serine protease specific for IGF binding proteins. FEBS Lett 398, 187-192 (1996)
- 3) Ponting CP: Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. Protein Sci 6, 464-468 (1997)
- 4) Clausen T, Southan C and Ehrmann M: The HtrA family of proteases: Implications for protein composition and cell fate. Mol Cell 10, 443-455 (2002)
- 5) Davies KJA and Lin SW: Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. Free Rad Biol Med 5, 215-223 (1988)
- 6) Laskowska B, Zylick M and Georgopoulos C: Degradation by protease Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. Mol Microbiol 22, 555-571 (1996)
- 7) Lipinska B, Zylick M and Georgopoulos C: The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. J Bacteriol 172, 1791-1797 (1997)
- 8) Stauch FM, Cheville NF and Morfitt D: An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. Proc Natl Acad Sci USA 85, 1576-1580 (1988)
- 9) Spiess C, Beil A and Ehrmann M: A Temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. Cell 97, 339-347 (1999)
- 10) Krojer T, Garrido-Franco M, Huber M, Ehrmann M and Clausen T: Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperon machine. Nature 416, 455-459 (2002)
- 11) Nieto-Sampedro M, Bussineau CM and Cotman CW: Isolation, morphology, and glycoprotein composition of synaptic junctional fraction from the brain of lower vertebrates: antigen PSD-95 as a junctional marker. J Neurosci 2, 772-34 (1982)
- 12) Woods DF and Bryant PJ: The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at separate junctions. Cell 66, 451-464 (1991)
- 13) Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS and Goodenough DA: Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J Cell Biol 103, 755-766 (1986)
- 14) Sasoon N, Arie JP and Betton JM: PDZ domains determine the native oligomeric structure of DegP (HtrA) protease. Mol Microbiol 33, 583-589 (1999)
- 15) Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA and Sauer RT: OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. Cell 113, 61-71 (2003)
- 16) Levin MM, Galen J, Barry E, Noriega F, Chatfield S, Szein M, Daugan G and Tacket C: Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors. J Biotechnol 44, 193-196 (1996)
- 17) Jhonson K, Charles I, Dougan G, Pickard D, O'Gaora P, Costa G, Ali T, Miller I and Hormaeche C: The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. Mol Microbiol 5, 401-407 (1991)
- 18) Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, Peterson KM and Roop II RM: Characterization and genetic complementation of *Brucella abortus* high-temperature-

- requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun* 62, 4135-4139 (1994)
- 19) Yamamoto T, Hanawa T, Ogata S and Kamiya S: Identification and characterization of the *Yersinia enterocolitica* *gsrA* gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. *Infect Immun* 64, 2980-2987 (1996)
 - 20) Li SR, Dorrell N, Everest PH, Dougan G and Wren BW: Construction and characterization of a *Yersinia enterocolitica* O: 8 high-temperature requirement (*htrA*) isogenic mutant. *Infect Immun* 64, 2088-2094 (1996)
 - 21) Stack HM, Sleator RD, Bowers M, Hill C and Gahan CGM: Role for HtrA in stress induction and virulence potential in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 71, 4241-4247 (2005)
 - 22) Pallen MJ and Wren BW: The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26, 209-221 (1997)
 - 23) Elzer PH, Philips RW, Robertson GT and Roop II RM: The HtrA stress response contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infect Immun* 64, 4838-4841 (1996)
 - 24) Jones CH, Bolken TC, Jones KF, Zeller GO and Hruby DE: Conserved DegP protease in Gram-positive bacteria is essential for thermal and oxidative tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 69, 5538-5545 (2001)
 - 25) Brøndsted L, Anderson MT, Parker M, Jørgensen K and Ingmer H: The HtrA protease of *Campyrobacter jejuni* is required for heat and oxygen tolerance and for optical interaction with human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 71, 3205-3212 (2005)
 - 26) Ibrahim YM, Kerr AR, McCluskey J and Mitchell TJ: Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 72, 3584-3591 (2004)
 - 27) Cortes G, Astorza BD, Bentedi VJ and Alberti S: Role of the *htrA* gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect Immun* 70, 4772-4776 (2002)
 - 28) Biswas S and Biswas I: Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 73, 6923-6934 (2005)
 - 29) Wilson RL, Brown LL, Kirkwood-watts D, Warren TK, Lund SA, King DS, Jones KF and Hruby DE: *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. *Infect Immun* 74, 765-768 (2006)
 - 30) Lamont RJ and Jenkinson HF: Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1244-1263 (1998)
 - 31) Zambon JJ, Reynolds HS and Slots J: Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect Immun* 32, 198-203 (1981)
 - 32) Cutler CW, Calmer JR and Genco CA: Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol* 3, 45-51 (1995)
 - 33) Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, et al.: Complete genome sequence of oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 185, 5591-5601 (2003)
 - 34) Hinode D, Hayashi H and Nakamura R: Purification and characterization of three types of proteases from culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 59, 3060-3068 (1991)
 - 35) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning; a laboratory manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
 - 36) Matsudaira P: Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262, 10035-10038 (1987)
 - 37) Schwabe C: A fluorescent assay for proteolytic enzymes. *Anal Biochem* 53, 484-490 (1973)
 - 38) Otsuka M, Endo J, Hinode D, Nagata A, Maehara R, Sato M and Nakamura R: Isolation and characterization of protease from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodont Res* 22, 491-498 (1987)
 - 39) Erlanger BF, Kokowsky N and Cohen W: The preparation and properties of new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95, 271-278 (1961)
 - 40) Grenier D and Mayrand D: Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 55, 111-117 (1987)
 - 41) Hu SI, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D and Crowl RM: Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as an differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 273, 34406-34412 (1998)
 - 42) Murwantoko, Yano M, Ueta Y, Murasaki A, Kanda H, Oka C and Kawachi M: Binding of proteins to PDZ domains regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J* 381, 895-904 (2004)
 - 43) Lipinska B, Sharma S and Georgopoulos S: Sequence analysis and transcriptional regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 16, 10053-10067 (1988)
 - 44) Głonek JS, Zurawa D, Tanfani F, Scirè A, Wawrzynów A, Narkiewicz J, Bertoli E and Lipinska B: The N-terminal region of HtrA heat shock protease from *Escherichia coli* is essential for stabilization of HtrA primary structure and maintaining of its oligomeric structure. *Biochem Biophys*

- Acta 1649, 171-182 (2003)
- 45) Glonek JS, Wawrzynow A, Krzewski K, Kurpierz K and Lipinska B: Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene* 163, 47-52 (1995)
 - 46) Zhou L, Srisatjaluk R, Justus DE and Doyle RJ: On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 163, 223-228 (1998)
 - 47) Duncan L, Yoshioka M, Chandad F and Grenier D: Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog* 36, 319-325 (2004)
 - 48) Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto 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)
 - 49) Roy F, Vanterpoor E and Fletcher HM: HtrA in *Porphyromonas gingivalis* can regulate growth and gingipain activity under stressful environmental conditions. *Microbiol* 152, 3391-3398 (2006)