様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 20 年 12 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：２００７年度～２００８年度
課題番号：１９７９１３５３
研究課題名（和文）　若年性歯周炎起因菌から発見された、呼吸鎖依存性の新規ペルオキシダーゼの生理的意義
研究課題名（英文）　The physiological role of the respiratory chain-dependent peroxidase that is discovered from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*

研究代表者
高島英造 (TAKASHIMA EIZO)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：５０３６６７６２

研究成果の概要：近年私達は若年性歯周炎起因菌である*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*から呼吸鎖中のキノールを基質とするペルオキシダーゼを発見し、キノールペルオキシダーゼ(QPO)と名付けた。本研究では、QPOの生理的機能について検討をおこなった。その結果、QPO変異株において種々の内在性酸化ストレスの増加を認めると共に、本菌の主な病原因子である白血球毒（ロイコトキシン）産生量の大幅な減少を観察した。また、QPO阻害剤としてアスコフラノンを見いだし、本菌のロイコトキシンの産生を濃度依存性に減少させることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：　分科；歯学　細目；形態系基礎歯科学（７４０１）
キーワード：呼吸鎖、ペルオキシダーゼ、限局性侵襲性歯周炎、毒素

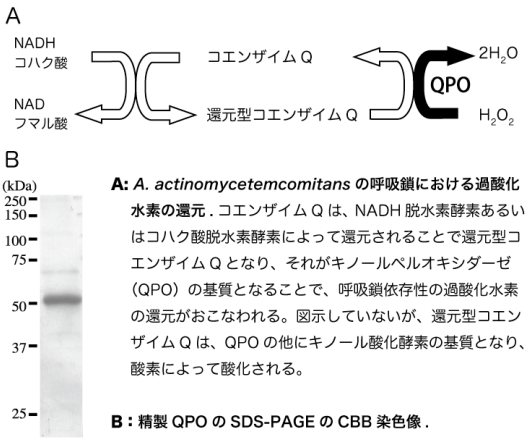
１．研究開始当初の背景

呼吸鎖は、効率的な ATP 産生に必須なエネルギー代謝系であるが、同時に一重項酸素や過酸化水素（H_2O_2）といった活性酸素種を「副産物」として生み出すことによって生体に酸化ストレスを与え、DNA の損傷や老化を引き起こしている————このことは、生命のエネルギー代謝系を語る上での常識のうちのひとつと言っていいだろう。しかし近年、私達

は若年性歯周炎（限局性侵襲性歯周炎）の起因菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の呼吸鎖が、この常識をくつがえす「呼吸鎖による活性酸素除去作用」を有することを発見した。*A. actinomycetemcomitans* の膜画分に過酸化水素を加え、そこに呼吸基質である NADH やコハク酸を添加したところ、基質依存性に過酸化水素を水に還元したのである（ペルオキシダーゼ活性）。ところが、このような活性については先に報告が無く、どのような酵素や基質がこの活性酸素除去作用を担っているのかは謎であった。

そこで私達は、この活性酸素除去作用を担う酵素を *A. actinomycetemcomitans* の呼吸鎖からほぼ純粋に精製し、生化学的に解析することによって、その謎を解いた（図１）。精製した酵素は、還元型コエンザイムＱ（ユビキノール-1, UQ_1H_2）を基質として過酸化水素を水に還元するという、これまで全く知られていなかった反応を触媒する新規ペルオキシダーゼであったため、これをキノールペルオキシダーゼ（QPO）と名付けた [$UQ_1H_2 + H_2O_2 \rightarrow UQ_1 + 2H_2O$]。精製した QPO の N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、メチオニンから始まる１０個のアミノ酸配列を得ることに成功したため、この配列情報を用いて QPO 遺伝子を同定した（キノールペルオキシダーゼ及びその遺伝子：特許出願済）。さらに精製 QPO の生化学的解析を行った結果、QPO は３つのヘム *c* を結合した、N 末端側に一回膜貫通領域をもつ分子量約 52kDa の膜タンパク質であることが明らかになった。続いて精製 QPO の酵素反応速度解析を行ったところ、基質となる還元型コエンザイムＱに対する K_m 値は 107 μM であることが分かった。この値は還元型コエンザイムＱを基質として用いるキノール酸化酵素（チトクロム *bo*, *bd*）の K_m 値と酷似していることから、これらの酵素が基質に対して同程度の親和性を相互にもつことによって、基質の共有を可能にしているものと考えられた。

以上のことなどから QPO は、１９７０年にチトクロム *c* ペルオキシダーゼが緑膿菌から発見・精製されて以来３６年ぶりに発見された、真性細菌由来の新規なヘムペルオキシダーゼであり、３個のヘム *c* を結合したペルオキシダーゼとして初めての例、また膜結合型のペルオキシダーゼとしても真性細菌における初めての例となった。以上の研究は、平成１７～１８年度 科学研究費補助金 若手研究（B）「限局性侵襲性歯周炎起因菌の呼吸鎖が持つ真の機能とはなにか」(研究代表者：高島英造)の助成を受けて行われた。



A: ***A. actinomycetemcomitans*** **の呼吸鎖における過酸化水素の還元.** コエンザイムＱは、NADH 脱水素酵素あるいはコハク酸脱水素酵素によって還元されることで還元型コエンザイムＱとなり、それがキノールペルオキシダーゼ（QPO）の基質となることで、呼吸鎖依存性の過酸化水素の還元がおこなわれる。図示していないが、還元型コエンザイムＱは、QPO の他にキノール酸化酵素の基質となり、酸素によって酸化される。

B：精製 QPO の SDS-PAGE の CBB 染色像.

図１.

２．研究の目的

A. actinomycetemcomitans の細胞質中には QPO とは別の過酸化水素を除去する酵素、すなわちカタラーゼ [$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$] が多量に存在することが知られている。活性酸

素除去作用を担う二つの酵素を同時に発現する生理的意義はなんだろうか。私達は *A. actinomycetemcomitans* の QPO とカタラーゼ欠損株を作出し、野生株とそれらの発育を比較したところ興味深い結果を得た。カタラーゼ欠損株と野生株は同等の発育を示すのに対し、QPO 欠損株ではこれらと比べ有意に発育が悪化したのである。このことは、QPO とカタラーゼとは相互に異なる生理的意義を有することを強く示唆するものであり、QPO の生理的意義についてさらに解析を進める必要があると考えられた。以上の事から、本研究の目的を *A. actinomycetemcomitans* における QPO の生理的意義を明らかにすることとした。

３．研究の方法

(1)過酸化脂質・酸化 DNA・酸化修飾タンパク質の検出

膜タンパク質である QPO は膜の構成成分である脂質と物理的な距離が近いことから、QPO は過酸化脂質の還元に深く関わっている可能性が高い。そのため、本研究では過酸化脂質の測定を行ない、野生株と欠損株の表現型を比較した。

酸化 DNA の検出は、低融点アガロースゲル内で菌染色体 DNA を精製した後、アルカリ変性ゲルを用いて電気泳動をすることによって生じるコメット状のスメアを観察することによって行った。

酸化修飾タンパク質の検出方法としては、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)を検出試薬とする方法を用いた。酸化修飾タンパク質は DNPH と反応して 2,4-ジニトロフェニル(DNP)タンパク質となり、抗 DNP 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。

(2)酸化ストレスに対する感受性の比較

QPO はペルオキシダーゼ反応を触媒することによって、過酸化水素をはじめとする過酸化物を還元し、細胞中の酸化ストレスを軽減する抗酸化酵素として生理的に機能している可能性が高い。そのため、QPO 変異株は野生株と比較して種々の過酸化物に対する感受性が高くなることが考えられる。本研究では過酸化水素、*t*-butyl hydroperoxide, cumene hydroperoxide の３薬剤について検討を行った。

(3)ロイコトキシン産生に関する影響

A. actinomycetemcomitans は培養液中に多量のタンパク質性白血球毒、ロイコトキシンを分泌することが知られている。近年、ロイコトキシンが酸化ストレスに対して暴露されると自己分解するという知見が報告されたのを受け、QPO 変異株におけるロイコトキシン産生の程度を培養上清の SDS-PAGE によって行った。

４．研究成果

(1)QPO 変異株における内在性酸化ストレスの亢進

本研究では、QPO が本菌にとってどのような生理的機能を有するかについて、QPO 変異株を用いて検討をおこなった。その結果、QPO 変異株では抗 DNP 抗体で検出される酸化修飾タンパク質量の増加、アルカリ変性ゲルによって検出される酸化 DNA の量の増加、そしてカタラーゼ（KatA）活性の亢進を認めた。これらの結果により、QPO 変異株は酸化ストレス下にあることを結論づけることができた。これらの事から、QPO は内因性の酸化ストレスに対して抗酸化酵素として機能している事が明らかとなった。しかしながら過酸化脂質の量は

亢進しないことから、本菌における過酸化脂質は、Thioperoxidase のような他の抗酸化酵素によって処理されているものと予想された。

(2)QPO 変異株の外因性酸化ストレスに対する感受性

QPO 変異株は種々の過酸化物質に対する抵抗性が減少することが考えられたが、実際にはそのような事は無く、野生株と感受性は変化しなかった。しかしながら、QPO をコードしたプラスミドを用いて本菌中の QPO を過剰発現させると、過酸化物質に対する抵抗性が有意に上昇したことから、QPO は外因性の酸化ストレスに対して抗酸化酵素として機能しうるが、必須ではないことが明らかとなった。

(3)QPO 変異株のロイコトキシン産生

また、続いてロイコトキシンの発現量を SDS-PAGE を用いて比較検討下結果、QPO 変異株は、ロイコトキシンを分泌することができないという特筆すべき表現型を有することが明らかとなった（図２）。このことは QPO が本菌の病態発現に大きく関与していることを示唆するものであった。

(4)QPO 特異的阻害剤のスクリーニング

北里大学の大村智、塩見良朗両博士からケミカルライブラリを提供いただき、その中から QPO 活性に対する阻害剤をスクリーニングした結果、アスコフラノンが Ki = 9.557 ± 0.865 nM という非常に低い濃度で QPO を強く阻害する事を見いだした。続いてアスコフラノンと共に本菌を培養した結果、アスコフラノン濃度依存的にロイコトキシンの産生能を阻害することが明らかになった。以上の事から、アスコフラノンは新規な若年性歯周炎の治療法の確立のための新機軸として期待できると考えられた。

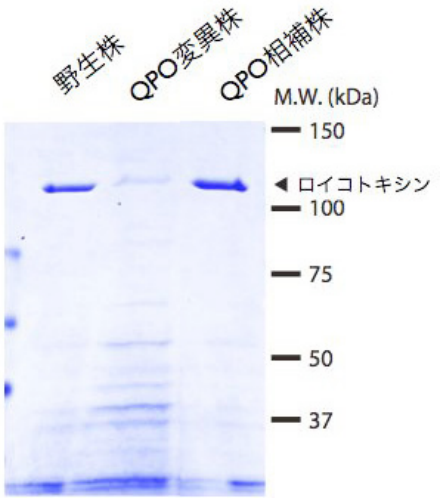


図２ *A. actinomycetemcomitans* 培養上清の SDS-PAGE

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計２件）

① Eizo Takashima, Kiyoshi Konishi. Bacterial multi-heme peroxidase. Research Advances in Biochemistry (1) 21-27, 2007. 査読なし

② Eizo Takashima, Kiyoshi Konishi. Characterization of a quinol peroxidase mutant in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. FEMS Microbiology Letters (286) 66-70, 2008. 査読あり

〔学会発表〕（計４件）

① Eizo Takashima, Hiroyuki Yamada, Kiyoshi Konishi.

Molecular characterization of the membrane-bound quinol peroxidase functionally connected to the respiratory chain. Gordon research conference, July 11 2007, University of New England, United States of America

② Eizo Takashima, Hiroyuki Yamada, Kiyoshi Konishi.
Characterization of the membrane-bound quinol peroxidase functionally connected to the respiratory chain. The Awaji international forum on infection and immunity, September 3 2007, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan

③ Eizo Takashima, Hiroyuki Yamada, Kiyoshi Konishi.
Characterization of the membrane-bound tri-heme *c* quinol peroxidase functionally connected to the respiratory chain. European Bioenergetics Conference 2008, July 20 2008, Trinity College Dublin, Ireland

④ 高島英造、山田裕之、古西清司
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*キノールペルオキシダーゼ特異的阻害剤によるロイコトキシン産生阻害　第５０回歯科基礎医学会学術大会･総会　平成２０年９月２４日　TOC 有明コンベンションホール

〔図書〕（計０件）
〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）
〔その他〕

６．研究組織

(1)研究代表者
高島　英造 (TAKASHIMA EIZO)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：50366762

(2)研究分担者

(3)連携研究者
大村　智（SATOSHI OMURA）
北里生命科学研究所・名誉教授
研究者番号：90050426

塩見　和朗（KAZURO SHIOMI）
北里生命科学研究所・教授
研究者番号：40235502

古西　清司（KONISHI KIYOSHI）
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：20178289