

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21592346

研究課題名（和文） 侵襲型歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの生理的役割と病原性との関連の研究

研究課題名（英文） Study of relationship of physiological roles and pathogenicity of aggressive periodontopathic bacterial quinol peroxidase

研究代表者

古西 清司 (KIYOSHI KONISHI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：20178289

研究成果の概要（和文）：侵襲型歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼ(QPO)は呼吸鎖のキノールを利用して内在性過酸化水素を代謝し、また病原因子の LtxA の分泌に必要なことを、QPO 欠損変異株などを用いて明らかにしてきた。今回 QPO 阻害剤のアスコフラノンを見出し、これの野性株への添加によって QPO 欠損変異株と同様の結果になることを示した。また大腸菌にリコンビナントタンパクを作製させ、この QPO を用いて ping pong bi bi 機構によって酵素反応が進むことを示した。

研究成果の概要（英文）：Quinol peroxidase (QPO) of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* catalyzes peroxidase activity using a quinol on respiratory chain. A *qpo* null mutant exhibits an oxidative stress phenotype, suggesting that QPO plays an important role in scavenging endogenously generated hydrogen peroxide, and exhibits reduced production of leukocyte (LtxA), a secreted bacterial toxin that is known to target human leukocytes. Screening identified ascofuranone as a highly potent inhibitor of QPO ( $K_i = 9.6$  nM). This inhibitor also reduced the secretion of LtxA, with an associated reduction in the pathogenicity of *A. actinomycetemcomitans* for HL-60 cells. We produced the recombinant QPO expression system in *Escherichia coli*. Purified recombinant QPO was used to analyse the catalytic mechanism, indicating that QPO catalyzes as ping pong bi bi mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

## 1. 研究開始当初の背景

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は通性嫌気性菌で、酸素が存在する環境下でも5%程度の二酸化炭素が存在すれば生育が

可能である。本菌は、よく知られている *Haemophilus* 属や *Pasteurella* 属が含まれる family *Pasteurellaceae* に属し、限局型侵襲性歯周炎(localized aggressive periodontitis);

LAP)や感染性心内膜炎、脳膿瘍などの種々の病気をヒトに引き起こす。限局性侵襲型歯周炎は急速な歯周組織の破壊や歯槽骨の吸収などを特徴とし、最終的に歯の喪失を引き起こす疾患である。

ほ乳類の宿主においては、本菌は食細胞の NADPH oxidase で産生されたスーパーオキシドイオン ( $O_2^-$ ) やこれの不均化反応 (spontaneous あるいは super oxide dismutase によって起こる) によって生じた過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を含めた活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) に対して抵抗性を示すことが報告されている。歯周ポケットにおいては、過酸化水素が殺菌作用を示す主要な化学物質であり、本菌はこの宿主が産生した過酸化水素に抵抗性を示すことから考えて、抵抗性に関与する因子を有していることが推定されていた。

一方、細菌に生じる内在性の ROS は細菌細胞膜に存在する好氣的な呼吸鎖で産生されることが推定されている。呼吸鎖の阻害剤であるロテノンやアンチマイシン A を添加した場合、大腸菌の細胞膜は過酸化水素の産生量が増加した。また大腸菌の反転膜小胞にシアン化カリウムを添加すると、NADH 依存に  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  が産生された。大腸菌の NADH:quinine oxidoreductase-2 (NDH-2)、succinate:quinine oxidoreductase、quinol fumarate oxidoreductase あるいは sulfite reductase の還元型を酵素に曝すと、すべて  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  を産生した。

従って、*A. actinomycetemcomitans* の  $H_2O_2$  を消去する因子は本菌の生存と、ヒトに対する病原性を発揮するのに極めて重要な役割を演じていると考えられる。本菌のカタラーゼは  $H_2O_2$  の代謝にとって重要であることが報告されたが、カタラーゼ欠損変異株は  $H_2O_2$  存在化増殖が可能であったので、ROS scavenging activity を有している他の酵素の存在が推定された。

申請者は本菌の呼吸鎖の研究を行ってきたが、その過程で NADH からの電子受容体として NADH 脱水素酵素の NDH-2、また末端酸化酵素としてシトクロム *bd* が存在し、これら両酵素が連結していることを明らかにした。現在までのところ NADH から酸素までの電子伝達反応はこれ以外には報告されておらず、特に末端酸化酵素は *bd* 以外には存在していないと考えられる。これらの呼吸鎖成分は水素イオンを排出する部位(site)は存在せず、水素イオン駆動力(proton motive force; PMF)を十分に作ることができず、従ってエネルギー産生系としては不利であると思われ、他の機能の存在が予想される。大腸菌のシトクロム *bd* は  $H_2O_2$  に対する結合活性を有していることが報告されている。申請者は、これらのことから、*A.*

*actinomycetemcomitans* のシトクロム *bd* にはオキシダーゼ活性以外にもペルオキシダーゼ活性が存在するのではないかとの仮説のもとに研究を実施した。細菌の細胞膜画分にはペルオキシダーゼ活性が存在し、キノール(還元型キノン)ペルオキシダーゼ活性を指標にタンパクの精製を行ったところ、予想に反して、*bd* とは全く異なった膜タンパクが精製された。さらにシトクロム *bd* を欠損した変異株の膜画分にもペルオキシダーゼが存在すること、精製シトクロム *bd* にペルオキシダーゼ活性が存在しないことから、我々が精製したタンパクが、ペルオキシダーゼの本体であることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

申請者らは *A. actinomycetemcomitans* のペルオキシダーゼの性質を詳細に調べた。(Yamada, Takashima, and Konishi, FEBS Journal, 274: 853-866, 2007. Takashima, Yamada, and Konishi, Res. Adv. Biochem., 1: 21-27, 2007.) 本菌の膜画分から精製された酵素は、還元型ユビキノール-1(ユビキノール-1)を基質として、過酸化水素を水に還元する新規の反応を触媒する酵素であり、キノールペルオキシダーゼ(QPO)と命名した。QPOは3個のヘムcを結合した、N末端に一回膜貫通領域を有する分子量約53KDaの単量体タンパク質であり、従って内膜に結合し、ペリプラズム側に突き出ている構造をしていることが推定された。さらに、呼吸基質であるNADHやコハク酸を添加して観察される本菌の膜画分に存在するペルオキシダーゼ活性は、QPO欠損変異株では認められないことから、QPO依存であることが明らかとなった。従って、我々が発見したこの膜結合性のペルオキシダーゼは呼吸鎖成分のキノンと連結しており、あるいはこれ自身が呼吸鎖の構成成分であるとの捉え方もできる。QPOは1970年にシトクロムcペルオキシダーゼが緑膿菌から発見・精製されて以来、発見された真性細菌由来の新規なペルオキシダーゼであり、また3個のヘムcを結合したペルオキシダーゼの最初の例、さらに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である。

本菌においてカタラーゼがすでに報告され、細菌の細胞質における過酸化水素の分解に寄与しているとの報告があり、本菌のQPOとカタラーゼ欠損変異株を作製し、野生株とこれらの株の好氣的条件下における増殖を比較した。(Takashima and Konishi, FEMS Microbiol., 286: 66-70, 2008) カタラーゼ欠損株(katA)と野生株(親株; IDH781)は同等の増殖速度を認めたが、QPO欠損変異株(QPS003株)は、野生株やカタラーゼ欠損株と比べて有意に増殖速度が減少していた。こ

のことより、QPOとカタラーゼとは異なる生理的な役割を有することを示唆していると考えられる。

QPO の欠損変異株の性質をさらに検討したところ、QPO 変異株では酸化修飾タンパクが検出されたが、その親株やカタラーゼ欠損変異株では酸化修飾タンパクは検出されなかった。この結果から、QPO 欠損変異株は内因性の酸化ストレス下にあることが明らかとなり、従って 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ことが示唆された。

QPO 欠損変異株は種々の外来性の過酸化物質に対する抵抗性が減少することが予想されたが、実際には野性株と比較しても感受性は変化しなかった。しかし、QPO をコードしたプラスミドを持っている本菌は QPO を過剰発現し、添加された過酸化水素に対する抵抗性が有意に上昇したことから、QPO は外来性の酸化ストレスに対して抗酸化酵素として機能するが、必須でないことが示唆された。

続いて、本菌の最も重要な病原因子であるロイコトキシン(LtxA)の発現量を比較検討した結果、QPO 欠損変異株は、LtxA を分泌することができないということが明らかとなった。従って、QPO が本菌の病原性に深く関わっていることが示唆される。

### 3. 研究の方法

#### (1)QPO 阻害剤の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の白血球毒である LtxA を分泌することが知られている。最近、酸化ストレスに曝露されると自己分解するという知見が報告された。QPO 欠損変異株では LtxA の分泌量が大きく減少するので、今回 QPO 阻害剤を添加した場合、同様に分泌量が減少するかを培養上清の SDS-PAGE をすることにより確認する。

#### (2)QPO 特異的な阻害剤のスクリーニング

北里大学の 大村智、塩見和朗両博士からケミカルライブラリー (約 300 種類) を提供頂き、その中から QPO 活性を阻害する化合物をスクリーニングした。

#### (3)リコンビナント QPO の大腸菌での大量発現系

DegP を欠損した大腸菌 Keio:JW0157 株は BW25113 の derivative である。これに  $\lambda$  DE3 を溶原化して Keio:JW0157 (DE3) 株を作製した。これに pCCM (pACYC184 より作製し、cytochrome *c* maturation genes の遺伝子群を持っている) と pET101QPO (pET101 の derivative で、*qpo* gene を持っている) を形

質転換(transformation)した。リコンビナント QPO の発現は 25℃ で好氣的に LB 培地をもちいて行い、French press を用いて菌体を破碎し、膜小胞を調製してから、0.5% SM-1200 で可溶化の後、0.1% SM-1200 存在下で精製した。精製は Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I column, AF-Red-560M column で順次精製を進めた後 PEG6000 による沈殿を行って最終精製標品とした。

#### (4)QPO の酸化還元スペクトルの測定

詳細なスペクトルの測定には、Amonco 社製 DW-2 UV-VIS spectrophotometer を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1)QPO の阻害剤のスクリーニング

QPO の阻害剤をスクリーニングしたところ、アスコフラノンが QPO 活性を強く阻害した。アスコフラノンはプレニール基が結合したフェノール化合物であり、文献的には *Trypanosoma brucei brucei* の呼吸鎖の末端酸化酵素である tripanosome alternative oxidase の強力な阻害剤として知られている。アスコフラノンの作用機序を調べるために各種濃度のアスコフラノン存在下のユビキノール-1 還元活性を測定した。その結果、QPO のユビキノール-1 還元活性に対してアスコフラノンは mixed-type 阻害剤であり、 $k_{cat} = 729.7 \pm 30.1/s$ 、 $K_m$  for ubiquinol-1 =  $108.4 \pm 8.01 \mu M$ 、 $K_i = 9.557 \pm 0.865 nM$ 、そして  $\alpha = 3.15 \pm 1.03$  と求めた。(図 1)

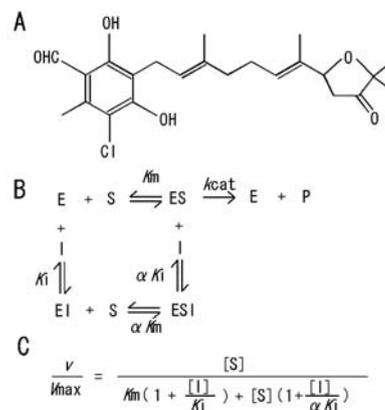


図 1 (A) アスコフラノンの化学構造 (B) Mixed-type 阻害機構 (C) Mixed-type 阻害の速度平衡式

#### (2)アスコフラノンは本菌の増殖を抑制する

前述したように、QPS003 株 (QPO 欠損株) は親株である IDH781 に比べると増殖が遅くなった。今回、 $20 \mu g/mL$  のアスコフラノン存在下、IDH781 の増殖は好氣的条件で有意に低下し、QPS003 の増殖カーブに近づいた。QPS003 株はアスコフラノン存在下と非存在下で大きな差は無かった。このことはアスコフラノンの主要な作用部位は QPO であることを示している。

QPO は内在性の oxidative stress phenotype を示し、QPO が内部で産生される ROS を排除 (scavenge) するのに重要であることは QPO 変異株の項で、記述した。従って QPO を標的とするアスコフラノンも同様に oxidative stress を誘導する可能性が推定される。実際に阻害剤存在下本菌の膜画分において酸化修飾タンパクが濃度依存的に検出された。この修飾タンパクの分子量は以前 QPS003 で検出されたタンパクのものと同様であった。

(3)アスコフラノンは LtxA の分泌を阻害する QPS003 株は LtxA の分泌が阻害されたので、アスコフラノンの添加も同様の効果が期待された。アスコフラノン存在下培養し、IDH781 株においても以前に QPS003 で確認されたように LtxA の分泌量はアスコフラノン添加で減少しており、それは阻害剤の濃度に依存して減少していた。また、IDH781 の培養上清は、ヒト promyelocytic leukemia 細胞株の HL60 に対して細胞毒性が認められたが、アスコフラノン 20  $\mu$ g/mL 添加でほとんど細胞毒性が無くなった。QPS003 でも同様の結果が得られた。HL60 への細胞毒性は培養上清中の LtxA の量を反映していると思われる。

#### (4)アスコフラノンの MIC 値

まずヒト口腔の正常細菌叢に存在する *Streptococcus gordonii* に対するアスコフラノンの MIC は 50  $\mu$ g/mL 以上であった。またヒト腸管内の正常細菌叢に存在する大腸菌と同様に病原性のない *Escherichia coli* K-12 株に対するアスコフラノンの MIC も 50  $\mu$ g/mL 以上であった。さらに *A. actinomycetemcomitans* に対するアスコフラノンの MIC も 50  $\mu$ g/mL 以上であった。このようにアスコフラノンは細菌の正常菌叢に影響を与えずに、ヒト白血球に毒性を示す最も重要な病原因子である LtxA の分泌を押さえる化合物であり、ヒト腸管内や口腔内の正常細菌叢に影響せず、従って抗菌薬の大きな欠点である菌交代現象を引き起こさずに歯周炎の治療ができる可能性がある物質である。今後アスコフラノンの類似化合物のスクリーニングを行い、限局性侵襲型歯周炎の治療薬の探索を行う予定である。

#### (5)大腸菌でのリコンビナントタンパクの発現

QPO の結晶化を行うために QPO の大腸菌での大量発現系について検討した。用いた大腸菌は、ペリプラズムのプロテアーゼである DegP を欠損している株に DE3 を溶原化したものである。QPO 遺伝子を含んだ pET100 plasmid は T7-promoter を有しているので、IPTG (isopropyl thio- $\beta$ -D-galactosidase) で誘導がかかるように設計した。また同時に

pCCM plasmid も形質転換したが、これはシトクローム c の maturation に関わる一連の遺伝子である。

精製したリコンビナント QPO (rQPO) のユビキノール-1 に対する  $K_m$  は  $59 \pm 4.5 \mu$ M (*A. actinomycetemcomitans* から精製した QPO (Aa-QPO) の値 ( $107 \pm 7.7 \mu$ M) に近い) であった。 $K_{cat}$  は rQPO の値 ( $567 \pm 14.6/s$ ) が Aa-QPO の値 ( $582 \pm 14.3/s$ ) に極めて近かった。動力学的には rQPO は Aa-QPO と同じと考えても良いと推定される。

次に、rQPO の標準酸化還元電位を調べたところ、+67, +156, +290 mV であった。QPO の 3 個のヘムへの帰属は現在のところ不明である。今後、rQPO の部位特異的変異株を取得することにより、各ヘムの標準酸化還元電位が明らかになるものと期待される。

#### (6)QPO の動力学的解析

精製 rQPO の過酸化水素に対する動力学的解析から、 $V_{max}=344.8 \mu$ mol/min/mg、 $K_m=6.17 \mu$ M であった。初速反応速度解析、生成物阻害様式及び酸化還元スペクトル測定から、本酵素の触媒反応は ping pong bi bi 機構であると推定された。(図 2. 報告されている細菌 cytochrome c peroxidase (ccp) の反応機構も図示した)

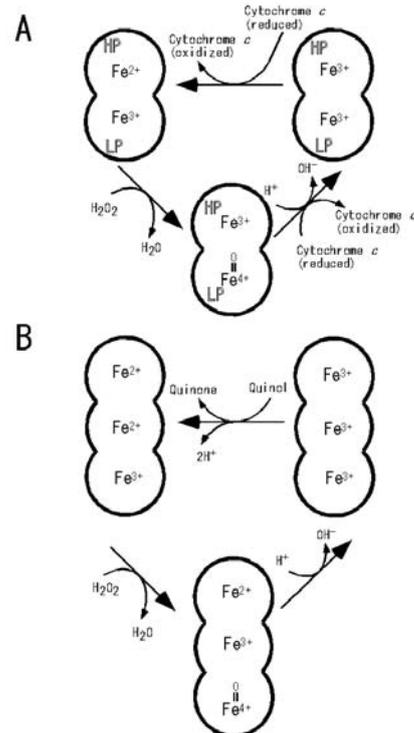


図 2 ペルオキシダーゼの作用機序  
(A)細菌のシトクロームcペルオキシダーゼ;  
LP(low potential heme),HP(high potential heme)  
(B)*A. actinomycetemcomitans*のQPO

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) A quinol peroxidase inhibitor prevents secretion of a leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Eizo Takashima, Hiroyuki Yamada, Kazuro Shiomi, Satoshi Omura, and Kiyoshi Konishi.

J. Periodontal Res. 2010 45: 123-128.

2) Recombinant expression and redox properties of triheme c membrane-bound quinol-bound quinol peroxidase.

Eizo Takashima, Hiroyuki Yamada, Tetsuo Yamashita, Kazunobu Matsushita, and Kiyoshi Konishi.

FEMS Microbiol. Lett. 2010 302: 52-57.

[学会発表] (計5件)

1) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの酵素学的解析

河原井武人、古西清司

第86回日本細菌学会大会、2013年3月18日、幕張メッセ(千葉県)

2) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの酵素学的性質

河原井武人、古西清司

第86回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場(福岡県)

3) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの酵素学的性質

古西清司、河原井武人

第85回日本細菌学会大会、2012年3月28日、長崎ブリックホール(長崎県)

4) 侵襲性歯周炎原因菌の呼吸鎖に含まれるキノールペルオキシダーゼとキノールオキシダーゼの酵素学的性質

古西清司、荒川悠輝、小川雄大、加藤景子、木下遼、大徳光世、河原井武人

第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、京都国際会館(京都府)

5) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 由来 quinol peroxidase の精製と結晶化条件の探索

山下智佳子、古西清司、原田繁治

第83回日本生化学会大会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古西 清司 (KIYOSHI KONISHI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：20178289

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：