

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462877

研究課題名(和文) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの病原性に関する研究

研究課題名(英文) Study of quinol peroxidase of aggressive periodontopathic bacterium as a virulence factor

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼ(QPO)は、高濃度過酸化水素によって擬一次的、不可逆的に不活化された。QPOの初速度分析及び生成物阻害分析によって本酵素の触媒反応はPing Pong Bi Biであることが証明された。また高濃度の $Q1H_2$ 存在下、過酸化水素が存在しなくとも3つのヘムcのうち2つだけが還元されていることが示された。今回さらにascochlorin, ilicicolin B, ilicicolin F, N-heptyl-quinoline-N-oxide, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinoloneがQPOの強力な阻害剤であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Oral pathogen for aggressive periodontitis encodes quinol peroxidase (QPO). Irreversible inactivation of QPO by high concentration of H_2O_2 exhibited pseudo-first order kinetics. Analyses of initial-rate kinetics and product inhibition of QPO indicate that enzyme catalytic mechanism is explained by a Ping Pong Bi Bi system. In addition, one of the three heme c moieties of QPO is maintained in an oxidized form even at increased ratios of $[Q1H_2]/[Q1]$, suggesting that QPO is reduced in the absence of H_2O_2 and only two of the three heme c moieties are reduced in the presence of high concentration of the $Q1H_2$. We also found that ascochlorin (competitive-type, $K_i=24.7$ nM), ilicicolin B (mixed-type, $K_i=576$ nM), ilicicolin F (competitive-type, $K_i=19.5$ nM), N-heptyl-quinoline-N-oxide (competitive-type, $K_i=1.0$ microM), 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (noncompetitive-type, $K_i=7.0$ microM) are potent inhibitor for QPO.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：ペルオキシダーゼ キノン 呼吸鎖 侵襲性歯周炎

1. 研究開始当初の背景

(1) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は偏性嫌気性グラム陰性細菌で、思春期に急速に骨吸収を起し、歯周組織破壊と最終的に歯を失わせる限局性侵襲性歯周炎 (localized aggressive periodontitis; LAP) に関連する(1)。また、*A. actinomycetemcomitans* は感染性心内膜炎の原因菌と言われている HACEK グループ (*Haemophilus* 属、*A. actinomycetemcomitans*、*Cardiobacterium hominis*、*Eikenella corrodens*、*Kingella kingae*) としても知られている。それらは本疾患の原因菌の約 3% であることがわかっている(2)。さらに *A. actinomycetemcomitans* は脳膿瘍にも関与しているといわれている(3, 4)。

(2) 過酸化水素は主要な生物学的活性酸素種であり、生体にダメージを与える。過酸化水素の産生には細胞内で酸素を最終電子受容体として使用して作られる内因性と病原体に対する免疫応答として宿主細胞によって作られる外因性の両方がある(5, 6)。従って、抗酸化酵素は過酸化水素に対する細菌の抵抗性に重要である。過酸化水素に対する抵抗性因子としてはカタラーゼが知られ、過酸化水素を水と酸素に分解する(7)

過酸化水素を分解するもう一つの酵素として知られているのは bacterial cytochrome *c* peroxidase (BCCP) である。この酵素はグラム陰性細菌に広く存在し、チトクロム *c* を電子供与体として使用し、過酸化水素を水に代謝する触媒をする。BCCP は生物学的生理学的、構造的に様々なバクテリア (例えば *Pseudomonas aeruginosa* (8, 9)) などで知られ、よく研究されている。BCCP はヘム *c* を 2 つ含む 300~400 アミノ酸残基から成るペリプラズムタンパク質であることがわかっている。

2. 研究の目的

(1) 以前、*A. actinomycetemcomitans* の膜画分から BCCP の類似酵素であるキノールペルオキシダーゼ (quinol peroxidase: QPO) を同定し、精製を行った(10)。QPO は約 53.6kDa の膜酵素であり、 Q_1H_2 を電子供与体として過酸化水素を水に還元する。QPO は C 末に 2 つヘム *c* をもち、さらに BCCP と違い、N 末に追加でヘム *c* を 1 つ持つ。QPO は、初めて明らかとなった 3 つのヘム *c* をもち、膜貫通領域がある酵素である。以前の研究から、*qpo* 欠損変異株では LtxA の分泌が起こらないことから、QPO はビルレンス因子であることが示された(11-13)。今回の研究では、QPO の過酸化水素によるキノールの酸化反応を酵素動力学的に触媒メカニズムについて検討をして、BCCP との比較を行った。さらに阻害剤の探索を行い、幾つかの協力的な QPO 阻害剤についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌 Keio:JW0157 株に λ DE3 を形質導入させた Keio:JW0157(DE3) を使用した。プラスミドは *A. actinomycetemcomitans* IDH781 株の *qpo* 遺伝子を含んだプラスミドの pET101QPO と tet プロモーターの制御下にある *ccmABCDEFGHI* 遺伝子のシトクロム *c* を含んだプラスミド

の pCCM を使用した。リコンビナント QPO (rQPO) は以前の方法(14)に少し改良を加えて発現と精製をした。

(2) QPO 活性は以前報告された方法(14)にわずかな修正をして測定した。活性は 0.1%SM-1200 含有 10mM Tris-Cl (pH7.5) 中で過酸化水素の濃度を変化させて測定した。 Q_1H_2 を添加させた時の初速度を測定した。還元型 Q_1 は Rieske の方法で調製した(15)。 Q_1H_2 の酸化は DU640 を使用し、10,000/M/cm の分子吸光係数にて 278nm の波長で測定、計算した。動力学的パラメータは直線回帰は Excel のソフトウェアを用いて最小自乗法で、非直線回帰は GRAPHPAD PRISM(Graphpad Software, San Diego, CA, USA)を使って計算した。すべての実験は独立して 3 から 4 回行っており、平均的な結果を解析に使用した。

(3) 酸化還元差スペクトルは 25°C で DW-2UV-VIS 分光光度計(AMINCO, Silver Spring, USA)にて $[Q_1H_2] / [Q_1]$ の様々な比率で測定された。 α 帯 (553nm) のピークを、コントロールを sodium dithionite によりサンプルを完全還元した時と比較し、様々な Q_1 と Q_1H_2 の濃度での酸化還元差スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) 様々な濃度の Q_1H_2 に対する酵素活性の両逆数プロットを作製した。 V_{max} と K_m は Michaelis-Menten 方程式と Lineweaver-Burk プロット (16) を使い、それぞれ 500 μ mol/min/mg と 111 μ M と求められた。 Q_1 の CMC(critical micelle concentration) が約 350 μ M であり(17)、 Q_1H_2 も類似していると推定されることから、 Q_1H_2 の飽和状態での H_2O_2 の V_{max} と K_m の測定は困難であると考えられた。

(2) 過酸化水素は高濃度で、一般的に酵素を不活化することがよく知られている。そこでこれから QPO の動力学的に酵素反応の詳細なメカニズムを解明する前に、過酸化水素による QPO の不活性化について検討した。QPO のペルオキシダーゼ活性は様々な H_2O_2 の濃度条件下で 0, 10, 20, 40, 60min の 5 つの時間に測定した。 A/A_0 に対する時間軸での片対数プロットを行うと直線的な減少を認めた。さらにこのプロットから QPO は時間と濃度依存的であることが示された。過酸化水素存在下で長時間インキュベーションすると残存活性は認められなかった。 K_{obs} (見かけの不活性化速度定数) は H_2O_2 の濃度に対して直線的であることが示された。これらの結果から、 H_2O_2 による不活化は擬一次的であり不可逆的であった。 K (不活性化速度定数) は 2.57×10^{-4} M/sec であった。

(3) QPO がシーケンシャルメカニズムなのか Ping Pong Bi Bi メカニズムなのかを調べるために、キノールの酸化反応の初速度解析の実験を行った。 H_2O_2 の濃度を変化させた時のキノールの酸化反応の初速度に対してキノールの初濃度の両逆数プロットをとると平行となった(Fig. 1A)。このような平行な回帰直線は Ping Pong Bi Bi メカニズムで観察される。Ping Pong Bi Bi の式は Cleland notation で Fig.2A のように示され、また Fig. 2B の式で表され、Fig.1A の結果と一致する。

Fig.2Bのslopeは定数であり、従って Fig.1Aの平行な回帰直線と矛盾しない。Fig.2Bの式から Fig.2Cの式が導き出され、 $1/V_{maxapp}$ と $1/H_2O_2$ の関係は直線関係となり、実際には Fig.1Bで示される結果と一致した。Fig.1Bの切片から $V_{max} = 417 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ と $K_{mH_2O_2} = 39 \mu\text{M}$ であり、初めて過酸化水素に対する K_m が求められた。

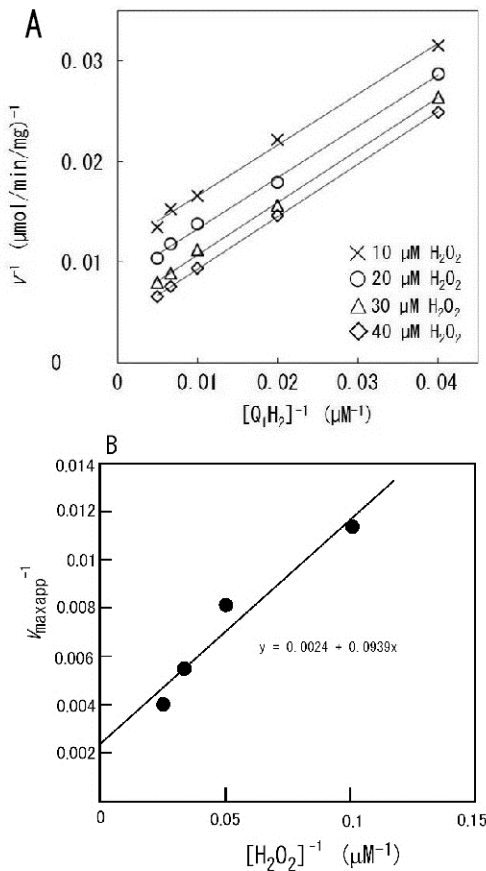


Fig. 1A. Initial-rate kinetics of QPO. The reciprocal rates, were plotted against the reciprocal concentration of Q_1H_2 . The $1/v$ -axis intercept and slope were $(1/V_{max})(1 + (K_m \text{ for } H_2O_2) / [H_2O_2])$ and $((K_m \text{ for } Q_1H_2)/V_{max})$, respectively, as indicated in Fig. 2B. B: The $1/v$ -axis intercept in Fig. 1A was equal to $1/V_{maxapp}$, and was replotted against $1/[Q_1H_2]$ (Fig. 1B). The $1/y$ -axis intercept and slope were $1/V_{max}$ and $(K_m \text{ for } H_2O_2)/V_{max}$, and were 0.0024 and 0.0939, respectively. Based on these results, V_{max} and K_m for H_2O_2 were calculated as 417 mmol/min/mg and 39.0 mM, respectively.

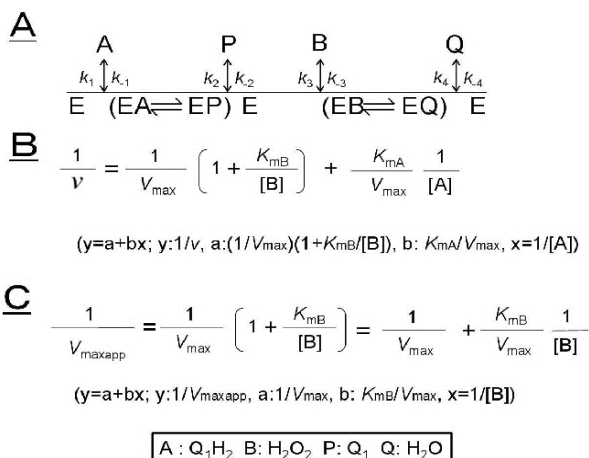
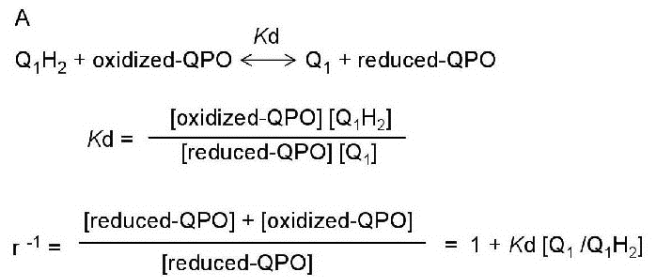


Fig. 2. The enzyme kinetics of QPO. (A) Individual steps of the Ping Pong Bi Bi system using the Cleland notation. (B) Equation for the Ping Pong Bi Bi mechanism ($1/v$ versus $1/[Q_1H_2]$ plot for Fig. 1A), where a is the y -axis intercept and b is the slope. (C) The equation in (B) was replotted for Fig. 1B ($1/V_{maxapp}$ versus $1/[H_2O_2]$). The V_{maxapp} is the apparent V_{max} .

(4) Ping Pong Bi Bi メカニズムでの第一過程(Fig. 2A, Fig. 3A)に関する情報を得るために、キノンの還元型 Q_1H_2 (substrate)と酸化型 Q_1 (product)の存在下でのQPOのへム c の還元率について調べた。QPOの還元型チトクロム c の割合と $[Q_1H_2] / [Q_1]$ のプロット(Fig. 3B)の結果によると、 $[Q_1H_2] / [Q_1]$ の値が高くなっても、約 2/3 のチトクロム c が還元されており、残り 1 つのへム c は酸化型の状態のままであることが明らかとなった。Fig.3B のデータの両逆数を取り、チトクロム c が 2/3 還元されたと仮定し、へム c の還元率に 3/2 を乗じたときに、直線的になり、Fig.3A の式とよく合っていた。これは QPO が H_2O_2 非存在下で完全に還元されたときに、3つのへム c のうち 2 つのみが還元されていることを示している。それらの結果から Fig.2A と Fig.3 が一致したことがわかり、メカニズムについては考察で詳しく検討した。



r: reduction rate of cytochrome c of QPO

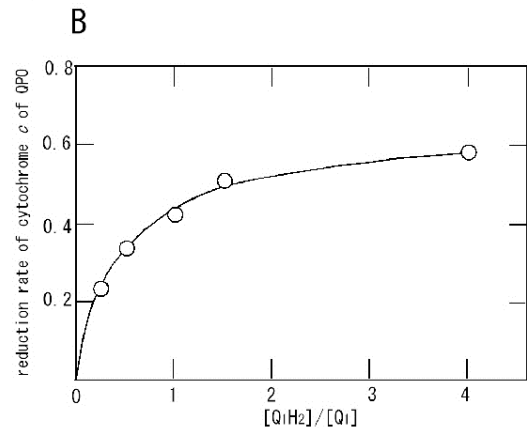


Fig. 3 A: The equation of reversible reaction kinetics of Ping Pong Bi Bi mechanism as provided in Fig. 2. B: This equilibrium was analyzed using the reduction rate of the alpha-band of cytochrome c of QPO in the presence of Q_1 and Q_1H_2 . About 1/3 of the cytochrome c was maintained in the oxidized state under conditions that reduced quinol (high values of $[Q_1H_2]/[Q_1]$).

(5) 酵素反応の順序の情報を得るために、様々な濃度での Q_1 (product)による生成物阻害様式を調べた。もう一つの生成物である水についての生成物阻害は水溶液中での酵素反応では調べることができない。 H_2O_2 の K_m に基づいた飽和不飽和による生成物阻害は調べることができたが、 Q_1H_2 については CMC の関係で飽和状態での実験はできなかった。それらの結果 (Table 1 lower) からわかるように、QPO は Ping Pong Bi Bi であることが示唆され、理論上の阻害様式 (Table 1 upper) と一致した。

Table I. Theoretical product inhibition patterns for the Ping Pong Bi Bi systems (upper) and practical product inhibition patterns obtained in this paper (lower).

Mechanism	Product Inhibitor	Varied Substrate			
		A		B	
		Unsaturated with B	Saturated with B	Unsaturated with A	Saturated with A
Ping Pong Bi Bi	P Q	Mixed Competitive	No Inhibition Competitive	Competitive Mixed	Competitive No Inhibition

Product Inhibitor	Varied Substrate			
	O ₂ H ₂		H ₂ O ₂	
	Unsaturated with H ₂ O ₂	Saturated with H ₂ O ₂	Unsaturated with O ₂ H ₂	Saturated with O ₂ H ₂
O ₁ H ₂ O	Mixed nd.	No Inhibition nd.	Competitive nd.	nd. nd.

(nd.:not determined)

(6) *qpo* 遺伝子欠損株は酸化ストレスに対する感受性の表現型となり、LtxA の産生が抑制される。このことから、QPO はビルレンスファクターであることがわかっている。また、我々は QPO 活性がアスコフラノンにより阻害され、またアスコフラノンは *A. actinomycetemcomitans* の LtxA の分泌を抑制することをみつけた。それらの結果から、QPO は LAP の治療や予防に重要なターゲットとなりうること、QPO を阻害することで *A. actinomycetemcomitans* の LtxA の分泌を抑制できると示唆された。(18) そのため、QPO の触媒メカニズムを知ることはとても重要である。2 基質の触媒システムでは、シーケンシャルと Ping Pong という 2 つのメカニズムの可能性がある。生成物阻害様式の検討から QPO の初速度は Ping Pong Bi Bi メカニズムであることが明らかになった。さらに、QPO のリアクションシーケンスは以下のようなものと予想できる。まず、キノールが即座に酵素に結合し、第一の生成物をリリースする。2 つ目の基質は過酸化水素で、それも即座に酵素に結合し触媒する。BCCP はふたつのドメインをもち、両者とも *c* 型ヘム結合をしている。緑膿菌などの BCCPs の分光光学的分析では複合体の存在反応メカニズムがヘムのスピンの酸化還元の変化に関与しているといわれている。BCCP は高電位ヘム(HP)と低電位ヘム(LP)をもつ。酸化された BCCP は HP で Fe³⁺ と LP で Fe³⁺ をもつ。その過程は以下の通りである。まず、HP ヘムがチトクロム *c* により還元され Fe²⁺ となる。そして、酵素により H₂O₂ との触媒反応が起こり、結果的に LP ヘムが Fe^{4+=O} となり水を産生する。そして、酸化酵素は引き続いてチトクロム *c* 由来の電子輸送体に還元され、OH⁻ を産生する。そして HP、LP とともに Fe³⁺ となる。我々は、QPO のメカニズムが BCCP に似ていることを見出した。まず、2 電子還元がおこり 3 つの Fe²⁺ のうち 2 つが Fe³⁺ になり、キノールは酸化されキノンになる。そして、H₂O₂ とともに触媒反応が起こり、3 つめのヘムが Fe^{4+=O} となり水を産生する。このように、QPO は分子内で 3 つのヘムが関与した 2 段階の反応をしており、それが BCCP との違いである。特に、BCCP と還元されたチトクロム *c* は、可溶性ペリプラズムタンパク質でチトクロム *c* は 1 電子還元剤である。これらの 2 つのタンパク質の非効率な衝突は、律速段階

である場合がある。ペリプラズムで酸化された状態であれば、BCCP の還元型チトクロム *c* も同様に律速段階になり得る。細胞質膜の呼吸鎖は、チトクロム *c* のための電子提供体として用いられるかもしれない。我々は QPO の進化が QPO のプロトタイプの酵素の N 末端領域への膜結合型チトクロム *c* の”獲得”、取り込みによって QPO の進化を反映したかもしれないと仮定している。この変化は QPO を膜に結合した酵素に変え、QPO が還元剤である呼吸鎖のキノンから電子を受け取ることが容易になった。そして、それに類似した過程として、耐熱性バチルス属 PS3 の呼吸鎖からチトクロム *caa3* を取り入れたような末端酸化酵素にもみられる。

(7) 前述したとおり、すでに我々は QPO の強力な阻害剤として ascofuranone を報告している。今回さらに以下の阻害剤を発見した。すなわち、ascochlorin (competitive-type, Ki=24.7nM), ilicicolin B (mixed-type, Ki=576nM), ilicicolin F (competitive-type, Ki=19.5nM), N-heptyl-quinoline-N-oxide (competitive-type, Ki=1.0μM), 緑膿菌のクオラムセンシングに関係している 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (noncompetitive-type, Ki=7.0μM) が QPO を阻害するのを示した。また呼吸鎖の特異的な阻害剤として知られている ZnCl₂ および KCN の IC₅₀ は各 4.9μM、85.0μM であった。

<引用文献>

1. Fine, D. H., Kaplan, J. B., and Kachlany, S. C. (2009) How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontol.* **42**, 114-157
2. Das, M., and Badley, A. D., Cockerill, F. R. (1997) Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms. *Ann. Rev. Med.* **48**, 25-33
3. Rahamat-Langendoen, J. C., van Vonderen, M. G., Engstrom, L. J., Manson, W. L., van Winkelhoff, A. J., and Mooi-Kokenberg, E. A. (2011) Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. *J. Clin. Periodontol.* **38**, 702-706
4. Moazzam, A. A., Rajagopal, S. M., Sedghizadeh, P. P., Zada, G., and Habibian, M. (2015) Intracranial bacterial infections of oral origin. *J. Clin. Neurosci.* **22**, 800-806
5. Storz, G., and Imlay, J. A. (1999) Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 188-194.
6. Imlay, J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395-418.
7. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 192-208
8. Ellfolk, N., and Soiminen, R. (1970) *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. I. Purification procedure. *Acta Chem. Scand.* **24**, 2126-2136
9. Fulop, V., Ridout, C.J., Greenwood, C. and Hajdu, J. (1995) Crystal structure of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* **3**, 1225-1233
10. Yamada, H., Takashima, E., and Konishi, K. (2007) Molecular characterization of the membrane-bound quinol peroxidase

- functionally connected to the respiratory chain. *FEBS J.* **274**, 853-866
11. Takashima, E., and Konishi, K. (2008) Characterization of a quinol peroxidase mutant in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* *FEMS Microbiol. Lett.* **286**, 66-70
 12. Lally, E. T., Hill, R. B., Kiecba, I. R., and Korostoff, I. (1999) The interaction between RTX toxin and target cells. *Trends Microbiol.* **7**, 356-361
 13. Balashova, N. V., Crosby, J. A., Ghofaily, L., and Kachlany, S. C. (2006) Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **74**, 2015-2021
 14. Takashima, E., Yamada, H., Yamashita, T., Matsushita, K., and Konishi, K. (2010) Recombinant expression and redox properties of triheme *c* membrane-bound quinol peroxidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 52-57
 15. Rieske, J. S. (1967) Preparation and properties of reduced coenzyme Q-cytochrome *c* reductase (complex III of the respiratory chain). *Methods Enzymol.* **10**, 239-245
 16. Segel I. H. (1993) Ping Pong Bi Bi systems in *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* (Segel I.H., ed), pp. 18-22, John Wiley & Sons Inc., New York
 17. Hoefnagel, M., Rich, P. R., Zhang, Q., and Wiskich, J. T. (1997) Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and the effects of pyruvate. *Plant Physiol.* **115**, 1145-1153.
 18. Takashima, E., Yamada, H., Yajima, A., Shiomi, K., Omura, S., Konishi, K. (2009) A quinol peroxidase inhibitor prevents secretion of a leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Periodont. Res.* **45**, 123-128
5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計1件)
- 1) Enzymatic kinetics of the quinol peroxidase of an aggressive periodontopathic bacterium.
Tasuku Abe, Taketo Kawarai, Yukihiko Takahashi, and Kiyoshi Konishi.
J. Biochem. (2017) 161(6): 513-520. doi: 10.1093/jb/mvw099. (査読有り)
- [学会発表] (計9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反応の解析.
安部佐, 河原井武人, 古西清司
第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日~20日, 仙台国際センター (宮城県)
 - 2) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* のキノールペルオキシダーゼの酵素反応の作用機序の解析.
安部佐, 高橋幸裕, 古西清司
平成28年度歯学会学内口頭発表会, 2016年9月16日, 日本歯科大学 (東京都)
 - 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反応の解析.
安部佐, 河原井武人, 高橋幸裕, 古西清司
第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月25日, 札幌コンベンションセンター (北海道)
 - 4) 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反応の研究.
安部佐, 河原井武人, 古西清司
平成28年度日本生化学会関東支部例会, 2016年6月11日, 自治医科大学 (栃木県)
 - 5) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤.
河原井武人, 安部佐, 古西清司
日本歯科大学歯学会大会・総会, 2015年6月6日, 日本歯科大学新潟生命歯学部 (新潟県)
 - 6) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤.
河原井武人, 安部佐, 古西清司
第88回日本細菌学会, 2015年3月28日, 長良川国際会議場(岐阜県)
 - 7) Enzymatic analysis of quinol peroxidase of aggressive periodontopathic bacterium.
河原井武人, 安部佐, 古西清司
日本歯科大学第1回ウィンターミーティング, 2014年12月13日, 日本歯科大学 (東京都)
 - 8) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤.
河原井武人, 古西清司
第55回歯科基礎医学会学術大会 2013年9月22日, 岡山コンベンションセンター (岡山県)
 - 9) 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤の検討.
河原井武人, 古西清司
第86回日本生化学会大会, 2016年9月13日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
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:
 - (4) 研究協力者
()
研究者番号: