

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592775

研究課題名(和文) SLPIによる*P. gingivalis*プロテアーゼ阻害作用と感染制御研究課題名(英文) Infection control with SLPI via the inhibitory effect on the proteases of *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

木村 重信 (Kimura, Shigenobu)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：10177917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：分泌型白血球プロテアーゼインヒビター，SLPIは，*Porphyromonas gingivalis* の主要かつ重要なプロテアーゼであるジンジパイン（RgpおよびKgp）に対して，特に比較的pHが高い場合（pH 8.0および8.5）に強い抑制効果を示すことが明らかとなった．それゆえ，SLPIは，そのプロテアーゼ阻害作用を通じて，歯肉溝における*P. gingivalis*に対する感染防御に働いている可能性が強く示唆された．

研究成果の概要(英文)： The results indicated that secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) showed a marked inhibitory effect on gingipains (Rgp and Kgp), the major and crucial proteases of *Porphyromonas gingivalis*, especially at relatively higher pH (8.0 and 8.5). Thus, SLPI could down-regulate the *P. gingivalis* infection in the gingival crevice through the inhibitory effect on gingipains.

研究分野：医歯薬学

キーワード：SLPI 感染制御 *P. gingivalis* プロテアーゼ阻害作用

### 1. 研究開始当初の背景

SLPI は、当初、好中球が産生するセリンプロテアーゼのインヒビターとして報告されたが、その後、粘膜系での病原微生物に対する感染防御を担う自然免疫として機能する生体因子であることが示唆されている。我々はこれまでの研究から、歯肉上皮細胞が SLPI 産生細胞の一つとして機能しており、*P. gingivalis* の感染刺激を通して反応的に SLPI 産生が増強されることを明らかにしてきた (Ishikawa ら;2010)。しかし、歯肉溝での SLPI の作用機序、特に *P. gingivalis* の感染に対する制御作用については明らかではなかった。また我々は別に、新規のプロテアーゼ、DPP11 の発見 (Ohara-Nemoto ら, 2011) を含め、*P. gingivalis* のプロテアーゼについても検討を行っており、プロテアーゼは本菌の生存にとって重要な役割を演じていることを明らかにしてきた。そこで、SLPI によるプロテアーゼ阻害という面から、*P. gingivalis* 感染抑制作用の詳細を明らかにするという着想にいたった。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず、リコンビナント SLPI の調製ならびにジンジバイン (Kgp および Rgp) を含む *P. gingivalis* のプロテアーゼ群のリコンビナントタンパク質の調製を行い、つぎにそれらを用いて、SLPI によるプロテアーゼ阻害という面から、*P. gingivalis* 感染抑制作用について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) rSLPI の発現と精製 rSLPI の調製：

発現ベクター系を用いて、rSLPI の発現と精製 rSLPI の調製を試みた。発現ベクターにコザック配列を追加することにより、発現効率の向上が得られ、V5タグ付き rmSLPI の精製を行った。

#### (2) *P. gingivalis* のプロテアーゼ群のリコンビナントタンパク質の調製と酵素学的検討：

我々のこれまでの研究実績 (2011) をもとに、ジペプチジルペプチダーゼ4 (DPP4)、DPP5、DPP7 および DPP11 の野生型および変異型組換え体の発現精製系を作製し、1 残基置換法により、それらの酵素学的特性と基質特異性決定機構について検討した。

#### (3) SLPI によるプロテアーゼ阻害作用：

*P. gingivalis* の産生する主要なプロテアーゼである Kgp および Rgp、DPP4、DPP5、DPP7 および DPP11 のプロテアーゼ活性を蛍光ペプチド基質を用いて測定する実験系に rSLPI を添加し、そのプロテアーゼ阻害作用について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) rSLPI の発現と精製 rSLPI の調製

種々の発現ベクター系を用いて、rSLPI の発現と精製 rSLPI の調製を試みたが、当初、

十分量のリコンビナントタンパク質を精製するまでにはいたらなかった。そこで、発現ベクターにコザック配列を追加することにより、発現効率の向上を試みた結果、発現効率の向上が得られ、V5タグ付き rmSLPI の精製を行った。

#### (2) *P. gingivalis* のプロテアーゼ群のリコンビナントタンパク質の調製と酵素学的検討：

DPP4、DPP5、DPP7 および DPP11 のリコンビナント体を作製し、それらの酵素学的特性について明らかにした。

#### (3) SLPI によるプロテアーゼ阻害作用：

2.5  $\mu\text{g/culture}$  の rSLPI の添加により、*P. gingivalis* の菌体結合型の Rgp、Kgp の酵素活性が有意に阻害された。

0.25  $\mu\text{g/culture}$  の rSLPI 添加によっても Rgp、Kgp の酵素活性阻害が観察されたが、高濃度の SLPI 添加の場合より、その阻害作用は弱かった。

0.25  $\mu\text{g/culture}$  の rSLPI による菌体結合型 Rgp、Kgp に対する阻害作用は、Rgp と比較し、Kgp に対して強かったが、いずれも pH が高い場合に強い阻害効果がみられた (図 1)。

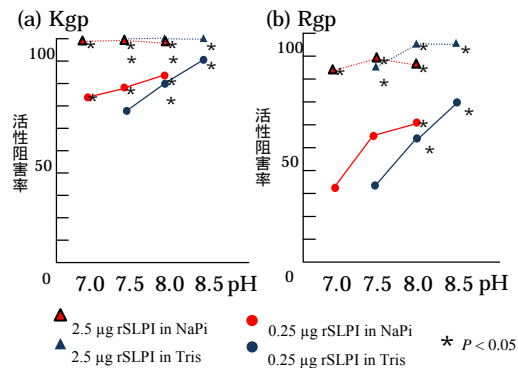


図1. SLPI による菌体結合型ジンジバイン活性阻害作用

菌体遊離型の Rgp、Kgp に対しては、菌体結合型 Rgp、Kgp の場合と比較して、rSLPI による阻害活性は弱かったが、rSLPI が高濃度の場合あるいは pH が高い場合に阻害効果が見られることが示唆された。

一方、*P. gingivalis* のジンジバイン以外のプロテアーゼである DPP4、DPP5、DPP7 および DPP11 に対しては、rSLPI はその酵素阻害活性を示さないことが強く示唆された。

rSLPI は、*P. gingivalis* のジンジバイン同様、トリプシンの Rgp 活性、Kgp 活性に対し、阻害活性を示した。

以上より Rgp、Kgp はともに *P. gingivalis* の生存・生育に関わる重要な機能を担っていることを勘案すれば、口腔において SLPI は、そのプロテアーゼ阻害作用を通じて、*P. gingivalis* に対する感染防御に働いている可能性が強く示唆された。

### 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13件)

1. Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S. M., Naito, M., Yanase, A., Tetsuo, F., Ono, T., Kobayakawa, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nakayama, K., Saiki, K., Konishi, K. and Nemoto, T. K.: Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem., 289: 5436-5448, 2014 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M113.527333. Epub 2014 Jan 7
2. Matsui, M., Chosa, N., Shimoyama, Y., Minami, K., Kimura, S. and Kishi, M.: Effects of tongue cleaning on bacterial flora in tongue coating and dental plaque: a crossover study. BMC Oral Health, 14: 4. 2014 査読有 DOI: 10.1186/1472-6831-14-4
3. Nishimata, H., Ohara-Nemoto, Y., Baba, T. T., Hoshino, T., Fujiwara, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Identification of dipeptidyl-peptidase (DPP)5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, distinct from those in *Porphyromonas gingivalis*. PLOS ONE, 10; 9(12):e114221. 2014 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0114221 eCollection 2014
4. Rouf, S. M., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: In vitro processing of glutamyl endopeptidase proenzymes from *Enterococcus faecalis* and importance of N-terminal residue in enzyme catalysis. Adv. Biochem., 1: 73-80, 2013 査読有 DOI: 10.11648/j.ab.20130105.11
5. Rouf, S. M., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Phenylalanine 664 of dipeptidyl peptidase (DPP) 7 and Phenylalanine 671 of DPP11 mediate preference for P2-position hydrophobic residues of a substrate. FEBS Open Bio., 3: 177-183, 2013 査読有 DOI: 10.1016/j.fob.2013.03.004
6. Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Takahashi, M., Kishi, K., Kimura, S., Aizawa, F. and Yonemitsu, M.: Prediction of periodontopathic bacteria in dental plaque of periodontal healthy subjects by measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. Arch. Oral Biol., 58: 324-330, 2013 査読有 DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.09.019
7. Taira, M., Sasaki, M. and Kimura, S.: Macrophage reaction against sub-micron titanium particles. In Interface Oral Health Science 2011 (Sasaki, K. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 283-284, 2012 査読有 DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0
8. Nomura, T., Suzuki, T., Furuya, J., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: In vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic resin with different surface status. In Interface Oral Health Science 2011 (Sasaki, K. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 145-146, 2012 査読有 DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0
9. Otake-Asakawa, A., Harada-Oikawa, R., Ohara-Nemoto, Y., Tanaka, M. and Kimura, S.: Maternal transmission of mutans and other oral streptococcal species. In Interface Oral Health Science 2011 (Sasaki, K. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 198-200, 2012 査読有 DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0
10. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Fibronectin binding activity of *Streptococcus anginosus* promotes adherence to mucosal epithelial cells. In Interface Oral Health Science 2011 (Sasaki, K. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 204-205, 2012 査読有 DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0
11. Shimoyama, Y., Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T.K., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Rapid identification of *Abiotrophia/Granulicatella* species by 16S rRNA-based PCR and RFLP. In Interface Oral Health Science 2011 (Sasaki, K. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 206-208, 2012 査読有 DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0
12. Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: NVS and staphylococci in the oral cavity - A cause of infective endocarditis. In Endocarditis (Breijo-Marquez, F.R, ed.), InTech, Rijeka, Croatia. p. 75-96, 2012 査読有 ISBN 978-953-307-901-1
13. Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Sasaki, M.: Pathogenic factors of *P. gingivalis* and host defense mechanisms. In Pathogenesis and treatment of periodontitis (N. Buduneli, ed.), InTech, Rijeka, Croatia. p. 3-18, 2012 査読有 ISBN 978-953-307-924-0

[学会発表](計12件)

1. 石河太知, 下山 佑, 根本優子, 佐々木 実,

- 木村重信: Laminine 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via alpha6beta1 integrin and MCAM. 第 88 回日本細菌学会総会・岐阜. 3月(2015) 3-28-15
2. 根本孝幸, 小野俊雄, 下山 佑, 木村重信, 根本優子: 歯周病原性細菌の新規ペプチダーゼの基質特異性と分子集合解離機構. 第 87 回日本生化学会大会・京都. 10月(2014) 10-16-14
3. 根本孝幸, 根本優子, 小野俊雄, 下山 佑, 木村重信: 歯周病原性細菌の新規オリゴペプチダーゼ: 基質特異性と分子集合性. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 福岡. 9月(2014) 9-27-14
4. 下山 佑, 石河太知, 根本優子, 根本孝幸, 佐々木 実, 木村重信: SLPI による *Porphyromonas gingivalis* に対する感染抑制作用. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 福岡. 9月(2014) 9-26-14
5. Endo, C., Shimoyama, Y., Sasaki, M., Shinohe, Y., Satoh, K., Satoh, M., Kimura, S. and Joh, S.: Preoperative oral care reduces the bacterial adhesion to endotracheal tubes. 92nd General Session & Exhibition of the IADR. Cape Town, South Africa. March (2014) 3-28-14
6. Iwasaki, K., Sasaki, M., Kodama, Y., Matsumoto, N., Kimura, S. and Sugiyama, Y.: The involvement of *Streptococcus anginosus* infection and AID expression in oral cancers. 21st International Conference of Oral and Maxillofacial Surgery. Barcelona, Spain. October (2013) 10-21-13
7. Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: Dipeptide production in *Porphyromonas gingivalis* mediated by dipeptidyl peptidases and gingipains. 113th General Meeting of the American Society for Microbiology. Denver, CO, USA. May (2013) 5-19-13
8. Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, M., Sasaki, M., Kodama, Y., Tanaka, M. and Kimura, S.: Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in children's plaques. 113th General Meeting of the American Society for Microbiology. Denver, CO, USA. May (2013) 5-19-13
9. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y. and Kimura, S.: The aciduricity of *Streptococcus anginosus*. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Seattle, WA, USA. March (2013) 3-20-13
10. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y. and Kimura, S.: A novel fibronectin

binding protein of *Streptococcus intermedius*. 90th General Session & Exhibition of the IADR. Iguazu Falls, Brazil. June (2012)

11. Ohara-Nemoto, Y., Abdur-Rouf, S., Hoshino, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ono, T. and Nemoto, T.: Classification and essential amino acid residues of the dipeptidyl peptidase (DPP) 7/11 family in the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group. 112th General Meeting of the American Society for Microbiology. San Francisco, USA. June (2012)
12. Kimura, M., Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Tanaka, M.: Colonization of *Porphyromonas gingivalis* in the plaques from mothers and their children. The 11th Congress of the European Academy of Pediatric Dentistry. Strasbourg, France. May (2012)

〔図書〕(計 1 件)

1. 木村重信, 中川一路, 川端重忠, 大原直也, 小松澤 均, 医歯薬出版, 最新歯科衛生士教本 疾病の成り立ち及び回復過程の促進 2 微生物学 (全国歯科衛生士教育協議会監修)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/micr/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 重信 (KIMURA SHIGENOBU)  
岩手医科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 10177917

(2) 研究分担者

根本 優子 (OHARA-NEMOTO YUKO)  
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 10164667

(3) 連携研究者

佐々木 実 (SASAKI MINORU)  
岩手医科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 40187133

下山 佑 (SHIMOYAMA YU)  
岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：90453331

石河 太知 (ISHIKAWA TAICHI)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：10569247