

石田 豊 論文内容の要旨

主 論 文

Determination of active site of Lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) by use of a *Porphyromonas gingivalis* plasmid system

Porphyromonas gingivalis プラスミドシステムを用いたリジン特異的システインプロテアーゼ（リジルジンジパイン）の活性中心の同定

石田 豊、胡 錦萍、坂井詠子、門脇知子、山本健二、筑波隆幸、
加藤有三、中山浩次、岡元邦彰

掲載学術雑誌名： Arch. Oral Biol. 掲載時期未定

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
(主任指導教員：筑 波 隆 幸 教 授)

緒 言

グラム陰性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. g.*) は成人性歯周炎の発症や進行に深く関わっている病原性細菌であると言われており、プロテアーゼや LPS など様々な病原性因子を産生している。我々は本細菌の産生するプロテアーゼに着目し、その中のアルギニン特異的システインプロテアーゼ (Arg-gingipain, 以下 Rgp) とリジン特異的システインプロテアーゼ (Lys-gingipain, 以下 Kgp) の酵素学および構造学的な解析を進めてきた。両酵素は基質特異性を初めとして異なる役割を担っているが、プロテアーゼと血球凝集素という2つの機能ドメインから構成されていること、血球凝集素ドメインはさらにいくつかのサブドメインに分けられることなど、構造上類似点も多々存在している。今回は、Kgp 遺伝子を *P. g.* 内で発現させる系を確立するとともに、その活性中心であるシステイン残基を同定することを試みた。

材料と方法

我々は以前、*P. g.* 野生株 ATCC33277 より Kgp を発現していない *P. g.* 変異体 (KDP129) を作製している。そこでまず、この変異体に Kgp を発現させ、合成基質によって Kgp 活性を測定することにより、簡便に Kgp 発現株を選別できる系の確立を試みた。まず、プラスミドの構築として、Kgp 遺伝子を鋳型に Polymerase Chain Reaction 法を用い目的とする部位の遺伝

子増幅を行った。その際、プライマーの両端に制限酵素 *KpnI* 部位を配列しておいた。これを日本歯科大学熊谷博士より供与していただいたプラスミド pYKP028（テトラサイクリン耐性遺伝子を持つ）の *KpnI* 部位に挿入し、精製したプラスミドを大腸菌 SMλ10pir にエレクトロポレーション法により導入した。SMλ10pir は *P. g.* に接合伝達できる遺伝子が挿入されている。また、pYKP028 にはあらかじめ大腸菌内で働くアンピシリン耐性遺伝子が挿入されているため、これにより選別を行った。Kgp 遺伝子プラスミド導入した大腸菌と KDP129 を混和し、接合伝達により Kgp 遺伝子の挿入されたプラスミドを KDP129 へ移動させた。ここで、テトラサイクリンにより選別を行い目的とする Kgp 遺伝子の挿入されたプラスミドをもつ *P. g.* 変異体を作製した（NOP003）。この変異体を培養上清と菌体に分離し、合成基質 Boc-Val-Leu-Lys-MCA を用いて Kgp 活性の測定を行った。また、蛋白質の発現を Kgp の抗体を用いたウエスタンブロット法にて確認した。

次に、上記で確立した Kgp の発現系を用いて、Kgp の活性中心を同定した。まず、Rgp の活性中心より Kgp の活性中心を予測したところ、2つのシステイン残基が存在していたため、その片方ずつおよび両方のシステイン残基をアラニンに変換したプラスミドを作製した。このプラスミドを上述したのと同じ方法で KDP129 に導入し、活性中心に変異の挿入された変異体の作製を行った。これらの変異体の Kgp 活性測定と Kgp 抗体によるウエスタンブロット解析により、どのシステイン残基が Kgp 活性に重要であるのかを調べた。

結 果

Kgp 欠損変異体（KDP129）に Kgp 遺伝子を導入した変異体（NOP003）は野生株の培養上清および菌体と比較して、50-70%の活性を示した。また、Kgp の欠損変異体で消失していたヘモグロビン結合蛋白質（HGP15）のプロセッシングも回復していた。さらに、*P. g.* の特徴の一つである黒色コロニーも形成した。

活性中心の解析においては、予想された2つのシステイン残基の両方をアラニン残基に置換した変異体（NOP011）は Kgp 蛋白質として発現はしていたが、Kgp 活性は全く認められなかった。476 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体（NOP021）でも、同様に Kgp 活性は認められなかったが、477 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体（NOP031）では、Kgp 蛋白質として発現し、Kgp 活性も認められた。

考 察

今回、*P. g.* のプラスミドシステムを用いて、Kgp の発現系を確立し、現在報告されている発現方法より、より活性の高い変異体を得ることができた。この変異体は野生型よりやや活性は低いものの、ヘモグロビン結合蛋白質のプロセッシングや黒色色素産生能の回復等、野生型と同等の機能を示すことが明らかとされた。また、NOP021（⁴⁷⁷Cys→⁴⁷⁷Ala）では、蛋白質としては発現しているものの Kgp 活性は認められなかったこと、逆に NOP031（⁴⁷⁶Cys→⁴⁷⁶Ala）では、Kgp 蛋白質としても発現し、Kgp 活性も認められたことより、Kgp の活性には 477 番目のシステイン残基が重要であることが明らかとされた。