

歯周病原性菌プロテアーゼと歯周炎

石原 和 幸

東京歯科大学微生物学講座

Role of bacterial protease in periodontitis

Kazuyuki Ishihara

Department of Microbiology, Tokyo Dental College

はじめに

口腔の2大疾患である歯周病と齲蝕は、細菌感染症である。歯肉縁下のグラム陰性桿菌とスピロヘータは歯周炎の発症に重要な関わりを持つことが示されてきた^{1,2)}。細菌の産生する酸による歯の脱灰という simple なモデルで説明できる齲蝕に対し、歯周病の発症には、複数の歯周病原菌の関与に加え宿主の要因や喫煙等の生活習慣も関るため、その発症のプロセスには不明な点が多い。慢性歯周炎局所から高頻度に分離される、*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* は、タンパク分解酵素を持ちそれが歯周病発症に重要な役割を果たすと考えられてきた。本稿では、これらの細菌の産生するタンパク分解酵素の病原性の解析、それを利用した細菌の検出及び予防への応用について述べる。

I. 歯周病原菌プロテアーゼによる歯周病原菌の検出

歯周病原性菌はそのほとんどが偏性嫌気性菌であるため酸素分圧の低い歯肉溝内等の部位に定着、増殖する。歯肉縁下の環境ではその増殖の主要な栄養源は歯肉から滲出してくる歯肉溝滲出液である。歯周病原菌の一部にはそれを分解し栄養源とするためにプロテ

アーゼを持つものがある。歯周病原菌のうち *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* は、慢性歯周炎局所から共に分離されることが多い³⁻⁵⁾。この3種の細菌は、アルギニン特異的ペプチダーゼ活性(トリプシン様活性)を有している。これ以外にトリプシン様活性を有しているとしては、*Capnocytophaga* 属の一部の株のみである⁶⁾。この活性の細菌学的診断キットへの応用は、3種の歯周病原菌の存在を検出を可能とし、さらにはそれによる検出が歯周炎の臨床的な指標と一致することを明らかにした^{7,8)}。

高齢者では嚥下反射の低下による唾液の誤嚥の増加と、防御機構の低下により呼吸器疾患を起こしやすくなっている^{9, 10)}。インフルエンザは高齢者での致死率が高いことからその予防の重要性が示されてきている。インフルエンザの感染には、プロテアーゼとノイラミニダーゼの2種の酵素が重要な役割を果たしている。インフルエンザウイルスが宿主に定着するためには宿主由来のプロテアーゼ等によってウイルス表面の赤血球凝集素が切断されることが必要である。この作用はブドウ球菌由来のトリプシン様活性によっても認められている。歯周病原性菌のトリプシン様活性も類似の活性を持つことからその感染に関与する可能性が考えられる。前述のトリプシン様活性による歯周病原

連絡先：石原和幸

〒261-8502 千葉県美浜区真砂1-2-2

東京歯科大学

Kazuyuki Ishihara

Department of Microbiology Tokyo Dental College

1-2-2 Masago, Mihama-ku Chiba 261-8502 Japan

E-mail : ishihara@tdc.ac.jp

細菌の検出システムを用いて、高齢者の口腔ケア前後の唾液中のトリプシン様活性と誤嚥性肺炎およびインフルエンザの罹患率について解析を行うと、図1に示すように口腔ケア群では口腔内のトリプシン様活性が著明な低下を示した¹¹⁾。同時に肺炎罹患率およびインフルエンザ罹患率が有意に低下していた。口腔ケアによる肺炎の低下が2次的にインフルエンザ感染を減らした可能性も考えられるためさらなる解析が必要であるが、この結果は口腔内細菌によるプロテアーゼ活性がインフルエンザの感染に関与する可能性を示している。

II. 歯周病原性菌プロテアーゼの遺伝子解析

a. *T. forsythia*

T. forsythia は、その歯周炎への関連性が報告されてきた。しかしその病原性のメカニズムの解析は少なかった^{5,12)}。本菌はトリプシン様活性を持つことが知られていたため、本菌のプロテアーゼを解析することによって病原性を明らかにする事を試みた。*T. forsythia* の genomic library を作成し、1% skim milk を含む培地を用いたスクリーニングによりペプチダーゼ活性を持つクローンを得た¹³⁾。組み換え大腸菌のペプチターゼ活性は嫌気的条件下および DTT の添加によって上昇した。クローニングされた遺伝子 *priH* は 1,272 bp であり、47.8 kDa のタンパクを code していた。組み換え大腸菌の超音波破碎上清の活性は N-benzoyl-Val-Gly-Arg-*p*-nitroanilide に特異的であり、トリプシン様活性は示さなかった。組み換え大腸菌の培養上清はヒト赤血球に対し溶血活性を示し、培養上清を電気泳動後ゲルに 10% ヒト赤血球を含む寒天を overlay すると、41 kDa 付近に溶血活性が認められた。これらの結果は、*priH* が *T. forsythia* の新規な病原性因子であることを示した。本酵素は、Nakajima らにより附着細胞を遊離させる作用を持つ *forsythia* detaching factor の一部であることが明らかにされた¹⁴⁾。

b. *Treponema denticola*

T. denticola は、らせん型を呈し、その回転運動により動く運動性菌である¹⁵⁾。Major outer sheath protein (Msp) と本菌の表層プロテアーゼは、病原性の中心的役割を担うことが報告されてきた¹⁶⁾。本菌のプロテアーゼは、窒素源獲得と共に組織への侵入に関わることによって病原性を発揮していると考えられていた。このうち表層の chymotrypsin 様プロテアーゼは、上皮の基底膜への侵入に関わる重要な病原性因子と考えられていた¹⁷⁻¹⁹⁾。われわれはこの酵素を精製し、N-末端のアミノ酸配列を明らかにし、そのクローニングを試みた²⁰⁾。本酵素をイオン交換クロマトグ

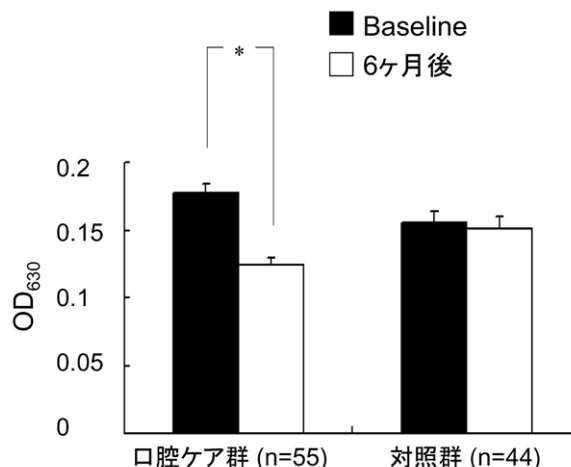


図1A 要介護高齢者における口腔ケア開始前後の口腔内トリプシン様プロテアーゼ活性の変化

口腔ケアのインフルエンザ罹患率への影響

	口腔ケア群 (n = 98)	対照群 (n = 92)
インフルエンザワクチン接種 (%)	39 (42.4)	36 (39.1)
インフルエンザ罹患率 (%)	1 (1.0)	9 (9.8) †
かぜ (%)	8 (8.2)	12 (13.0)

*人数. (%). †Fisher's exact test; p=0.008

図1B 要介護高齢者での口腔エアのインフルエンザ罹患率への影響

ラフィー、ロトフォア、ゲル濾過により精製すると、精製されたプロテアーゼは非還元の状態での SDS-PAGE では 100kDa 付近に近接し重なった 2 本のバンド、還元状態の SDS-PAGE では 72 kDa, 43 kDa, 38 kDa の 3 本のバンドとして認められた。さらなる精製によっても、それ以上の分離精製はできないことより、このプロテアーゼは複数のタンパクの複合体であることが予想された。合成基質による解析では精製酵素は、prolyl-phenylalanine の所でタンパクを切断する活性を持っていた。本酵素はフィブロネクチン、フィブリノーゲン、IgG、アンチトリプシン等のタンパクに対して分解活性を示した。

エドマン法によって N-末端のアミノ酸の配列を解析すると、100 kDa 付近の重複したバンドからは、2 種のタンパクの混合物であることを示す結果が得られた。これが 72 kDa のタンパクと 43 kDa のタンパクの N-末端のアミノ酸の配列と一致したため、chymo-

trypsin 様プロテアーゼは、これらのタンパクの複合体であると考えられた。この配列に基づいて遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行い2種のクローンを得た。これらの塩基配列の決定の結果、2種のタンパクは operon を形成していることが明らかになった。このうち下流に存在する 72 kDa のタンパクをつかさどる遺伝子 *prtP* は、*Bacillus subtilis* のセリンプロテアーゼ subtilisin にアミノ酸レベルで 25.9% の相同性を示していた。特にその活性中心では活性をつかさどるアスパラギン酸、セリン、ヒスチジンの3つのアミノ酸の triad は完全に保存されていた。このタンパク分解酵素を dentilisin と命名した。その欠損株を作成すると、chymotrypsin 様活性が失われたことより dentilisin が chymotrypsin 様プロテアーゼであることが証明できた。さらにこの欠損株と野生株での病原性をマウス側腹部への接種により比較すると、図2に示すように dentilisin 欠損株で膿瘍形成能が低下していることから、本酵素が *T. denticola* の主要な病原因子であることが明らかになった²¹⁾。

Dentilisin は、上流のタンパクとタンデムに存在し、operon を形成している。この上流のタンパクの機能を明らかにする目的で上流のタンパクの sequence の決定及び欠損株を作成した。dentilisin 上流にはおよそ 1,917 bp の遺伝子が認められていた。この上流の遺伝子 *prcA* は、発現の過程で前半部と後半部の2つのタンパクに分解されることが明らかにされた²²⁾。この後半部が 43 kDa タンパクを code する部分であった。この上流のタンパクの dentilisin 活性発現への関与を明らかにする目的で、43 kDa のタンパク遺伝子の部分の欠損株を作成した。得られた欠損株では 43 kDa タンパクの活性と共に dentilisin 活性も失われていた。RT-PCR の解析では、dentilisin 発現が欠損株で野生株の 50% 程度と減っているがその発現が認められている事、さらに Limberger ら²³⁾も、欠損させた遺伝子の下流の遺伝子発現が影響を受けないことを報告していることから、dentilisin 活性の消失は 43 kDa タンパクの欠損が原因であると考えられた。この結果は、dentilisin の活性発現には dentilisin が PrcA と複合体を形成することが必要であることを示唆している。

c. Dentilisin が免疫応答に与える影響

プロテアーゼはその分解活性により免疫応答の mediator 等を分解し免疫に影響を与える。本酵素の、補体の活性化を介した免疫応答に対する影響に解析を加えた。ルミノール存在下で本菌にウサギ抗 *T. denticola* 抗体と C5 吸収ヒト補体を作用させると多型核白血球の活性化が認められた。この反応系から抗 *T.*

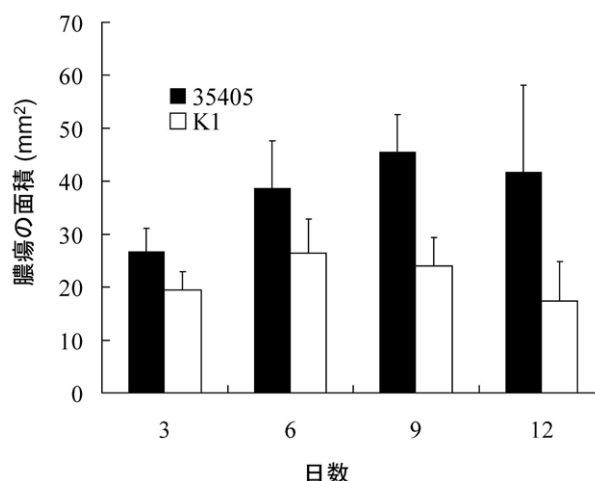


図2 *T. denticola* プロテアーゼ dentilisin が膿瘍形成能に与える影響 *T. denticola* 3x10⁹をマウス側腹部に接種し形成された膿瘍の面積を測定した。35405: *T. denticola* ATCC35405 (親株) K1: *T. denticola* K1 (dentilisin 欠損株)

denticola 抗体を除いても、好中球の活性化が認められた。これに対し dentilisin 欠損株を用いて同じ実験を行うと、抗 *T. denticola* 抗体存在下では好中球の活性化が起こるのに対し、抗体非存在下では好中球の活性化が認められなかった。Dentilisin の補体成分に対する作用を明らかにするため、本酵素を補体に加え 37°C で 17 時間培養し、電気泳動によって解析を行うと、補体の第 3 成分の 110 kDa の α 鎖を 37 kDa と 35.5 kDa のタンパクに分解していた²⁴⁾。これら結果から dentilisin が補体を活性化している可能性が考えられた。*T. denticola* と C5 吸収ヒト補体を反応後、上清中の iC3b を ELISA によって測定すると、iC3b の遊離は、dentilisin 欠損株に比べ野生株で明らかに高くなっていった。このことは *T. denticola* が dentilisin によって補体を活性化して好中球に作用を及ぼしている事を示している。補体存在下で好中球に *T. denticola* を作用させ、活性化した好中球からの matrix metalloproteinase (MMP) の遊離を測定すると、図3に示すように野生株において好中球からの MMP-9 の遊離が dentilisin 欠損株に比べ増加していた。このことは、歯周ポケット内の *T. denticola* による補体の活性化が、好中球からの MMP-9 産生亢進を引き起こし歯周組織破壊に関わる可能性を示している。

本菌を末梢血単核球に作用させ培養上清中の炎症性サイトカインの産生を解析すると、野生株では欠損株に比べて interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6) の産生が低下

していた。本菌を作用させた末梢血単核球から mRNA を抽出し、RT-PCR によって遺伝子発現を解析すると、これらのサイトカインの発現は野生株、欠損株共に上昇していた。この結果は、*T. denticola* の刺激によって末梢血単核球は炎症性サイトカインを産生するが、本菌はこれらを dentilisin によって分解している事を示している。*T. denticola* が、炎症性サイトカインを遊離させ、炎症を引き起こす事によって滲出液の増加をもたらす栄養源を確保すると共に、その部位に定着し生存するため、菌体周囲のサイトカインを分解することによりサイトカインの作用を減弱して防御作用から逃れ生き延びていると考えられる。

Ⅲ. 歯周病原菌の atherosclerosis への関与

歯周病原菌は、冠状動脈疾患をはじめとする他臓器疾患に関わっていることが示唆されている²⁵⁾。われわれは、atherosclerosis への口腔細菌の関与を明らかにする目的で、大動脈の動脈硬化症病変や、心冠状動脈の狭窄部のサンプルから歯周病原性の検出を行ってきた。大動脈の動脈硬化症病変では 16S rRNA 遺伝子部分の PCR による増幅によって *T. denticola* が 23.1% の頻度で検出され、抗 *T. denticola* 抗体を用い

た免疫組織学的染色によっても抗体の反応が認められた²⁶⁾。心冠状動脈の狭窄部のサンプルからは、*P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *Campylobacter rectus* が 21.6, 23.3, 5.9, 23.5, 15.7% の割合で検出された。さらに図 4 に示すように 4 mm 以上の歯周ポケットを 4 部位以上持つ群とそれ未満の群で比べると *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* の検出率は歯周ポケットを 4 部位以上持つ群のほうが高くなっていた。これらの結果は歯周炎の進行と共に歯周病原菌が血管に影響を与える確率が上昇していることを示している。

Atherosclerosis 形成のプロセスには、マクロファージの血管壁への侵入が key となる。これに関与するケモカインの MCP-1 の産生について解析を加えた。*T. denticola* を、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) に感染させて MCP-1 産生性を調べると、感染後 MCP-1 の mRNA 発現が認められた²⁷⁾。しかし、細胞培養上清には MCP-1 の上昇が認められなかった。dentilisin 欠損株では培養上清中のサイトカイン産生が認められている

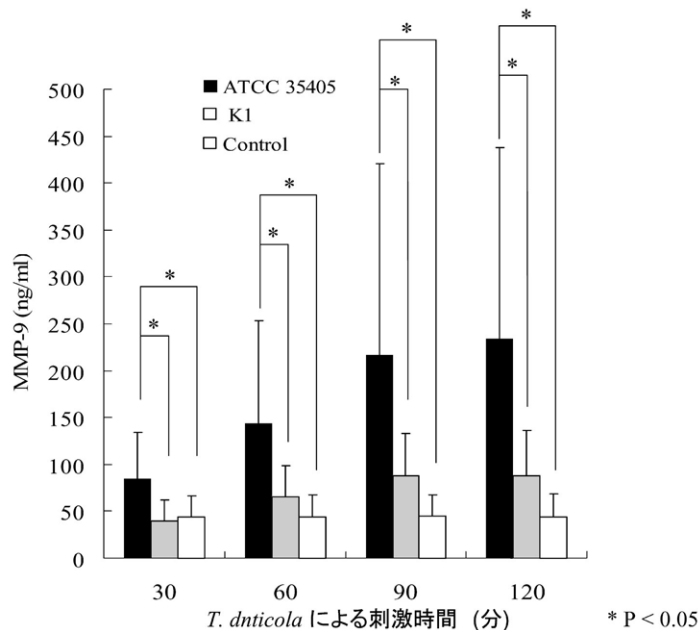


図 3 Dentilisin による多形核白血球の MMP-9 産生誘導

ヒト多形核白血球に *T. denticola*, 抗 *T. denticola* ウサギ血清, ヒト C5 吸収補体を加え培養後, 培養上清の MMP-9 を測定
 35405 : *T. denticola* ATCC35405 (親株)
 K1 : *T. denticola* K1 (dentilisin 欠損株)
 Control : 多形核白血球のみ

菌種	検出率 (%)			
	PD ≥ 4 mm (N=17)		PD ≥ 4 mm (N=34)	
	3ヶ所以下		4ヶ所以上	
	歯肉縁下	冠動脈壁	歯肉縁下	冠動脈壁
<i>P. gingivalis</i>	47.1	5.8	58.8	29.4
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	41.2	17.6	29.4	26.5
<i>T. forsythia</i>	41.2	5.8	41.2	5.9
<i>T. denticola</i>	58.8	11.8	67.7	29.4
<i>C. rectus</i>	29.4	17.6	41.2	14.7

図4 心冠状動脈狭窄部からの歯周病原菌検出率

ことから、産生された MCP-1 が dentilisin によって分解されていることが明らかになった。これらの結果は、MCP-1 の産生により *T. denticola* が atherosclerosis 形成に関与すると同時にその分解により防御作用から逃れている可能性を示している。

IV. 歯周病原性菌プロテアーゼワクチンによる歯周病の制御

P. gingivalis は慢性歯周炎の主要な病原因子である²⁸⁾。*P. gingivalis* は複数のタンパク分解酵素を産生することが報告され、トリプシン様活性を中心にその病原性が解析されてきた。トリプシン様活性は Okamoto らの報告をはじめとする複数のグループから arg-gingipain (Rgp) 遺伝子が報告されてから急速にその全貌が明らかにされ^{29,30)} 多様な病原性が明らかにされた^{31,32)}。本酵素は、本菌の定着、栄養獲得、炎症等の多種の機能に関わっている。本酵素に対する抗体を誘導することによってこれらの作用を阻止すれば歯周炎が予防できる可能性がある。Gingipain には、トリプシン様酵素と呼ばれてきたアルギニン特異的タンパク分解活性を持つ arg-gingipain (Rgp) とリシン特異的タンパク分解活性をもつ lys-gingipain (Kgp) がある。Rgp は触媒ドメインのみにより構成される RgpB と触媒ドメインに加え赤血球凝集・付着ドメインを持つ RgpA の2種に分かれる。Kgp も触媒ドメインと RgpA の赤血球凝集・付着ドメインに相同性の高い赤血球凝集・付着ドメインを持っている。そのため Rgp A の免疫により RgpA, RgpB の触媒ドメインと RgpA, Kgp の赤血球凝集・付着ドメインに対する抗体を誘導することができるはずである。免疫法としては、DNA を組織に接種し、抗原タンパクを宿主細

胞内で発現させて抗体を誘導する DNA ワクチンを用いた。RgpA 遺伝子を発現ベクター pVAX1 に挿入し、得られた rgpA DNA vaccine をマウス腹部皮膚に1週間毎に6週間免疫した。血清抗体価を測定すると6週間で抗体価がピークに達し³³⁾、得られた抗体は RgpA のそれぞれのドメインに反応していた。付着に対する効果を type I collagen スポンジへの付着によって評価すると、得られた抗体によって、*P. gingivalis* の付着作用が抑制された。さらにこの血清は Rgp のタンパク分解活性に対し抑制効果を示していた。本菌の免疫後 *P. gingivalis* 生菌を皮下に感染させたときの膿瘍のサイズは明らかに免疫を行ったマウスで小さくなっていった。

本ワクチンは *P. gingivalis* の腹腔内感染による致死作用に対しても防御効果を示した。さらにこのモデルで、サイトカイン産生についての影響を調べると、免疫マウスでは、非免疫マウスに比べて感染後 interferon γ の産生が抑制されていた。さらに IL-4, IL-6 等の Th2 type のサイトカイン産生は上昇していた³⁴⁾。免疫によって得られる抗体のサブクラスが IgG1, 2b であることから、本ワクチンの作用には Th2 type の反応の誘導が関わっていることが考えられた。

歯周炎に対する防御をシミュレーションするため、*P. gingivalis* のマウス口腔感染モデルを用いて歯周炎の主な症状である骨吸収に対する防御効果についても検討を加えた。本ワクチンを、腹部皮膚またへ鼻腔に投与しその効果を比較した。鼻腔免疫では、腹部皮膚で認められなかった唾液中の sIgA も誘導されていた。このワクチンを免疫したマウスに対し *P. gingivalis* 生菌を 2% carboxy methylose に懸濁して2日おき

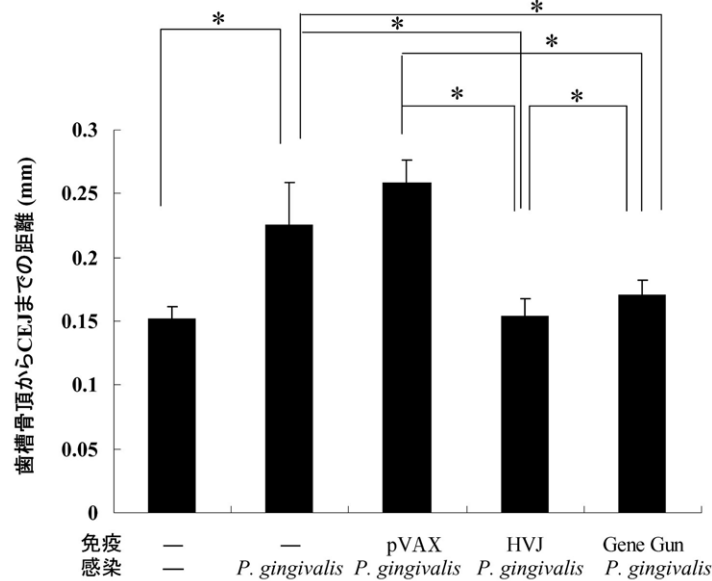


図5 *rgpA* DNA vaccine による歯槽骨吸収抑制作用

マウスに DNA vaccine を 6 週間接種後, *P. gingivalis* を口腔感染させ, 1ヶ月後骨吸収を測定した。

pVAX : ベクターのみ, HVJ : *rgpA* DNA vaccine 経鼻投与群, Gene Gun : *rgpA* DNA vaccine 腹部皮膚接種群

に 3 回口腔感染させると, 図 5 に示すように鼻腔免疫群, 腹部皮膚免疫群ともに非免疫群に比べマウス歯槽骨吸収の抑制が認められた³⁵⁾。これらの結果は RgpA が歯周病予防ワクチン抗原となりうることを示している。

これらの結果は, 歯周病原性菌プロテアーゼが歯周炎の発症のプロセスに重要な役割を果たしていることを示すと共に, その機能の阻止によって歯周病の発症を阻止できる事を示唆している。

おわりに

歯周病の病因は細菌, 宿主, 環境と言った因子が複雑に絡み合っているため, その病因を明らかにするのが困難な疾患である。そのため, 歯周病の治療には経験からの視点が優先される傾向がある。しかし, 近年の社会の変化に伴い, 残存歯数の増加による口腔環境の変化が起こり, 歯周病の罹患者数は増えることはあっても減ることがない傾向がある。これに対応し, 歯周病から患者を守っていくためには, 従来型の治療に加え, 病因を科学的に把握し, その予後を正確に判定するためのシステムやその予防のための処置が必要とされてきている。それらを生み出していくためには, 歯周炎の病態について複数の病因に対する多角的かつ総合的な研究を推進し, 新しい歯周病治療のコンセプトを生み出していくことが必要だと考えられる。

文 献

- 1) Darby, I, Curtis, M: Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol* 2000, 26 : 33-53, 2001.
- 2) Darveau, RP, Tanner, A, Page, RC : The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000, 14 : 12-32, 1997.
- 3) Armitage, GC, Dickinson, WR, Jenderseck, RS, Levine, SM, Chambers, DW : Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol*, 53 : 550-556, 1982.
- 4) Moore, WE, Moore, LH, Ranney, RR, Smibert, RM, Burmeister, JA, Schenkein, HA : The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol*, 18 : 729-739, 1991.
- 5) Socransky, SS, Haffajee, AD, Cugini, MA, Smith, C, Kent, RL Jr : Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25 : 134-144, 1998.
- 6) Suido, H, Eguchi, T, Tanaka, T, Nakamura, M: Identification of periodontopathic bacteria based upon their peptidase activities. *Adv Dent Res*, 2 : 304-309, 1988.
- 7) Ishihara, K, Naito, Y, Kato, T, Takazoe, I,

- Okuda, K, Eguchi, T, Nakashima, K, Matsuda, N, Yamasaki, K, Hasegawa, K, Suido, H, Sugihara, K: A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection and quantification of specific periodontopathogens. *J Periodont Res*, 27 : 81-85, 1992.
- 8) Seida, K, Saito, A, Yamada, S, Ishihara, K, Naito, Y, Okuda, K: A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque samples. *J Periodont Res*, 27 : 86-91, 1992.
- 9) Paju, S, Scannapieco, FA: Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis*, 13 : 508-512, 2007.
- 10) Okuda, K, Kimizuka, R, Abe, S, Kato, T, Ishihara, K : Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. *J Periodontol*, 76 : 2154-2160, 2005.
- 11) Abe, S, Ishihara, K, Adachi, M, Sasaki, H, Tanaka, K, Okuda, K : Professional oral care reduces influenza infection in elderly. *Arch Gerontol Geriatr*, 43 : 157-164, 2006.
- 12) Tran, SD, Rudney, JD, Sparks, BS, Hodges, JS : Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol*, 72 : 1-10, 2001.
- 13) Saito, T, Ishihara, K, Kato, T, Okuda, K : Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65: 4888-4891, 1997.
- 14) Nakajima, T, Tomi, N, Fukuyo, Y, Ishikura, H, Ohno, Y, Arvind, R, Arai, T, Ishikawa, I, Arakawa, S: Isolation and identification of a cytopathic activity in *Tannerella forsythia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 351 : 133-139, 2006.
- 15) Ishihara, K, Okuda, K: Molecular analysis for pathogenicity of oral treponemes. *Microbiol Immunol*, 43 : 495-503, 1999.
- 16) Ishihara, K, Okuda, K: Molecular pathogenesis of the cell surface proteins and lipids from *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol Lett*, 181 : 199-204, 1999.
- 17) Fenno, JC, Hannam, PM, Leung, WK, Tamura, M, Uitto, VJ, McBride, BC : Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsinlike protease of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 66 : 1869-1877, 1998.
- 18) Mathers, DA, Leung, WK, Fenno, JC, Hong, Y, McBride, BC : The major surface protein complex of *Treponema denticola* depolarizes and induces ion channels in HeLa cell membranes. *Infect Immun*, 64 : 2904-2910, 1996.
- 19) Uitto, VJ, Grenier, D, Chan, EC, McBride, BC : Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 56 : 2717-2722, 1988.
- 20) Ishihara, K, Miura, T, Kuramitsu, HK, Okuda, K: Characterization of the *Treponema denticola* prtP gene encoding a prolyl-phenylalanine-specific protease (dentilisin). *Infect Immun*, 64 : 5178-5186, 1996.
- 21) Ishihara, K, Kuramitsu, HK, Miura, T, Okuda, K: Dentilisin activity affects the organization of the outer sheath of *Treponema denticola*. *J Bacteriol*, 180 : 3837-3844, 1998.
- 22) Lee, SY, Bian, XL, Wong, GW, Hannam, PM, McBride, BC, Fenno, JC: Cleavage of *Treponema denticola* PrcA polypeptide to yield protease complex-associated proteins Prcal and Prc2 is dependent on PrtP. *J Bacteriol*, 184 : 3864-3870., 2002.
- 23) Izard, J, Samsonoff, WA, Limberger, RJ: Cytoplasmic filament-deficient mutant of *Treponema denticola* has pleiotropic defects. *J Bacteriol*, 183 : 1078-84., 2001.
- 24) Yamazaki, T, Miyamoto, M, Yamada, S, Okuda, K, Ishihara, K : Surface protease of *Treponema denticola* hydrolyzes C3 and influences function of polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect*, 8: 1758-1763, 2006.
- 25) Beck, JD, Eke, P, Heiss, G, Madianos, P, Couper, D, Lin, D, Moss, K, Elter, J, Offenbacher, S : Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulation*, 112 : 19-24, 2005.
- 26) Okuda, K, Ishihara, K, Nakagawa, T, Hirayama, A, Inayama, Y, Okuda, K : Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol*, 39 : 1114-1117, 2001.
- 27) Okuda, T, Kimizuka, R, Miyamoto, M, Kato, T, Yamada, S, Okuda, K, Ishihara, K : *Treponema denticola* induces interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein 1 production in human umbilical vein epithelial cells. *Microb Infect*, 9 : 907-913, 2007.
- 28) Lamont, RJ, Jenkinson, HF : Life below the gum line : Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 : 1244-1263, 1998.
- 29) Okamoto, K, Misumi, Y, Kadowaki, T, Yoneda,

- M, Yamamoto, K, Ikehara, Y : Structural characterization of argingipain, a novel arginine-specific cysteine proteinase as a major periodontal pathogenic factor from *Porphyromonas gingivalis*. Arch Biochem Biophys, 316 : 917-925, 1995.
- 30) Pavloff, N, Potempa, J, Pike, RN, Prochazka, V, Kiefer, MC, Travis, J, Barr, PJ : Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. Biosynthesis as a proteinase-adhesin polyprotein. J Biol Chem, 270 : 1007-1010, 1995.
- 31) Imamura, T, Travis, J, Potempa, J : The biphasic virulence activities of gingipains : Activation and inactivation of host proteins. Curr Protein Pept Sci, 4 : 443-450, 2003.
- 32) Nakayama, K : Molecular genetics of *Porphyromonas gingivalis* : Gingipains and other virulence factors. Curr Protein Pept Sci, 4 : 389-395, 2003.
- 33) Yonezawa, H, Ishihara, K, Okuda, K : Arg-gingipain a DNA vaccine induces protective immunity against infection by *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. Infect Immun, 69 : 2858-2864., 2001.
- 34) Yonezawa, H, Kato, T, Kuramitsu, HK, Okuda, K, Ishihara, K : Immunization by Arg-gingipain A DNA vaccine protects mice against an invasive *Porphyromonas gingivalis* infection through regulation of interferon-gamma production. Oral Microbiol Immunol, 20 : 259-266, 2005.
- 35) Miyachi, K, Ishihara, K, Kimizuka, R, Okuda, K : Arg-gingipain A DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice. J Dent Res, 86 : 446-450, 2007.
-