

## 歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と関連菌の タンパク分解酵素と鉄獲得機構

藤村 節夫

松本歯科大学 口腔細菌学講座

Proteolytic Enzymes and Iron Uptake Mechanism of Periodontopathogen  
*Porphyromonas gingivalis* and Its Related Microorganisms

SETSUO FUJIMURA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental University School of Dentistry

### Summary

*Porphyromonas gingivalis*, an oral indigenous bacterial species has been implicated in the pathogenesis of adult human periodontitis. This microorganism lacks, however, siderophore system which serves the purpose of iron uptake function in bacteria. Therefore, an alternative mechanism responsible for iron uptake system must be found in *P. gingivalis*. In this review, the present knowledge of acquisition of iron source and possible role of endogenous proteolytic enzymes in the iron uptake system in periodontopathogens including *P. gingivalis* and its related species.

### はじめに

歯周炎は歯肉炎と異なり歯の支持組織にまで炎症が広がったもので、歯槽骨の吸収に至れば歯を喪失することになる。ヒト（成人性）歯周炎の原因菌として *Porphyromonas gingivalis*（旧名 *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides gingivalis*）をはじめ、*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, など血液平板で培養すると黒色集落を形成する偏性嫌気性グラム陰性桿菌が挙げられている<sup>25,34,40,47</sup>。

細菌は発育上鉄が必須であることは当然であるが、宿主生体内の遊離鉄濃度は極端に低く  $10^{-18}$ M 程度しかないといわれる<sup>11,24</sup>。この濃度は細菌の

必要とする濃度の  $10^{-11}$ ~ $10^{-10}$ に過ぎず、これでは細菌は宿主内で発育することはできない<sup>33</sup>。したがって病原細菌には鉄キレート機能を持つシデロフォアが備わっており、トランスフェリン (Tf) やラクトフェリン (Lf) などの鉄運搬タンパク質に結合した鉄原子をキレートしている。しかし上記の歯周病原菌にはシデロフォアが備わっていない<sup>8,9</sup>ので、別の手段で鉄を獲得している筈である。現在のところ歯周病原菌は鉄源としてヘムを利用するものと、Tf と Lf（いずれもホロ型）をタンパク分解系を通して利用するものが報告されている。本稿ではそれらに関連した文献について紹介する。

### 1. タンパク分解酵素（プロテアーゼ）とペプチダーゼについて

この20年来 *P. gingivalis*（以下ジンジバリス菌と表記）のプロテアーゼについては多くの内外の研究者によって調べられてきており多数のレポートが発表されている。ここではそのうち古典的なものと鉄獲得機構に関連したものについて紹介し、最近出始めたプロテアーゼ関連酵素であるペプチダーゼの知見を付記する。

いささか手前味噌的になるがこの分野での端的な報告は Fujimura と Nakamura によって1981年に発表されている<sup>17)</sup>。ジンジバリス菌がまだ *Bacteroides melaninogenicus* と呼ばれていた頃で、われわれもプロテアーゼは始めて扱うので、発色合成基質のような便利なものがあるとも知らず、わざわざカゼインを用いて面倒な手法でタンパク分解活性を測定している。骨子は菌体の粗抽出液をクロマトグラフィーで分別すると二峰性の活性を呈しそれぞれの分子量が420 kDa と73 kDa でこの二酵素の熱安定性、カゼインに対するミカエリス-メンテン定数 ( $K_m$ )、各種の群特異薬剤の影響などを比較している。この程度の稚拙なものでも当時では *Infection and Immunity*（米国細菌学会誌の一つ）に掲載されたのである。その3年後 Yoshimura ら<sup>48)</sup>は膜結合性のプロテアーゼを可溶化、精製している。この酵素はトリプシンの活性測定に使われる benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) をよく加水分解するので「トリプシン様酵素」の常用名が与えられ、SH 保護剤（還元剤）による活性上昇、ロイペプチン、アンチパイン、キモスタチン、金属キレーターによる阻害を始めあらかじめ基礎的性状が記載され、この論文が以後のジンジバリス菌プロテアーゼ研究の方向性を決めたとあって過言ではない。

その後の研究の進展によりジンジバリス菌プロテアーゼの主要なものにアルギニン残基のC末端側を切断するアルギニンジンジパイン (arginine gingipain, RGP) とリジン残基のC末端側を分解するリジンジンジパイン (lysine gingipain, KGP) が知られるようになった。RGP は分子量43 kDa で合成基質のみならずタンパク分解能も陽性である（プロテアーゼの合成基質は分

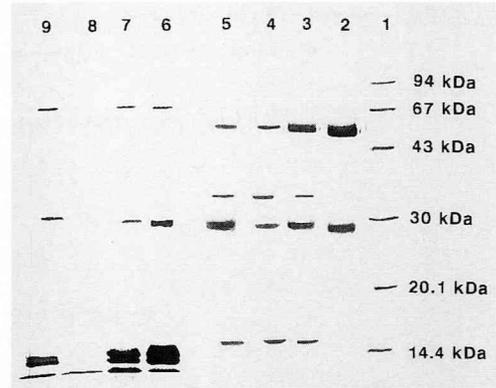


図1：RGPとKGPによるタンパク質の分解（SDS-PAGE）

- 1：分子量マーカー
- 2：対照 IgG
- 3：RGP-A で処理した IgG
- 4：RGP-B で処理した IgG
- 5：KGP で処理した IgG
- 6：対照ヘモグロビン
- 7：RGP-A で処理したヘモグロビン
- 8：RGP-B で処理したヘモグロビン
- 9：KGP で処理したヘモグロビン

解するが天然のタンパクは分解できない酵素も存在する）。筆者らの知見ではエンベロープ結合性のRGPを精製していくと2種の存在が明らかで（RGP-AとRGP-B）、両者の間には目立った酵素学的差異は認められないが、ヘモグロビンを分解させるとRGP-Bはほぼ完全に分解してしまうがRGP-Aには分解能がなかった（図1）<sup>21)</sup>。しかし Lewis らによればヘモグロビン分解能はRGPにもKGPにも認められ、KGPの方が分解はより活発である<sup>36)</sup>という。この矛盾用いた菌株、精製手段や他の手法の違いに起因するのも知れないが、両者の扱ったそれぞれのRGP、KGPそのものに酵素学的差異がある可能性も否定できない。

このところプロテアーゼの研究動向もその遺伝子解析へと移るとともに「鋼鉄的転回」のそしりも免れないが、タンパク質よりも小分子のペプチドを基質とするペプチダーゼに興味を持つ研究者が出てきている。現在のところジペプチジルペプチダーゼ (DPP) とトリペプチジルペプチダーゼ (TPP) がペプチダーゼ研究の対象となっている。ジンジバリス菌のようにブドウ糖をはじめ種々の糖をエネルギー源として利用できない細菌

にとっては、プロテアーゼで分解されたオリゴペプチド断片をペプチダーゼでさらにジペプチドもしくはトリペプチドにまで分解し、細胞内でエネルギー源とさせる重要な機能がある(ジンジバリス菌ではオリゴペプチドは細胞膜を通過できない)という意味でも無視できない酵素であろう。DPPではAla-Ala-Xaa, Ala-Phe-Xaa, Gly-Phe-Xaaを分解するDPP-7はセリン酵素で分子量は76 kDaで、C末端側アミノ酸配列は黄色ブドウ球菌のV8エンドペプチダーゼに類似している<sup>5)</sup>。Lys-Ala-Xaa, Ala-Ala-Xaa, Val-Ala-XaaなどC末端側から2番目の位置にアラニンをもつジペプチドを分解するDPPは分子量が64 kDa, pI 5.7のセリン酵素である。これらの3ペプチドに対する酵素活性の比( $V_{max}/K_m$ )はそれぞれ34.95, 5.86, 6.41であった。本酵素の基質特異性は極めて限定的で上記の3つのペプチド基質以外の加水分解は見られなかった<sup>23)</sup>。Ala-Phe-Pro-Xaaのようなプロリントリペプチドを分解するTPPがジンジバリス菌<sup>6)</sup>で、*P. nigrescence* (Fujimura 未発表)で分離されており今後ペプチダーゼによるプロテアーゼの補助的ではあろうが有意な酵素の機能が明らかにされる可能性も高い。

## 2. ヘムタンパク質の利用

生体内での鉄源として最も単純にはヘモグロビン(Hb)のポルフィリン環の鉄原子の利用が考

えられる。このことはジンジバリス菌などを培養するとき鉄源を加えないと発育しないが(通常ヘミンすなわちプロトポルフィリンIX (PPIX)と鉄の化合物を5  $\mu\text{g/ml}$ ほどの濃度で加える)、Hbを添加することで増殖が見られることから可能性もある。菌周疾患病巣部は易出血傾向にあり、日常生活上の物理的刺激によって出血が起こり易いので菌周病原菌へのHbの供給は期待できる。しかしHbから鉄原子を取り出すには、溶血、タンパク部分の分解という段階を踏む必要がある。溶血に関してはすでにジンジバリス菌のヘモジン産生能が報告されており<sup>12,27)</sup>、菌体近傍での溶血を通してのHbの供給は可能である。問題はHbをそのまま菌体内に取り込むことは考えにくく、その前に分解される必要があると思われる。しかもそれは菌体近傍というよりは菌体表層部(エンベロープ)で行われなければならない。そのための第一段階としてHbをエンベロープに固定する機構があろうと仮定し、エンベロープとHbの結合の有無を調べてみると、たしかに菌体そのものとも、また超音波破碎と100,000 G遠心で調製したエンベロープとも結合は起こることが確認できた。この結合は低温(4℃)では起こらず、70℃、15分加熱したエンベロープでも起こらない。塩化ナトリウムを0.15 M~0.5 Mに加えても阻害は見られないので結合は静電的なものではない。定量的実験から1 mgのエンベロープは最大58  $\mu\text{g}$ のHbと結合でき、エンベロープとHb

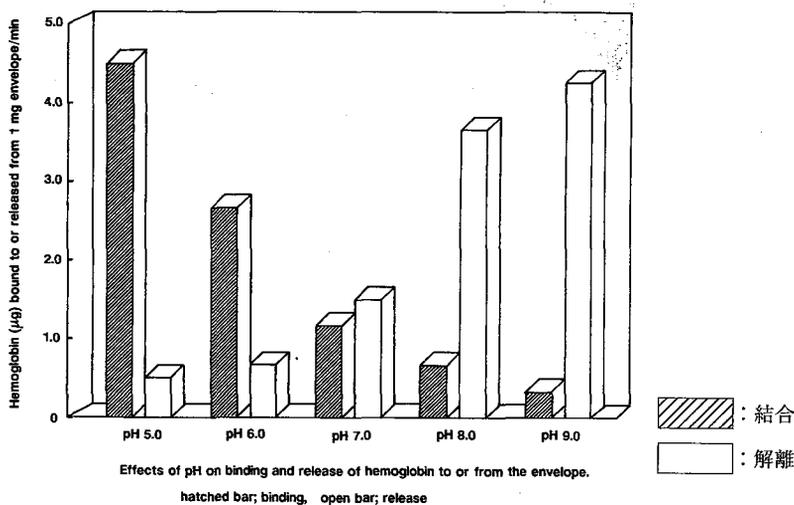


図2 : *P. gingivalis* ATCC 33277とヘモグロビンの結合と解離

の結合における解離定数は $1.7 \times 10^{-10} \text{M}$ であった<sup>19)</sup>。また Amano らによればこの結合は可逆的で、ヘミン、Hb 以外のヘムタンパク質、鉄運搬タンパク質、ヘミンおよびプロトポルフィリンなどで大きな阻害を受けないのでリガンドと Hb の結合部位はヘム部分ではないと考えられ、菌体と Hb の結合の解離定数は $1.0 \pm 0.9 \times 10^{-6} \text{M}$ であった<sup>4)</sup>。結合には pH の影響が強く、酸性側でよく結合し中性以上ではほとんど結合しない。またエンベロープと結合した Hb はアルカリ緩衝液中で解離する (図 2)。本結合はエンベロープ中のタンパク質すなわち Hb 結合タンパク質 (HbBP) に担われており、その分離精製と結合様式が明らかにされた<sup>20)</sup>。それによると HbBP はデタージェント (CHAPS) によりエンベロープから可溶化され、イオン交換クロマトグラフィー、Hb アガーロースを担体とするアフィニティクロマトグラフィー (pH 5.5 で吸着し、pH 9.0 で解離させる)、等電点電気泳動で精製され、分子量は 19 kDa で等電点は 4.3 であった。精製 HbBP はドットプロット法で Hb と結合することが証明された。この HbBP は鉄源となる Hb を菌体表層に固定させる役割がありその意義は大きい、菌体に結合した Hb は次に断片に分解される必要がある。前述のようにジンジバリス菌はタンパク分解能が強いが、ここで問題にしたいのは、RGP、KGP のロケーションで、エンベロープにも存在しているかどうかである。報告者によって分布量の多少に違いはあるが、両プロテアーゼともにエンベロープ画分に菌体外、細胞質内と共に有意量存在している<sup>18, 43)</sup>。また RGP と KGP には Hb に対する分解能がある<sup>21, 36)</sup>ことも示されているので Hb の菌体表層での分解は期待できる。しかし断片化された Hb のうちのどのペプチドが本当に鉄源となっているのかは未解決である。

HbBP の遺伝子解析もなされ次のような考察がされている。ジンジバリス菌の染色体上には RGP をコードする遺伝子 *rgpA*, *rgpB* と KGP をコードする *kgp* が存在する。*rgpA* 遺伝子は N 末端のプロペプチド、プロテアーゼドメインと C 末端アドヘジン領域からなっている。アドヘジンはさらに HGP (highmolecular-mass gingipain complex) 44, HGP 15, HGP 17, HGP 27 の各ドメインから構成されている。*rgpB* には C 末端ア

ドヘジンの大部分が認められない。*kgp* は *rgpA* とよく似た構造をしており、特に C 末端アドヘジン部分は共通である。HbBP の N 末端域の 18 個のアミノ酸配列は 4 例の RGP<sup>7, 16, 31, 42)</sup>、2 例の KGP<sup>7, 39)</sup> および 1 例の血球凝集素<sup>26)</sup> の HGP 15 によってコードされるタンパクのそれと同一で、1 例の RGP<sup>1)</sup> とは一ヶ所異なるだけである。このことから、このタンパク質は *rgpA*, *kgp*, *hagA* (血球凝集素遺伝子) の内部領域の HGP 15 によってコードされていると考えられる<sup>38)</sup>。

これとは別の株から精製したジンジバリス菌の Hb 結合タンパク質は分子量が KGP と同じ 51 kDa で、かつ両タンパクの N 末端側の 23 アミノ酸配列は同一であったことから、Hb 結合タンパク質の実体は KGP であり、Hb との結合は KGP 分子内のプロテアーゼ活性サイトとは別のドメインによって成立しているという見解もある<sup>32)</sup>。

ジンジバリス菌以外の歯周病原菌では、*P. in-*

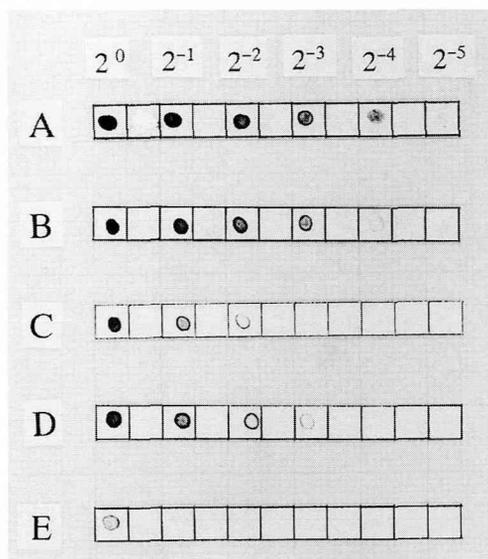


図 3 : HbBP とヘムタンパク質と鉄運搬タンパク質の結合

倍数希釈した HbBP サンプルをスポットしたニトロセルロース膜をスキムミルクでブロックし、各タンパク質とカップリングしたパーオキシダーゼと反応後過酸化水素水を加え 4-メトキシ-1-ナフトールで発色させた。

- A : ヘモグロビン      B : ミオグロビン  
C : チトクローム c    D : カタラーゼ  
E : ホロトランスフェリン

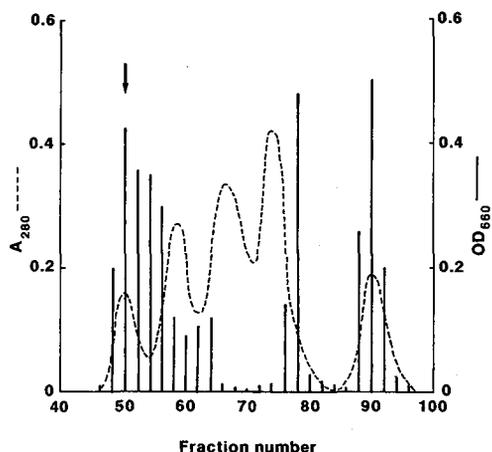


図4: *P. gingivalis* ATCC 33277のエンベローププロテアーゼで処理したミオグロビンのセファクリルS-300でのゲル濾過  
矢印は未処理ミオグロビンの溶出位置。ヒストグラムは各フラクションの*P. gingivalis* ATCC 33277の発育促進の度合いを示す。

*termedia* でHbとの結合能および鉄源としての利用が観察されている<sup>35)</sup>。Liuらは*P. intermedia*の膜画分のCHAPS抽出物のアフィニティークロマトグラフィーでHbBPを分離しその分子量をウェスタンブロット法で約100 kDaと算定している。ジンジバリス菌の場合と同様結合は低pHで強く高pHで弱い<sup>37)</sup>。

HbBPはHb以外のヘムタンパク質とも結合し特にミオグロビン(Mb)とはHbの50%程結合できる(図3)。Hbは $\alpha$ サブユニット2個と $\beta$ サブユニット2個からなっている( $2\alpha 2\beta$ )が、MbはHbのサブユニット1本だけでできている。したがって構造の複雑なHbよりもより単純なMbを用いた方が今後の実験で種々有利な点多かろうと思われる。そこでMbをジンジバリス菌のエンベロープ由来のプロテアーゼ(エンベロープをCHAPSで可溶化した粗抽出標品)で処理し、分解産物をゲル濾過し各フラクションの一定量を鉄欠乏培地に無菌的に加えジンジバリス菌の発育をサポートする画分があるかどうかを調べた。結果は(図4)に示すように増殖サポート活性域は3つあり、1つは未分解でインタクトあるいはそれに近いMbの部分にある。最後出のピークはかなり小分子のペプチド域と考えられる。この部分の物質の同定はこれからの課題であ

るが、プロテアーゼは鉄獲得に少なくともMbを鉄源するとき実質的な役割をしていることが示唆されている<sup>29)</sup>。

### 3. ヘミンの利用

ジンジバリス菌の培養に際しては鉄源として普通にはヘミンを加える。PPIXとFe(III)の混合物を加えても発育できるが、PPIX、Fe(II)、Fe(III)を単独で加えても発育はできない。ヘミンの代わりにHbやMbを加えても有効であることはすでに述べたが、与えられたヘムタンパク質は菌によって分解されヘムを誘導するものと思われる。ただしヘム分子内の鉄はFe(II)であるが、タンパク部分を切り離されると酸化防止効果がなくなるのでヘミンの鉄同様Fe(III)に変わる。ヘミンを与えるということはヘムタンパク質からヘムの取り出し過程を飛ばして直接鉄源物質を利用させることに他ならない。歯肉溝液中のヘミンの濃度がそれほど高いとは考えにくい。はたして宿主生体内にジンジバリス菌に必要な量のヘミンが存在するのかという基本的な問題は未解決のようである。

ヘミン利用に関しても最初の段階として結合が必要と考えられ、ヘミン結合タンパク質は菌体表面層部に認められ分子サイズは30 kDa~32 kDaで、菌体による鉄取り込みの前段階としてヘムからの鉄キレート過程があると推測されている<sup>13,30,45)</sup>。しかしこのタンパク質が分離精製されたわけでもないので結合様式などのデータは得られていない。ヘミン利用についてのレポートは多い割には詳しいことは分かっていない。

### 4. トランスフェリン(Tf)の利用

Tfは鉄の吸着、運搬上重要な役割をする血漿中の分子量約76 kDaのタンパク質で、1分子に2つのFe(III)が結合する。このTfを5  $\mu$ Mに加えた培地とヘミンを7.7  $\mu$ M (5  $\mu$ g/mlに相当)に加えた培地での3株のジンジバリス菌の増殖を比較するとTf加培地ではヘミン加培地の約50%~70%の増殖が認められ、Tfを10  $\mu$ Mにすればヘミン7.7  $\mu$ M加培地での増殖と同じレベルに達するので、Tfが鉄源として利用されることが証明された。このTfの効果は鉄キレート剤のジピリジルによって失われる<sup>29)</sup>。Tfからの鉄獲得機構

の可能性の一つとしてやはり菌のタンパク分解系によって Tf の鉄結合サイトが破壊され遊離した鉄原子が利用されるという過程が考えられる。菌体と Tf との結合の解離定数は  $1.37 \pm 0.16 \mu\text{M}$  で細胞あたり  $1.13 \pm 0.26 \times 10^5$  個の Tf レセプターがあり、菌体を  $80^\circ\text{C}$  で 1 時間あるいはプロテイナーゼ K で処理すると結合能が失われる<sup>46)</sup>。Tf を唯一の鉄源としたときその分解と増殖に対するプロテアーゼの役割を変異株を用いて調べた詳細な論文が出ている。まずジンジバリス菌にはドットプロット法で調べると Tf との結合能はない。RGP, KGP いずれかの欠損株と RGP, KGP 両方の欠損株を用いての実験から、Tf の分解には KGP の方が RGP より重要な働きがあることが分かった。また Tf 存在下で KGP 欠損株は増殖できず RGP 欠損株は発育可能である。しかしその世代時間は野生型より長く、最終的な発育も野生型の約半分しかない ( $660 \text{ nm}$  での OD で測定) ので RGP も Tf からの鉄獲得機構に関与しているらしいことが分かる。(表 1) このことは培地に TLCK (RGP, KGP 両方の阻害剤)、ロイペプチン (RGP の阻害剤)、カテプシン B インヒビター (RGP の阻害剤) を培地に加えて培養するといずれの阻害剤使用のものでも増殖は認められないことから裏付けられる<sup>49)</sup>。

ジンジバリス菌と近縁の *P. nigrescens* でも Tf を単独の鉄源として利用することができる。その結合は加熱あるいはプロテアーゼ処理によって失われる。Tf 結合タンパク質も分離されていて分子量は  $37 \text{ kDa}$  であるという。精製には Tf アガロースでのアフィニティクロマトグラフィーを行うが、この場合は HbBP とは逆にアルカリ (pH 8.0) で吸着させ酸性緩衝液 (pH 3.2) で溶出さ

せるのが興味深い<sup>41)</sup>。この論文の著者たちも述べているように、Tf を鉄源とするにはその分解過程が必要であろうが、*P. nigrescens* には少なくとも RGP, KGP といったプロテアーゼはないので、未知の酵素の存在が有力で新しい課題が提起されている。

## 5. ラクトフェリン (Lf) の利用

Lf も鉄結合タンパクで唾液や母乳中に存在し、ジンジバリス菌、*P. intermedia*, *P. nigrescens* によって分解されることが分かっている<sup>2,14,15,20)</sup>。とくに *P. intermedia* と *P. nigrescens* の Lf の結合はヘミンによって阻害されるが、*P. gingivalis* では促進される<sup>2)</sup>。最近のレポートでジンジバリス菌の培養で Hb を単独の鉄源とし、Lf を加えると発育が阻害される (ジンジバリス菌は Lf を鉄源として利用することはできない) という観察から非常に示唆に富む報告が出された。ジンジバリス菌の Lf のレセプターは HbBP であり、その結合は Hb と HbBP の場合と異なり pH 依存性がない。HbBP との親和性は Lf の方が HbBP より強く HbBP-Hb 結合体に Lf を導入すると Hb は遊離する。この遊離はジンジバリス菌のシステインプロテアーゼ (RGP, KGP) インヒビターによって阻害される。さらに Lf は Hb を単独の鉄源とした培地でのジンジバリス菌の発育を抑制し静菌作用がある。この作用は Lf 分子内の 25 アミノ酸からなるラクトフェリン B によっても起こすことができるが、そのメカニズムは次のように説明されている。HbBP の N 末端側の 27 アミノ酸組成を見るとアスパラギン酸残基とグルタミン酸残基で 8 つ含まれ、塩基性アミノ酸はヒスチジンが 1 つのみ、残りは中性アミノ

表 1 : *P. gingivalis* 変異株のトランスフェリン分解と利用

<i>P. gingivalis</i> 変異株	トランスフェリン分解能	増殖*		
		無添加	ヘミン (1 $\mu\text{g/ml}$ )	トランスフェリン (1 $\text{mg/ml}$ )
野生株 (RGP <sup>+</sup> , KGP <sup>+</sup> )	+	-	+	-
KDP 112 (RGP <sup>-</sup> , KGP <sup>+</sup> )	+	-	+	+
KDP 129 (RGP <sup>+</sup> , KGP <sup>-</sup> )	±	-	+	-
KDP 128 (RGP <sup>-</sup> , KGP <sup>-</sup> )	+	-	+	-

\*メナジオン (1  $\mu\text{g/ml}$ ) を加えたマイコプラズマ用培地にヘミンまたはトランスフェリンを加えたときの増殖の有無

酸となっており、電氣的にマイナスにチャージしている。この部分がLfのプラスにチャージした部位と電氣的に結合し、HbBPとエンベロープとの非コバレント結合を緩め細胞表層から遊離させるといものである。したがってHbBPを失った菌はHbを単独の鉄源として与えられたときLf存在下では発育できない<sup>40)</sup>。

歯周病には成人性と若年性のものがあり、前者の主要病原菌はジンジバリス菌と考えられ後者は通性嫌気性グラム陰性桿菌である*Actinobacillus actinomycescomitans*といわれる。本菌においてもLfと酸性側では結合するが、中性以上ではほとんどしないというpH依存性の結合についての報告がある。その結合は塩化ナトリウムによる阻害がほとんどなく、4M尿素で約50%の阻害があるので疎水結合の傾向もある。カオトロピック試薬(チオシアニルカリウム)で強い阻害が見られる。外膜にLf結合タンパク質があつてウェスタンブロットで分子量を調べると、29 kDaと16.5 kDaであるという<sup>3)</sup>。

#### おわりに

以上歯周病原菌、特にジンジバリス菌のタンパク分解酵素、ペプチダーゼおよび鉄獲得機構についてのトピックを紹介した。これらのトピックはそれぞれ独立して研究が進んで来たのであつて、むしろ相互に関連し合つて来たわけではない。しかし歯周病原菌が鉄を獲得するためにはタンパク分解系が働かなければ不可能であろうことはまず間違いない。したがってこれらの間の接点を探りつつ解明のための実験をすすめることは両者の研究の進展にも役立つであろう。ほとんどの人は歯周病を避けて通れない中、その予防と治療にこれらの知見がヒントになることも考えられるので今後ともこの分野の研究の進展が望まれる。

“The great questions of the time are not decided by speeches and majority decisions....., but by iron and blood.”

(O. von Bismarck, 1862)

#### 文 献

- 1) Aduse-Opoku J, Muir J, Slaney J M, Rangarajan M and Curtis M A (1995) Characterization, genetic analysis, and expression of a protease

- antigen (PrpR I) of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **63** : 4744-54.
- 2) Aguilera O, Andres M T, Heath J, Fierro J F and Douglas C W I (1998) Evaluation of the antimicrobial effect of lactoferrin on *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21** : 29-36.
- 3) Alugupalli KR, Kalfas S, Edwardsson S and Naidu A S (1995) Lactoferrin interaction with *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Oral Microbiol Immunol* **10** : 35-41.
- 4) Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K., Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H and Shizukuishi S (1995) Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **134** : 63-7.
- 5) Banbula A, Yen J, Oleksy A, Mak P, Bugno M, Travis J and Potempa J (2001) *Porphyromonas gingivalis* DPP-7 represents a novel type of dipeptidyl peptidase. *J Biol Chem* **276** : 6299-305.
- 6) Banbula A, Yen J, Oleksy A, Silberrings J, Dubin A, Nelson D, Travis J and Potempa J (1999) Prolyl tripeptidyl peptidase from *Porphyromonas gingivalis*. A novel enzyme with possible pathological implication for the development of periodontitis. *J Biol Chem* **274** : 9246-52.
- 7) Barkocy-Gallagher G A, Han N, Patti J M, Whitlock J, Progulsk-Fox A and Lantz M S (1996) Analysis of the *prtP* gene encoding porphyrin, a cysteine proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **178** : 2734-41.
- 8) Bramanti T E and Holt, S C (1990) Iron-regulated outer membrane proteins in the periodontopathic bacterium, *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Comm* **166** : 1146-54.
- 9) Bramanti T E and Holt S C (1991) Roles of porphyrins and host transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W 50. *J Bacteriol* **173** : 7330-9.
- 10) Bronchu V, Grenier D, Nakayama K and Mayrand D (2001) Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis* : a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral Microbiol Immunol* **16** : 79-87
- 11) Bullen J J (1978) The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* **3** : 1127-38.
- 12) Chu L, Bramanti T E, Ebersole J L, Holt S C (1991) Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* : kinetics of

- enzyme release and localization. *Infect Immun* **59** : 1932-40.
- 13) Dashper S G, Hendtlass S, Slakesk N, Jackson C and Reynolds E C (2000) Characterization of a novel outer membrane hemin-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **182** : 6456-62.
  - 14) De Lillo A, Teanpaisan R, Fierro J F and Douglas C W I (1996) Binding and degradation of lactoferrin by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prrevotella nigrescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14** : 135-43.
  - 15) De Lillo A and Fierro F F (1997) Identification of a lactoferrin-binding protein in *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett* **150** : 61-4.
  - 16) Fletcher H M, Schenkein H A and Macrina, F L (1994) Cloning and characterization of a new protease gene (*prtH*) from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **62** : 4279-86.
  - 17) Fujimura S and Nakamura T (1981) Isolation and characterization of proteases from *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect Immun* **33** : 738-42.
  - 18) Fujimura S and Nakamura T (1989) Multiple forms of proteases of *Bacteroides gingivalis* and their cellular location. *Oral Microbiol Immunol* **4** : 227-9.
  - 19) Fujimura S, Shibata Y, Hirai K and Nakamura T (1995) Some binding properties of the envelope of *Porphyromonas gingivalis* to hemoglobin. *FEMS Immunol Med Microbiol* **10** : 109-14.
  - 20) Fujimura S, Shibata Y, Hirai K and Nakamura T (1996) Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect Immun* **64** : 2339-42.
  - 21) Fujimura S, Shibata Y, Hirai K, and Nakamura T (1998) Comparative properties of envelope-associated arginine-gingipain and lysine-gingipain of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **163** : 173-9.
  - 22) Fujimura S, and Nakamura T (2000) Binding and utilization of myoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **184** : 247-51.
  - 23) Fujimura S, Hirai K, and Shibata Y (2002) Dipeptidyl peptidase with strict substrate specificity of an anaerobic periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **209** : 127-31
  - 24) Griffiths E. (1987) Iron and infection: molecular, physiological and clinical aspects, 69-139, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
  - 25) Haffajee A D and Socransky, S S (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 **5** : 78-111.
  - 26) Han N, Whitlock J and Progulske-Fox A (1998) The haemagglutinin gene (*hagA*) of *Porphyromonas gingivalis* 381 contains four large, contiguous, direct repeats. *Infect Immun* **64** : 4000-7.
  - 27) Hoshi M, Kato I, Goto N and Hasegawa K (1993) Hemolytic toxin produced by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **114** : 273-8.
  - 28) Inoshita E, Iwakura K, Amano A and Tamagawa H (1991) Effect of transferrin on the growth of *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* **70** : 1258-61.
  - 29) Kalfas S, Andersson M, Forsgren A and Naidu A S (1991) Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. *Oral Microbiol Immunol* **6** : 350-5.
  - 30) Kim S-J, Chu L and Holt S C (1996) Isolation and characterization of a hemin-binding cell envelope protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis* **21** : 65-70.
  - 31) Kirszbaun L, Sotiropoulos C, Jackson C, Cleal S, Slakeski N and Reynolds E C (1995) Complete nucleotide sequence of a gene *prtR* of *Porphyromonas gingivalis* W50 encoding a 132 kDa protein that contains an arginine-specific thiol endopeptidase domain and haemagglutinin domain. *Biochem. Biophys Res. Com* **207** : 424-31.
  - 32) Kuboniwa M, Amano A and Shizukuishi, S (1998) Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain). *Biochem Biophys Res. Com* **249** : 38-43.
  - 33) Martinez J L, Delgado-Iribarren A and Baquero F (1990) Mechanism of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev* **75** : 45-56.
  - 34) Mayrand D and Holt, S C (1988) Biology of as-sacharolytic black pigmented *Bacteroides species*. *Microbiol Rev* **52** : 134-52.
  - 35) Leung K-P, Subramaniam P S, Okamoto M, Fukushima H. and Lai, C-H (1998) The binding and utilization of hemoglobin by *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol Lett* **162** : 227-33.

- 36) Lewis J P, Dawson J A, Hannis J C, Muddiman D and Macrina F L (1999) : Hemoglobilinase activity of lysine gingipain protease (kgp) of *Porphyromonas gingivalis* W83. *J Bacteriol* **181** : 4905-13.
- 37) Liu J C, Cox C and Drake D (2000) Isolation of a hemoglobin-binding protein from *Prevotella intermedia*. *J Dent Res* **79** : (IADR abstracts) 393.
- 38) Nakayama K, Ratnayake D B, Tsukuba T, Kadowaki T, Yamamoto K and Fujimura S (1998) Haemoglobin receptor protein is intragenetically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Microbiol* **27** : 51-61.
- 39) Okamoto K, Kadowaki T, Nakayama K and Yamamoto K (1996) Cloning and sequence of the gene encoding a novel lysine-specific cysteine proteinase (lys-gingipain) in *Porphyromonas gingivalis*: structural relationship with the arginine-specific cysteine-proteinase (Arg-gingipain). *J Biochem* **120** : 398-406.
- 40) Paquet C and Mouton C (1997) RAPID finger printing for the distinction of *Prevotella intermedia* sensu stricto from *Prevotella nigrescens*. *Anaerobe* **3** : 271-8.
- 41) Pascale, D, Grenier D and Mayrand D (1999) Binding and utilization of human transferrin by *Prevotella nigrescens*. *Infect Immun* **67** : 576-80.
- 42) Pavloff N, Potempa J, Pike R N, Prochazka V, Kiefer M C, Travis J and Barr P J (1995) Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* **270** : 1007-10.
- 43) Potempa J, Pike R and Travis J (1995) The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* **63** : 1176-82.
- 44) Shi Y, Kong W and Nakayama, K (2000) Human lactoferrin binds and remove the hemoglobin receptor protein of the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* **275** : 30002-4.
- 45) Smalley J W, Birss A J, McKee A S and Marsh P D (1993) Haemin-binding proteins of *Porphyromonas gingivalis* W50 growing in a chemostat under haemin-limitation. *Microbiology* **139** : 2145-50.
- 46) Tazaki K, Inoshita E, Amano A, Hanioka T, Tamagawa H and Shizukuishi S (1995) Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with transferrin. *FEMS Microbiol Lett* **131** : 161-7.
- 47) Van Winkelhoff A J, Van Steenberghe J M, De Graaft J (1988) The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol* **15** : 145-55.
- 48) Yoshimura F, Nishikata M, Suzuki T, Hoover C I and Newbrun E (1984) Characterization of a trypsin-like protease from the bacterium *Bacteroides gingivalis* isolated from human dental plaque. *Arch Oral Biol* **29** : 559-64.