

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05057

研究課題名(和文) 特定遺伝子を標的とするRNA誘導型ヌクレアーゼ輸送システムによる口腔細菌叢の制御

研究課題名(英文) Development of a novel method to prevent an ecological shift in oral polymicrobial biofilms by using bacteriophage therapy.

研究代表者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA, Masae)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00303983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては*S. gordonii*をモデル菌種として採用し、同菌と仲介菌*F. nucleatum*の代謝を介した相互作用に重要な役割を果たすアルギニン/オルニチントランスポーターであるArcD、さらに同菌と歯周病菌*P. gingivalis*との相互作用に重要な役割を果たすパラアミノ安息香酸(pABA)の産生酵素であるCbeを標的分子とし、多菌種よりなる口腔バイオフィルムモデル中で標的遺伝子を確実にノックアウトする技術を確立することを目指した。バクテリオファージを用いた口腔細菌叢制御には課題が残ったが、口腔細菌叢がディスバイオーシスに至るメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dysbiosis is a term for a microbial imbalance or maladaptation on or inside the body, such as an impaired microbiota. Recent studies have provided insights into the emergence and persistence of dysbiotic oral microbial communities, which result in periodontitis. In this model, periodontal disease results not from individual pathogens but rather from polymicrobial synergy and dysbiosis, which perturbs the ecologically balanced biofilm associated with periodontal tissue homeostasis.

When periodontitis becomes advanced, dysbiotic oral microflora excretes increased amounts of specific metabolites. The aims of this study were to identify the key metabolites which promote dysbiosis in subgingival region, and to develop an effective method to prevent the ecological shift resulted in dysbiosis by using bacteriophage therapy.

Although the novel method still has several unsolved matters, we showed an example of mechanisms of oral dysbiosis by using in vitro polymicrobial biofilm model.

研究分野：予防歯科学

キーワード：バイオフィルム ディスバイオーシス Porphyromonas gingivitis Streptococcus gordonii Fusobacterium nucleatum メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、細菌叢を対象としたメタゲノム研究の進展により、細菌叢構成細菌間での代謝パスウェイの補完関係が注目を集めている。我々の研究室では、直接的にこの相互関係を観察し得るメタボローム解析の手法をいち早く取り入れて精力的に研究を推進している。特に、口腔常在菌 *Streptococcus gordonii* で構成される *in vitro* バイオフィームが、口腔細菌叢のエコロジカルシフトに重要な役割を果たす仲介菌である *Fusobacterium nucleatum* や、歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* などをバイオフィーム中に取り込み、細菌叢全体としての病原性を高めていく過程において、どのような代謝物質がその相互作用の鍵となる物質なのかを同定すること、また、その物質を標的として歯周病原性バイオフィームを制御する新たな歯周病予防法を確立することを最終目標としている。さらに、平行して臨床メタボローム研究を推進することにより、歯周病の重症度が進むにつれて唾液中での濃度が上昇するプラーク由来の代謝物質の手がかりを得ようとしている。

これらの一連の *in vitro* 研究、臨床研究の成果より、正常細菌叢から歯周病原性細菌叢へのエコロジカルシフトに関わる重要な代謝物質が浮かび上がってきたことから、初期付着菌におけるそれらの代謝物質の菌体外輸送を特異的に抑制することで、健全な細菌叢を維持しつつ病原性菌の繁殖を抑制することを試みる、という着想を得た。

エコロジカルシフトが始まる最初の段階でのイベントである、菌体表層構造タンパク質を介した初期付着菌-歯周病原性菌間の共凝集の阻害を目的とするペプチドの開発は我々の研究室でこれまでに成果を挙げてきているが、少数の病原性菌であってもいったん正常細菌叢への定着を許してしまうと、異なる結合様式と増殖とによってその抑制効果が経時的に相殺されてしまうという問題点がある。共凝集阻害に加えて、代謝物質をターゲットとする細菌叢制

御法を用いることにより、歯周病原性細菌叢へのエコロジカルシフトに関与する細菌種の正常細菌叢への定着・増殖を持続的に抑制する画期的な歯周病予防法が実現可能となると考えられる。

2. 研究の目的

ファージを利用し、ゲノム編集ツールである RGN を高効率で大腸菌バイオフィーム中の標的菌株の細胞質に輸送し、目的の遺伝子のノックアウトに成功した研究が報告されている[Citorik et al.(2014)*Nature Biotechnology*]。しかし、口腔細菌を対象にしてこの系を実施した報告は皆無である。我々が所有している *S. gordonii* DL1 Challis 株は、対数増殖期初期に菌体外 DNA を取り込む能力が高く、また、テンプレートファージ PH15 に感染するとの報告がある。そこで、本研究においては *S. gordonii* をモデル菌種として採用し、同菌と仲介菌 *F. nucleatum* の代謝を介した相互作用に重要な役割を果たすアルギニン/オルニチントランスポーターである ArcD、さらに同菌と歯周病菌 *P. gingivalis* との相互作用に重要な役割を果たす異菌種間シグナル伝達分子 AI-2、パラアミノ安息香酸 (pABA) の産生酵素である LuxS および Cbe (Chorismate binding enzyme) を標的分子とし、多菌種よりなる口腔バイオフィームモデル中で標的遺伝子を確実にノックアウトする技術を確立することを目指した。また、これらの遺伝子ノックアウトが、多菌種よりなる細菌叢全体の代謝プロファイルや病原性に及ぼす影響を検討することとした。

3. 研究の方法

Van der Ploeg の方法 [Van der Ploeg. (2008) *Microbiology* 154:2970-2978] に従い、*S. gordonii* への感染能を有するテンプレートファージの単離を試みたが、不調に終わったため、本研究における主たる目的を以下の2点に絞り、研究を推進することとした。

(1) *S. gordonii* アルギニン/オルニチントランスポーター ArcD の発現抑制が *S. gordonii* - *F. nucleatum* 混合バイオフィーム形成に及ぼす影

響の検討

*S. gordonii*はアルギニンを代謝して最終的にアンモニアとATPを産生するアルギニンデイミナーゼ経路(ADS)を有している。そのため、同菌のアルギニン代謝は、主としてアルカリ産生による腐蝕制御の観点から論じられており、歯周病原性バイオフィーム内での栄養共生についてはあまり知られていない。また、ADSの一部を構成し、アルギニン・オルニチンアンチポーターであるとされるArcDについては、代謝物の輸送に関わることから栄養共生に関与する可能性がある。しかし、これまでに*S. gordonii*のArcDを対象とした研究は行われていない。そこで本研究では*S. gordonii*のArcDに着目し、ArcDの機能解析を行うとともに、歯周病原性バイオフィーム内での栄養共生における役割について検討を加えることとした。

arcD 遺伝子のノックアウトおよびコンプリメンテーションが確認された*S. gordonii*株(以後 $\Delta arcD$ 株および comp *arcD* 株と表記)と仲介菌*F. nucleatum*の混合バイオフィーム形成能を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、*S. gordonii*野生株と比較した。また、*S. gordonii* $\Delta arcD$ 株における代謝プロファイルの変化を、メタボローム解析にて網羅的に調べ、野生株と比較することで、仲介菌*F. nucleatum*との混合バイオフィーム形成に必要なKeyとなる代謝物質を同定した。

(2) *S. gordonii* パラアミノ安息香酸産生酵素 Cbe の発現抑制が *S. gordonii* - *P. gingivalis* 混合バイオフィームの病原性と代謝活性に及ぼす影響の検討

cbe 遺伝子のノックアウトが確認された*S. gordonii* Δcbe 株と*P. gingivalis*の混合バイオフィーム形成能を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、*S. gordonii*野生株と比較した。また、その表現型の変化が*P. gingivalis*菌体のpABA処理によって回復するかどうかを観察した。次に、pABAを作用させた*P. gingivalis*菌体内でどのような代謝変動が生じるのかを、プロテオミクスとメタボロミクスを組み合わせたトランスオミクス解析

により詳細に検討した。また、pABAを作用させた*P. gingivalis*の歯肉上皮細胞への付着能力やマウス口腔感染モデルにおける口腔内定着率、および歯槽骨吸収量を測定した。さらに、*S. gordonii* Δcbe 株と*P. gingivalis*の相互作用によって生じる病原性の変化を、マウスモデルを用いて評価した。

4. 研究成果

(1) *S. gordonii* アルギニン/オルニチントランスポーターArcD の発現抑制が *S. gordonii* - *F. nucleatum* 混合バイオフィーム形成と *S. gordonii* アルギニン代謝経路に及ぼす影響

ヨウ化ヘキシジウムにより*S. gordonii*野生株および $\Delta arcD$ 株を生染色し、FITCにより*F. nucleatum*を生染色した後、混合バイオフィームを形成させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィームの微細形態を観察した。その結果、*S. gordonii* $\Delta arcD$ 株で、*F. nucleatum*との混合バイオフィーム形成能が低下していることが明らかとなった。続いてArcDトランスポーターが*S. gordonii*の代謝調節に果たす役割を評価するために、質量分析装置を用いて野生株・ $\Delta arcD$ 株間での菌体内代謝物プロファイルを比較した。検出された233個の代謝物に基づいてMetabolite set enrichment analysisを実施し、各菌株を特徴づける代謝経路を抽出したところ、 $\Delta arcD$ 株ではオルニチン回路が有意に高値を示すことが分かった。そこでオルニチン近傍の代謝に注目したところ、ADSの最終代謝産物であるアンモニアとATPが $\Delta arcD$ 株で有意に減少していたのに対し、ADSの中間代謝物であるオルニチン・シトルリンは劇的に増加していた(図1)。その一方で、アルギニン生合成経路上の代謝物の多くが、 $\Delta arcD$ 株で有意に減少していた。この代謝変動のメカニズムを探るために、リアルタイム RT-PCRを行い関連する酵素の発現量を調べたところ、 $\Delta arcD$ ではADS上の酵素の発現が軒並み上昇していたのに対し、アルギニン生合成経路上の酵素の発現は低下していた(図1)。以上のことから、ArcDを介したオルニチンの放出がア

ルギニン代謝の恒常性を維持していることが示唆された。

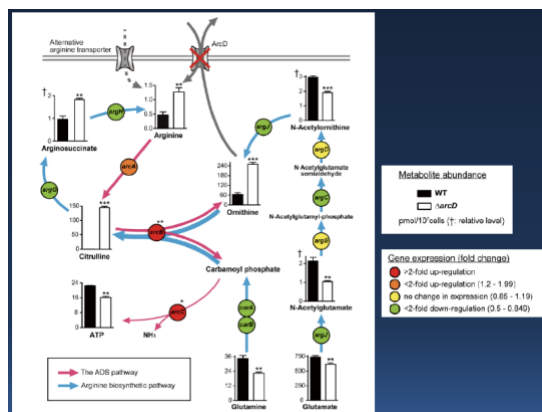


図1. ArcD トランスポーターによる *S. gordonii* 菌体内アルギニン/オルニチン代謝調節

(2) *S. gordonii* パラアミノ安息香酸産生酵素 Cbe の発現抑制が *S. gordonii* - *P. gingivalis* 混合バイオフィルムの病原性と代謝活性に及ぼす影響

① pABA による *S. gordonii*-*P. gingivalis* 混合バイオフィルム形成促進効果

まず始めに、*S. gordonii* Δcbe 株が *P. gingivalis* との混合バイオフィルム形成能を失う現象が、pABA の培地への添加によって回復するかどうかを確認した。ウエルのガラス底面にヨウ化ヘキシジウムで生染色した *S. gordonii* 野生株および Δcbe 株のバイオフィルムをそれぞれ形成させ、培養上清と浮遊細菌を捨てた後、FITC にて生染色した *P. gingivalis* とともに pABA 含有 PBS 中で共培養し、混合バイオフィルムの形成状態を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、*S. gordonii* Δcbe 株と *P. gingivalis* の混合バイオフィルム形成能の回復が確認された。また、*S. gordonii* 野生株においても、pABA の添加による混合バイオフィルム形成能の増強が観察された(図2)。

② pABA 処理によって誘発される *P. gingivalis* 菌体内代謝変動の解析

次に、pABA を作用させた *P. gingivalis* 菌体内でどのような代謝変動が生じるのかを、プロテオミクスとメタボロミクスを組み合わせたトランスオミク

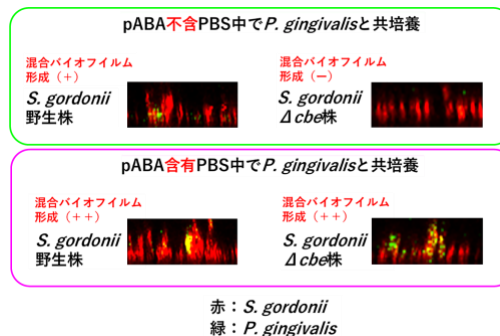


図2. pABA による *S. gordonii*-*P. gingivalis* 混合バイオフィルム形成能の増強
共焦点レーザー顕微鏡を用いて混合バイオフィルム形成状態を観察した $x-y$ 平面像および $x-z$ 平面の拡大像を示す。

ス解析により詳細に検討した。その結果、環境中に pABA が存在する場合、*P. gingivalis* は pABA を菌体内に取り込み、自らの pABA 生合成経路の活性を低下させる一方、THF 合成を加速させ、THF 誘導体合成経路とその周辺メチオニン代謝経路、ヒスチジン分解経路、核酸合成経路に大きな変動をきたすことがわかった。そこで、これらの経路上に位置する酵素群の経時的な遺伝子発現情報も加味して考察したところ、pABA の取り込み開始後初期段階の、THF 誘導体生合成反応が進んでいる時点では、メチオニン代謝経路、ヒスチジン分解経路、核酸合成経路が活性化し、シグナル伝達物質である AI-2 の産生やチミジンを含むピリミジン産生が亢進するが、その後 THF-グルタミン酸サルベージ経路が稼働すると、これらの代謝経路が抑制されるという代謝変動が推察された(図2)。さらに興味深いことに、pABA を作用させた *P. gingivalis* では、トランスケターゼの発現量が抑制されることでビタミン B₆ (Pyridoxal phosphate; PLP) の産生量が低下し、ポリアミン産生酵素群をはじめとするいくつかの PLP 依存性酵素の産生物質が顕著に減少していることが明らかとなった。

③ pABA による *P. gingivalis* の口腔内定着促進作用

線毛は、*P. gingivalis* の口腔内定着に重要な役割を果たす。プロテオーム解析から、pABA は *P. gingivalis* の線毛発現量を増加させる作用を有することが示されたため、まず *S. gordonii* 野生株、

Δcbe 株と *P. gingivalis* との共培養系における線毛遺伝子発現解析を実施した。その結果、*S. gordonii* 野生株との共培養時には *P. gingivalis* の線毛遺伝子発現が亢進する一方、 Δcbe 株との共培養時にはそのような現象は観察されなかった。そこで、pABA を作用させた *P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への付着能力やマウス口腔感染モデルにおける口腔内定着率を確認したところ、pABA を作用させた *P. gingivalis* は歯肉上皮細胞への付着能力を高め、感染後3週目においても口腔内定着数が有意に増加していることが確認された。

④ pABA による *P. gingivalis* の病原性抑制作用

続いて、pABA を作用させた *P. gingivalis* を用いて、マウス口腔感染モデルにおける歯槽骨吸収量を測定した。すると、予想に反して、歯槽骨吸収は pABA を作用させることで抑制されることが明らかとなった。さらに、背部中央への皮下注射によるマウス感染実験において、*S. gordonii* Δcbe 株と *P. gingivalis* を混合感染 (5×10^9 total bacteria) させたマウスでは、*S. gordonii* 野生株と *P. gingivalis* との混合感染や、それぞれの株の単一感染結果と比較して、顕著に高い致死率を示した。また、感染菌量を少量 (2.5×10^9 total bacteria) にしても、同様の結果が得られた。通常、我々が使用した *P. gingivalis* ATCC33277 株は、感染局所に限局的な膿瘍を形成することはあっても宿主を死に至らしめることはないことから、その詳細なメカニズムは不明であるが、pABA 産生機能を喪失した *S. gordonii* が近傍に存在することで、*P. gingivalis* ATCC33277 株の病原性が著しく亢進していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Kuboniwa M, Houser JR, Hendrickson EL, Wang Q, Alghamdi SA, Sakanaka A, Miller DP, Hutcherson JA, Wang T, Beck DAC, Whiteley M, Amano A, Wang H, Marcotte EM, Hackett M, Lamont RJ* (2017): Metabolic crosstalk regulates

Porphyromonas gingivalis colonization and virulence during oral polymicrobial Infection. *Nature Microbiology*, 2:1493-1499.

2. Sakanaka A, Kuboniwa M*, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A (2017): Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Scientific Reports*, 7:42818.

3. Kuboniwa M*, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A (2017): Prediction of periodontal inflammation via metabolic profiling of saliva. *Journal of Dental Research*, 95:1381-1386.

4. Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, Amano A* (2016): Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microbial Pathogenesis*, 94:42-47

5. Takeuchi H*, Takada A, Kuboniwa M, Amano A* (2016): Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells. *Cellular Microbiology*, 18:928-948.

6. Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, Nagata H* (2016): Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*, 87:83-90.

7. 坂中哲人, 久保庭雅恵, 天野敦雄 (2016) *Fusobacterium nucleatum* との栄養共生における *Streptococcus gordonii* アルギニン・オルニチンアンチポーター ArcD の機能解析. *大阪大学歯学雑誌*. 61:1-4

8. 久保庭雅恵 (2016) 歯垢 (デンタルバイオフィルム) の病原性変化: Microbial shift. コラム1 特別企画「新時代の歯周病を知る」*日本歯科評論*. 76:40-41.

9. Sakanaka A, Kuboniwa M*, Takeuchi H, Hashino E, Amano A (2015): Arginine-ornithine antiporter ArcD controls arginine metabolism and interspecies biofilm development of *Streptococcus gordonii*. *Journal of Biology Chemistry*. 290:21185-21198.

[学会発表] (計 6件)

1. Kuboniwa M. New insights into the periodontal research - findings from metabolome analyses, **Oral Immunology and Infectious Diseases Special Seminar, University of Louisville School of Dentistry**, 2017/8/7, Louisville, USA.
2. Sakanaka A, Kuboniwa M, Amano A. Butyrate production in *Fusobacterium nucleatum* is enhanced by cross-feeding with *Streptococcus gordonii*. **7th Congress of European Microbiologists (FEMS)**, 2017/7/12, Valencia, Spain.
3. 久保庭雅恵. メタボロミクスによる歯周病トランスレーショナルリサーチの新展開, シンポジウム7:一次予防を科学する基礎研究の新展開, **第66回日本口腔衛生学会・総会**, 2017年6月2日, 山形テルサ, 山形市.
4. 久保庭雅恵. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva~唾液メタボローム解析による歯周組織炎症程度の予測~, **第66回日本口腔衛生学会・総会 Lion Award 受賞講演**, 2017年6月1日, 山形テルサ, 山形市.
5. Kuboniwa M, Sakanaka A, Amano A. Metabolic pathways involved in phenotypic alteration between planktonic and biofilm-forming stages in *Porphyromonas gingivalis*. **The 3rd international conference on Porphyromonas gingivalis and related species in oral and systemic diseases (Pg Melbourne 2017)**, 2017/5/14-17, Melbourne, Australia.
6. 久保庭雅恵. Metabolomic shifts during periodontopathic microbiome maturation. **第90回日本細菌学会総会シンポジウム S20「細菌の集団形成とその制御機構の新展開」**, 2017/3/21,
7. Kuboniwa M. Insight into the oral microbiome study. **Keynote Lecture at 2nd Symposium 2016 of Yeongnam Branch of Korean Academy of Preventive Dentistry and Oral Health**,

2016/11/25, Daegu, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA, Masae)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 00303983

(2) 研究分担者

竹内 洋輝 (TAKEUCHI, Hiroki)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 40572186

関根 伸一 (SEKINE, Shinichi)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 70506344

永田 英樹 (NAGATA, Hideki)
関西女子短期大学・教授
研究者番号: 50260641

(4) 研究協力者

坂中 哲人 (SAKANAKA, Akito)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 90815557