

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09905

研究課題名（和文）包括的糖代謝プロファイリングによるScardoviaの齲蝕関連因子の特定

研究課題名（英文）Identification of caries-related factors in Scardovia sp. -Comprehensive profiling of glucose metabolism-

研究代表者

安彦 友希 (Abiko, Yuki)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00470170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：重度の早期小児齲蝕（Early Childhood Caries：ECC）から検出されることが報告され、新たな齲蝕関連細菌として注目されているScardoviaは、代表的な齲蝕関連細菌であるStreptococcus mutansとは異なる糖代謝経路（F6PPK shunt）を有することが報告されている。本研究では包括的糖代謝プロファイリングにより、ScardoviaがF6PPK shuntを使うことで乳酸よりも酢酸を多く産生すること、さらにフッ化物による酸産生阻害効果の影響を受けにくく、且つ低いpH環境下でも酢酸を産生し続けることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのScardoviaに関する報告は、ECC患児の口腔内にどれくらい存在するかという、主にゲノム解析を手法とした細菌叢の構造（構成）をターゲットとする研究であった。本研究では、Scardoviaの包括的糖代謝プロファイリング すなわち、Scardoviaが炭素源（糖）をどのように代謝し酸を産生するのか、またどのような物質により糖代謝が阻害されるのかという細菌の機能を明らかにしたことにより、ECCの病態を理解する一助となった。

研究成果の概要（英文）：Scardovia, which has been reported to be detected in severe Early Childhood Caries (ECC) and is attracting attention as a new caries-associated bacterium, has been reported to have a different carbohydrate metabolism pathway (F6PPK shunt), which is different from that of Streptococcus mutans, a typical caries-associated bacterium. In this study, comprehensive carbohydrate metabolism profiling revealed that Scardovia use the F6PPK shunt to produce more acetic acid than lactic acid, and that Scardovia are less susceptible to the inhibitory effect of fluoride on acid production and continue to produce acetic acid even under low pH conditions.

研究分野：口腔細菌

キーワード：糖代謝 齲蝕 ECC

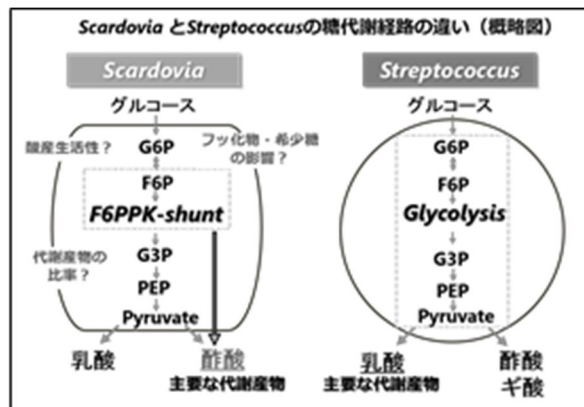
### 1. 研究開始当初の背景

*Scardovia* はグラム陽性の偏性嫌気性細菌で、2002年に腸内細菌として有名な *Bifidobacterium* から独立した比較的新しい菌種である。そして2011年に Harvard Dental Center の Professor. Anne C.R. Tanner らのグループが、小児のプラークを、pH 5.0 の低 pH 寒天培地にて培養したところ、*Scardovia* が分離同定され、本菌が口腔内に存在することが初めて明らかとなった (Tanner AC et al., 2011)。その際、齲蝕を持たない小児よりも、小児重度齲蝕患者 (Early Childhood Caries : ECC) からの検出率が有意に高かったことから、齲蝕への関わりが注目されるようになった。最新の Review では、*Scardovia* は *Streptococcus mutans*、Non-mutans streptococci、*Actinomyces*、*Lactobacilli*、*Bifidobacterium* と共に、ECC の病態の進行に関わる細菌として取り上げられており (Hajishengallis E et al., 2017)。その存在が広く認識されるようになってきた。

一方で、これらの報告は、細菌が存在するか (検出されるか) という、主にゲノム解析を手法とした細菌叢の構造 (構成) をターゲットとする研究である。そのため、次の段階として口腔内で「何をしているか?」という生化学的な性質 (機能) を探ることで、*Scardovia* が齲蝕の病態にどのように関わっているのかを明らかにすることが求められている。

### 2. 研究の目的

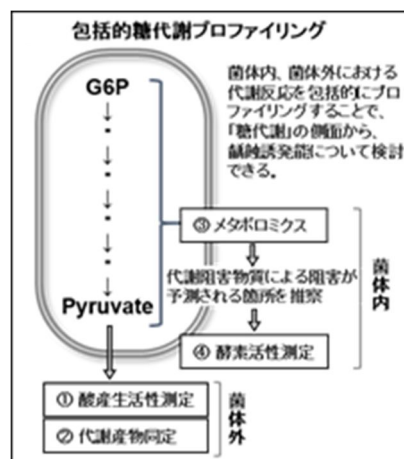
齲蝕の発生、進行に関わる細菌側の因子としては、多量に酸を産生することができる「酸産生能」を有すること、低 pH 環境でも代謝を行い酸産生活性が持続できる「耐酸性能」が高いこと、さらには歯面への「付着能」が強く関連している。*Scardovia* は、*S. mutans* のようにスクロース (ショ糖) を利用し、菌体外多糖を産生する能力については報告が無いことから、乳酸桿菌等と同様、酸産生能・耐酸性能を生かして齲蝕が発生しやすい環境作りに寄与していることが予測される。*Scardovia* は「フルクトース 6 リン酸経路 (F6PPK shunt)」と呼ばれる特殊な糖代謝経路を持つことが知られており、ミュータンスレンサ球菌等の一般的な解糖系とは代謝経路に大きな違いがある (右図)。この違いが、*Scardovia* の齲蝕誘発能、すなわち酸産生活性やフッ化物感受性を規定しているものと予測されるが、これまでに口腔内を模した環境で、糖代謝機構を検討した報告は無く不明である。また、フッ化物などの代謝阻害物質による代謝抑制機構についての検討も急務である。そこで本研究では、糖代謝の側面から *Scardovia* の齲蝕関連性について検討することを目的とした。



### 3. 研究の方法

本研究は、齲蝕に対する *Scardovia* の及ぼす影響について、包括的糖代謝プロファイリングにて明らかにする。そのために、酸産生活性測定、代謝産物同定、メタボローム解析 (メタボロミクス) を用いた細胞内代謝中間体の網羅的解析、さらに糖代謝抑制経路を確定するための酵素活性測定を行った (右図)。

酸産生活性を測定するために、口腔内における嫌気環境、および食事や唾液の緩衝作用などによって変化する pH 環境を再現する必要がある。そのため当研究室では、嫌気グローブボックス内に自動中和滴定装置 (pH-stat) を設置し、任意の pH 環境 (とくに耐酸性を考慮した低 pH 環境) における酸産生活性の測定を可能にしている。pH-stat を用いて酸産生活性測定を行った試料は、 $\text{H}_2\text{O}$  の実験に利用した。代謝産物の解析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い正確な同定、定量を行った。メタボローム解析 (メタボロミクス) にはキャピラリー電気泳動 - 質量分析装置 (CE-TOFMS) を用い、細胞内代謝中間体を網羅的に一斉解析した。特に阻害物質による代謝抑制機構の推測に威力を発揮する最新の代謝解析手法である。ただし、メタボロミクスは網羅的に代謝中間体の増減を知ることができるが、実際に酵素阻害が起こっているかまでは分からない。そのため、メタボロミクスによって代謝阻害が推測された代謝反応を触媒する酵素を細胞内より抽出し、in vitro で酵素活性測定を行い、代謝抑制ステップを確定した。



#### 4. 研究成果

##### (1) 酸産生活性測定

グルコース非添加時には pH6.5 以上を維持していたが、グルコース添加後は直ちに pH が低下し、エナメル質の臨界 pH (pH5.5) を下回り、2 時間以内に pH3.56 となった (Figure 1A)。フッ化物を添加すると、濃度依存的に pH の低下が抑制された。*S. wiggisiae* の酸産生量は、pH-stat を用いて酸産生量に相当するアルカリ (KOH) 溶液の滴定量を元にモニターすることで評価した (Figure 1B)。*S. wiggisiae* の酸産生量は、pH5.5 で  $5.9 \pm 4.0 \mu\text{L}/\text{OD}$ 、pH7.0 で  $5.6 \pm 0.6 \mu\text{L}/\text{OD}$  で、*S. wiggisiae* は pH7.0 および 5.5 で同様の高い酸産生活性を示した (Figure 1B)。フッ化物の添加は濃度依存的に酸産生活性を抑制したが、pH7.0 ではフッ化物濃度が高くて (20 mM) 酸産生は継続した (Figure 1B)。フッ化物の酸産生に対する  $\text{IC}_{50}$  を算出したところ pH7.0 では 8.0 mM、pH5.5 では 1.5 mM であることがわかった。

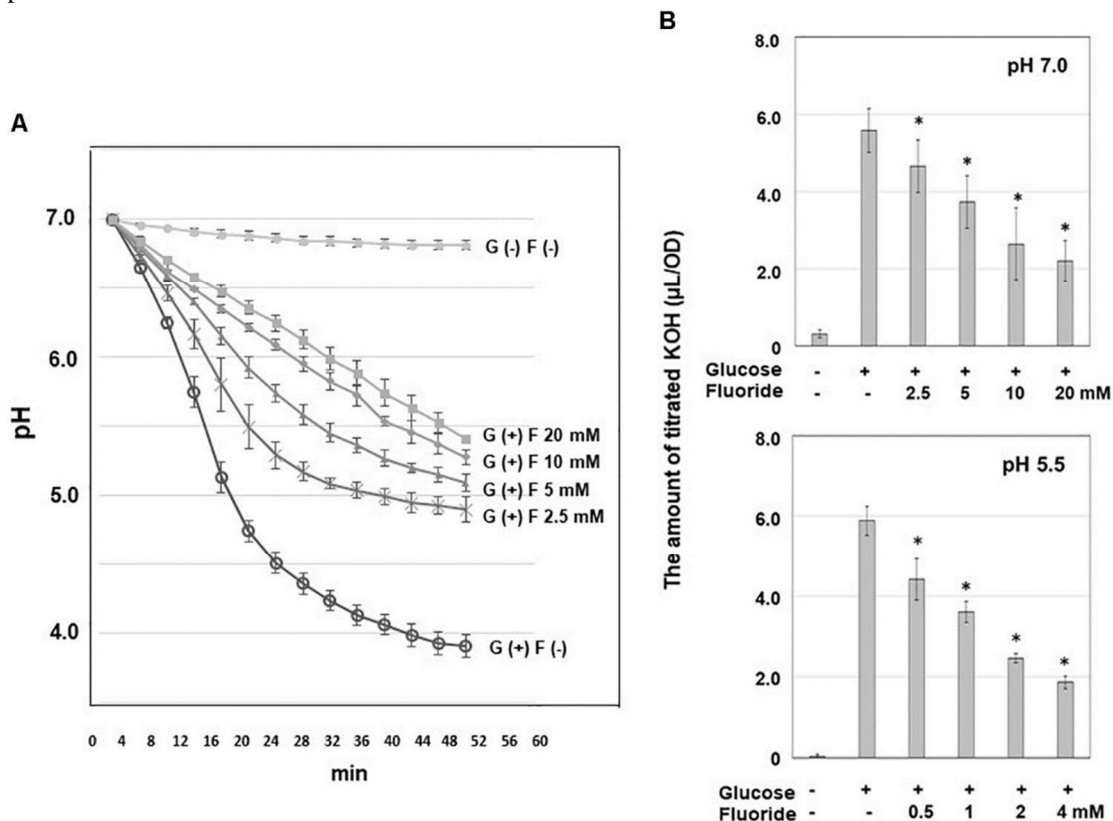


FIGURE 1. Acid production from glucose by *S. wiggisiae* and inhibitory effects of fluoride on such acid production. (A) Curves of the reduction in pH from pH 7.0; (B) the rates of acid production at pH 7.0 and 5.5. The data are shown as the mean and standard deviation of three independent experiments. Fifty percent inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) were calculated from the fluoride concentration and the rate of acid production. The significance of difference from the control was analyzed using Dunn's test (\* $P < 0.05$ ).

##### (2) 代謝産物同定

グルコースから産生された代謝産物の約 70% は酢酸で、残りは pH7.0 でギ酸、pH5.5 でギ酸および乳酸であった (Table 1)。フッ化物の濃度依存的に代謝産物の産生レベルは低下した。それに伴い、酢酸の割合が 85~90% に増加し、ギ酸および乳酸の割合が低下した。

TABLE 1. Metabolic end-products from glucose at pH 7.0 and 5.5 by *S. wiggisiae*.

Acidic end-products				
	Substrate	Acetate	Formate	Lactate
pH 7.0	G (-) F (-)	27.2 ± 5.5 <sup>†</sup> (78.4) <sup>‡</sup>	7.52 ± 1.8 (21.6)	ND
	G (+) F (-)	90.4 ± 8.9 (74.4)	31.1 ± 3.5 (25.6)	ND
	G (+) F (2.5)	80.3 ± 8.1 (74.4)**	27.6 ± 3.7 (25.6)	ND
	G (+) F (5)	67.1 ± 8.3 (76.0)**	21.1 ± 2.9 (24.0)**	ND
	G (+) F (10)	55.8 ± 11.7 (81.6)**	12.6 ± 8.2 (18.4)**	ND
	G (+) F (20)	54.0 ± 7.4 (85.1)**	9.46 ± 2.9 (14.9)**	ND
pH 5.5	G (-) F (-)	27.6 ± 5.8 (78.5)	7.56 ± 2.1 (21.5)	ND
	G (+) F (-)	104.8 ± 11.1 (71.4)	22.9 ± 3.1 (15.6)	19.0 ± 1.8 (12.9)
	G (+) F (0.5)	86.9 ± 9.2 (74.7)**	25.5 ± 2.6 (21.9)*	3.97 ± 0.9 (3.4)*
	G (+) F (1)	76.0 ± 7.6 (77.7)**	21.8 ± 2.5 (22.3)	ND
	G (+) F (2)	63.0 ± 7.9 (82.3)**	13.6 ± 2.9 (17.7)**	ND
	G (+) F (4)	67.4 ± 9.6 (91.2)**	6.54 ± 1.1 (8.8)**	ND

<sup>†</sup>Data are presented as the mean and standard deviation of three independent experiments (μM/OD). <sup>‡</sup>Relative amount of each acidic end-product compared with the total amount of acidic end-products (%).

G, 10 mM glucose; F, fluoride (mM).

\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; compared with the amount of acidic end-products produced in the presence of glucose.

### (3) メタボローム解析 (メタボロミクス)

グルコース代謝中にフッ化物を添加すると、3PG が蓄積し、ピルビン酸のレベルが低下した (Figure 2)。pH7.0 と pH5.5 で同様の傾向がみられた。また、フッ化物添加後に G6P と E4P の蓄積も見られたが、これらの変化は統計的に有意ではなかった。

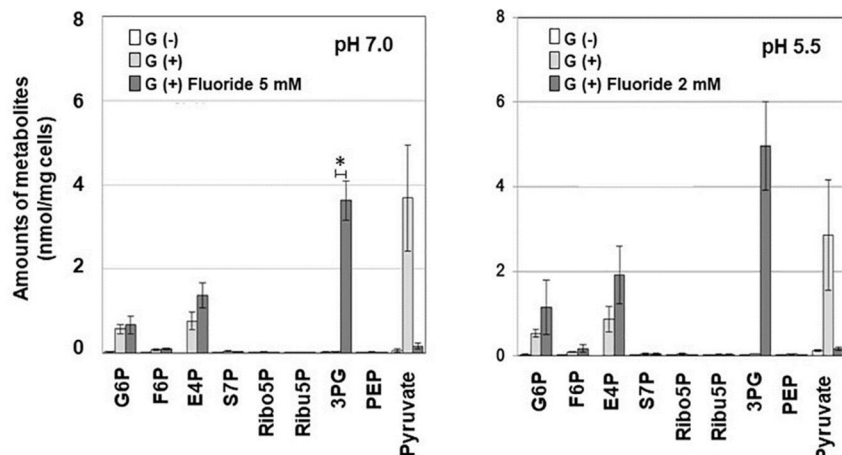


FIGURE 2. Effects of fluoride on the metabolomic profile of *S. wiggisiae* at pH 7.0 and 5.5. Data are shown as the mean and standard deviation of three independent experiments. The significance of differences between the with and without fluoride conditions were analyzed using the paired t-test. The level of significance was set at 0.00556, based on Bonferroni's correction (\*P < 0.0056).

### (4) 酵素活性測定

メタボローム解析の結果、フッ化物によるエノラーゼ活性阻害が予測されたため、細胞抽出液を用いて、フッ化物添加後の pH7.0 でのエノラーゼ活性を調べた。フッ化物の添加は濃度依存的にエノラーゼ活性を阻害した (Table 2)。

TABLE 2. Inhibition of enolase activity by fluoride.

Fluoride concentration (mM)	Inhibition of enolase activity by fluoride (%)		
	<i>S. wiggisiae</i>	<i>B. dentium</i>	<i>S. mutans</i>
0.02	nt	10.4 ± 2.5	7.6 ± 3.3
0.2	nt	49.4 ± 4.7	7.6 ± 3.3
2	8.53 ± 4.7	96.2 ± 1.0	94.9 ± 2.5
5	55.5 ± 4.8	nt	nt
20	92.5 ± 1.8	nt	nt

Data are shown as the mean ± standard deviation of three independent experiments. Data of *B. dentium* and *S. mutans* are adopted from Manome et al. (2019). nt, not tested.

以上の結果から、*S. wiggisiae* は高い酸産生性とフッ化物に対する耐性を有することが明らかになった。*S. wiggisiae* は F6PPK シャントというユニークな代謝経路を持ち、酢酸経路への代謝フローを維持することでフッ化物耐性に寄与していると考えられた (Figure 4)。

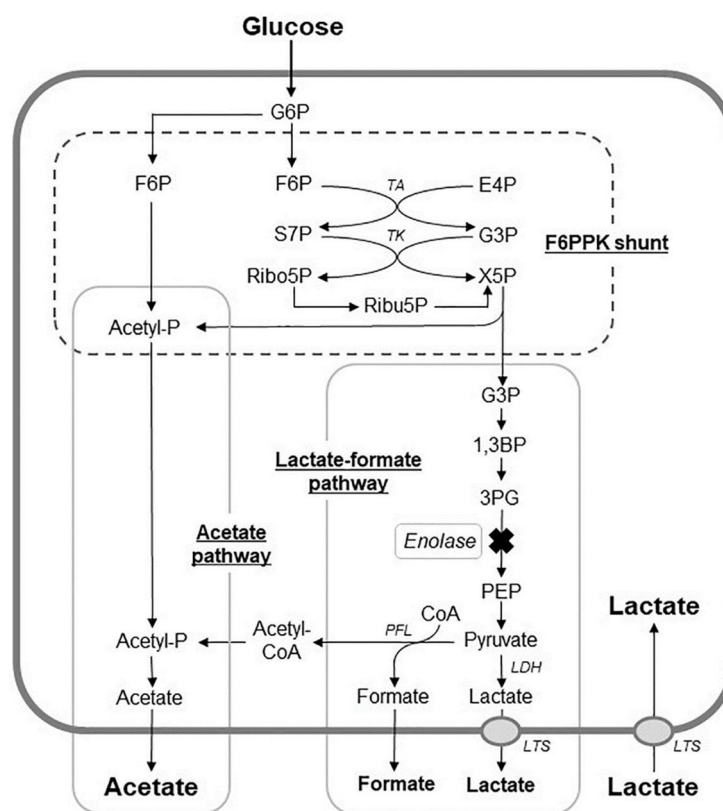


FIGURE 4. Proposed metabolic pathways for glucose metabolism in *S. wiggisiae*. X mark, a step assumed to be inhibited by fluoride; G6P; glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; X5p, xylulose 5-phosphate; Ribo5P, ribose 5-phosphate; Ribu5P, ribulose 5-phosphate; 1,3BP, 1,3-bisphosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate; Acetyl-P, CoA, coenzyme A; TA, transaldolase; TK, transketolase; LDH, lactate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate-lyase; LTS, lactic acid transport system.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Han Sili, Abiko Yuki, Washio Jumpei, Luo Yufang, Zhang Linglin, Takahashi Nobuhiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Green Tea-Derived Epigallocatechin Gallate Inhibits Acid Production and Promotes the Aggregation of Streptococcus mutans and Non-Mutans Streptococci	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Caries Research	6. 最初と最後の頁 205 ~ 214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000515814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kameda M, Abiko Y, Washio J, Anne C. R. Tanner, Christine A. Kressirer, Mizoguchi I, Takahashi N	4. 巻 25
2. 論文標題 Sugar Metabolism of Scardovia wiggsiae, a Novel Caries-Associated Bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.00479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kameda M, Abiko Y, Washio J, Takahashi N
2. 発表標題 Growth promotion factors of ECC-associated bacterium
3. 学会等名 2022FJMU-HKU-TU International Online Symposium on Oral Health Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀田 真衣, 安彦 友希, 鷲尾 純平, 佐藤 聡子, 高橋 信博
2. 発表標題 Scardovia wiggsiae の増殖促進因子の検討
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kameda M, Abiko Y, Washio J, Takahashi N
2. 発表標題 Unique acid production from sugars and fluoride resistance of a novel caries-associated bacterium <i>Scardovia wiggisiae</i> .
3. 学会等名 2021FJMU-HKU-TU International Online Symposium on Oral Health Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kameda M, Abiko Y, Washio J, Takahashi N
2. 発表標題 Cariogenic potential of a novel caries-associated bacterium <i>Scardovia wiggisiae</i> , based on its unique carbohydrate metabolism.
3. 学会等名 The 16th International Workshop on Biomaterials in Interface Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安彦 友希、馬目 歩実、亀田 真衣、鷺尾 純平、高橋 信博
2. 発表標題 口腔内ピフイズ菌の糖代謝 - 齲蝕との関連 -
3. 学会等名 令和3年度第3回・『革新的食学拠点』ミーティング
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Han S, Washio J, Abiko Y, Zhang L, Takahashi N
2. 発表標題 The antimicrobial properties of green tea derived-catechins on <i>Streptococcus mutans</i> .
3. 学会等名 The 99th IADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Han S, Washio J, Abiko Y, Zhang L, Takahashi N:
2. 発表標題 The antimicrobial properties of green tea derived-catechins on Streptococcus mutans
3. 学会等名 第78回東北大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀田真衣、安彦 友希、鷲尾 純平、高橋 信博
2. 発表標題 新規齲蝕関連細菌Scardovia属の齲蝕誘発能について
3. 学会等名 第77回東北大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kameda M, Abiko Y, Washio J, Takahashi N
2. 発表標題 Carbohydrate metabolism of a novel caries-associated bacterium Scardovia wiggsiae
3. 学会等名 第8回IOHS国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中隆	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 333
3. 書名 ポリフェノールの機能と多角的応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高橋 信博  (Takahashi Nobuhiro)  (60183852)	東北大学・歯学研究科・教授    (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	亀田 真衣  (Kameda Mai)		
研究 協力者	鷲尾 純平  (Washio Jumpei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Forsyth Institute	Harvard School of Dental Medicine	