

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17281

研究課題名（和文）アミノ酸バランスを軸とした歯周病に伴う微生物叢代謝変動の解析

研究課題名（英文）Exploring common shifts in amino acid balance in periodontitis-associated microbial communities

研究代表者

坂中 哲人（Sakanaka, Akito）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：90815557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではin vitroおよび臨床的アプローチの両面から、歯肉縁下微生物集団におけるアミノ酸栄養共生機構の解明を目指した。まずFusobacterium nucleatumの高いポリアミン産生能を見出すとともに、口腔レンサ球菌と協働することで、産生能が飛躍的に高まることが示された。臨床研究では、歯周病重症度と相関する代謝物としていくつかの芳香族アミノ酸分解産物を見出し、それらがP. gingivalisやPrevotella属細菌により産生されていることを示唆する結果を得た。これらの新知見は、細菌集団におけるアミノ酸代謝変動が病態形成の基礎をなすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病はバイオフィルムの量および質の変化に起因する慢性炎症性疾患である。近年、バイオフィルムの質の変化、特に、バイオフィルム内の菌種を超えた代謝活動が病原性を表す一つの尺度として注目されている。バイオフィルムにおける代謝活動の本体は、様々な微生物種間で行われる代謝物の受け渡し、すなわち栄養共生であり、これらのネットワークの総和として集団の代謝が形作られる。本研究の結果から、細菌集団内でのアミノ酸代謝変動が病態形成に關与する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the amino acid trophic webs in subgingival microbial communities from both in vitro and clinical approaches. We showed that Fusobacterium nucleatum has the high production capability of polyamines, which is strengthened by coexistence with commensal microbes such as oral streptococci and Veillonella species. In clinical studies, we found several aromatic amino acid degradation products as metabolites that correlated with periodontal disease severity. We also found evidence suggesting that they were produced by Porphyromonas gingivalis and Prevotella spp. bacteria. These novel findings suggest that shifts in amino acid metabolism in subgingival communities underlie periodontal pathogenesis.

研究分野：予防歯科学

キーワード：歯周病 微生物叢 栄養共生 アミノ酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔内を生息環境とする微生物は、呼吸・食事・ブラッシング・絶え間なく分泌される唾液といった環境変動に常にさらされている。こうした環境において微生物は、粘着性の物質で覆われたバイオフィームと呼ばれる集合体を形成し、歯の表面などに付着することで長期の生存を可能にしている。歯周病はこのバイオフィームの量および質の変化に起因する慢性炎症性疾患である。近年バイオフィームの質の変化、特にバイオフィーム内の菌種を超えた代謝活動が、病原性を表す一つの尺度として注目されている (Jorth et al, mBio, 2014)。バイオフィームにおける代謝活動の本体は、様々な微生物種間で行われる代謝物の受け渡し、すなわち栄養共生であり、これらのネットワークの総和として集団の代謝が形作られる。これまで我々は基礎・臨床研究の両面から、細菌集団内での代謝変動に関する研究を推進し、次のような知見を得ている。

- 唾液中に含まれる歯垢微生物叢由来代謝物を試料として、歯周病重篤度予測を試みた (Kuboniwa et al, J Dent Res, 2016; Sakanaka et al, Sci Rep, 2017)。その結果、健常者ではグルタミンが、歯周病重篤度の高い患者では塩基性アミノ酸 (オルニチン, リジン) やポリアミン類が、それぞれ高い割合で歯垢から唾液中へと放出されている可能性を示した。
  - 口腔常在菌 *Streptococcus gordonii* はオルニチンを産生し、歯周病関連菌 *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィーム形成を促進することを示した (Sakanaka et al, J Biol Chem, 2015)。
  - 口腔常在菌 *Veillonella parvula* はアルギニンおよびリジン生合成経路を完備し、実際にアルギニン, リジンを産生することを確認した。
- 以上より、歯周病の進展に伴い歯垢微生物集団内でのアミノ酸代謝ネットワークが変化し、微生物由来のアミノ酸濃度バランスが変化することが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究では基礎実験・臨床研究の両面から高病原化に伴う歯垢微生物叢におけるアミノ酸代謝ネットワークの変動を解析するとともに、それを利用した歯周病重篤度評価法の開発に展開するための基礎となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

- (1) 代表的な口腔細菌のアミノ酸要求性・産生能を評価し、それに基づき複数菌種によるアミノ酸栄養共生機構について解析するとともに、それが病態形成に及ぼす影響について評価する。
- (2) ヒト歯垢を用いて、細菌構成割合・細菌由来アミノ酸濃度バランス・細菌集団内アミノ酸生合成遺伝子発現プロファイルについて解析するとともに、歯周病原性の亢進に伴う変動をマルチオミクス解析により調査する。

### 3. 研究の方法

- (1) 歯垢モデル細菌 (*S. gordonii*, *F. nucleatum*, *V. parvula*, *Actinomyces oris*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*) に関するアミノ酸産生能・要求性を調査すると共に、複数菌種によるアミノ酸栄養共生機構について評価する。まず最小培地を用いて歯周病モデル細菌を培養し、培地中の 20 種のアミノ酸量を超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) を用いて測定することで、モデル細菌の各種アミノ酸産生能を評価する。また各種アミノ酸を添加した最小培地中での増殖様式を評価することで、モデル細菌の各アミノ酸要求性を評価する。さらにモデル細菌のアミノ酸産生能・要求性の結果から、栄養共生関係にあると予想される組み合わせを見出し、それらを最小培地を用いて共培養し 24 時間後の各菌数を定量 PCR で評価することで、栄養共生状態を評価する。
- (2) 歯周病重篤度の高い患者の歯垢中では、アミノ酸代謝が変動し、細菌由来アミノ酸バランスが変化することが示唆された。本研究では様々な歯周状態をもつ集団に対する観察研究を行い、歯垢中の代謝変動をマルチオミクスの手法を用いて解析し、メカニズム解明に迫る。まず大阪大学歯学部附属病院において被験者を募る。歯垢を採取するとともに歯周検査を行い、歯周病重篤度を評価する。歯周病重篤度の評価には、先行研究と同様に、歯周病由来慢性炎症を定量的に表現し得る Periodontal Inflamed Surface Area (PISA) を指標として用いる。得られた歯垢サンプルを遠心操作で液体成分と微生物成分に分ける。液体成分中のアミノ酸含量を UPLC で定量する。また微生物成分については、メタゲノム解析およびアミノ酸代謝系に特化したメタトランスクリプトーム解析を実施する。得られたデータセットに対し、所有する SIMCA を用いて多変量解析を行い、歯垢微生物叢の Dysbiosis に伴うアミノ酸代謝変動を解析する。

### 4. 研究成果

現在まで 3-(2) に関しては、歯周病重篤度と相関する代謝物としてポリアミンの他、いくつかの芳香族アミノ酸分解産物を見出した。さらにそれらが *P. gingivalis* や *Prevotella* 属細菌により産生されていることを示唆する結果が得られており、現在解析を進めている段階である。以下では 3-(1) に関する研究成果について報告する。

- (1) 歯垢モデル細菌は多様なアミノ酸・ポリアミンプロファイルを呈する  
まず *in vitro* において微生物の菌体内・外のアミノ酸・ポリアミンプロファイルを解析したところ、細菌ごとに特徴的なプロファイルを呈することが分かった。特に *F. nucleatum* が、プトレシン・カダベリンなどのポリアミンを高効率で産生することを見出した。
- (2) *F. nucleatum* のポリアミン産生能は他の常在菌の存在により高まる  
プトレシン・カダベリンはそれぞれオルニチン・リジンが脱炭酸されて生じる。オルニチンは *S.*

*gordonii* が高効率に産生し、リジンは *V. parvula* が高効率に産生していたことから、これらの菌種と *F. nucleatum* を共培養しポリアミン産生量の変化を観察すると、*F. nucleatum* のプトレシン・カダベリン産生量は *S. gordonii*・*V. parvula* それぞれの存在下で顕著に高まることが示された。また *S. gordonii* のオルニチンに関しては、我々の前研究でアルギニン・オルニチンアンチポーター ArcD がその排出に関与していることが分かっていたことから、*S. gordonii*  $\Delta$ arcD 株も含めて *F. nucleatum* のプトレシン産生能を評価したところ、 $\Delta$ arcD 株存在時ではプトレシン産生量が有意に減少し、さらなる解析で *F. nucleatum* のプトレシン産生能は、*S. gordonii* の有するアルギニン分解経路と協働することで相乗的に高まることが示された（図 1）。

(3) *F. nucleatum* のポリアミン産生は *P. gingivalis* のバイオフィーム形成を促進する

*F. nucleatum*, *S. gordonii* 野生株及び  $\Delta$ arcD 株の単一および混合培養上清を用いて、歯周病菌 *P. gingivalis* のバイオフィーム応答の異同を評価したところ、プトレシンを最も産生する組み合わせである *F. nucleatum*-*S. gordonii* 野生株の培養上清を作用させたときに、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成量が有意に増加した（図 2）。このことから、アルギニンからプトレシンに至る *S. gordonii* と *F. nucleatum* による一連の協調的な代謝が、歯周病の病態形成にも関与することが示唆された。

図 1 *F. nucleatum* と *S. gordonii* による協調的なポリアミン産生

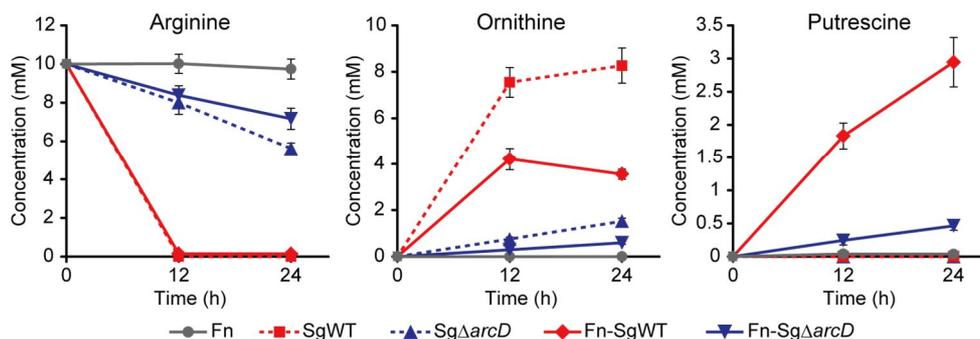
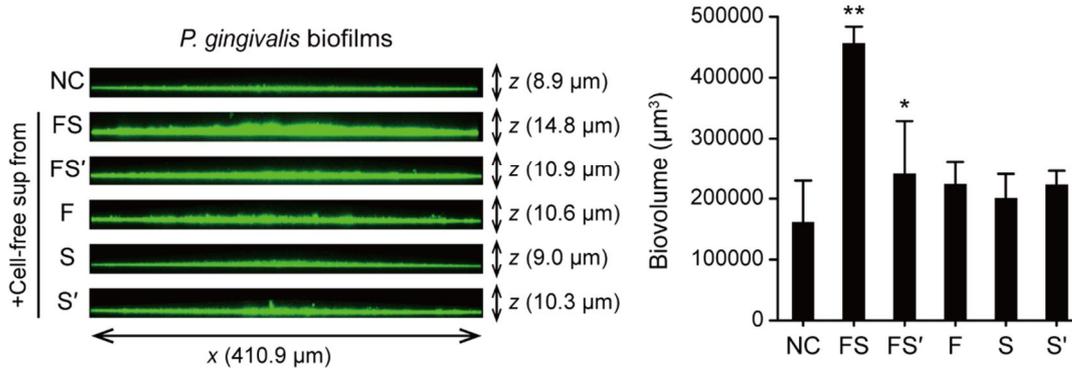


図 2 *F. nucleatum* のポリアミン産生が *P. gingivalis* バイオフィームに及ぼす影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka T, Kobayashi T, Tamenori Y, Sakanaka A, Kuriki T, Amano A	4. 巻 101
2. 論文標題 Phosphoryl oligosaccharides of calcium enhance mineral availability and fluorapatite formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 135-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.03.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂中哲人、久保庭雅恵、天野敦雄	4. 巻 7
2. 論文標題 細菌叢代謝ネットワークからみる歯周病の病因論	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 別冊B10 Clinica	6. 最初と最後の頁 116-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Sakanaka A, Kuboniwa M, Ishikawa A, Mayumi S, Amano A
2. 発表標題 Role of pantothenate biosynthesis in starvation response and biofilm formation of Porphyromonas gingivalis
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綿井大輔、坂中哲人、久保庭雅恵、福崎英一郎
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisのバイオフィルム形成におけるポリアミン類の影響の検討
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakanaka A, Kuboniwa M, Ishikawa A, Mayumi S, Amano A
2. 発表標題 Pantothenate Metabolism Involves Long-term Survival and Virulence of Porphyromonas gingivalis
3. 学会等名 IADR 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂中哲人、久保庭雅恵、石川明日香、眞弓昌大、天野敦雄
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisの代謝産物シトルリンを介した栄養共生系の探索
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuboniwa M, Sakanaka A, Ishikawa A, Mayumi S, Lamont R, Amano A
2. 発表標題 Nutritional Synergy Between Porphyromonas gingivalis and Filifactor alocis
3. 学会等名 IADR 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuboniwa M, Sakanaka A, Ishikawa A, Mayumi S, Amano A
2. 発表標題 Dental biofilm microenvironment is potentially affected by nutritional synergy between Streptococcus gordonii and Porphyromonas gingivalis
3. 学会等名 Biofilm 8 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishikawa A, Kuboniwa M, Sakanaka A, Mayumi S, Amano A
2. 発表標題 Thiamine plays a key role in the middle stage of oral biofilm formation
3. 学会等名 Asian Academy of Preventive Dentistry 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞弓昌大、久保庭雅恵、坂中哲人、石川明日香、天野敦雄
2. 発表標題 口腔レンサ球菌Streptococcus oralisとStreptococcus gordoniiの抗酸化物質を介した共生関係
3. 学会等名 第29回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----