

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17196

研究課題名（和文）口腔細菌間ネットワークによる口臭成分メチルメルカプタンの増強促進機構の解明

研究課題名（英文）Interspecies chemical communication between oral bacteria enhances the generation of volatile methyl mercaptan

研究代表者

原 武史（Hara, Takeshi）

大阪大学・大学院薬学研究科・招へい研究員

研究者番号：10898224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Fusobacterium nucleatumと口腔レンサ球菌との共存によってメチルメルカプタン（CH<sub>3</sub>SH）の発生が増加する「口臭増強機構」の解明を目指した。その結果、口腔レンサ球菌が排出するアミノ酸代謝物によってF. nucleatumのCH<sub>3</sub>SH産生が増加すること、その促進にはF. nucleatumのポリアミン合成を介したメチオニン代謝経路が関与していることを見出した。口臭原因物質である硫化水素（H<sub>2</sub>S）の産生に関与する新たな口臭原因菌も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口臭は他人が最も不快に感じる体臭の一つであるが、自己識別が難しい。そのため、口臭を気にする人は多く、口臭心身症（自臭症）も増加傾向にある。口臭の原因成分の中でも微量で非常に強力な臭気を発するメチルメルカプタン（CH<sub>3</sub>SH）は、日本人の8割が罹患している歯周病の悪化因子としても注目されている。本研究より、口腔内のCH<sub>3</sub>SH発生には、口臭増強因子を口臭原因菌に受け渡す、間接的口臭原因菌の関与が明らかになったことで、今後は新たな治療法や薬剤開発が進み、口臭予防のみならず、歯周病の治療にも役立つと期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the influences of bacterial interactions on CH<sub>3</sub>SH production and its molecular mechanisms using representative oral bacteria. As a result, we found that (1) CH<sub>3</sub>SH production by Fusobacterium nucleatum is increased by amino acid metabolites excreted from oral Streptococci, (2) the methionine metabolic pathway via polyamine synthesis in Fusobacterium nucleatum is involved in its promotion, and (3) the halitosis-causing bacteria involved in the production of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S).

研究分野：予防歯科学

キーワード：口臭 歯周病 微生物代謝 細菌間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

口臭は、最も気にしている体臭の一つとして上位に列挙される。また、口臭は自己識別が難しく、口臭心身症(自臭症)を患っている人も多い。一方で、強い自己の口臭に無自覚な人も多く、口臭は対人コミュニケーションに悪影響を及ぼす原因にもなっている。口臭は、主に歯垢や舌苔、歯肉などからの滲出液などを口腔細菌が代謝することで発生し、主に揮発性硫黄化合物(VSCs)が口臭の原因物質として認められている。その中でも嗅覚閾値が非常に小さいメチルメルカプタン(CH<sub>3</sub>SH)は歯周病の患者から多く発生することが確認されている。また、CH<sub>3</sub>SHは、口臭の主原因物質のみならず、歯周病の病態を悪化させる因子にも成り得る重要な臭気物質である。これまで我々は、嫌気環境下で口腔細菌が産生したCH<sub>3</sub>SHガスを直接定量するin vitro VSCs評価系を構築し、以下の様な結果を得ている。

- ① 主要な口腔細菌の1種である *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) がメチオニンを代謝することで非常に高いCH<sub>3</sub>SHを産生する
- ② 初期定着菌である *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) と *F. nucleatum* を共存させたところ、*F. nucleatum* のCH<sub>3</sub>SH産生量は約3倍に増加する
- ③ 透析膜を用いて菌体同士の接触をなくした非接触型共培養系においても *F. nucleatum* によるCH<sub>3</sub>SH産生は *S. gordonii* の共存によって3倍に増加する

以上のことから、*S. gordonii* からの菌体外代謝物が *F. nucleatum* のCH<sub>3</sub>SH産生促進に関与していると予想している。

## 2. 研究の目的

本研究では、*S. gordonii* からの菌体外代謝物や *S. gordonii* 共存下での *F. nucleatum* の菌体内代謝物の変動を解析することによって、*F. nucleatum* のCH<sub>3</sub>SH産生促進における *S. gordonii* の役割とその機序を解明することを目的としている。口臭予防の新たな知見や治療法の開発に展開する基礎となる研究を実施する。

## 3. 研究の方法

(1) *A. naeslundii*、*S. gordonii* (Sg)、*F. nucleatum* (Fn)、*F. alocis*、*P. intermedia*、*P. gingivalis* を用い、嫌気条件下での単培養、および2菌種共培養で発生する揮発性物質を培養フラスコより回収し、産生されたCH<sub>3</sub>SHをGC-FPDで定量した。*F. nucleatum* と *S. gordonii* (WTおよびアルギニン/オルニチン対向輸送体欠損  $\Delta arcD$  株) については、単培養、および2菌種共培養条件下での培養上清を0、6、12時間で回収し、菌体外に放出された代謝物を定量した。また、[<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N] L-メチオニンをを用いて、*S. gordonii* WTとの共培養下での *F. nucleatum* の菌体内代謝物の動態を解析した。また、*F. nucleatum* のメチオニン代謝関連代謝経路の遺伝子発現量も解析した。

(2) 16種類の代表的な口腔細菌を用いて、合成培地にメチオニン、システイン、ホモシステインをそれぞれ添加し、嫌気条件下での単培養し、産生された硫化水素(H<sub>2</sub>S)をGC-FPDで定量した。

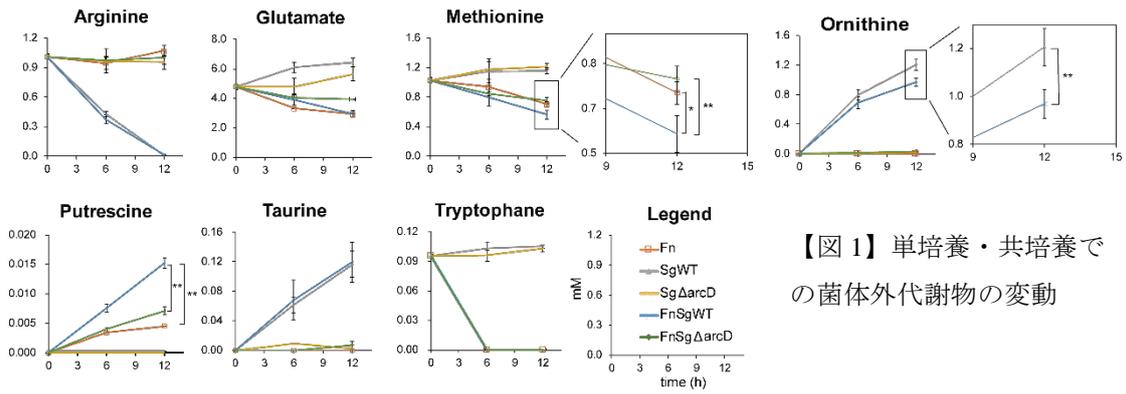
## 4. 研究成果

現在までに、3-(2)に関しては、H<sub>2</sub>S産生に大きく関与している口腔細菌 *Actinomyces* 属を特定し、その産生条件(pH条件や必要栄養源など)を見出した。また、*Actinomyces* 属の糖代謝がH<sub>2</sub>S産生に大きく関与していることを示唆する結果を得ており、現在解析している。以下では、3-(1)について報告する。

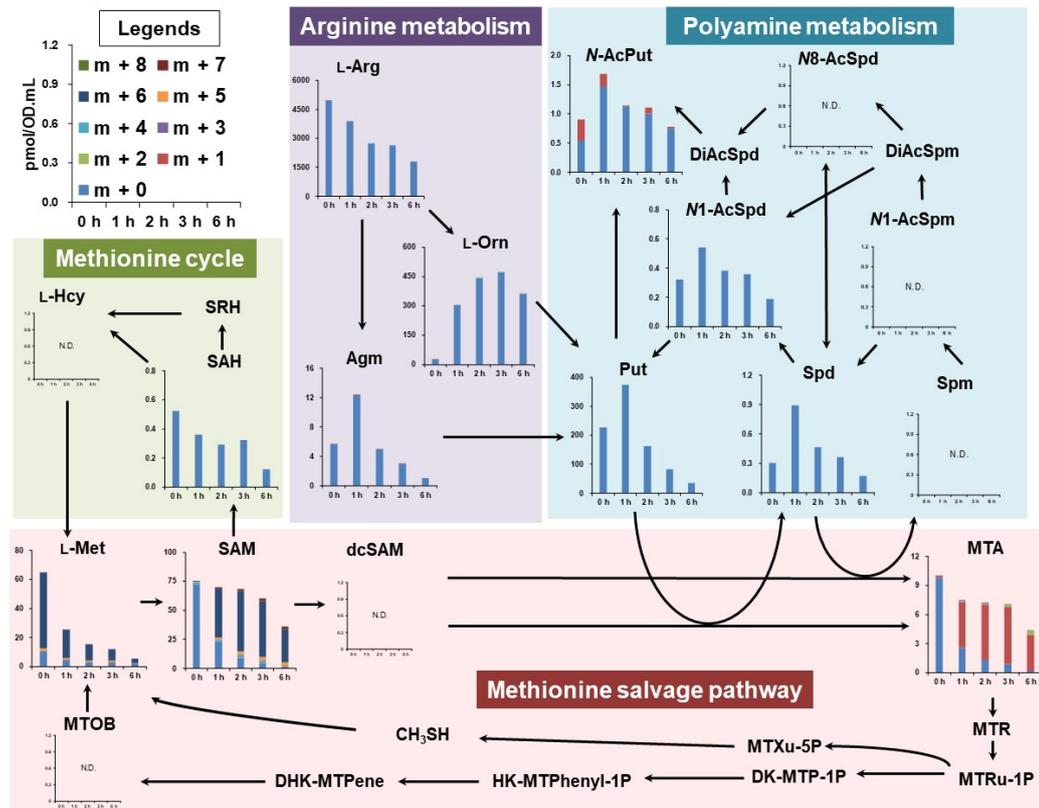
(1) *S. gordonii* からのオルニチンが *F. nucleatum* のCH<sub>3</sub>SH産生を促進する *F. nucleatum* - *S. gordonii* WT と *F. nucleatum* - *S. gordonii*  $\Delta arcD$  の共培養上清の代謝物分析から、CH<sub>3</sub>SH生成には *S. gordonii* から放出されるオルニチンとその脱炭酸反応によって生じるポリアミン類が必要であることが示された(図1)。また、*F. nucleatum* にオルニチンを添加することで、濃度依存的に *F. nucleatum* のCH<sub>3</sub>SH生成量は上昇した。

(2) *F. nucleatum* はメチオニンサルベージ経路を、CH<sub>3</sub>SH産生を伴いつつ回転させている [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N] L-メチオニンをを用いた *F. nucleatum* 菌体内代謝動態解析から、ポリアミン類が脱炭酸型 S-アデノシルメチオニンから 5'-メチルチオアデノシンを生成する反応に必要であり、その下流に位置するメチオニンサルベージ経路を、CH<sub>3</sub>SH産生を伴いつつ回転させていることが示唆された(図2)。

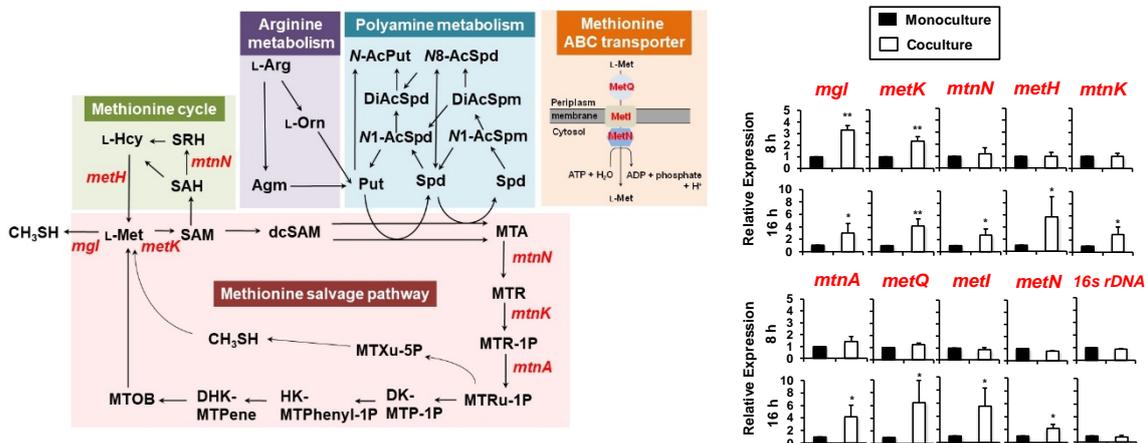
(3) 共培養条件下では *F. nucleatum* のメチオニン代謝関連遺伝子が高発現しているメチオニンサイクル、メチオニンサルベージ経路、メチオニン ABC トランスポーターに関与する遺伝子の発現量を確認したところ、共培養条件下での *F. nucleatum* の *mgl*、*metK*、*metH*、*metQ*、*metI* の発現量は単培養条件下に比べ、著しく増加した(図3)。これらの結果から、共培養の *F. nucleatum* の代謝の流れが、メチオニンサイクル、メチオニンサルベージ経路、メチオニン ABC トランスポーターに移行していることが示された。



【図1】単培養・共培養での菌体外代謝物の変動



【図2】安定同位体を用いた *F. nucleatum* の代謝フラックス解析



【図3】単培養・共培養での *F. nucleatum* の遺伝子発現量の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原武史, 久保庭雅恵, 坂中哲人, 天野敦雄
2. 発表標題 Interspecies chemical communication between oral bacteria enhances the generation of volatile methyl mercaptan.
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

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

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
---------	---------