

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890112

研究課題名（和文） 糖アルコールによるバイオフィーム形成阻害機構の解明

研究課題名（英文） Effects of polyols on periodontopathic biofilm development

研究代表者

橋野 恵衣 (HASHINO EI)

大阪大学・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：90614553

研究成果の概要（和文）：数種の糖アルコールは、口腔常在菌 *Streptococcus gordonii* と歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* で構成される歯周病原性バイオフィームの形成を阻害し、とりわけエリスリトールが *P. gingivalis* を最も効果的に抑制することを確認した。そこで、その形成阻害機序を明らかにすることを目的とし、エリスリトール存在下におけるバイオフィーム構成細菌のタンパク質や代謝産物の変化を観察するためにメタボローム解析等を実施した。その結果、エリスリトールは核酸合成系、解糖系を含む様々な代謝経路に影響を及ぼすことにより、各菌の増殖を抑制し、バイオフィーム抑制効果を発揮している可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our previous study showed that sugar alcohols (polyols) such as erythritol inhibited *Streptococcus gordonii*-*Porphyromonas gingivalis* biofilm formation and erythritol was the most effective reagent to reduce *P. gingivalis* as compared with other tested polyols. To examine the inhibitory effects of erythritol, we analyzed the metabolomic profiles of erythritol-treated *P. gingivalis* and *S. gordonii* cells. These results suggest that erythritol has inhibitory effects on dual species biofilm development via several pathways, including suppression of growth resulting from DNA and RNA depletion and alteration of central carbon metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：糖アルコール、歯周病細菌、バイオフィーム、メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

糖アルコールは、糖が還元されてアルコールとなったもので、キシリトール・エリスリトール・ソルビトール等に代表される。多くは代用甘味料として用いられるが、低カロリー

一性やインスリン非刺激性などの特徴により特定保健用食品や病者用食品などに広く応用されている。本研究開始時点以前において、糖アルコールの抗う蝕作用についての報告はみられたが、歯周病に対する効能は明ら

かではなく、一部の糖アルコールでプラーク除去促進作用が検討されてはいるものの、歯周病菌の生育やバイオフィーム形成への影響といった歯周病臨床応用につながる報告はなかった。申請者らは研究開始時点までに、数種の糖アルコールが歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* と口腔常在菌 *Streptococcus gordonii* で構成される混合バイオフィームの形成を顕著に抑制することおよび供試糖アルコールの中でエリスリトールが *P. gingivalis* に対して最も高い抑制効果を示すことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、メタボローム解析などのオミクス手法の情報を統合的に解析し、歯周病原性バイオフィーム構成細菌の代謝産物および代謝経路の動態を網羅的に探索することにより、バイオフィーム形成機構を解析するとともに、糖アルコールによるバイオフィーム形成阻害機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* メタボローム解析

0、0.8、10%エリスリトール含有希釈 TSB 培地中で培養した *P. gingivalis* ATCC33277 菌体を回収し、メタノール処理により菌体内よりイオン性代謝産物を抽出した。抽出した代謝産物に対して、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用い、代謝物質の網羅的測定を実施した。検出された代謝物質は、ソフトウェア MasterHands および代謝物質データベースを用いて、同定・解析を行った。

(2) *S. gordonii* メタボローム解析

0、0.8、10%エリスリトール含有バイオフィーム形成用既知組成培地中で培養した *S. gordonii* DL1 菌体から抽出した菌体内イオン性代謝産物を用いて、(1) と同様に網羅的解析を実施した。

(3) ソルビトール群との主成分解析

トランスウェルシステムを用いて、10%エリスリトール添加、10%ソルビトール添加および糖質非添加の PBS 中で *S. gordonii* と共培養した *P. gingivalis* を回収し、(1) と同様にメタボローム解析を行った。また、同様の条件で、*P. gingivalis* と共培養した *S. gordonii* 菌体から抽出した代謝産物に対してもメタボローム解析を実施した。これらの結果を用いて、主成分分析を行った。

(4) *Filifactor alocis* メタボローム解析

10%エリスリトール添加、10%ソルビトール添加および糖質非添加の PBS 中で培養した *F.*

alocis ATCC35896 菌体から抽出した菌体内イオン性代謝産物に対して、(1) と同様にメタボロームの網羅的解析を実施した。

4. 研究成果

(1) エリスリトール存在下での *P. gingivalis* のメタボロームプロファイルの変化を解析したところ、複数の主要代謝経路に明らかな変化がみられた。特に核酸合成経路、ペントースリン酸経路およびアミノ糖・ヌクレオチド糖代謝経路では糖質非添加対照群と比較して、明らかな抑制がみられた。また、糖利用のない *P. gingivalis* においては糖新生経路にも特徴的な変化がみられた。これにより、エリスリトールは *P. gingivalis* の核酸合成や菌体構成物質の合成を阻害することなどにより、そのバイオフィーム形成に抑制する可能性が示された。

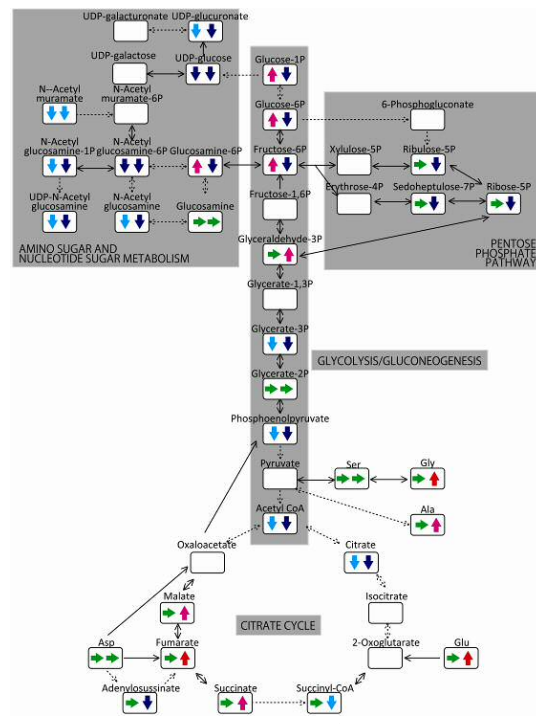


図1. エリスリトール存在下における *P. gingivalis* 主要代謝経路の変化

各代謝物質における左側の矢印は低濃度エリスリトール存在下、右側の矢印は高濃度エリスリトール存在下での変化を示す。上向き矢印は増加傾向、右向き矢印は変化なし、下向き矢印は減少を示す (エリスリトール非添加群と比較)。

(2) エリスリトール存在下での *S. gordonii* のメタボロームプロファイルの変化を解析したところ、*P. gingivalis* と同様に核酸合成経路やアミノ糖・ヌクレオチド糖代謝経路、

などの複数の経路に明らかな抑制がみられた。また、糖利用能のない *P. gingivalis* とは異なり、糖利用能のある *S. gordonii* においては解糖経路での抑制がみられた。これにより、エリスリトールは *P. gingivalis* に対してと同様に *S. gordonii* の核酸合成経路などを阻害することで、そのバイオフィーム形成に抑制的に働く可能性が示された。また、糖からのエネルギー獲得にも影響していると考えられる。

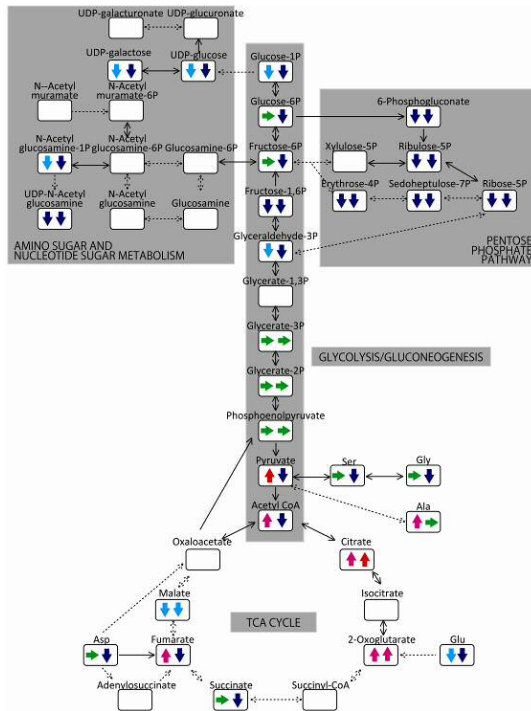


図2. エリスリトール存在下における *S. gordonii* 主要代謝経路の変化
図中の矢印は図1と同様

(3) いくつかの糖アルコール存在下において *S. gordonii*-*P. gingivalis* 混合バイオフィームは糖質非添加対照群に比較して形成が抑制されるが、形成された混合バイオフィームの抑制率や微細構造は、各糖アルコールによって異なることが研究開始以前に明らかとなっている。(1)(2)で示した現象が糖アルコール共通の作用であるかを検討するために、*S. gordonii* および *P. gingivalis* の各菌に対し、エリスリトール処理群とソルビトール処理群とのメタボロームプロファイルの主成分解析を行った。糖アルコール非添加群に対し、糖アルコール共通の変化を示すメタボライト群がある一方で、エリスリトール群とソルビトール群においても明らかに異なる挙動を示すメタボライト群があることが確認された。

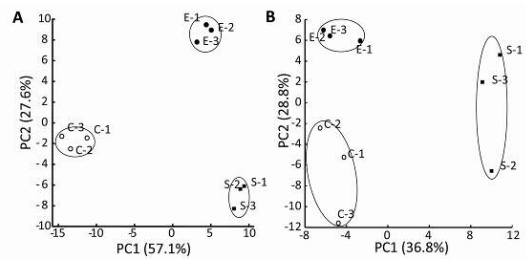


図3. エリスリトールおよびソルビトール存在下におけるメタボロームプロファイルの主成分分析(スコアプロット)

A: *P. gingivalis* メタボローム解析データ

B: *S. gordonii* メタボローム解析データ

E: エリスリトール添加群

S: ソルビトール添加群

C: 糖質非添加群

(4) エリスリトールあるいはソルビトール存在下での *F. alocis* のメタボロームプロファイルの変化を解析したところ、糖アルコール群共通の特徴として、核酸合成経路やアミノ糖・ヌクレオチド糖代謝経路、などの複数の経路に明らかな抑制がみられた。また、ソルビトール存在下において、*F. alocis* は酪酸やイソ吉草酸などの短鎖脂肪酸の産生を有意に増加させたが、エリスリトール存在下においては有意な変化が見られなかった。これにより、ソルビトール存在下において、*F. alocis* の歯周病原性が増強する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Hashino E, Kuboniwa M, Alghamdi A S, Amano A. Metabolome profiles of polyols-treated *Filifactor alocis*. 2nd Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region. Aug 21-23, 2013, Bangkok, Thailand
- ② Kuboniwa M, Tomio A, Alghamdi A S, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* biofilm dispersion triggered by exogenous polyamines. *Biofilms* 5, December 10-12, 2012, Paris, France
- ③ Alghamdi A S, 久保庭雅恵, 橋野恵衣, 天野敦雄. テルペノイド骨格生合成阻害剤が口腔バイオフィームに及ぼす影響. 第 23 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会, 2012 年 10 月 7 日, 大津

- ④ Hashino E, Kuboniwa M, Sekine S, Alghamdi A S, Amano A. Alteration of *Streptococcus gordonii* metabolomic profiles under sorbitol stress. The 10th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry. Sep 14-16, 2012, Ulaambaatar, Mongolia
- ⑤ Alghamdi A S, 久保庭雅恵, 橋野恵衣, 富尾紋子, 馬場健史, 福崎英一郎, 天野敦雄. Effects of polyamines on single species biofilms of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 2012 年 9 月 14 日, 郡山
- ⑥ 関根伸一, 橋野恵衣, 永田英樹, 天野敦雄: 歯肉由来 iPS 細胞を利用した樹状細胞は抗原特異的な抗体産生を誘導する. 第 61 回日本口腔衛生学会・総会, 2012 年 5 月 27 日, 横須賀
- ⑦ Hashino E. Erythritol alters metabolome profiles in periodontopathic biofilm-forming microbes. The Second Osaka Mahidol Chulalongkorn Joint Symposium. Oct 25, 2011, Bangkok, Thailand
- ⑧ 橋野恵衣, 久保庭雅恵, 黒田裕美子, 前田和彦, 小島美樹, 永田英樹, 天野敦雄. メタボロミクス解析によるエリスリトール存在下での *Porphyromonas gingivalis* 代謝プロファイルの検討. 第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 2011 年 10 月 10 日, 千葉
- ⑨ 前田和彦, 久保庭雅恵, 小島美樹, 黒田裕美子, 橋野恵衣, 東江正裕, 永田英樹. *Porphyromonas gingivalis* GAPDH は *Streptococcus oralis* GAPDH に特異的に結合する. 第 60 回日本口腔衛生学会・総会, 2011 年 10 月 9 日, 千葉
- ⑩ Hashino E, Kuboniwa M, Amano A. Metabolome profiles in *Porphyromonas gingivalis* under erythritol stress. 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Oct 8, 2011, Hiroshima, Japan
- ⑪ 久保庭雅恵, Alghamdi Samar, 橋野恵衣, 天野敦雄. パラアミノ安息香酸による *Porphyromonas gingivalis* の菌体内メタボロームプロファイルの変化. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2011 年 10 月 2 日, 岐阜
- ⑫ Kuboniwa M, Kuroda Y, Hashino E,

Alghamdi S, Hackett M, Lamont RJ, Amano A. Metabolome profiles in *Streptococcus gordonii* co-cultured with *Porphyromonas gingivalis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep 10, 2011, Sapporo, Japan

- ⑬ Kuboniwa M, Alghamdi S, Hashino E, Lamont RJ, Amano A. Metabolome profiles in *Porphyromonas gingivalis* stimulated with exogenous para-aminobenzoate. 7th International Conference of the Metabolomics Society, Jun 29, 2011, Caines, Australia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋野 恵衣 (HASHINO EI)
大阪大学・歯学部附属病院・特任助教
研究者番号：90614553