

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593150

研究課題名(和文) 歯周病原性バイオフィーム構成細菌の生活環を制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of phenotype alteration between planktonic and biofilm in *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

久保庭 雅恵 (Kuboniwa, Masae)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00303983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、歯周病原性菌がプランクトニックな状態からバイオフィーム構成細菌となる現象がどのような分子基盤によって制御されているのかを詳細に明らかにし、歯周病原性バイオフィームを特異的に制御する有効な手段を見出し、歯周病予防に役立てることを最終的な目的としている。

その一環として、まず口腔常在菌 *S. gordonii* から歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* へと受け渡されていると考えられるパラアミノ安息香酸(pABA)による歯周病原性バイオフィーム形成への影響を検討することとした。その結果、pABAは同菌の線毛の発現を亢進させ、糖新生を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： *S. gordonii* cbe (chorismate binding enzyme: pABA syntase) deficient mutant developed short and flat biofilms, and failed to support *P. gingivalis* accumulation. In the low concentration of pABA (0.05 and 0.1 mg/ml), *P. gingivalis* levels increased although the biofilms retained the low and flat morphology. In contrast, 5 mg/ml of pABA drastically changed the microstructure of the mixed biofilms with prominent peaks and channels appearing, and this phenomenon was observed in both WT-*P. gingivalis* and DCBE-*P. gingivalis*. Incubation of *P. gingivalis* with pABA resulted in elevated ($p < 0.01$) transcription of genes encoding both short and long fimbriae (*mfa1* and *fimA*) and *LuxS*, which are required for the initial accumulation of *P. gingivalis* on streptococcal substrates.

Conclusion: The results suggest that Cbe of *S. gordonii* is essential for maturation of *S. gordonii*-*P. gingivalis* communities, and pABA is involved in communication with *P. gingivalis*.

研究分野：予防歯科学

キーワード：バイオフィーム 歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* パラアミノ安息香酸

1. 研究開始当初の背景

デンタルプラーク形成はまず *Streptococcus* 属, *Actinomyces* 属, *Veillonella* 属などに代表される初期付着菌が歯面ペリクルに付着・定着することから開始される。初期付着菌が歯面定着後に増殖し、バイオフィーム形成の第二段階であるマイクロコロニー形成に至ると、多くの菌種との強い共凝集活性を有し、細菌凝集塊である corn-cob の芯となる仲介菌 *Fusobacterium nucleatum* や、最も強力な病原性を有する後期付着菌 *P. gingivalis* などのグラム陰性桿菌がバイオフィームに取り込まれ、より複雑な混合菌種バイオフィームのマクロコロニー形成が始まる。これらの菌の組合せにおいて、*P. gingivalis* と凝集能を有する初期付着菌のなかでも、*P. gingivalis* との混合バイオフィーム形成能に差異があることが報告され、*S. gordonii* は最も有力な *P. gingivalis* 混合バイオフィーム形成時のパートナー菌種のひとつであることが示されている [Periasamy, S. and Kolenbrander P. E. (2009) J Bacteriol 191:6804-11]。

我々はこれまでに、*S. gordonii* のランダムノックアウトライブラリを用い、*P. gingivalis* との混合バイオフィーム形成に関与する遺伝子を網羅的に解析し、コリスミ酸結合性酵素遺伝子 *cbe* など、計 10 個の遺伝子が関与していることを明らかにしてきた。*Cbe* は、そのアミノ酸配列より、基質としてコリスミ酸を基質とし、パラアミノ安息香酸 (pABA) を産生する酵素であることが予想された。

2. 研究の目的

本研究においては、歯周病原性菌がプラנקトニックな状態からバイオフィーム構成細菌となり、その後バイオフィームからの乖離を経て、再びプラנקトニックな状態となって感染拡大に至るまでの生活環がどのような分子基盤によって制御されているのかを明らかにし、歯周病原性バイオフィームを特異的に制御する有効な手段を見出し、歯周病予防に役立てることを最終的な目的としている。

その一環として、まず口腔常在菌から歯周病原性菌 *P. gingivalis* へと受け渡されていると考えられる pABA による歯周病原性菌 *P. gingivalis* のバイオフィーム形成への影響を詳細に検討することとした。

3. 研究の方法

1) バイオフィーム形成に pABA が果たす役割の解析

pABA の培地への添加による *S. gordonii* Cbe 変異株と *P. gingivalis* との混合バイオフィーム形成能の回復確認
S. gordonii, *P. gingivalis* をヨウ化ヘキシジウム、FITC を用いてそれぞれ生染色し、

*in vitro*にてさまざまな濃度の pABA 存在下で混合菌種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画像データを取得し、3D 画像解析ソフトを用いて *S. gordonii* - *P. gingivalis* 混合菌種バイオフィーム中でのボリュームをそれぞれ測定する。

pABA 存在下で培養した *P. gingivalis* の遺伝子発現状態、タンパク質発現状態および菌体内メタボロームプロファイルの変化をマルチオミクスによって解析し、pABA によって発現状態が変化する *P. gingivalis* の分子群を明らかにする。

2) RNA ポリメラーゼ 54 因子がバイオフィーム形成と菌体乖離に及ぼす影響

P. gingivalis 54 遺伝子変異株および過剰発現株を作出し、54 因子が窒素代謝、バイオフィーム形成およびバイオフィームからの菌体乖離に果たす役割を明らかにする。

4. 研究成果

1) バイオフィーム形成に pABA が果たす役割

pABA の培地への添加による *S. gordonii* Cbe 変異株と *P. gingivalis* との混合バイオフィーム形成能の回復確認

pABA の培地への添加によって *S. gordonii* Cbe 変異株と *P. gingivalis* との混合バイオフィーム形成が濃度依存的に回復することが確認された。

マルチオミクスによる pABA 存在下で培養した *P. gingivalis* の遺伝子発現状態・タンパク質発現状態およびメタボロームプロファイルの検討。

pABA を取り込んだ *P. gingivalis* 菌体にどのような変化が生じているのかを観察するため、病原遺伝子群の発現状態を定量 RT-PCR で測定し、さらにプロテオミクスおよびメタボロミクスの手法を用いてタンパク質および代謝産物の網羅的解析を実施した。その結果、1) pABA 濃度依存的に線毛遺伝子 *fimA*, *mfa1* の発現が亢進し、タンパク質レベルでも *FimA* 線毛、*Mfa* 線毛の発現量が有意に増加していること、2) 異種細菌間シグナル伝達物質であるオートインデューサー 2 の産生に関与する葉酸誘導体経路およびメチオニン代謝経路が活性化すること、3) バイオフィームのマトリックス形成に必要な核酸糖やアミノ糖の産生量が増加していること、4) リジン、スレオニン、グルタミン以外の全てのアミノ酸が減少していること、5) スペルミジン、N8-アセチルスペルミジンなどのポリアミン類は、コントロール群では検出されるものの、pABA 処理群では検出出来ないレベルまで減少して

いること、などが明らかとなった。

2)RNA ポリメラーゼ 54 因子がバイオフィルム形成と菌体乖離に及ぼす影響

P. gingivalis 54 遺伝子変異株および過剰発現株の作出

KEGG データベースより *P. gingivalis* ATCC33277 株の 54 遺伝子 (PGN_1202) 情報を取得し, erythromycin 耐性遺伝子 *ermF* との ORF 置換によるノックアウト株を作出することを試みたが, 変異株を得ることができなかった。同遺伝子の機能が生育に必須であると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 50 件)

● 英文総説

1. Amano A*, Kuboniwa M, Takeuchi H (2014): Transcellular invasive mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* in host-parasite interactions. *J Oral Biosci*, 56:58-62. doi:10.1016/j.job.2014.02.001 (査読有)
2. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M (2012): Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 9(3):311-323. doi: 10.1586/epr.12.16. (査読有)

● 英文原著論文

3. Inaba H*, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A (2014): *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cellular Microbiology* 16:131-145. doi: 10.1111/cmi.12211. (査読有)
4. Hashino E, Kuboniwa M*, Alghamdi S, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H, Amano A (2013): Erythritol alters microstructures and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Oral Microbiology*, 28(6):435-451. doi: 10.1111/omi.12037. (査読有)
5. Yamaguchi M, Noiri Y*, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Hayashi M, Ebisu S (2013): *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. *Eur J Oral Sci*, 121(3 Pt 1): 162-168.

doi:10.1111/eos.12050 (査読有)

6. Yamamoto R, Noiri Y*, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S (2013): The sinR ortholog PGN_0088 encodes a transcriptional regulator that inhibits polysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 biofilms. *PLoS One*, 8:e56017. doi:10.1371/journal.pone.0056017 (査読有)
 7. Maeda K*, Nagata H, Kuboniwa M, Ojima M, Osaki T, Minamino N, Amano A (2013): Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Infection and Immunity*, 81(3): 753-763. doi:10.1128/IAI.00875-12 (査読有)
 8. Hamasaki M[†], Furuta N[†], Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Ohmori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A*, Yoshimori T* (2013): Autophagosome forms at the ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441): 389-393. [†]Equal contributors. doi:10.1038/nature11910 (査読有)
 9. Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K*, Inaba H, Kuboniwa M, Hirai N, Shirai M, Kato Y, Murakami M, Naka S, Iwai S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, Amano A, Asai F (2012): Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new *fimA* genotype. *Veterinary Microbiology*, 161(1): 196-205. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.026 (査読有)
 10. Inaba H*, Kuboniwa M, Sugita H, Lamont RJ, Amano A (2012): Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* in human trophoblasts. *Infection and Immunity*, 80(8):2847-2857. doi:10.1128/IAI.00258-12 (査読有)
- #### ● 和文総説
11. 久保庭雅恵 (2013) : 歯周病とメタボリックシンドローム. **メディカル・ビューポイント (MVP)** 34(12):4 (査読無し)
- #### ● 和文原著論文
12. 久保庭雅恵, 天野敦雄 (2015) : 歯周病菌高感度検出キット「バナペリオ」と位

相差顕微鏡を組み合わせた“歯周病リスクの評価”. **デンタルハイジーン** 35: 90 (査読無し)

[学会発表](計69件)

● 国際シンポジウム

1. Kuboniwa M, Al-ghamdi SA, Hashino E, Sakanaka A, Amano A: Effect of agmatine on biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. International conference of the gums & joints consortium, 2014/3/5, Ustroń (Poland).

2. Kuboniwa M: Cycle between planktonic and sessile cells: Phenotypic changes during subgingival biofilm development and disassembly. The 2nd International Joint Symposium of Oral and Dental Sciences in Commemoration of the 64th Anniversary of the Faculty of Dentistry, Universitas Gadjah Mada, 2013/1/18, Yogyakarta (Indonesia).

● 国際一般講演

3. Sakanaka A, Kuboniwa M, Takeuchi H, Hashino E, Amano A: A putative arginine-ornithine antiporter ArcD in *Streptococcus gordonii* controls *de novo* arginine biosynthesis, low pH tolerance and biofilm formation. FEBS · EMBO meeting, 2014/9/4, Paris (France).

4. Hashino E, Kuboniwa M, Sakanaka A, Amano A: Effect of arginine metabolic pathways on periodontopathic biofilms formation. Metabolomics 2014, 2014/6/25, Tsuruoka (Japan).

5. Hashino E, Kuboniwa M, Alghamdi S, Cho H, Amano A: Metabolome profiles of polyol-treated *Filifactor alocis*. 2nd meeting of IADR-Asia Pacific Region, 2013/8/21, Bangkok (Thailand).

6. Kuboniwa M, Tomio A, Alghamdi S, Hashino E, Sugita H, Bamba T, Fukusaki E, Amano A: Oral biofilm dispersion triggered by exogenous polyamines. 88th General session of the IADR, 2013/3/22, Seattle (USA).

7. Kuboniwa M, Tomio A, Alghamdi AS, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A: *Porphyromonas gingivalis* biofilm dispersion triggered by exogenous polyamines. Biofilms 5, 2012/12/11, Paris (France).

8. Hashino E, Kuboniwa M, Sekine S, Alghamdi As, Amano A: Alteration of

Streptococcus gordonii metabolomic profiles under sorbitol stress. 10th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2012/9/15, Ulaanbaatar (Mongolia).

● 国内シンポジウム

9. 久保庭雅恵:歯周病研究へのメタボロミクスの応用:シンポジウム「トレンドメーカーによるサイエンティフィック・エクステンジ」第63回口腔衛生学会, 2014年5月30日, 熊本市市民会館/熊本市国際交流会館(熊本市, 熊本)

10. 久保庭雅恵:口腔バイオフィルム研究へのメタボロミクスの応用:セミナー「メタボローム研究の疾患への応用を目指して」千里ライフサイエンスセミナーE1, 2013年5月27日, 千里ライフサイエンスセンタービル(吹田市, 大阪)

● 国内一般講演

11. 坂中哲人、久保庭雅恵、竹内洋輝、橋野恵衣、天野敦雄: PotD が *Streptococcus gordonii* の酸性環境中でのバイオフィルム形成に及ぼす影響. 第25回近畿・中国・四国口腔衛生学会, 2014年10月5日, 兵庫県歯科医師会館(神戸市, 兵庫)

12. 坂中哲人、久保庭雅恵、橋野恵衣、天野敦雄:口腔清掃状態の唾液メタボロームへの影響. 第63回口腔衛生学会, 2014年5月30日, 熊本市市民会館/熊本市国際交流会館(熊本市, 熊本)

13. 泉井秀介、関根伸一、高田明比古、前田和彦、久保庭雅恵、永田英樹、天野敦雄:クルクミンが歯周病菌の生育およびバイオフィルム形成に及ぼす影響. 第63回口腔衛生学会, 2014年5月30日, 熊本市市民会館/熊本市国際交流会館(熊本市, 熊本)

14. 稲葉裕明、久保庭雅恵、天野敦雄: *Porphyromonas gingivalis* 感染がヒト口腔癌細胞の浸潤能に及ぼす影響. 第62回口腔衛生学会, 2013年5月17日, キッセイ文化ホール(松本市, 長野)

15. 前田和彦、永田英樹、小島美樹、天野敦雄: *Porphyromonas gingivalis* MDH の混合バイオフィルム形成に及ぼす阻害効果. 第62回口腔衛生学会, 2013年5月17日, キッセイ文化ホール(松本市, 長野)

16. 久保庭雅恵、稲葉裕明、Alghamdi S、橋野恵衣、天野敦雄:歯肉上皮細胞由来ポリアミンが *Porphyromonas gingivalis* の病原性に及ぼす影響. 第62回口腔衛生

学会, 2013年5月17日, キッセイ文化ホール(松本市, 長野)

17. 関根伸一、橋野恵衣、久保庭雅恵、永田英樹、天野敦雄: 小型印刷電極を用いた *P. gingivalis* II 型線毛株検出システムの臨床応用 第 62 回口腔衛生学会, 2013年5月17日, キッセイ文化ホール(松本市, 長野)
18. Inaba H, Kuboniwa M, Amano A: Multiple pathways regulate apoptosis induced by periodontal pathogen in trophoblast. 第 60 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 2012年12月14日, 朱鷺メッセ(新潟市, 新潟)
19. 富尾紋子、Alghamdi AS、久保庭雅恵、天野敦雄、馬場健史、福崎英一郎: Evaluation of effects of polyamines on biofilm formation in *Porphyromonas gingivalis* by metabolomics. 第 64 回生物工学会大会, 2012年10月25日神戸国際会議場(神戸市, 兵庫)
20. Alghamdi AS、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 回歯科基礎医学学会学術大会, 2012年9月14日, 奥羽大学(郡山市, 福島)
21. 前田和彦、永田英樹、久保庭雅恵、小島美樹、天野敦雄: *Porphyromonas gingivalis* の AbfD はバイオフィルム形成に關与する. 第 61 回日本口腔衛生学会, 2012年5月27日, 神奈川歯科大学(横須賀市, 神奈川)

〔図書〕(計7件)

1. Kuboniwa M, Amano A (2012): Chapter 10. Genotyping of periodontal anaerobic bacteria in relationship to pathogenesis. pp. 149-166. In de Filipis I, McKee ML (ed.), Molecular typing in bacterial infections. Springer, NY, U.S.A..
2. Kuboniwa M, Hendrickson EL, Xia Q, Wang T, Xie H, Hackett M, Lamont RJ (2012): Chapter 13. Proteomics of *Porphyromonas gingivalis*. pp. 209-223. In Santos DM (ed.), Recent advances in Microbiology. Apple academic press, NJ, U.S.A.
3. Kuboniwa M, Hendrickson EL, Xia Q, Wang T, Xie H, Hackett M, Lamont RJ (2012): Confocal laser scanning microscopy of *P. gingivalis*-*F. nucleatum*-*S.*

gordonii community. Image ID: 63445. In Biology image library. BioMed Central, London, U.K.

4. 久保庭雅恵 (2012): Chapter3. 歯周病病因論・感染因子 1. バイオフィルムに生息する歯周病菌: 天野敦雄, 村上伸也, 岡 賢二(編) 歯周病を科学する, クインテッセンス出版, 東京.

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~prevent/research03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保庭 雅恵 (Kuboniwa Masae)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 00303983

(2) 研究分担者

古田 信道 (Furuta Nobumichi)
大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号: 50452446
小島 美樹 (Ojima Miki)
大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号: 20263303

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

(3) 連携研究者

天野 敦雄 (Amano Atsuo)
研究者番号: 50193024