



Title	口腔バイオフィルムの栄養的な連係を強化する <i>Fusobacterium nucleatum</i> の代謝特性と歯周病への影響
Author(s)	坂中, 哲人; 久保庭, 雅恵; 天野, 敦雄
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2024, 68(2), p. 27–30
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101991
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

口腔バイオフィルムの栄養的な連係を強化する *Fusobacterium nucleatum* の代謝特性と歯周病への影響

坂中 哲人*, 久保庭 雅恵*, 天野 敦雄*

(令和6年4月22日受付)

はじめに

バイオフィルムは多種多様な微生物の共生体であり、人体の中でも口腔との親和性が高く、歯周病の直接的な原因となる。近年、口腔バイオフィルムの「多即一」という二面性、即ち多の振る舞いが一つの機能として統合されるダイナミズムが病因の一つとして注目されている¹⁾。*Fusobacterium nucleatum* は豊富な接着因子を介して多くの口腔細菌と結合する特性が知られているが、代謝物の交換を通じた異種細菌間の栄養的な相互作用については不明な点が多い。我々は以前、初期定着菌 *Streptococcus gordonii* が ArcD 輸送体を介してオルニチンを放出し、それが *F. nucleatum* のバイオフィルムを増加させることを示した²⁾。本研究では新たに口腔常在菌 *Veillonella parvula* を加え、*F. nucleatum* のバイオフィルム内での栄養的な役割や歯周病への影響を探求した。

異種細菌間の栄養的な連係を介した

F. nucleatum の代謝変動

Transwell を使用して物理的に細菌を分離しつつ代謝物の交換を可能にし、*S. gordonii* または *V. parvula* との共培養下における *F. nucleatum* の細胞内外の代謝物の変化を調査した。その結果、*S. gordonii* との共培養ではオルニチンの上清濃度が 24.7 倍に増加し、*F.*

nucleatum の細胞内でプロテシンが 4.2 倍に増加することが確認された。また酪酸の細胞外濃度も 9.4 倍に増加した。*V. parvula* との共培養ではカダベリンの上清濃度が増加し、*F. nucleatum* の細胞内でリジンが有意に増加した。*F. nucleatum* はオルニチンおよびリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子 (FN0501) を有し、これがプロテシンとカダベリンの産生に寄与すると考えられる。リアルタイム RT-PCR により、この遺伝子の発現は *S. gordonii* および *V. parvula* と共に培養時に 20 倍以上増加することが確認された。したがって、*F. nucleatum* がこれらの細菌から放出されるオルニチンとリジンを取り込み、プロテシンとカダベリンを生成することが示唆された (図 1)。

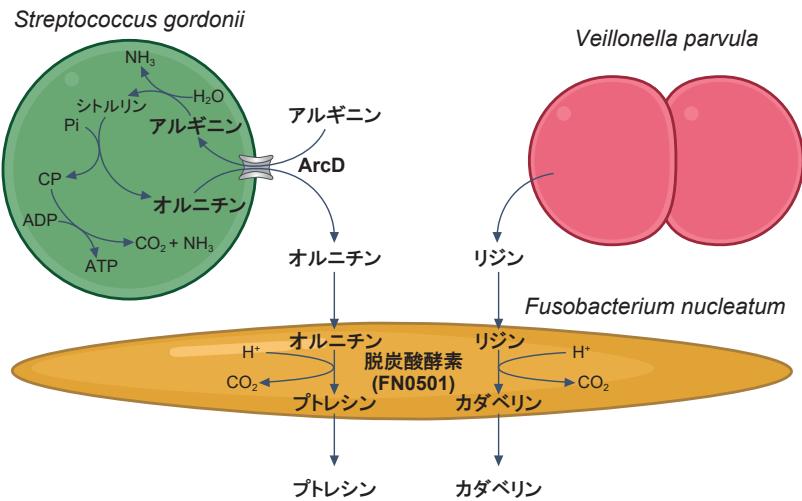
この栄養的な連係をさらに検証したところ、*F. nucleatum* と *S. gordonii* 野生株との共培養でプロテシンが生成される一方、*S. gordonii* ΔarcD 変異体との共培養ではプロテシンの生成が大きく減少した。従って、*F. nucleatum* によるプロテシンの生成は、*S. gordonii* の ArcD を介したオルニチンの放出に依存することが示された。

栄養的な連係によるポリアミンの産生が歯周病原性バイオフィルムに及ぼす影響

以上の結果は、異種細菌間の化学的な相互作用により *F. nucleatum* のポリアミン産生が誘導されることを示すものである。

* 大阪大学大学院歯学研究科 予防歯科学講座

本総説の内容の一部は、令和6年2月29日に開催された大阪大学歯学会第136回例会において、令和5年度弓倉奨励賞の受賞講演（対象論文：Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, Alghamdi SA, Mayumi S, Lamont RJ, Fukusaki E, Amano A. (2022) : *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. *mSystems*, 7 (4), e0017022.）として発表した。

図1 異種細菌間の栄養的な連係を介した *F. nucleatum* のポリアミン産生

示している。この知見を基に、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルムの表現型に対する主要な生理活性ポリアミン（putrescine, spermidine, spermine, cadaverine）の影響を評価した。各ポリアミンを *P. gingivalis* バイオフィルムに添加して 12 時間嫌気培養し、Live/Dead 試薬で染色してバイオフィルム形成量を評価したところ（生細胞 = 緑、死細胞 = 赤）、putrescine, cadaverine, spermidine でバイオフィルムの増加を認めた（図 2A）。特に putrescine は、バイオフィルムだけでなく浮遊凝集塊の増加も認めた一方、cadaverine は浮遊凝集塊の少ない堅固なバイオフィルムを形成した。さらに、洗浄手順がバイオフィルムの脱離に影響する可能性を排除した前染色法を用いても、putrescine の用量依存的なバイオフィルムの形成と浮遊凝集塊の増加が観察された（図 2B）。以上より、これらのポリアミンが *P. gingivalis* のバイオフィルムの表現型に異なる影響を及ぼすこと、特に putrescine はバイオフィルムのライフサイクル（付着、成熟、脱離、再付着）を加速させることが示唆された。さらに、*F. nucleatum* と *S. gordonii* 野生株の共培養から得られた無細胞上清が、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成を促進することが確認された（図 2C）。また、アルギニン存在下での *F. nucleatum*, *S. gordonii*, *P. gingivalis* 三種混合バイオフィルム形成実験において、ArcD の欠損は *P. gingivalis* のバイオフィルムと浮遊凝集塊の減少をもたらしたが、他の種に有意な変化は見られなかった（図 2D, E）。我々は以前、ArcD の欠損が *S. gordonii* の単独または *P. gingivalis* との混合

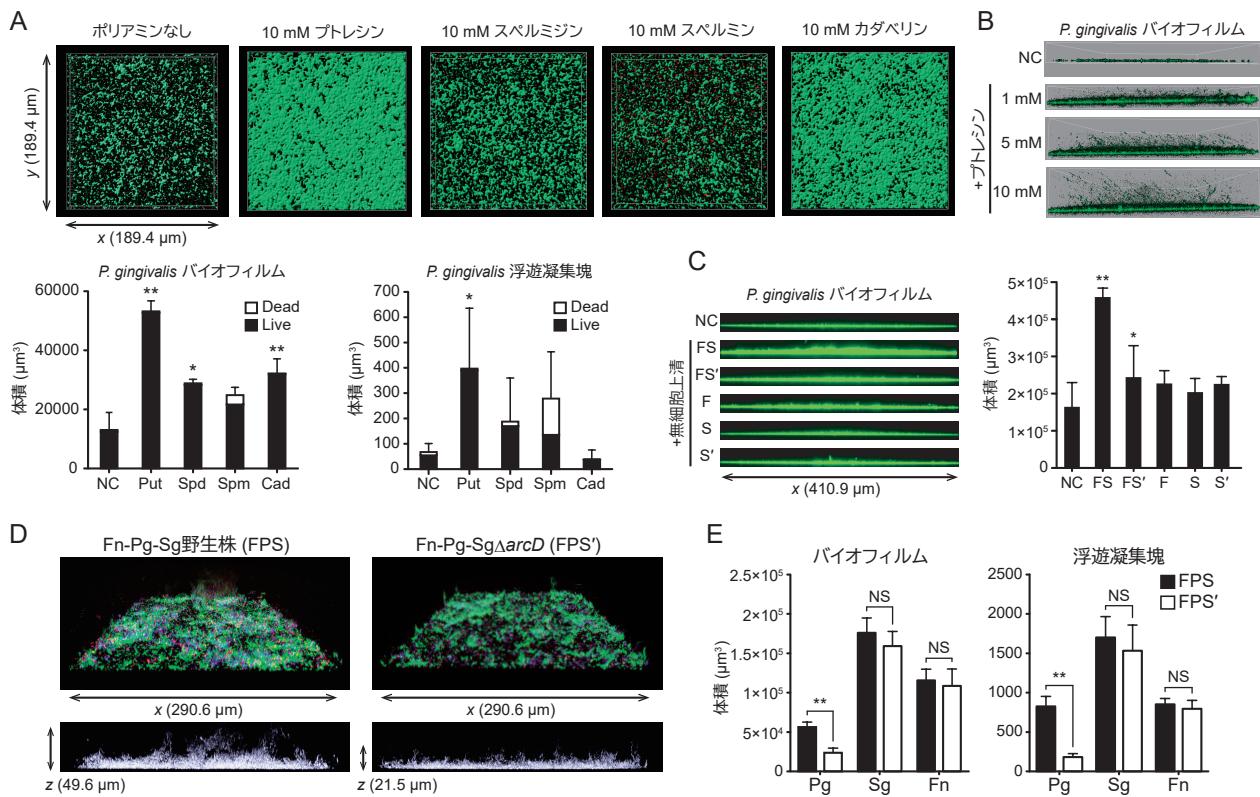
バイオフィルムに影響しないことを報告している²⁾。したがって *S. gordonii* と *F. nucleatum* の ArcD 依存的な putrescine 生成が *P. gingivalis* のバイオフィルムの表現型を変化させ、病原性を高めることが示唆された。

ヒト歯垢試料を用いた仮説の検証

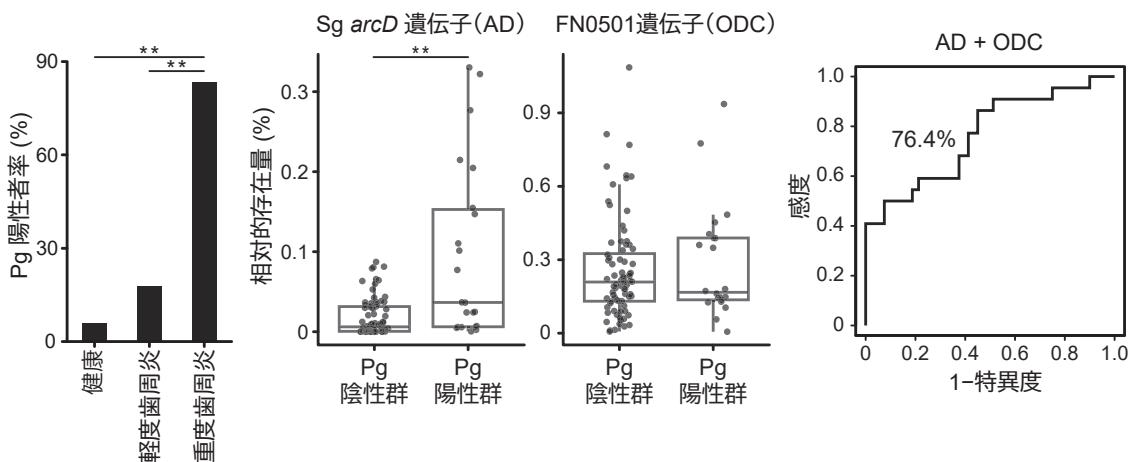
上記知見のヒト口腔内での臨床的妥当性を検証するために、健康な 102 名の被験者から採取した歯垢試料を分析し、*P. gingivalis*, *S. gordonii* の arcD 遺伝子および *F. nucleatum* の FN0501 遺伝子の共起関係を調査した。その結果、*P. gingivalis* は歯周病患者で検出頻度が高く、*P. gingivalis* 陽性検体では *S. gordonii* の arcD 遺伝子量が増加し、arcD 遺伝子と FN0501 遺伝子の組み合わせは *P. gingivalis* 検出予測に高い精度を示した（図 3）。これは、*S. gordonii* と *F. nucleatum* の putrescine 产生遺伝子が *P. gingivalis* と高い共起関係にあることを示している。以上より、口腔バイオフィルムでの *F. nucleatum* と初期定着菌との化学的相互作用が、*P. gingivalis* のバイオフィルム化と離脱を促進し、微生物共同体の高病原化に寄与する可能性が示された（図 4）。

おわりに

F. nucleatum は多くの接着因子を持ち、他菌種との共凝集能力が高いため、初期定着菌と *P. gingivalis* のような後期定着菌との橋渡し役としてバイオフィルム

図2 *P. gingivalis* バイオフィルムに対するポリアミンの影響

(A) ポリアミン添加による *P. gingivalis* バイオフィルムへの影響。Put = プトレシン, Spd = スペルミジン, Spm = スペルミン, Cad = カダベリン。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, Dunnett 検定。(B) プトレシンの用量依存的な *P. gingivalis* バイオフィルムへの影響。(C) *F. nucleatum* (F) と *S. gordonii* 野生株 (S) の共培養上清による *P. gingivalis* バイオフィルム形成促進効果。S' は *S. gordonii* $\Delta arcD$ 変異体。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, Dunnett 検定。(D) ArcD 欠損が三種混合バイオフィルム形成に及ぼす影響。緑が FITC 標識された *F. nucleatum*, 赤が HI 標識された *S. gordonii*, 白が DAPI 標識後, 視認性を高めるため白に変換された *P. gingivalis* バイオフィルム。 $**p < 0.01$, Mann-Whitney U 検定。

図3 *S. gordonii* と *F. nucleatum* によるプトレシン産生遺伝子モジュールと *P. gingivalis* の共起性

$**p < 0.01$, カイ二乗検定 (左棒グラフ)。 $**p < 0.01$, Mann-Whitney U 検定 (中央左箱ひげ図)。

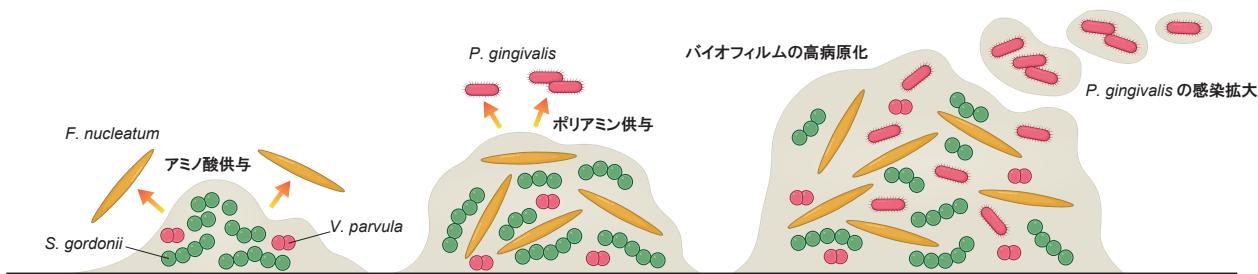


図4 口腔バイオフィルムの異種細菌間の相互作用が生む代謝変動と高病原化

を構造的に支持し、歯垢の成熟において中心的な役割を果たしていると一般に考えられている³⁾。しかしMark Welchらの研究で、健康な被験者から採取した歯肉縁上歯垢の細菌の空間配置が明らかとなり⁴⁾、歯肉縁上歯垢の構造的中心は*F. nucleatum*ではなく*Corynebacterium matruchotii*であり、同菌が歯面から放射状に配向し、周囲を多様な細菌が取り巻くヘッジホッグ様の凝集体を形成することが判明した。ヘッジホッグ中央辺縁部には*Fusobacterium*属が存在するが、明確な橋渡し構造は確認されていない。このため*F. nucleatum*が口腔バイオフィルムの構造的中心であるという従来の考え方は、少なくとも歯肉縁上においては見直されつつある。それでも*F. nucleatum*は、歯周病菌を含めたグラム陰性嫌気性菌との共凝集能力が高く、健康・歯周病に関わらず歯肉縁下歯垢から高頻度で検出され、歯周病が進行するとその代謝活動が高まることが示されている⁵⁾。我々の研究結果を考え合わせると、*F. nucleatum*は代謝ネットワークハブとして微生物共同体の栄養的なつながりを強化し、歯肉縁下バイオフィルムの構築および高病原化において中心的な役割を担っていることが示唆される。

謝 辞

本研究の遂行に際し、多大なるご支援や貴重なご指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学講座の天野敦雄名誉教授、久保庭雅恵教授、同工学研究科の福崎英一郎教授、新聞秀一准教授、米国ルイビル大学のリチャード・ラモント教授に、深甚なる感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Hajishengallis, G., Lamont, R. J. and Koo H. (2023): Oral polymicrobial communities: Assembly, function, and impact on diseases. *Cell Host Microbe*, **31**, 528–538.
- 2) Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Takeuchi, H., Hashino, E. and Amano, A. (2015): Arginine–ornithine antiporter ArcD controls arginine metabolism and interspecies biofilm development of *Streptococcus gordonii*. *J Biol Chem*, **290**, 21185–21198.
- 3) Kolenbrander P. E., Palmer Jr. R. J., Rickard A. H., Jakubovics N. S., Chalmers N. I. and Diaz P. I. (2006): Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*, **42**, 47–49.
- 4) Mark Welch J. L., Rossetti B. J., Rieken C. W., Dewhurst F. E. and Boris J. G. (2016): Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, 791–800.
- 5) Solbiati J. and Frias-Lopez J. (2018): Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J Dent Res*, **97**, 492–500.