The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Fusobacterium nucleatumとの栄養共生における Streptococcus gordoniiアルギニン・オルニチンアンチポーターArcDの機能解析
Author(s)	坂中, 哲人; 久保庭, 雅恵; 天野, 敦雄
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2016, 61(1), p. 1-4
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60649
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

阪大歯学誌　61(1)：1～4，2016

Fusobacterium nucleatum との栄養共生における *Streptococcus gordonii* アルギニン・オルニチンアンチポーター ArcD の機能解析

坂中哲人*，久保庭雅恵*，天野敦雄*

（平成 28 年 1 月 27 日受付）

はじめに

これまで歯周病は数種の歯周病菌種による混合感染と考えられてきた。しかし，近年，歯周病は単一の病原菌に起因するのではなく，常在菌を含めた多様な細菌種の相互作用の結果によりバイオフィルムの病原性が高まり発症に至る疾患，つまり細菌叢の乱れ（Dysbiosis）に由来する疾患であると捉えられるようになってきた[1)]。さらに，これまで病原性をもたない常在菌としか見なされていなかった*Streptococcus gordonii* など一部の口腔レンサ球菌群が，歯周病原性バイオフィルムの成熟過程において，歯周病関連菌種と様々な相互作用をすることが明らかとなってきた[2)]。この相互作用のひとつに細菌代謝物のやりとりがあり，菌種間での栄養共生が歯周病原性バイオフィルムの成熟，さらには高病原化の要因の一つであると考えられている。最近のメタゲノム研究において，歯周病患者のプラーク中でのアルギニン代謝に関連する遺伝子の変化が，疾患を特徴づける因子のひとつと示唆されたことから，アルギニン関連代謝物が特に注目されている[3)]。

S. gordonii はアルギニンを代謝して最終的にアンモニアと ATP を産生するアルギニンデイミナーゼ経路（ADS）を有している。そのため，同菌のアルギニン代謝は，主としてアルカリ産生によるう蝕制御の観点から論じられており，歯周病原性バイオフィルム内での栄養共生についてはあまり知られていない。また，ADS の一部を構成し，アルギニン・オルニチンアンチポーターであるとされる ArcD については，代謝物の輸送に関わることから栄養共生に関与する可能性がある。しかし，これまでに *S. gordonii* の ArcD を対象とした研究は行われていない。そこで本研究[4)]では *S. gordonii* の ArcD に着目し，ArcD の機能解析を行うとともに，歯周病原性バイオフィルム内での栄養共生における役割について検討を加えた。

ArcD の機能解析

S. gordonii arcD 遺伝子欠損株（Δ*arcD*）およびコンプリメント株（Comp *arcD*）を作製後，放射性標識したアルギニンを用いてその取り込み能を比較したところ，ArcD の高いアルギニン取り込み能が示された。また液体クロマトグラフィーを用いた上清中のオルニチン濃度測定の結果，Δ*arcD* のオルニチン排出能が有意に低下していることも示された。続いて ArcD が *S. gordonii* の代謝調節に果たす役割を評価するために，質量分析装置を用いて野生株・Δ*arcD* 間での菌体内代謝物プロファイルを比較した。検出された 233 個の代謝物に基づいて Metabolite set enrichment analysis を行い各菌株を特徴づける代謝経路を抽出したところ，Δ*arcD* ではオルニチン回路が有意に高値を示すことが分かった。そこでオルニチン近傍の代謝に注目したところ，ADS の最終代謝産物であるアンモニアと ATP が Δ*arcD* で有意に減少していたのに対し，ADS の中間代謝物であるオルニチン・シトルリンは劇的に増加していた（図 1）。その一方で，アルギニン生合成経路上の代謝物の多くが，Δ*arcD* で有意に減少していた。

＊　大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座（予防歯科学教室）

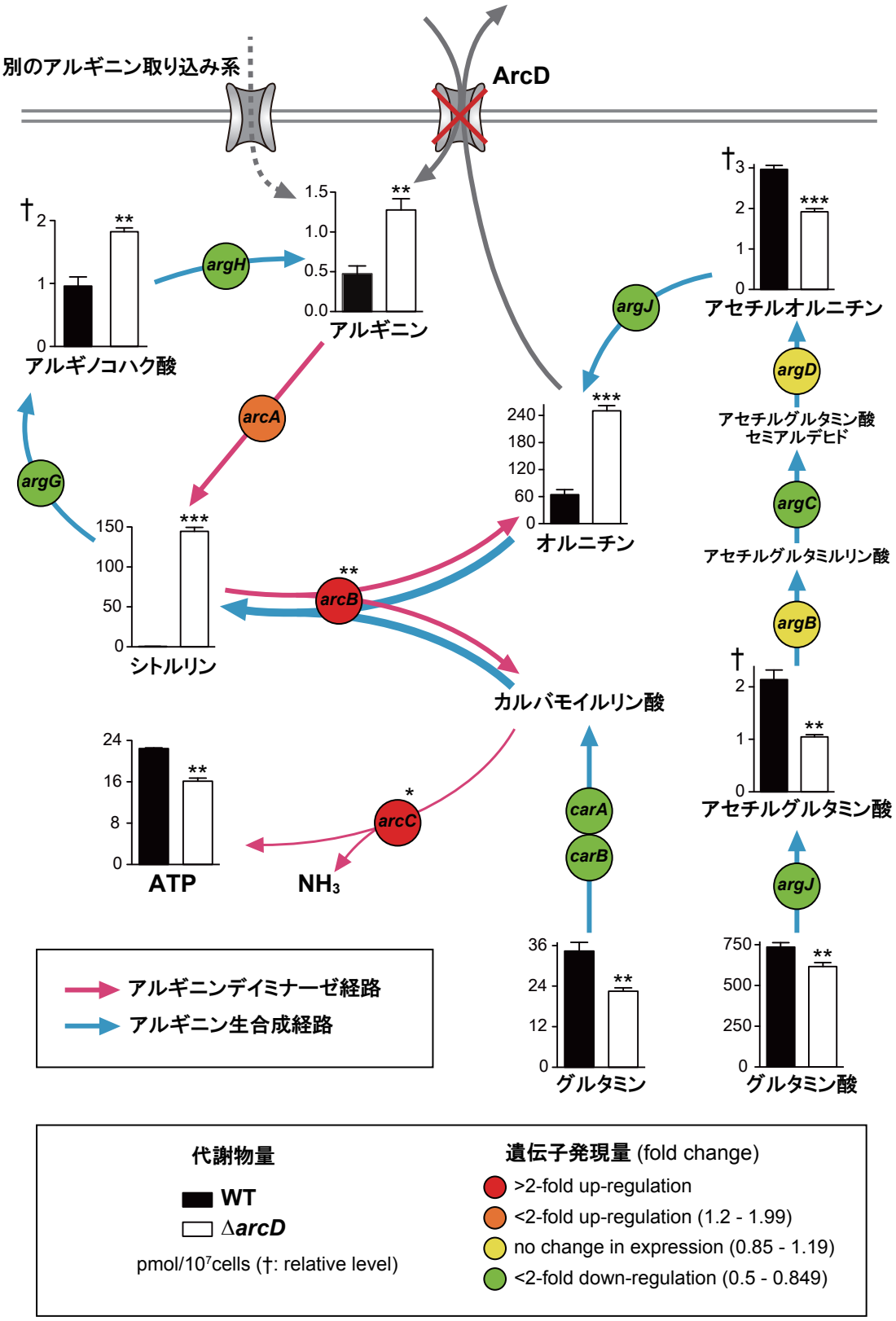

図 1　Δ *arcD* のアルギニン代謝変化

アルギニンを含んだ最小培地で 8 時間培養後，菌体を回収し，野生株・Δ*arcD* 間で代謝物・遺伝子発現プロファイルの変化を比較した。Δ*arcD* 菌体内ではオルニチンが適切に排出されないことが引き金となり，アルギニン代謝に攪乱が生じ，アルカリ産生能および ATP 産生能が低下している。棒グラフは平均値 ± 標準偏差を示す。$^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, n = 3, two-tailed *t* test. 文献 4 より改変・転載。

この代謝変動のメカニズムを探るために，リアルタイム RT-PCR を行い関連する酵素の発現量を調べたところ，Δ*arcD* では ADS 上の酵素の発現が軒並み上昇していたのに対し，アルギニン生合成経路上の酵素の発現は低下していた。この中で，シトルリンをオルニチンに変換する酵素反応は可逆的であることが知られている[4)]。従って，一連の結果の一つの解釈として，Δ*arcD* ではオルニチン排出が不能となりオルニチンが蓄積し，その結果反応が逆回りしてオルニチン回路上の代謝物が滞留するとともに，カルバモイルリン酸が枯渇して ATP とアンモニアの産生量が減少したと考えられた。さらにオルニチン回路の停止によりアルギニンが増加した結果，ネガティブフィードバック制御が働きアルギニン生合成が抑制されるとともに，ADS 上の酵素の発現が上昇した可能性が考えられた。以上のことから，ArcD を介したオルニチンの放出がアルギニン代謝の恒常性を維持していることが示唆された。

ArcD を介した栄養共生の探索

アルギニン関連代謝物を介した歯周病原性バイオフィルムにおける栄養共生の可能性を探るため，複数菌種による実験的バイオフィルム形成モデルを用いて *S. gordonii* 野生株，Δ*arcD* 株，Comp *arcD* 株のそれぞれについて，歯周病原性バイオフィルムの成熟過程における仲介菌 *Fusobacterium nucleatum*，および歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* とのバイオフィルム形成能を評価した。まず *F. nucleatum* と *S. gordonii* 各菌株の混合バイオフィルム形成能を評価したところ，Δ*arcD* バイオフィルム上の *F .nucleatum* 菌量の有意な減少を認めた（図 2）。一方，オルニチン存在下では，*F. nucleatum* 単一バイオフィルムおよび Δ*arcD* との混合バイオフィルムいずれにおいても，*F. nucleatum* 菌量の回復を認めたことから，ArcD を介したオルニチンの放出が *F. nucleatum* との栄養共生に関与していることが示唆された。また *P. gingivalis* には *S. gordonii* の各菌株による有意な変化は見られなかったことから，ArcD を介したオルニチンによる栄養共生は菌種特異的なものであることが示唆された（図 3）。

おわりに

これまで *S. gordonii* のアルギニンデイミナーゼ経路上の酵素に関する研究は数多く行われているが，トラ

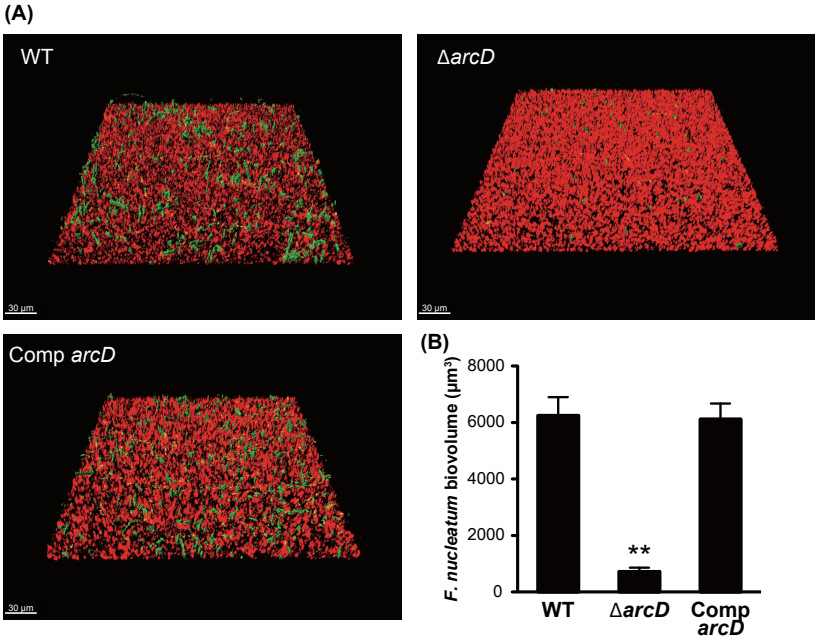

図 2　*S. gordonii* 各菌株上に形成された *F. nucleatum* バイオフィルム量の比較
（A）各菌株の共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）像。まず *S. gordonii* 各菌株を赤色蛍光色素で生染色後，チャンバースライドを用いて 16 時間培養し，底面にバイオフィルムを形成させ，浮遊菌を除去した後，緑色蛍光色素で生染色した *F. nucleatum* と PBS 中で 24 時間共培養し，CLSM でバイオフィルムを観察した。（B）*F. nucleatum* バイオフィルムの定量化（平均値±標準誤差）$^{**}p < 0.01$, n = 10, Dunnett test. 文献 4 より改変・転載。

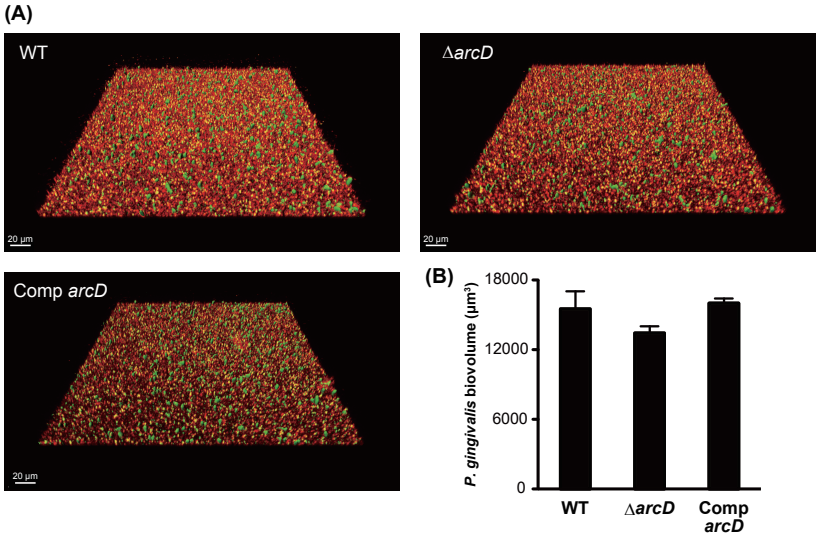

図 3　*S. gordonii* 各菌株上に形成された *P. gingivalis* バイオフィルム量の比較
（A）各菌株の CLSM 像。*S. gordonii*（赤）-*P. gingivalis*（緑）混合バイオフィルムは，*F. nucleatum* との混合バイオフィルムと同様の方法で形成させた。（B）*P. gingivalis* バイオフィルムの定量化（平均値±標準誤差）n = 10, Dunnett test. 文献 4 より改変・転載。

ンスポーターによる代謝調節に着目した研究はなく，本研究は *S. gordonii* のもつアルギニン・オルニチンアンチポーター ArcD に関する最初の包括的知見を提供した。また *S. gordonii* の ArcD は自身のアルギニン代謝の恒常性維持に重要なだけでなく，*F. nucleatum* とのオルニチンを介した栄養共生にも利用されていることが示唆された。*F. nucleatum* が歯周病原性バイオフィルムの成熟過程における仲介菌であることを考えると，オルニチンを介した細菌間相互作用が歯周病原性バイオフィルムの高病原化を引き起こし，歯周病への序章となる可能性が考えられる。近年 *S. gordonii* は栄養共生を介して歯周病菌の定着を促進する Accessory pathogen であるとして注目されている。今回得られた知見は *S. gordonii* の Accessory pathogen としての側面を提示するとともに，歯周病因論における代謝物を介した菌体間相互作用の重要性を示すものであると考えられる。

謝　辞

本研究の遂行にあたり，多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文　献

1）Hajishengallis, G. and Lamont, R. J.（2016）: Dancing with the stars: How choreographed bacterial interactions dictate nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. *Trends Microbiol*, **24**, 477–489.
2）Whitmore, S. E. and Lamont, R. J.（2011）: The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol Microbial*, **81**, 305–314.
3）Li, Y., He, J., He, Z., Zhou, Y., Yuan, M., Xu, X., Sun, F., Liu, C., Li, J., Xie, W., Deng, Y., Qin, Y., VanNostrand, J. D., Xiao, L., Wu, L., Zhou, J., Shi, W. and Zhou, X.（2014）: Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J*, **8**, 1879–1891.
4）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.
5）Mouz, N., Tricot, C., Ebel, C., Petillot, Y., Stalon, V. and Dideberg, O.（1996）: Use of a designed fusion protein dissociates allosteric properties from the dodecameric state of *Pseudomonas aeruginosa* catabolic ornithine carbamoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9414–9419.