



Title	Streptococcus gordoniiのFusobacterium nucleatumとの栄養共生におけるアルギニン・オルニチンアンチポーターArcDの機能解析
Author(s)	坂中, 哲人
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61672">https://doi.org/10.18910/61672</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 口腔分子免疫制御学講座

予防歯科学分野

坂中 哲人



## 緒言

今なお地球上に蔓延する歯周病は、成人の歯牙喪失の主な理由のひとつであり、その発症・進行には歯肉縁下に存在する歯周病原性バイオフィルムが関与する<sup>1)</sup>。この病原性バイオフィルムの成立機序は、バイオフィルムのエコロジカルシフトという観点から、三段階に分けられている<sup>2,3)</sup>。すなわち、*Streptococcus gordonii*などの初期付着菌による固層表面への付着、仲介菌 *Fusobacterium nucleatum* の菌叢への参画、そして *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病菌の参画である。これまで *S. gordonii* などの口腔レンサ球菌は病原性をもたない常在菌としか見なされていなかったが、近年これら常在菌が“accessory pathogen”として歯周病菌の病原性を高める種々の相互作用を発揮することが明らかとなってきた<sup>4)</sup>。この相互作用として、クオラムセンシングによる情報伝達、付着因子による物理的な結合、そして細菌代謝物を介した栄養共生などがある。なかでも複数菌種による実験的バイオフィルム形成モデルにおいて、*S. gordonii* との共存が *F. nucleatum* あるいは *P. gingivalis* の代謝を大きく変化させ、その定着を促進することから、菌種間での栄養共生が歯周病原性バイオフィルムの高病原化の要因の一つとして注目されている<sup>5,6)</sup>。

興味深いことに、口腔レンサ球菌を介した菌体間相互作用には、塩基性アミノ酸の一種であるアルギニンや、その類似体が関与している場合が多い。例えば、*S. gordonii* の好気条件下での増殖はアルギニン要求性であることが知られているが、*Actinomyces oris* と共凝集することにより *S. gordonii* のアルギニン生合成が安定化し、アルギニンを欠く環境での好氣的な増殖が可能となることが示されている<sup>7)</sup>。また、*Streptococcus intermedius* は菌体表層にアルギニンをシトルリンに変換する酵素である ArcA を有しており、これが *P. gingivalis* の病原因子の一つである FimA の発現を抑制し *P. gingivalis* によるバイオフィルム形成を抑制することが報告されている<sup>8)</sup>。最近、この FimA の発現抑制が ArcA の触媒する酵素反応、すなわちアルギニンからシトルリンへの変換に起因するものであることが示されたことから、環境中のアルギニン・シトルリンの増減が FimA の発現に影響する可能性が示唆された<sup>9)</sup>。また、*F. nucleatum* と口腔レンサ球菌との共凝集には RadD という付着因子が関与するが、その働きが高濃度のアルギニンによって阻害されることが報告されている<sup>10)</sup>。さらに、近年行われたメタゲノム解析では、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、疾患を特徴付ける因子のひとつと示唆された<sup>11)</sup>。こうしたことから、アルギニン関連代謝物は口腔レンサ球菌が種々の歯周病菌と相互作用する際に働き、歯周病原性バイオフィルムの高病原化に影響を及ぼしている可能性がある。

一方、口腔レンサ球菌によるアルギニン代謝は、これまでアルカリ産生によるう蝕制御の観点から論じられてきた。これは *S. gordonii* を含む多くの口腔レンサ球菌が、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システム (ADS) を有しているからである<sup>12)</sup>。ADS は三つのコアとなる酵素で構成され、オペロンとして発現調節を受けている<sup>13)</sup>。まず、ArcA によりアルギニンがシトルリンに変換され、ArcB がシトルリンからオルニチンとカルバモイルリン酸への反応を触媒し、最後に ArcC によりカルバモイルリン酸から ATP とアンモニアが生成される。*S. gordonii* は ADS を有する口腔レンサ球菌のモデル細菌として、ADS の機能や発現調節、あるいは酸ストレスの中和作用に関する研究に用いられてきた<sup>14-16)</sup>。

また *S. gordonii* は *arcABC* の下流に、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 をコードした領域を有している。他菌に関する研究から、ArcD は膜貫通型タンパク質で、プロトン駆動力によってアルギニンとオルニチンの交換輸送を触媒し、ADS の働きを調節しているとされている<sup>17,18)</sup>。実験的共培養モデルにおいて、*F. nucleatum* 共存時に *S. gordonii* の ArcD タンパクが有意に低下する一方、ArcABC タンパクは増加すること、*P. gingivalis* 共存時には有意な変化が認められないことが報告されている<sup>19)</sup>。さらに *A. oris* 共存時には、*S. gordonii* の ArcD の発現が有意に低下することが示されている<sup>20)</sup>。こうした知見は、ArcD が菌種特異的な栄養的相互作用に関与していることを視わせる。このように ArcD はアルギニン代謝に密接に関連している上、代謝物の輸送に関わることから、歯周病原性バイオフィームにおける栄養共生に関与する可能性があるにも関わらず、これまで *S. gordonii* の ArcD を対象とした研究は行われていない。

本研究では、*S. gordonii* の ArcD に着目し、*arcD* 欠損株 ( $\Delta arcD$ ) および相補株 (Com *arcD*) を作製し、ArcD の機能解析を行うとともに、複数菌種による実験的バイオフィーム形成モデルを用いて、ArcD を介した代謝物の輸送が歯周病原性バイオフィームに及ぼす影響について検討を加えた。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株および培養条件

本研究で使用した菌株およびプラスミドを表 1 に示す。*S. gordonii* は Todd-Hewitt broth (THB) を用いて 37°C・好気条件下で静置培養し、対数増殖期に至った細菌を  $7,000 \times g$ , 4°C, 7 分間の遠心操作 (以後、特に言及しない場合、遠心条件は同じである) により集菌し、各実験に使用した。各実験では糖質を微調整した化学合成培地 (chemically defined medium: CDM)<sup>20)</sup>を使用した。具体的には、培養上清中の代謝物定量実験およびバイオフィーム実験には、1.2%および 0.025%グルコースをそれぞれ CDM の糖質として使用し、アンモニアアッ

セイおよびメタボロミクス実験には 0.1%ガラクトースを使用した。*P. gingivalis* については 37°C・嫌気条件下、1 mg/ml 酵母エキス、5 µg/ml ヘミンおよび 1µg/ml メナジオンを含む trypticase soy broth を用いて培養し、バイオフィルム実験に供した。*F. nucleatum* についても 37°C・嫌気条件下、10 mg/ml 酵母エキス、10 mg/ml trypticase peptone、10 mg/ml biosate peptone、19.2 mg/ml brain heart infusion broth、72 µM CaCl<sub>2</sub>、66 µM MgSO<sub>4</sub>、0.23 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.29 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4.76 mM NaHCO<sub>3</sub>、1.37 mM NaCl、5 µg/ml ヘミンおよび 1 µg/ml メナジオンを含む専用培地を用いて培養した。

## 2. 遺伝子改変

*S. gordonii*  $\Delta arcD$  株の作製にはフュージョン PCR 法<sup>24)</sup>を用いた。はじめに pVA891 からエリスロマイシン耐性遺伝子 *ermAM* 領域、*S. gordonii* 野生株 DNA から *arcD* 遺伝子に隣接する領域（上流 686 塩基対、下流 684 塩基対）を PCR で増幅した。このとき、3 つの断片は 15 塩基対ずつオーバーラップするよう設計した。次にこれら 3 つの断片を PCR で 1 本化し、得られた PCR 産物を用いて *S. gordonii* 野生株の *arcD* 遺伝子を、double-crossover により翻訳領域ごと *ermAM* で置換した。 $\Delta arcD$  の選別には、最終濃度 5 µg/ml のエリスロマイシンを含んだ THB 寒天培地を用いた。

Comp *arcD* 株を作製するために、隣接領域を含んだ *arcD* 遺伝子を組み込んだプラスミド pCK に *aad9* カセット（プロモーター領域を含むスペクチノマイシン耐性遺伝子）をクローニングし、得られたプラスミドをキャンベル様機構により  $\Delta arcD$  に組み込み *arcD* 遺伝子を導入した。Comp *arcD* の選別には、最終濃度 100 µg/ml のスペクチノマイシンおよび最終濃度 5 µg/ml のエリスロマイシンを含んだ THB 寒天培地を用いた。いずれの菌株も PCR と DNA シーケンス解析により改変部の塩基配列を確認した。

## 3. アルギニン取り込み実験

アルギニンの菌体内への経時的取り込み量を評価するため、対数増殖期に至った *S. gordonii* 各菌株を集菌し、0.15 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（phosphate-buffered saline: PBS）で 2 回洗浄後、10<sup>9</sup> cfu（colony forming unit）/ml の PBS 懸濁菌液を 400 µl 調整し、これに L-[<sup>3</sup>H]アルギニン（37 MBq/mmol）を最終濃度 50 µM となるよう添加し反応を開始させた。所定の時間経過後、100 µl の菌液を分取し 0.22 µm フィルター（Millipore, Billerica, MA, USA）でろ過し、細菌をろ過膜に吸着させた。ろ過膜は 4 ml の PBS を通過させた後、Ultima Gold MV（PerkinElmer, Norwalk, CT, USA）に浸漬し、液体シンチレーションカウンター LS6500（Beckman Coulter, Brea, CA, USA）を用いて放射能を測定した。*ArcD* のアルギニンに対する基質特異性を評価するため、種々のアルギニン類似

体を L-[<sup>3</sup>H]アルギニンの 100 倍の濃度で添加し、20 秒間の野生株の放射性標識アルギニン取り込み率を評価した。K<sub>m</sub> 値および V<sub>max</sub> 値の算出には、種々の L-[<sup>3</sup>H]アルギニン濃度 (1, 10, 25, 50, 100 μM: それぞれ 37 MBq/mmol) の溶液を用いて各菌株を 1 分間培養後、上述の通り放射能を測定し、得られたデータを ORIGIN 2015 で解析して算出した。

#### 4. 増殖実験および培養上清中のアルギニン関連代謝物濃度の測定

ArcD 欠損による増殖への影響を評価するために、対数増殖期の *S. gordonii* 菌株を集菌し、PBS で 2 回洗浄後、1 mM アルギニンを含んだ CDM に 10<sup>8</sup> cfu/ml となるよう播種して 37°C・好気条件下で静置培養した。培養開始時および培養後 18 時間までの 2 時間毎に各培養液の濁度を分光光度計 (UV-1600; 島津製作所, 京都) にて計測した。また 0~3 mM の種々の濃度のアルギニンを含んだ CDM を用いて同様の実験を繰り返した。

次に培養上清中のアルギニン関連代謝物濃度を測定するために、培養開始後 6 時間経過した 1 mM アルギニン含有 CDM 懸濁菌液を遠心し、デカントされた上清を 0.22 μm フィルター (Millipore) にてろ過滅菌を行い回収した。その後、高速液体クロマトグラフィー (Acquity UPLC System; Waters, Milford, MA, USA) にて代謝物濃度を測定し、Empower 2 software を用いてデータ解析を行った。

#### 5. メタボロミクス解析

ArcD 欠損による *S. gordonii* 菌体内の代謝の変動を評価するために、野生株および Δ*arcD* を 1 mM アルギニンを含有 CDM 中に 8×10<sup>8</sup> cfu/ml となるよう調整したのち、37°C で 8 時間、嫌気条件下にて培養した。培養後、遠心操作により集菌した菌体を、1 ml の超純水で 2 回洗浄し、内部標準物質 [ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT), 鶴岡] を含んだメタノール 1 ml に浸漬した後、タンパク除去の目的でクロロホルム 2 ml および超純水 0.8 ml を加えて攪拌し、2,300×g, 4°C, 5 分間の遠心分離操作を行った。遠心分離後、水層を限外ろ過チューブ (Amicon Ultrafilter System; Millipore) に移し取り、9,100×g, 4°C, 120 分間の遠心操作により限外ろ過処理を行った。ろ液中の細菌代謝物を乾固させ、再度 50 μl の超純水に溶解して測定に供した。

代謝物の測定には、キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計 [Capillary Electrophoresis-Time-of-Flight Mass Spectrometer (CE-TOFMS), Agilent CE-TOFMS system; Agilent Technologies, SantaClare, CA, USA] を用いて、陽イオン性物質を対象とするカチオンモードおよび陰イオン性物質を対象とするアニオンモードにて測定を行った。検出されたピークは、自動積分ソフトウェア MasterHands ver.2.13.0.8 (慶應義塾大学, 東京) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z), 泳動時間 (Migration time: MT) およびピ

ーク面積値を取得した。さらに、同ソフトウェアを使用し、検出されたピークに対して、 $m/z$  と MT の値をもとに HMT 代謝物質データベース (HMT, 鶴岡) との照合・検索を行い、代謝物を同定した。同定された代謝物については、ピーク面積値をもとに、野生株群・ $\Delta arcD$  群間の相対比較定量解析を実施した。

#### 6. アルギニン代謝関連酵素遺伝子群の発現解析

*S. gordonii* 野生株および  $\Delta arcD$  をメタボロミクス解析と同様の方法で 3 試料ずつ培養後、遠心操作により集菌し、液体窒素で速やかに凍結したのち、Shake Master neo (バイオメディカルサイエンス, 東京) を用いて 1,500 rpm, 4°C, 5 分間の条件下で細胞壁を破碎した。その後、TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて全 RNA を抽出し、iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて cDNA に逆転写した後、KAPA SYBR Fast kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いてリアルタイム RT-PCR を行った。使用したプライマーを表 2 に示す。

#### 7. 培養上清中のアンモニア産生量および pH の測定

*S. gordonii* 野生株および  $\Delta arcD$  を 1mM アルギニンを含んだ CDM 中で 37°C で 24 時間、好気条件下にて培養した後、遠心操作にて培養上清を分離しアンモニアアッセイキット (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてその産生量を測定するとともに、pH メーター (堀場製作所, 京都) にて培養前後での培地の pH 変化を比較した。また培養開始後 8 時間毎に、各培養液の濁度を分光光度計 (UV-1600 ; 島津製作所) にて計測した。

#### 8. *S. gordonii*-*F. nucleatum* および *S. gordonii*-*P. gingivalis* 混合バイオフィーム形成実験

*S. gordonii* と他菌種による混合バイオフィームの形成は、Kuboniwa らの方法<sup>20)</sup>に準じて行った。すなわち、対数増殖期に至った *S. gordonii* 菌株を遠心操作により集菌し、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ヘキシジウムイオダイド [hexidium iodide (HI) ; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA] 溶液に懸濁して 15 分間緩やかに振盪し生染色を行った。染色後、PBS で 3 度洗浄し、1 mM アルギニン含有 CDM に懸濁 ( $10^8$  cfu/ml) した後、その懸濁菌液を 25% 滅菌ヒト唾液で被覆した LAB-TEK Chamber Slide System (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) に播種し、37°C, 16 時間、好気条件下で培養した。

続いて対数増殖期に至った *F. nucleatum* あるいは *P. gingivalis* を遠心操作により集菌し、6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  フルオレセインイソチオシアネート [fluorescein isothiocyanate (FITC) ; Molecular Probes] 含有 PBS に懸濁して 30 分間生染色を行い、PBS で 3 度洗浄後、PBS に懸濁した染色菌体 ( $1.5 \times 10^7$  cfu) を *S. gordonii* のバイオフィームを底面に形成させたチャンバーに加え、



さらに 37°C・嫌気条件下で 24 時間培養を継続した。*F. nucleatum* 単一バイオフィルム形成については、唾液処理を施したチャンバーに  $2.5 \times 10^7$  cfu の PBS 懸濁染色菌体（所定濃度のオルニチンを含む）を播種し、37°C・嫌気条件のもと 24 時間培養した。

バイオフィルム量の評価には、共焦点レーザー顕微鏡 [Confocal laser scanning microscopy (CLSM), LSM510; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Oberkochen, Germany] を用いた。まず形成されたバイオフィルムを PBS で穏やかに洗浄し浮遊細菌を除去した後、チャンバー底面に形成されたバイオフィルムを CLSM で観察した。倍率は 40 倍、ヘリウムネオンレーザーによる励起波長は 543 nm, アルゴンレーザーによる励起波長は 488 nm とすることで、HI 染色 *S. gordonii* と FITC 染色 *F. nucleatum*（あるいは *P. gingivalis*）をそれぞれ発色させた。無作為に 10 視野を撮影し、Imaris Software Ver. 7.0.1 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) を用いて各菌株のバイオフィルム量を算出した。

## 9. 統計解析

全ての対比較には両側 *t* 検定により、各サンプル群間の有意差を検討した。プランクトニック状態の細菌増殖実験については、反復測定一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) を行い、下位検定には Dunnet の検定による多重比較検定を用いて各菌株間の有意差を検討した。その他の 3 群以上の多重比較には、ANOVA を行い、下位検定には Dunnet の検定による多重比較検定を用いた。統計ソフトは SPSS Ver. 22 (IBM Japan, 東京) を用い、 $p < 0.05$  を有意差有りとした。主成分分析については、SIMCA Ver. 13 (Umetrics, Umeå, Sweden) を用い、Metabolite set enrichment analysis (MSEA) については、山本らの方法<sup>22)</sup>に準じて行った。

## 結果

### 1. ArcD の機能解析および *S. gordonii* の増殖における役割

*S. gordonii*  $\Delta arcD$  および Comp *arcD* を作製後、L-[<sup>3</sup>H]アルギニンを用いて *S. gordonii* ArcD のアルギニン取り込み能を評価したところ、野生株・Comp *arcD* は高いアルギニン取り込み能を示したのに対し、 $\Delta arcD$  は顕著なアルギニン取り込み量の減少を示した (図 1-A)。種々の L-[<sup>3</sup>H]アルギニン濃度の溶液を用いて反応速度パラメーター  $K_m$  値および  $V_{max}$  値を算出したところ、野生株ではそれぞれ  $12.4 \pm 2.1 \mu M$ ,  $2.4 \pm 0.1 \text{ nmol/min/}10^9 \text{ cfu}$  であったのに対し、 $\Delta arcD$  では  $65.1 \pm 12.9 \mu M$ ,  $0.7 \pm 0.1 \text{ nmol/min/}10^9 \text{ cfu}$ , Comp *arcD* では  $13.3 \pm 2.1 \mu M$ ,  $2.5 \pm 0.1 \text{ nmol/min/}10^9 \text{ cfu}$  であった (図 1-B, C)。このことから、ArcD 以外の小規模なアルギニン取り込み系の存在が予想されるものの、ArcD が主要なアルギニン取り込み系であることが示唆

された。次に ArcD のアルギニンに対する基質特異性を評価するために、放射線標識されていない種々のアルギニン類似体（オルニチン、シトルリン、アグマチン、グアニジン、アルギニンアミド、5-アミノ吉草酸、リジン、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、セリン）存在下での野生株の L-[<sup>3</sup>H]アルギニン取り込み率を比較した。その結果、非標識アルギニン存在下で L-[<sup>3</sup>H]アルギニン取り込み率が有意に低下したのに対し、その他の物質に関しては、オルニチンが緩やかな抑制効果を示したことを除き、野生株の L-[<sup>3</sup>H]アルギニン取り込み率にほとんど影響を及ぼさなかった（図 1-D）。以上のことから、ArcD を介したアルギニンの取り込みは、高い基質特異性を有することが示唆された。

続いて 1 mM アルギニン含有 CDM 中で各菌株を培養して増殖を比較するとともに、高速液体クロマトグラフィーを用いて上清中のアルギニン・オルニチン・シトルリンの濃度変化を比較した。その結果、 $\Delta arcD$  の増殖速度は有意に低下し、静止期におけるバイオマス量も減少していること（図 2-A）、また培地中のアルギニン消費量およびオルニチン排出量は野生株と比べ著しく低下していることが示された（図 2-B）。その一方で、上清中のシトルリン濃度については各菌ともわずかに増加するものの、菌株間で有意な差は認めなかった。次に、種々の濃度のアルギニン含有 CDM 中で野生株と  $\Delta arcD$  の増殖を比較したところ、アルギニン非添加 CDM ではどちらもほとんど増殖しなかった一方、0.25 mM アルギニン含有 CDM の場合、 $\Delta arcD$  では依然として低い増殖を示す一方、野生株の増殖は 1 mM アルギニン含有時のレベルまで回復することが示された。その後 0.5 mM から 2 mM まで濃度を振り分けたアルギニン含有 CDM で増殖を評価したところ、 $\Delta arcD$  の増殖は部分的に回復するものの、野生株と比べその増殖は抑制されていた（図 2-C, D）。以上のことから、ArcD はアルギニンを選択的に取り込むことで *S. gordonii* の正常な増殖を支えること、また、低濃度のアルギニン存在下においては、ArcD によるアルギニン取り込みがその増殖に必要不可欠であることが示唆された。

## 2. ArcD が *S. gordonii* の代謝調節に果たす役割

上述の結果から、ArcD 以外のアルギニン取り込み系が機能している可能性があるものの、ArcD はアルギニン・オルニチンアンチポーターとして *S. gordonii* の正常な増殖に不可欠であることが示唆された。ArcD 欠損による代謝への影響をさらに解析するために、1 mM アルギニン含有 CDM 中で野生株と  $\Delta arcD$  を培養後、菌体を回収し CE-TOFMS を用いて菌体内代謝物プロファイルを比較した。ここでは糖質として 0.1%ガラクトースを用いた。これはガラクトースが *S. gordonii* の ADS 遺伝子群の発現を促進することが報告されているからである<sup>13)</sup>。ちなみに、0.1%ガラクトースによる野生株と  $\Delta arcD$  の増殖に有意な差は認めなかった。メタボミクス解析の結果、233 個の代謝物（119 個の陽イオン性代謝物と 114 個の陰イオン性代謝物）が検出された。データを概観するために主成分分析を行ったところ、第一主成分（PC1）

で群間差を認めた（図 3）。各代謝物の因子負荷量は主成分スコアと各変数の値（代謝物レベル）との相関係数として扱えることが知られている。そこで各代謝物の PC1 における因子負荷量を確認し、それをもとに相関係数の仮説検定を行って統計的に有意な代謝物を選択した。その結果、 $\Delta arcD$  を特徴づける代謝物、すなわち PC1 と 5%の有意水準で正の相関を示す代謝物 30 個が選定された（表 3）。次に選定された代謝物から統計的に有意な代謝経路を抽出するために、MSEA を行った<sup>22)</sup>。まず Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースに基づいて検出された全代謝物を代謝経路毎に分類・リスト化した後、 $\Delta arcD$  を特徴づける代謝物 30 個が各代謝経路に含まれる確率をフィッシャーの正確性検定によって算出することで、5%の有意水準のもと $\Delta arcD$  を特徴づける代謝経路を抽出した（表 4）。その結果、 $\Delta arcD$  では、オルニチン回路（ $p = 0.0110$ ）とクエン酸回路（ $p = 0.0296$ ）が有意に活性化していることが示唆された。同様の方法で PC1 と有意に負の相関を示す代謝物 56 個を選定し MSEA を行ったところ、解糖系/糖新生経路（ $p = 0.0211$ ）、グリシン・セリン・スレオニン代謝経路（ $p = 0.0004$ ）、バリン・ロイシン・イソロイシン代謝経路（ $p = 0.0126$ ）が $\Delta arcD$  で有意に抑制されていることが示唆された。

MSEA の結果を基に、オルニチン回路とその近傍の代謝物レベルに注目したところ、ADS 中間代謝産物であるアルギニン、オルニチン、シトルリンがそれぞれ 2.7 倍、3.9 倍、310 倍と $\Delta arcD$  内で劇的に増加していたのに対し、N-アセチルオルニチンや N-アセチルグルタミン酸といった、アルギニン生合成経路上流の代謝物の多くが有意に減少していた（それぞれ 1.7 倍と 2 倍）（図 4）。

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評価した。その結果、 $\Delta arcD$  では ADS を構成する酵素の遺伝子発現量は軒並み増加していた（*arcA*: 1.6 倍、*arcB*: 2.7 倍、*arcC*: 2.2 倍）のに対し、アルギニン生合成経路を構成する酵素の発現量は、上流（グルタミン酸からオルニチンへの変換に関わる *argCJBD* とグルタミンからカルバモイルリン酸への変換に関わる *carAB*）および下流（シトルリンからアルギニンへの変換に関わる *argGH*）とも低下する傾向にあることが示された（図 4、表 5）。過去の報告から、高濃度アルギニンにより *S. gordonii* の *arcABC* の発現が上昇すること<sup>15)</sup>、さらに ArcB がシトルリン・オルニチン双方向の変換を触媒している可能性が指摘されている<sup>23)</sup>。従って、一連の結果の解釈として、 $\Delta arcD$  ではオルニチン排出が不能となりオルニチンが蓄積、さらに小規模なアルギニン取り込み系の働きによって菌体内アルギニンレベルが上昇しアルギニンの異化が停滞し、その結果 ADS が機能不全に陥るとともに、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たと考えられる。その際、ArcB がオルニチンからシトルリンへの変換を媒介することで、菌体内シトルリンレベルが劇的に増加した可能性がある。また、 $\Delta arcD$  の菌体内 ATP レベルが、ADS 関連遺伝子の発現が上昇しているにも関わ

らず、有意に低下していることも ADS の機能不全を裏付けるものと考えられる (図 4)。

### 3. $\Delta arcD$ のアルカリ産生能と酸性環境における増殖

メタボロミクス解析の結果から、 $\Delta arcD$  は ADS の機能不全により ATP およびアルカリ産生能が低下していることが予想された。そこで、 $\Delta arcD$  のアンモニア産生量と酸性環境における増殖を評価した。まず pH 5.5 に調節した 1 mM アルギニン含有 CDM (炭素源は 0.1% グラクトース) を用意し、野生株と  $\Delta arcD$  の増殖の違いを評価した。通常の pH 7.0 の場合、0.1% グルコース含有時 (図 2) と同様に  $\Delta arcD$  の増殖速度は有意に低下し、静止期におけるバイオマス量も減少していたのに対し、pH 5.5 の場合、野生株の増殖は pH 7.0 時の約 70% に抑えられた一方、 $\Delta arcD$  ではほとんど増殖しなかった (図 5-A)。

続いて 32 時間培養後の上清中のアンモニア産生量と pH 変化を比較したところ、 $\Delta arcD$  のアンモニア産生量は野生株と比べ pH 7.0 で 4.1 倍、pH 5.5 で 80 倍それぞれ減少していた (図 5-B)。さらに培養上清の pH 変化についても、野生株では培養 32 時間で pH 7.0 から pH 7.5  $\pm$  0.19 へ上昇したのに対し、 $\Delta arcD$  では pH 7.0 から pH 6.3  $\pm$  0.017 へ低下していた (図 5-C)。以上より、 $\Delta arcD$  ではアルカリ産生能が低下し酸ストレスに脆弱になることで、増殖が損なわれることが示された。このことから、ArcD は ADS のアルカリ産生系としての機能に必要不可欠であると考えられる。

### 4. 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ームにおける栄養共生の可能性を探索するために、2 菌種による実験的バイオフィーム形成モデルを用いて *S. gordonii* 菌株と歯周病関連菌 *F. nucleatum* とのバイオフィーム形成能を評価した。はじめに、歯周病原性バイオフィームの成熟過程における初期付着菌である *S. gordonii* 菌株を、唾液処理を施したチャンバースライドを用いて 1 mM アルギニン含有 CDM 中で 16 時間培養した後、仲介菌である *F. nucleatum* と PBS 中で 24 時間共培養した。形成された混合バイオフィームを CLSM で撮影し、Imaris software を用いて *F. nucleatum* バイオフィーム量を算出することで、*S. gordonii* 各菌株の *F. nucleatum* との混合バイオフィーム形成能を評価した。その結果、 $\Delta arcD$  バイオフィーム上に形成された *F. nucleatum* バイオフィーム量は、野生株と比べ有意に減少していること、コンプリメント株ではそれが完全に回復することが示された (図 6-B)。コントロール実験として、*F. nucleatum* と共培養する前の *S. gordonii* 菌株単独でのバイオフィーム形成量を評価したところ、菌株間で有意な差は認められなかった (図 7)。以上より、ArcD は *F. nucleatum* との混合バイオフィーム形成において重要な役割を担っていることが示唆された。

過去の報告によると、口腔レンサ球菌との共凝集に参与する *F. nucleatum* の付着因子 RadD

は、アルギニンによってその働きが阻害される<sup>10)</sup>。そこで、アルギニンが *S. gordonii* - *F. nucleatum* バイオフィーム形成に及ぼす影響を評価するために、前述通り *S. gordonii* を培養した後、1 mM アルギニン含有 PBS 中で *F. nucleatum* と 24 時間共培養した。その結果、アルギニンの有無で *F. nucleatum* バイオフィーム量に有意な差は認められなかった (図 8)。次に、ArcD を介して排出されるオルニチンが *F. nucleatum* に供与されることで混合バイオフィーム形成が促進されるのではないかと考え、次の実験を行った。まず、前述同様の方法で  $\Delta arcD$  のみを培養した後、種々の濃度のオルニチン含有 PBS 中で *F. nucleatum* と 24 時間共培養した。その結果、 $\Delta arcD$  バイオフィーム上に形成された *F. nucleatum* バイオフィーム量は、5 mM をピークにオルニチン濃度依存的に回復することが示された (図 9)。さらに *F. nucleatum* のみをオルニチン含有 PBS 中で 24 時間培養し、バイオフィーム形成量を評価したところ、やはり 5 mM をピークにオルニチン濃度依存的にバイオフィーム量が増加した (図 10-A, B)。一方、*F. nucleatum* のプランクトニックな増殖に対するオルニチンの効果は軽微であった (図 10-C)。以上のことから、ArcD を介したオルニチンの排出は *S. gordonii* - *F. nucleatum* バイオフィーム形成を顕著に促進することが示唆された。

最後に、同様の現象が歯周病菌 *P. gingivalis* との混合バイオフィームにおいても見られるか検証した。しかし、*S. gordonii* 菌株のバイオフィーム上に形成された *P. gingivalis* バイオフィーム量には有意な差は認めなかった (図 11)。このことから、ArcD を介した菌体間相互作用は、菌種特異的なものであることが示唆された。

## 考察

本研究において、*S. gordonii* の有する ArcD はアルギニンの菌体内への輸送、オルニチンの菌体外への輸送、そしてアルギニン代謝の恒常性維持を担うだけでなく、ArcD を介して *F. nucleatum* にオルニチンを供与することで混合バイオフィーム形成を促進することが示された。*S. gordonii* と *F. nucleatum* との栄養共生に関する報告は他ではみられない。また、*S. gordonii* は歯周病原性バイオフィームの成熟過程において歯周病菌の定着を促進する accessory pathogen として近年注目を集めていることから、今回得られた知見は *S. gordonii* の accessory pathogen としての一面に新たな知見を加えるものになると考えられる。さらに、ArcD は *S. gordonii* の ADS の一部としてアルカリ産生およびエネルギー産生を調節し、酸性環境における増殖に不可欠であることも示された。

本研究ではアルギニン・オルニチン交換輸送を直接的に示してはいないが、*S. gordonii* の ArcD は、近縁種同様<sup>24)</sup>、アルギニン・オルニチンアンチポーターとして機能していると推測される。その一方で、アルギニンは濃度依存的に  $\Delta arcD$  のプランクトニックな増殖を部分

的に回復させたことから（図 2-C, D）, *S. gordonii* は ArcD 以外の小規模なアルギニン取り込み系を有している可能性が高い。それでも,  $\Delta arcD$  の増殖不全は 0.25 mM という低濃度のアルギニン存在下でより顕著であったことから, ArcD はアルギニンが欠乏した低栄養な環境で威力を発揮すると考えられる。成熟したプラーク中に含まれるアルギニンは 0.2 mM 未満であるとする報告があることから<sup>25)</sup>, ArcD を介したアルギニンの取り込みは, バイオフィーム中での栄養飢餓状態で重要な役割を果たしている可能性がある。

*S. gordonii* がしばしば宿主に有益な菌と見なされるのは, ADS を介したアルカリ産生がバイオフィームの酸性化を緩和し, う蝕リスクを低減するからである<sup>26)</sup>。今回の結果では, アルカリ産生による酸ストレスの中和や, 対数増殖期の細胞分裂に必要な ATP の産生といった ADS の機能が十分に発揮されるには, ArcD が欠かせないことが示唆された。また, *S. gordonii* の ADS は近縁の口腔レンサ球菌と比べ, 炭素カタボライト抑制の影響を受けやすく, グルコースの枯渇した環境（歯肉縁下など）でのエネルギー産生において重要な役割を担っていることが知られている<sup>27)</sup>。*S. gordonii* は少なからず歯肉縁下にも生息していることから, こうしたレンサ球菌の ADS あるいは ArcD は, エネルギー産生系として機能を果たしているのかもしれない。

さらに本研究では, メタボロミクス解析により  $\Delta arcD$  菌体内の代謝物プロファイルが明らかとなった。すなわち,  $\Delta arcD$  ではオルニチン回路とクエン酸回路が活性化している一方, 解糖系とアミノ酸代謝経路は抑制されていた。窒素源を遮断して大腸菌を培養すると, クエン酸回路の活性化, 解糖系や種々のアミノ酸生合成の抑制といった今回の知見と類似する変動が見られている<sup>28,29)</sup>。このことから,  $\Delta arcD$  は深刻な窒素飢餓に陥っていた可能性があると同時に, *S. gordonii* は ArcD を介して取り込まれるアルギニンを主要な窒素源として利用していることが示唆される。さて, ArcD 欠損により最も影響を受けた代謝経路のひとつがオルニチン回路であるが, 本研究ではオルニチン回路を ADS とアルギニン生合成を包含する用語として用いている。オルニチン回路を構成する 2 つの要素のうち, 口腔レンサ球菌の ADS は詳細に研究されている一方, アルギニン生合成に関しては未解明の部分が多い。

多くのレンサ球菌はアルギニン生合成経路が不完全であるため, 環境中のアルギニンを取り込んで生存している<sup>30)</sup>。一方で, 少数の口腔レンサ球菌には, アルギニンを生合成するための酵素をコードした遺伝子群をほぼ完全に兼ね備えた菌種が存在する。そのうちのひとつが *S. gordonii* であるが, 本菌種のアルギニン生合成能は低く, 好気条件下での増殖はアルギニン要求性であることが報告されている<sup>7)</sup>。この原因として, anabolic ornithine carbomoyltransferase (ArgF; EC 2.1.3.3) というオルニチンからシトルリンへ変換する酵素が唯一欠如しており, 代わりに ArcB が双方向の反応を担っているためではないかと考えられている。実際に, 緑膿菌の ArcB はオルニチンとシトルリンを双方向に変換し, 熱力学な観点か

らはむしろシトルリンを合成する方向へ反応が進むことが報告されている<sup>23)</sup>。また *S. gordonii* の ArcB のアミノ酸配列は、*Lactococcus lactis* の ArgF と高い類似性をもつことが示されている<sup>7)</sup>。さらにごく最近、*S. gordonii* のアルギニン生合成に ArcB が必須であることが実験的に示されている<sup>31)</sup>。これらのことから、*S. gordonii* の ArcB はアルギニン生合成が活性化する環境においては、オルニチンからシトルリンへの変換を触媒し、ADS によるアルギニンの異化が活性化する環境においては、シトルリンからオルニチンへの変換を触媒すると考えられる。

今回のメタボロミクス解析では、 $\Delta arcD$  のアルギニン生合成経路上の代謝物レベルが低下していた一方、ADS 経路上の代謝物レベルが上昇していることが示された (図 4)。このことから、 $\Delta arcD$  ではオルニチン排出が不能となり、オルニチンが菌体内に蓄積し、これによりアルギニン異化反応が停止するとともにアルギニン生合成経路上流の代謝が抑制された可能性が考えられる。ArcD 欠損によるアルギニン生合成の抑制については、*Corynebacterium glutamicum* のコハク酸エクスポーターを欠損させた菌株では、コハク酸が菌体内に蓄積し、解糖系上流の代謝が抑制されたとする報告があり<sup>32)</sup>、これは今回の知見と類似している。 $\Delta arcD$  の菌体内シトルリンレベルの極端な上昇については、オルニチンの蓄積と ArcB によるシトルリンへの変換によって、また  $\Delta arcD$  の菌体内アルギニンレベルの予想外の上昇については、オルニチンの蓄積によるアルギニン異化反応の停止と小規模なアルギニン取り込み系による持続的なアルギニンの取り込みによって、それぞれ説明できる。リアルタイム RT-PCR の結果は、これらの代謝の変動と概ね一致していたが、いくつか食い違いも見られた。その一つが、 $\Delta arcD$  では *arcC* の発現が上昇していたにも関わらず、反応産物である ATP および NH<sub>3</sub> 産生量が減少していたことである。*S. gordonii* の *arcABC* はオペロンとして発現調節を受けており、高濃度アルギニンで転写が促進されることが報告されている<sup>15)</sup>。従って、これに対する解釈として、 $\Delta arcD$  の菌体内ではアルギニンレベルが上昇し、それに伴って *arcABC* の発現も上昇するが、ArcB を介したオルニチンからシトルリンへの変換が進んでしまうことで ArcC の基質であるカルバモイルリン酸が枯渇し、最終的に ATP と NH<sub>3</sub> の産生量が減少した可能性がある。このように考えると、ArcD を介したオルニチンの排出は、アルギニン生合成を開始させる上で重要であるだけでなく、ArcC に基質を供給し ADS を適切に機能させる上でも重要であると考えられる。

今回の研究で最も興味深い知見の一つが、 $\Delta arcD$  バイオフィーム上に形成された *F. nucleatum* のバイオフィーム量が著しく減少していたことである (図 6)。オルニチンを培地に添加すると、これが回復するとともに、*F. nucleatum* 単独でのバイオフィーム形成をも促進したことから、ArcD を介したオルニチンの排出が *S. gordonii* - *F. nucleatum* 混合バイオフィーム形成に不可欠であることが示唆される。一方、*S. gordonii* - *P. gingivalis* 間では同様の現象は見られなか

った (図 11)。このことから、歯周病原性バイオフィーム内では、極めて菌種特異的な栄養共生現象が存在することが示唆される。

*F. nucleatum* は“bridging organism”と呼ばれるように、その豊富な付着因子で様々な口腔細菌を結び付け、歯周病原性バイオフィームの高病原化に寄与している<sup>3,33)</sup>。同菌はグルタミン酸をはじめ種々のアミノ酸を発酵して主要なエネルギーを得ていると考えられている<sup>34,35)</sup>。興味深いことに、本研究で使用した *F. nucleatum* 株は、他近縁種と比べオルニチンに対して高い取り込み能を有することが示されている<sup>36)</sup>。さらに *S. gordonii* 共培養時の *F. nucleatum* 菌体内では、オルニチンデカルボキシラーゼがタンパクレベルで有意に上昇することが示されている<sup>5)</sup>。以上のことから、*S. gordonii* の ArcD を介して排出されたオルニチンは、*F. nucleatum* に取り込まれオルニチンデカルボキシラーゼの基質として利用されていると推測される。その結果 *F. nucleatum* の菌体内ではプトレシンなどのポリアミンが産生されることが考えられ、このことが今回得られた知見とどのように関連するかについては現在調査中である。

*F. nucleatum* は口腔レンサ球菌との共凝集に関与する RadD を有し、その働きは高濃度アルギニンによって阻害される<sup>10)</sup>。このことから、今回の結果に対して次のような解釈が可能である。すなわち、*S. gordonii* – *F. nucleatum* 共培養時にはアルギニンを含まない培地を使用したか、*S. gordonii* 単独培養時のアルギニンが残留したか、*F. nucleatum* からアルギニンが供給されていた場合、 $\Delta arcD$  はアルギニンを取り込むことができず、それにより *F. nucleatum* RadD の働きが阻害されバイオフィーム量が減少したという解釈である。そこで、培地にアルギニンを添加して *S. gordonii* – *F. nucleatum* バイオフィームの変化を観察したが、有意な変化は認めなかった。従って、今回の結果において、RadD が関与した可能性は低いと考えられる。先の研究との結果の食い違いについては、混合バイオフィーム形成と共凝集アッセイという実験系の違いに加えて、先の研究が 50 mM という非常に高濃度のアルギニンを使用していたことが理由として挙げられる。いずれにせよ、ArcD が *S. gordonii* – *F. nucleatum* 混合バイオフィーム形成に不可欠であり、むしろ ArcD はオルニチンを供与すると同時に環境中のアルギニンを取り込んで RadD の働きを促すという二つの作用によって異菌種間の共生に貢献していると考えるのが妥当であろう。

これまでに *F. nucleatum* の共凝集に関する研究は多く行われているが、異菌種との代謝物を介した相互作用を報告したものはごく少数しかない。例えば、*F. nucleatum* の主要な代謝産物である短鎖脂肪酸が、*Actinomyces naeslundii* のバイオフィーム形成を促進することが報告<sup>37)</sup>されているほか、*F. nucleatum* がプロピオン酸を持続的に産生することによって、髄膜炎の原因菌として知られる *Neisseria meningitidis* が口腔内へ定着しやすくなる可能性も指摘されている<sup>38)</sup>。こうした *F. nucleatum* の栄養共生に関する報告はいずれも短鎖脂肪酸についてのものであるが、本研究では初めて *F. nucleatum* のアミノ酸を介した異菌種間相互作用を報告し



た。また最近の研究によって、*F. nucleatum* が早産や大腸がん等の様々な全身疾患に関与することが報告されており<sup>39,40)</sup>、本研究はこうした *F. nucleatum* の多面的な病原性への理解を深める一助となる可能性がある。

また本研究は、口腔レンサ球菌の ADS がう蝕だけでなく歯周病の発症にも関わる可能性を示した。過去の報告では、*S. gordonii* の ArcA, ArcB, ArcC, ArcD のタンパクレベルが *P. gingivalis* 共培養時に比べ、*F. nucleatum* 共培養時にいずれも顕著に増加することが示されている<sup>19)</sup>。また *A. oris* と共存時に *S. gordonii* の *arcD* の発現が有意に抑制されることが報告されており<sup>7)</sup>、こうしたことから共存菌種のア르기ニン利用能の違いに応じて *S. gordonii* は ArcD あるいは ADS の機能を調節し歯周病原性バイオフィルムの成熟に関与している可能性がある。しかし、歯周病原性バイオフィルムの成熟過程における口腔レンサ球菌の ADS の役割については、まだまだ未解明の部分が多く、今後さらなる研究が必要である。

## 結論

*S. gordonii* のもつ ArcD は、自身のア르기ニン代謝の恒常性維持や ADS の機能の発揮に不可欠であるだけでなく、歯周病関連菌 *F. nucleatum* との栄養共生に関与している可能性が示された。*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。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂くとともに、終始にわたり御懇篤なるご指導とご教授を賜りまし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分野 天野敦雄教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、直接の御指導と御鞭撻を賜りました同口腔分子免疫制御学講座予防歯科学分野 久保庭雅恵准教授に深謝致します。また放射性同位体の取り扱いにあたり、ご指導と貴重な御助言を賜りました本学ラジオアイソトープ総合センター山口喜朗技術専門員に深く感謝致します。最後に、本研究に際し、様々な御援助と御協力を頂きました予防歯科学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. 天野 敦雄 (2012) ビジュアル 歯周病を科学する (天野 敦雄, 岡 賢二, 村上 伸也 編). 1 版, クインテッセンス出版, 東京, 12-32.
2. Kuboniwa, M., and Lamont, R. J. (2010) : Subgingival biofilm formation. *Periodontology* 2000 **52**, 38-52.
3. Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr, Periasamy, S., and Jakubovics, N. S. (2010) : Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 471-480.
4. Whitmore, S. E., and Lamont, R. J. (2011) The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol. Microbiol.* **81**, 305-314.
5. Hendrickson, E. L., Wang, T., Beck, D. A., Dickinson, B. C., Wright, C. J., R, J. L., and Hackett, M. (2014) : Proteomics of *Fusobacterium nucleatum* within a model developing oral microbial community. *Microbiologyopen* **3**, 729-751.
6. Kuboniwa, M., Hendrickson, E. L., Xia, Q., Wang, T., Xie, H., Hackett, M., and Lamont, R. J. (2009) : Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiol.* **9**, 98.
7. Jakubovics, N. S., Gill, S. R., Iobst, S. E., Vickerman, M. M., and Kolenbrander, P. E. (2008) : Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *J. Bacteriol.* **190**, 3646-3657.
8. Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C., and Davey, M. E. (2010) : A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiology* **156**, 3469-3477.
9. Cugini, C., Stephens, D. N., Nguyen, D., Kantarci, A., and Davey, M. E. (2013) : Arginine deiminase inhibits *Porphyromonas gingivalis* surface attachment. *Microbiology* **159**, 275-285.
10. Kaplan, C. W., Lux, R., Haake, S. K., and Shi, W. (2009) : The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Mol. Microbiol.* **71**, 35-47.
11. 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.
12. Burne, R. A., and Marquis, R. E. (2000) : Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 1-6.
13. Dong, Y., Chen, Y. Y., and Burne, R. A. (2004) Control of expression of the arginine deiminase operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. *J. Bacteriol.* **186**, 2511-2514.
14. Liu, Y., Dong, Y., Chen, Y. Y., and Burne, R. A. (2008) : Environmental and growth phase regulation of the *Streptococcus gordonii* arginine deiminase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5023-5030.
15. Dong, Y., Chen, Y. Y. M., Snyder, J. A., and Burne, R. A. (2002) : Isolation and Molecular Analysis of the Gene Cluster for the Arginine Deiminase System from *Streptococcus gordonii* DL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5549-5553.

16. Liu, Y., and Burne, R. A. (2009) : Multiple two-component systems modulate alkali generation in *Streptococcus gordonii* in response to environmental stresses. *J. Bacteriol.* **191**, 7353-7362.
17. Driessen, A. J., Poolman, B., Kiewiet, R., and Konings, W. (1987) : Arginine transport in *Streptococcus lactis* is catalyzed by a cationic exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6093-6097.
18. Bourdineaud, J. P., Heierli, D., Gamper, M., Verhoogt, H. J., Driessen, A. J., Konings, W. N., Lazdunski, C., and Haas, D. (1993) : Characterization of the *arcD* arginine:ornithine exchanger of *Pseudomonas aeruginosa*. Localization in the cytoplasmic membrane and a topological model. *J. Biol. Chem.* **268**, 5417-5424.
19. Hendrickson, E. L., Wang, T., Dickinson, B. C., Whitmore, S. E., Wright, C. J., Lamont, R. J., and Hackett, M. (2012) : Proteomics of *Streptococcus gordonii* within a model developing oral microbial community. *BMC Microbiol.* **12**, 211.
20. Kuboniwa, M., Tribble, G. D., James, C. E., Kilic, A. O., Tao, L., Herzberg, M. C., Shizukuishi, S., and Lamont, R. J. (2006) : *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Mol. Microbiol.* **60**, 121-139.
21. Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Katoh, M., Urushihara, H., and Tanaka, Y. (2002) : PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res.* **30**, E2.
22. Yamamoto, H., Fujimori, T., Sato, H., Ishikawa, G., Kami, K., and Ohashi, Y. (2014) : Statistical hypothesis testing of factor loading in principal component analysis and its application to metabolite set enrichment analysis. *BMC Bioinformatics* **15**, 51.
23. 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.
24. Fulde, M., Willenborg, J., Huber, C., Hitzmann, A., Willms, D., Seitz, M., Eisenreich, W., Valentin-Weigand, P., and Goethe, R. (2014) : The arginine-ornithine antiporter ArcD contributes to biological fitness of *Streptococcus suis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 107.
25. Higham, S. M., and Edgar, W. M. (1989) : Human dental plaque pH, and the organic acid and free amino acid profiles in plaque fluid, after sucrose rinsing. *Arch. Oral. Biol.* **34**, 329-334.
26. Liu, Y. L., Nascimento, M., and Burne, R. A. (2012) : Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int. J. Oral Sci.* **4**, 135-140.
27. Griswold, A., Chen, Y. Y. M., Snyder, J. A., and Burne, R. A. (2004) : Characterization of the Arginine Deiminase Operon of *Streptococcus rattus* FA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1321-1327.
28. Brauer, M. J., Yuan, J., Bennett, B. D., Lu, W., Kimball, E., Botstein, D., and Rabinowitz, J. D. (2006) : Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19302-19307.
29. Yuan, J., Doucette, C. D., Fowler, W. U., Feng, X. J., Piazza, M., Rabinowitz, H. A., Wingreen, N. S., and Rabinowitz, J. D. (2009) : Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 302.
30. Kloosterman, T. G., and Kuipers, O. P. (2011) : Regulation of arginine acquisition and

- virulence gene expression in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* by transcription regulators ArgR1 and AhrC. *J. Biol. Chem.* **286**, 44594-44605.
31. Jakubovics, N. S., Robinson, J. C., Samarian, D. S., Kolderman, E., Yassin, S. A., Bettampadi, D., Bashton, M., and Rickard, A. H. (2015) : Critical Roles of Arginine in Growth and Biofilm Development by *Streptococcus gordonii*. *Mol. Microbiol.* **97**, 281-300.
  32. Fukui, K., Koseki, C., Yamamoto, Y., Nakamura, J., Sasahara, A., Yuji, R., Hashiguchi, K., Usuda, Y., Matsui, K., Kojima, H., and Abe, K. (2011) : Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J. Biotechnol.* **154**, 25-34.
  33. Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., and Moore, L. V. (1989) : Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect. Immun.* **57**, 3194-3203.
  34. Rogers, A. H., Chen, J., Zilm, P. S., and Gully, N. J. (1998) : The behaviour of *Fusobacterium nucleatum* chemostat-grown in glucose- and amino acid-based chemically defined media. *Anaerobe* **4**, 111-116.
  35. Kapatral, V., Anderson, I., Ivanova, N., Reznik, G., Los, T., Lykidis, A., Bhattacharyya, A., Bartman, A., Gardner, W., Grechkin, G., Zhu, L., Vasieva, O., Chu, L., Kogan, Y., Chaga, O., Goltsman, E., Bernal, A., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Kyrpides, N., and Overbeek, R. (2002) : Genome Sequence and Analysis of the Oral Bacterium *Fusobacterium nucleatum* Strain ATCC 25586. *J. Bacteriol.* **184**, 2005-2018.
  36. Gharbia, S. E., and Shah, H. N. (1991) Comparison of the amino acid uptake profile of reference and clinical isolates of *Fusobacterium nucleatum* subspecies. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**, 264-269.
  37. Yoneda, S., Kawarai, T., Narisawa, N., Tuna, E. B., Sato, N., Tsugane, T., Saeki, Y., Ochiai, K., and Senpuku, H. (2013) : Effects of short-chain fatty acids on *Actinomyces naeslundii* biofilm formation. *Mol. Oral. Microbiol.* **28**, 354-365.
  38. Catenazzi, M. C., Jones, H., Wallace, I., Clifton, J., Chong, J. P., Jackson, M. A., Macdonald, S., Edwards, J., and Moir, J. W. (2014) : A large genomic island allows *Neisseria meningitidis* to utilize propionic acid, with implications for colonization of the human nasopharynx. *Mol. Microbiol.* **93**, 346-355.
  39. Wang, X., Buhimschi, C. S., Temoin, S., Bhandari, V., Han, Y. W., and Buhimschi, I. A. (2013) : Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS One* **8**, e56131.
  40. Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., Ojesina, A. I., Jung, J., Bass, A. J., Tabernero, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R. A., Ogino, S., Birren, B. W., Huttenhower, C., Garrett, W. S., and Meyerson, M. (2012) : Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**, 292-298.
  41. Pakula, R., and Walczak, W. (1963): On the nature of competence of transformable streptococci. *J. Gen. Microbiol.* **31**, 125-133

表 1 本研究で使⽤した菌株およびプラスミド

菌株/プラスミド	詳細	情報源
菌株		
<i>Streptococcus gordonii</i>		
DL1 Challis	Wild type	Pakula and Walczak (1963) <sup>41)</sup>
$\Delta arcD$	<i>arcD::ermAM</i> (ArcD <sup>-</sup> Em <sup>r</sup> )	本研究
Comp <i>arcD</i>	<i>arcD::ermAM::pCKarcD</i> (ArcD <sup>+</sup> Em <sup>r</sup> Spcm <sup>r</sup> )	本研究
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586	Wild type	American Type Culture Collection
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	Wild type	American Type Culture Collection
プラスミド		
pCK <i>arcD</i>	<i>S. gordonii arcD</i> in pCK; Spcm <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	本研究

表 2 本研究で使したプライマー

KEGG 情報	遺伝子名	方向 <sup>a</sup>	配列 (5'-3')	サイズ (bp)	情報源
SG01593	<i>arcA</i>	F	GAAGCAGCAAAAGGCTTGAC	95	本研究
		R	GCAAATGGATCTCGTGTGAA		
SG01592	<i>arcB</i>	F	AGTTTTGGGCCGTATGTTTG	111	本研究
		R	TCGTCAGTCAAACCATTTCCA		
SG01591	<i>arcC</i>	F	CATCTGATCCGTCAGCAAAA	114	本研究
		R	GAGGACCATTCCCGTGAGTA		
SG01569	<i>argC</i>	F	CCAGCCATTTTGTTCATGTG	89	本研究
		R	CTGCAACTGCTGCACAATCT		
SG01568	<i>argJ</i>	F	GACCAAAGCCTCAATCCAAA	111	本研究
		R	TGCATCTCATAGGCAGCATC		
SG01567	<i>argB</i>	F	GCCTTGCTAGGTCAAGTTGG	100	本研究
		R	CCGAAACTGTCTTTCCCAAA		
SG01566	<i>argD</i>	F	ATGCTGGAATTGATCCAAGG	82	本研究
		R	GTTGGCAAAAATCAGCCAGT		
SG00175	<i>argG</i>	F	AAACGATCAGGTCCGTTTGT	103	文献 7
		R	GATTTCTTCTCCCGAGACC		
SG00176	<i>argH</i>	F	TCCATCATGCCACAAAAGAA	96	本研究
		R	AACCGTCAGAAGGCTGAAGA		
SG01103	<i>carA</i>	F	GACCTGGAAATCCGGAAGAT	114	本研究
		R	CGTTAGCCATGGAGAAGAGC		
SG01104	<i>carB</i>	F	CGCTAAGATTCCACGCTTTC	92	文献 7
		R	TAGCCATGACTTCCCCTGTC		
SG00611, SG01706, SG01956, SG02129	16S rRNA gene	F	AGACACGGCCCAGACTCCTAC	138	文献 7
		R	CTCACACCCGTTCTTCTTTACAA		

<sup>a</sup>F, フォワード; R, リバーズ

表 3 PC1 と有意に正の相関を示す代謝物

	正の相関 (PC1)	
	因子負荷量	p 値
シトルリン	0.9897	0.0002
ホスホリボシルニリン酸	0.9881	0.0002
コハク酸	0.9877	0.0002
クエン酸	0.9840	0.0004
インドール-3-酢酸	0.9838	0.0004
N <sup>6</sup> ,N <sup>6</sup> ,N <sup>6</sup> -トリメチルリジン	0.9811	0.0005
グルコース-1-リン酸	0.9810	0.0005
4-( $\gamma$ -グルタミルアミノ)酪酸	0.9802	0.0006
サッカロピン	0.9791	0.0006
GTP	0.9770	0.0008
オルニチン	0.9767	0.0008
dTDP	0.9728	0.0011
アルギノコハク酸	0.9713	0.0012
クリセロホスホコリン	0.9615	0.0022
ジベレリン酸	0.9603	0.0023
オロチジン-5'-リン酸	0.9562	0.0028
dTTP	0.9556	0.0029
カルボキシメチルリジン	0.9457	0.0043
アルギニン	0.9416	0.0050
S-メチルグルタチオン	0.9390	0.0055
カルニチン	0.9274	0.0077
オフタルミン酸	0.9234	0.0086
$\alpha$ -ケトグルタル酸	0.8835	0.0196
イノシトール-1-リン酸/イノシトール-3-リン酸	0.8629	0.0269
3'-CMP/2'-CMP	0.8501	0.0320
GDP	0.8463	0.0336
ヘキサン酸	0.8454	0.0340
チオプロリン	0.8233	0.0441
未知物質	0.8218	0.0448
トレオン酸	0.8217	0.0449



表 4 MSEA により特徴づけられた統計的に有意な代謝経路

	正の相関 (PC1)		負の相関 (PC1)	
	<i>p</i> 値*	<i>q</i> 値	<i>p</i> 値*	<i>q</i> 値
オルニチン回路	0.0110	0.2849	0.2958	0.5494
TCA 回路	0.0296	0.3850	1.0000	1.0000
グルタミン酸/グルタミン代謝	0.1253	1.0000	0.3466	0.5633
ヒスチジン代謝	0.1731	1.0000	0.8118	0.8442
クレアチニン代謝	0.2414	1.0000	0.4237	0.6414
リジン代謝	0.2748	1.0000	0.6123	0.7580
ピリミジン代謝	0.2768	1.0000	0.6008	0.7580
デオキシリボ核酸代謝	0.3769	1.0000	0.1979	0.4890
トリプトファン代謝	0.4260	1.0000	0.6697	0.7915
ポリアミン代謝	0.5012	1.0000	0.7505	0.8130
チロシン代謝	0.5012	1.0000	0.7505	0.8130
リボ核酸代謝	0.5611	1.0000	0.2251	0.4890
シキミ酸代謝	0.5669	1.0000	0.4441	0.6414
プリン代謝	0.6835	1.0000	0.0610	0.3964
アラニン/アスパラギン酸/アスパラギン代謝	0.7175	1.0000	0.1440	0.4890
解糖系/糖新生	1.0000	1.0000	0.0211	0.1826
ペントースリン酸代謝	1.0000	1.0000	0.0913	0.4750
バリン/ロイシン/イソロイシン代謝	1.0000	1.0000	0.0126	0.1633
グリシン/セリン/トレオニン代謝	1.0000	1.0000	0.0004	0.0092
システイン代謝	1.0000	1.0000	0.1326	0.4890
メチオニン代謝	1.0000	1.0000	0.1518	0.4890
プロリン代謝	1.0000	1.0000	0.2445	0.4890
$\beta$ アラニン代謝	1.0000	1.0000	0.6123	0.7580
タウリン代謝	1.0000	1.0000	0.3466	0.5633
ニコチン酸代謝	1.0000	1.0000	0.1979	0.4890

\*有意な代謝経路のセルを灰色で示す

表 5 遺伝子発現量の相対変化

KEGG 情報	遺伝子名	相対変化量 ( $\Delta arcD/WT$ ) <sup>a</sup>
SG01593	<i>arcA</i>	$1.650 \pm 0.266$
SG01592	<i>arcB</i>	$2.779 \pm 0.266$
SG01591	<i>arcC</i>	$2.299 \pm 0.248$
SG01569	<i>argC</i>	$0.775 \pm 0.081$
SG01568	<i>argJ</i>	$0.844 \pm 0.106$
SG01567	<i>argB</i>	$1.009 \pm 0.124$
SG01566	<i>argD</i>	$1.032 \pm 0.094$
SG00175	<i>argG</i>	$0.637 \pm 0.069$
SG00176	<i>argH</i>	$0.783 \pm 0.075$
SG01103	<i>carA</i>	$0.781 \pm 0.088$
SG01104	<i>carB</i>	$0.786 \pm 0.071$

<sup>a</sup> 値は平均と標準誤差を示す (n=3)

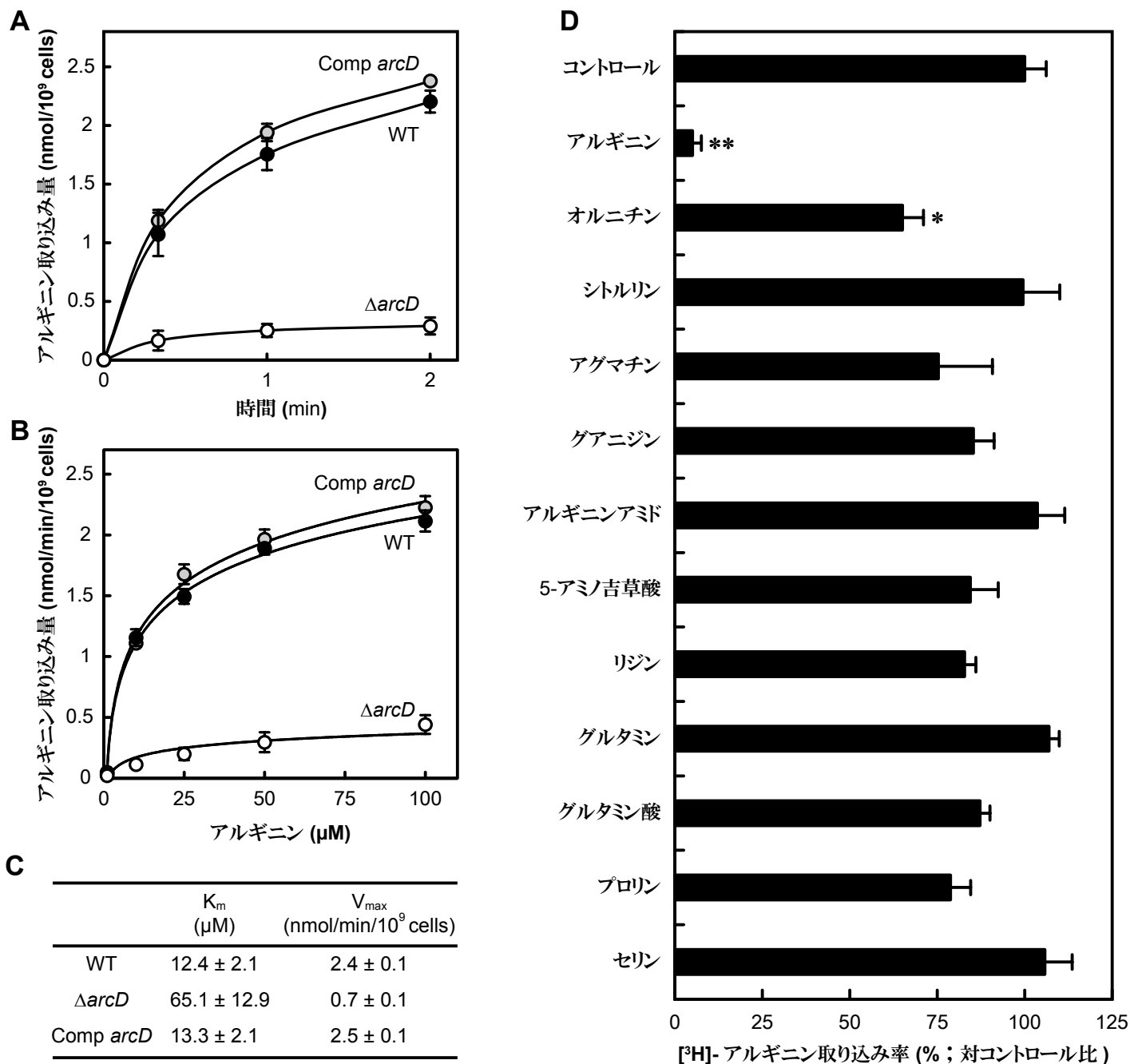


図1 *S. gordonii* ArcD のアルギニン取り込み能

A. *S. gordonii* 各菌株による放射線標識アルギニン取り込み量の経時変化の比較。PBS 懸濁菌液に最終濃度  $50 \mu M$  となるよう  $L-[^3H]$  アルギニンを添加することで反応を開始させた。値は平均と標準誤差（プロットで表示）を示す ( $n=3$ )。B. *S. gordonii* 各菌株のアルギニン取り込みにおける用量依存性の比較。各アッセイの反応時間は1分間で、値は平均と標準誤差（プロットで表示）を示す ( $n=3$ )。C. *S. gordonii* 各菌株のアルギニン取り込みにおける反応速度パラメーター。 $K_m$  値および  $V_{max}$  値は、Michaelis-Menten 型速度式を仮定し ORIGIN 2015 を用いた非線形曲線フィッティングにより算出した。D. 非標識アルギニン類似体が *S. gordonii* 野生株のアルギニン取り込みに及ぼす影響。野生株のアッセイソリューションに種々のアルギニン類似体が  $L-[^3H]$  アルギニンの 100 倍の濃度で添加され、20 秒間の放射性標識アルギニン取り込み率を評価した。値は平均と標準誤差（バーで表示）を示す ( $n=3$ )。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (対コントロール比)

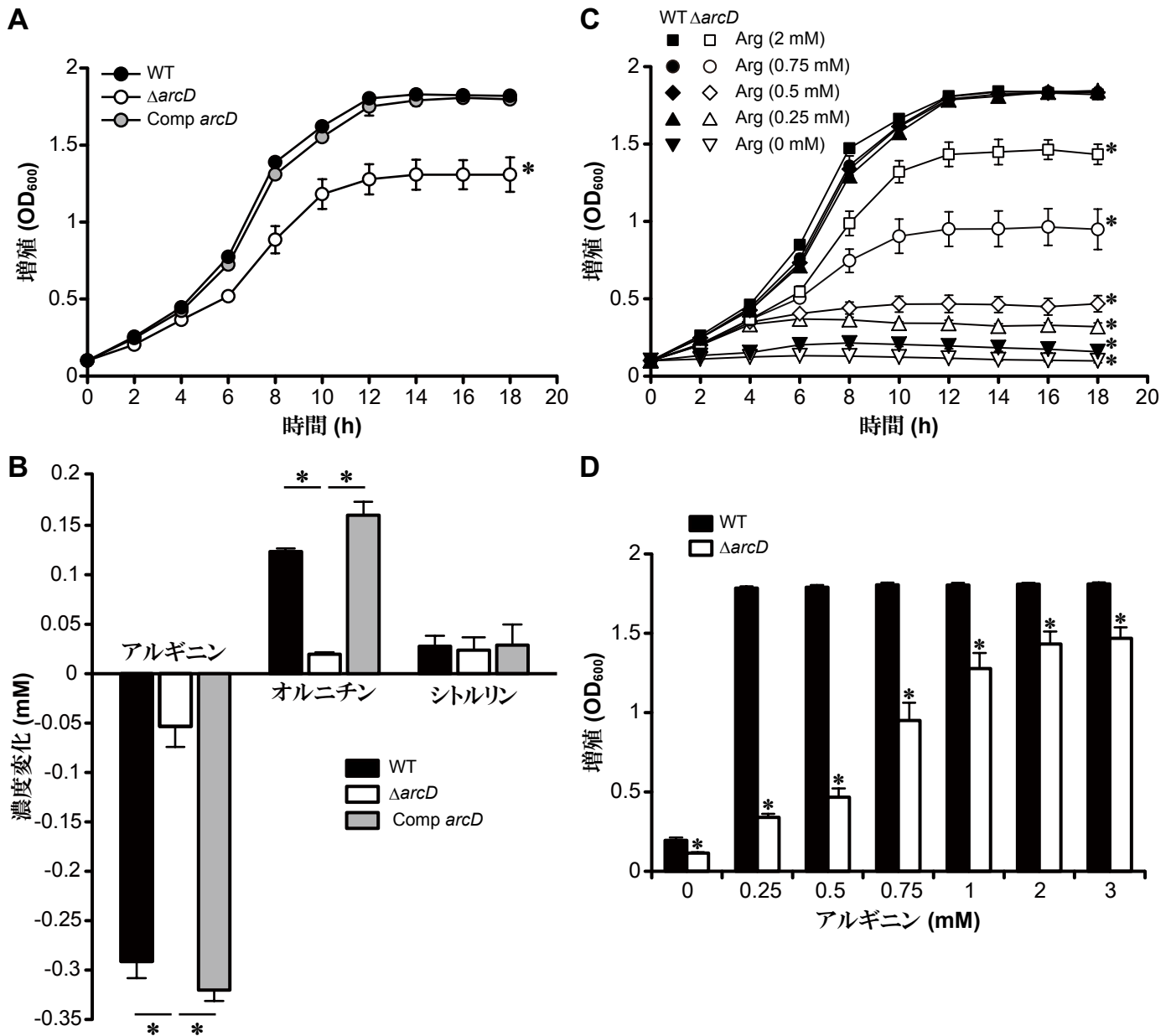


図2 *S. gordonii* 各菌株の増殖とそれに伴う菌対外アルギニン関連代謝物の濃度変化

A. 1 mM アルギニンおよび 1.2% グルコースを含有した CDM 中での *S. gordonii* 各菌株の増殖の比較。値は平均と標準偏差（プロットで表示）を示し（ $n=3$ ），反復測定 ANOVA を用いて各菌株の増殖を比較した。\*,  $p < 0.01$ （対野生株あるいは対 Comp *arcD*）。B. *S. gordonii* 各菌株の菌対外アルギニン関連代謝物の濃度変化。A と同じ培地を用いて 6 時間培養した後の各代謝物の増減が示されている（平均値  $\pm$  標準誤差； $n=3$ ）。\*,  $p < 0.01$ 。C. 種々の濃度のアルギニン含有 CDM における *S. gordonii* 野生株と  $\Delta arcD$  の増殖の比較。値は平均と標準偏差（プロットで表示）を示し（ $n=3$ ），反復測定 ANOVA を用いて菌株間の違いを比較した。\*,  $p < 0.01$ （対 2 mM アルギニン含有時の野生株）。D. 種々の濃度のアルギニン含有 CDM における *S. gordonii* 野生株と  $\Delta arcD$  の培養開始 6 時間後の増殖の比較。値は平均と標準偏差（バーで表示）を示す（ $n=3$ ）。\*,  $p < 0.01$ 。

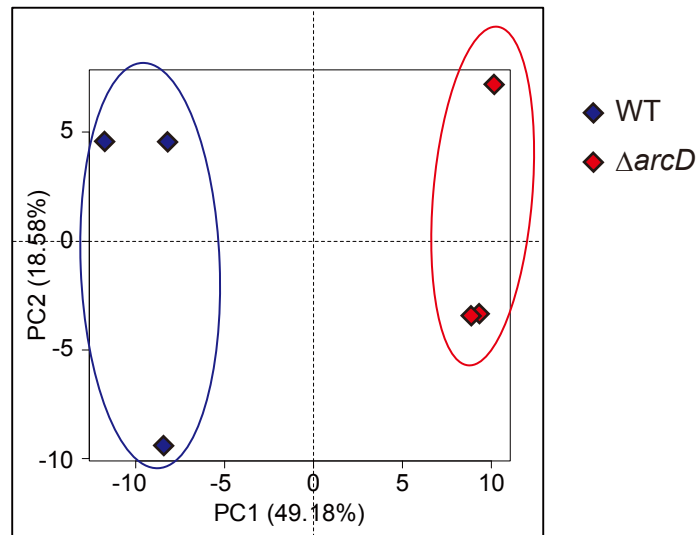


図3 *S. gordonii* 野生株と $\Delta arcD$  の菌体内メタボロームについての主成分分析

第1主成分（PC1）と第2主成分（PC2）から成るスコアプロットを示す。青で囲まれたプロットが野生株の菌体サンプルで、赤が $\Delta arcD$ の菌体サンプルを示し、233個の代謝物量を変数とする多変量空間上のプロットに対し、その分散が最大となるよう2次元平面へ投影した図とみることができる。

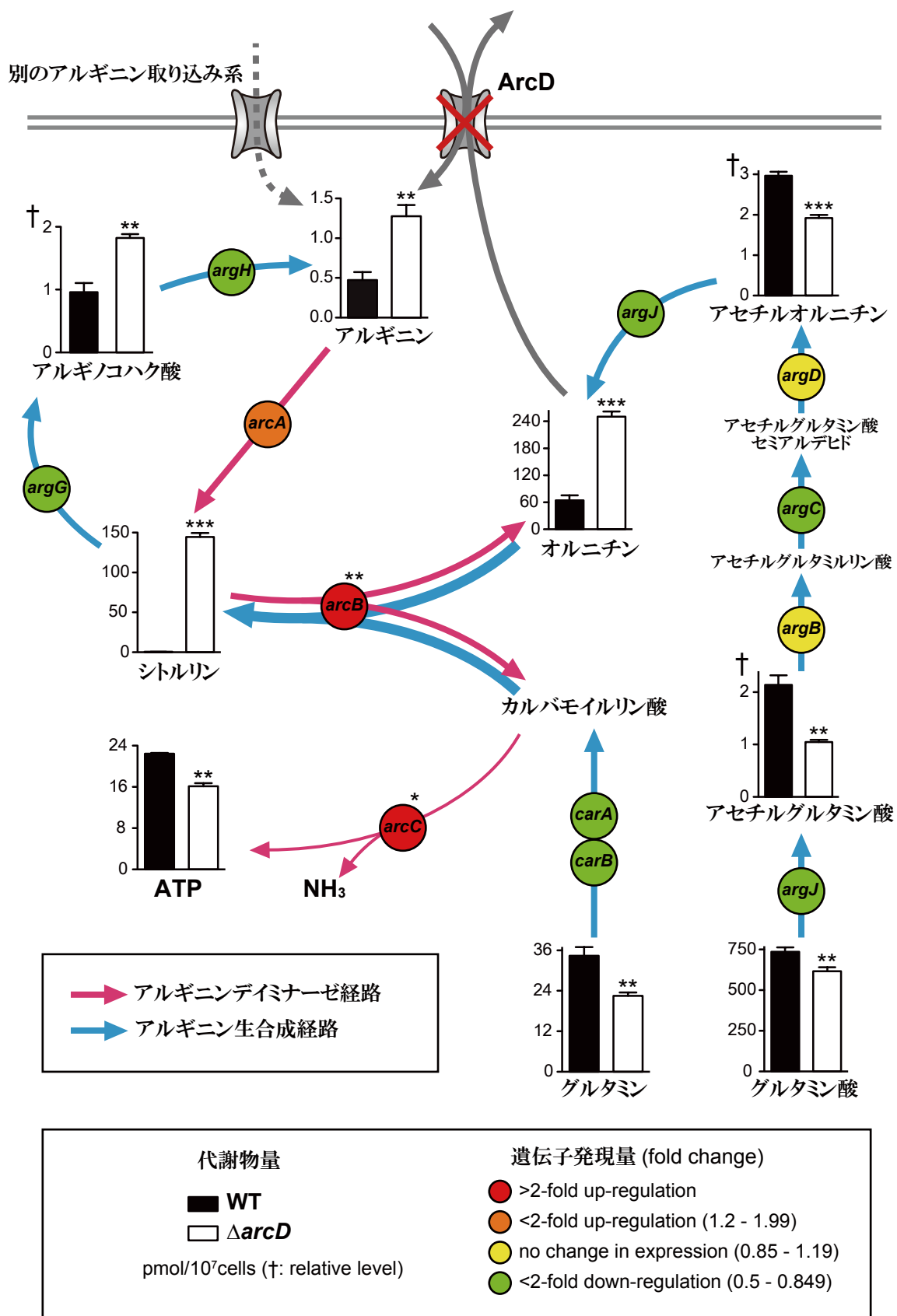


図4  $\Delta arcD$  のアルギニン代謝変化

1 mM アルギニン・0.1% ガラクトース含有 CDM (pH 7.0) で各菌株を 8 時間培養後、菌体を回収し、野生株・ $\Delta arcD$  間で代謝物・遺伝子発現プロファイルの変化を比較した。菌株間の増殖の違いの影響を最小限に抑えるために、 $OD_{600} = 0.8$  の状態から培養を開始した。 $\Delta arcD$  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ていると考えられる。値は平均と標準偏差を示す ( $n=3$ )。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; †, 相対的代謝物量 (それ以外は絶対定量値を示す)。

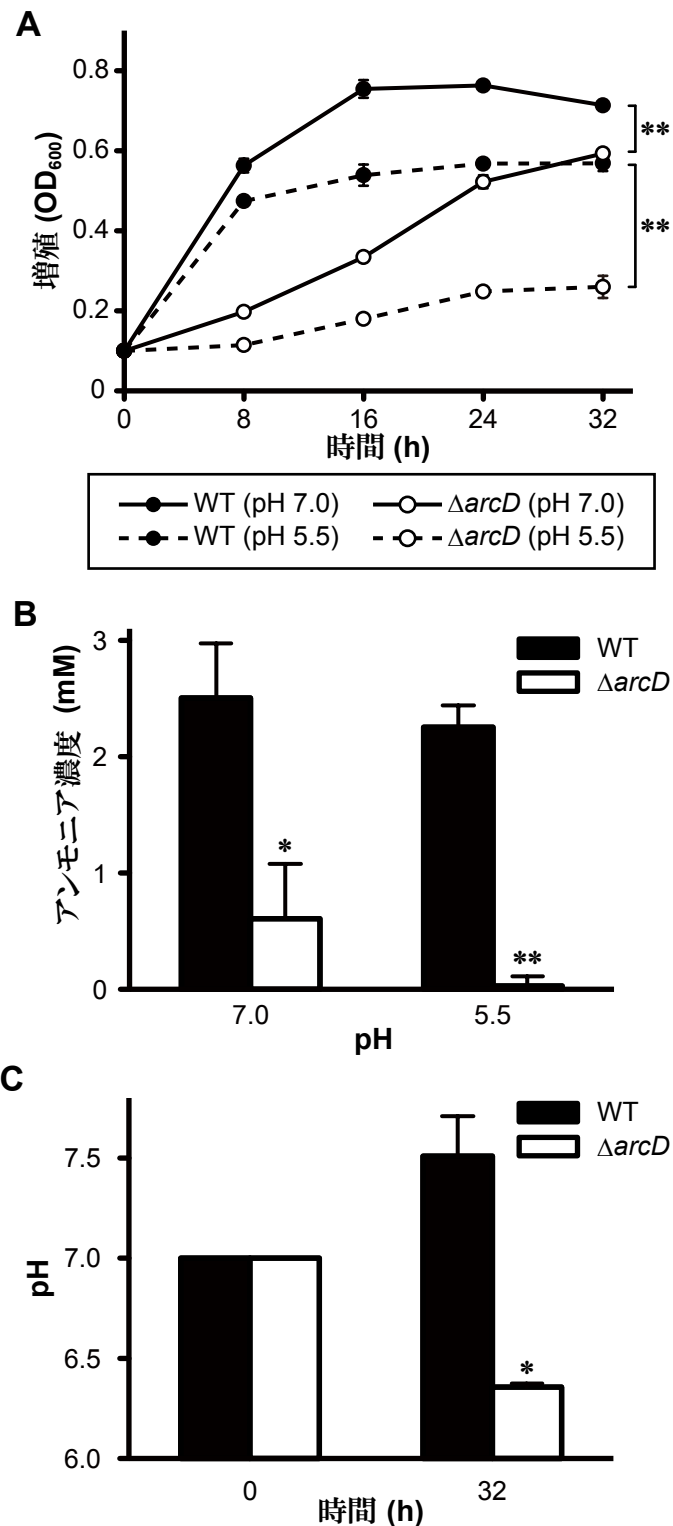


図5  $\Delta arcD$  のアンモニア産生量と酸性環境中での増殖

A. 1 mM アルギニン・0.1% ガラクトース含有 CDM (pH 7.0/5.5) での *S. gordonii* 野生株と  $\Delta arcD$  の増殖の比較。値は3回繰り返した実験の代表的な結果に関する平均と標準偏差(プロットで表示)で示され(n=3), 反復測定ANOVAを用いて各菌株の増殖を比較した。\*\*,  $p < 0.01$ 。B. 培養32時間後における各菌株のアンモニア産生量。値は平均と標準誤差を示す(n=3)。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ 。C. 培養32時間における各菌株の培養上製のpH変化。値は3回繰り返された実験の代表的な結果の平均と標準誤差(バーで表示)を示す(n=3)。\*,  $p < 0.05$ 。

A

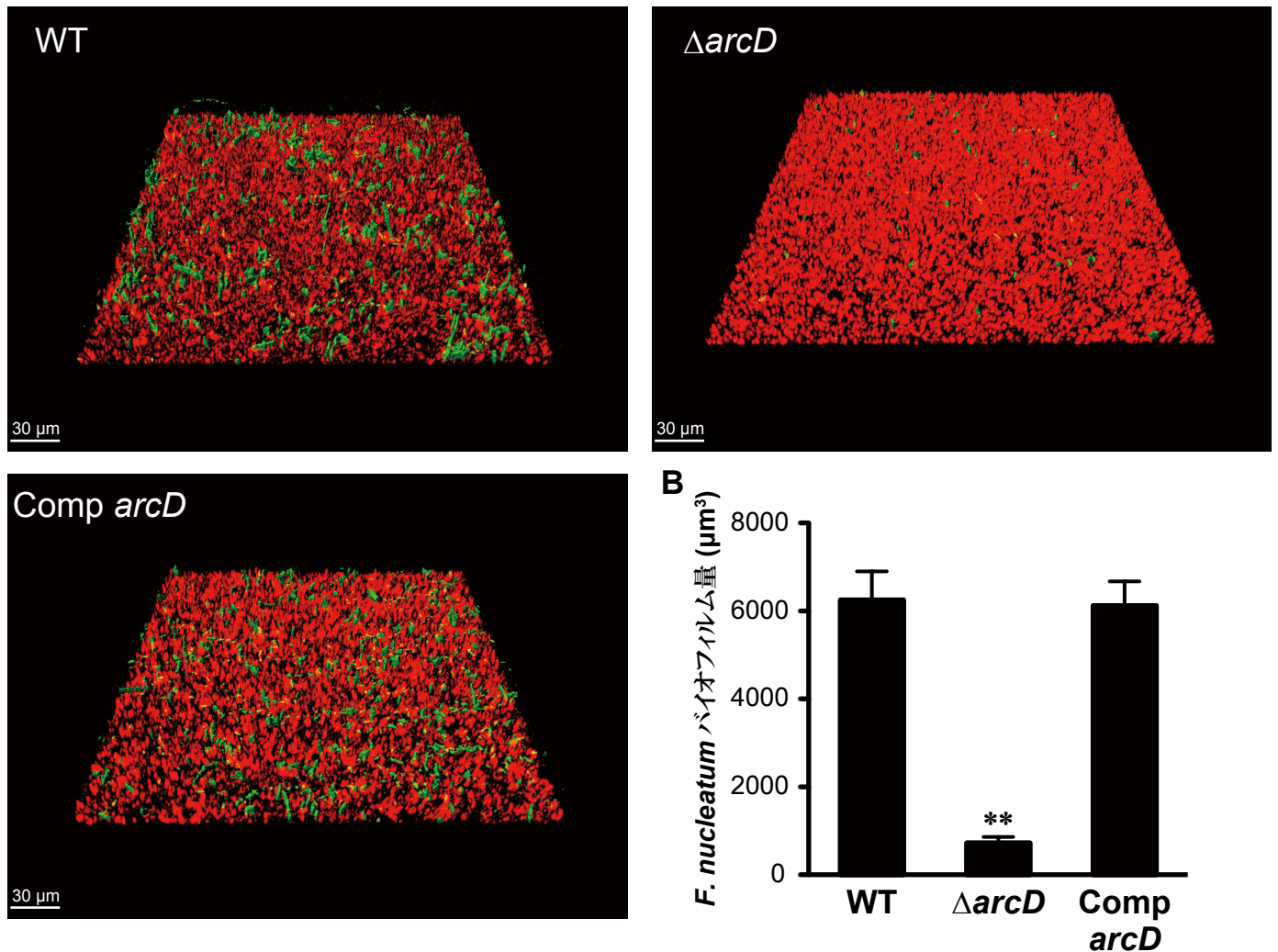


図6 *S. gordonii* 各菌株上に形成された *F. nucleatum* バイオフィルム量の比較。

A. 各菌株を用いて形成された混合バイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 像。まず *S. gordonii* 各菌株をヘキシジウムイオダイド (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, FITC (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. 24 時間共培養後の *F. nucleatum* バイオフィルムの定量値。値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果の平均と標準誤差 (バーで表示) を示す (n=10)。

\*\*,  $p < 0.01$ 。



**A**

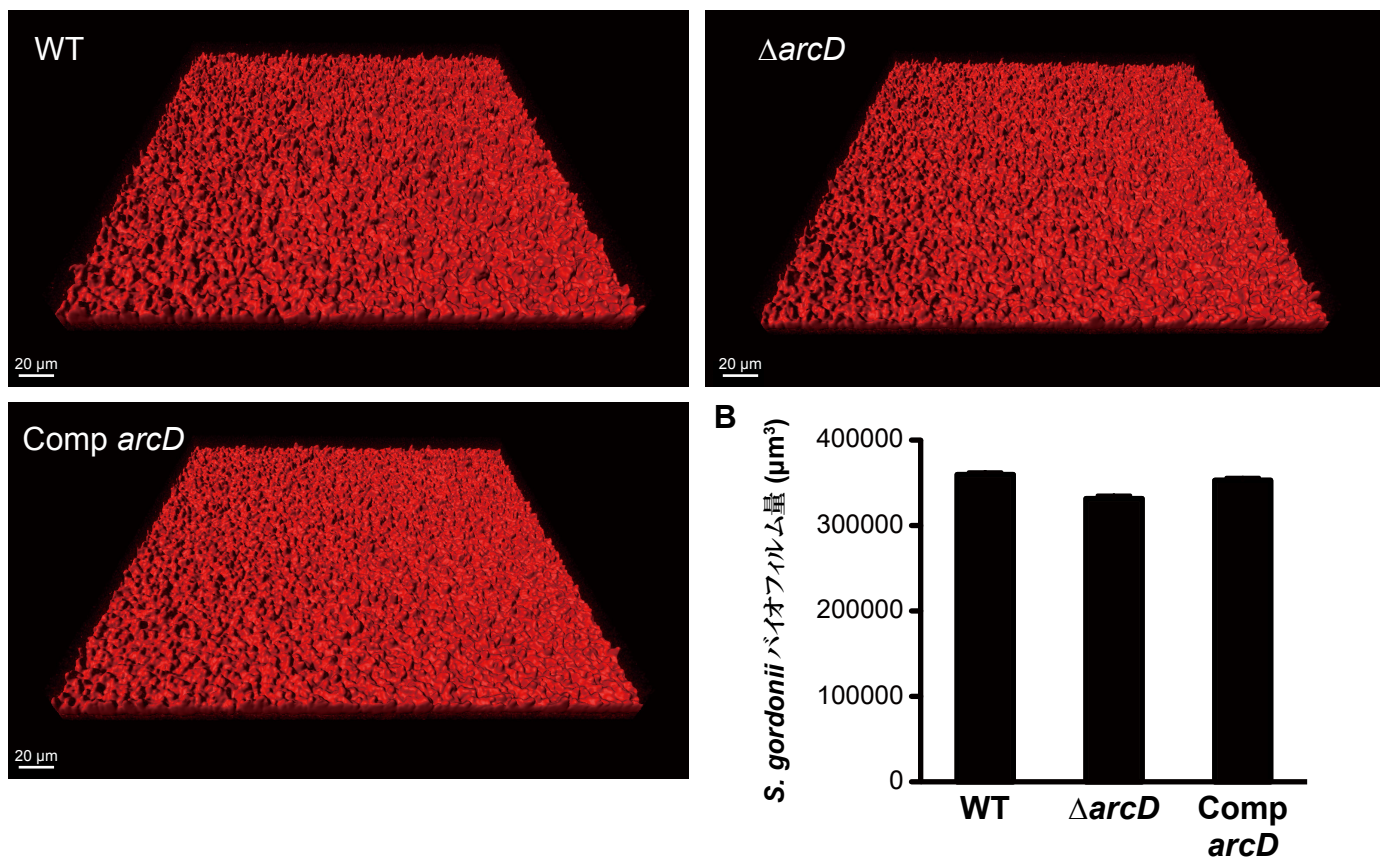
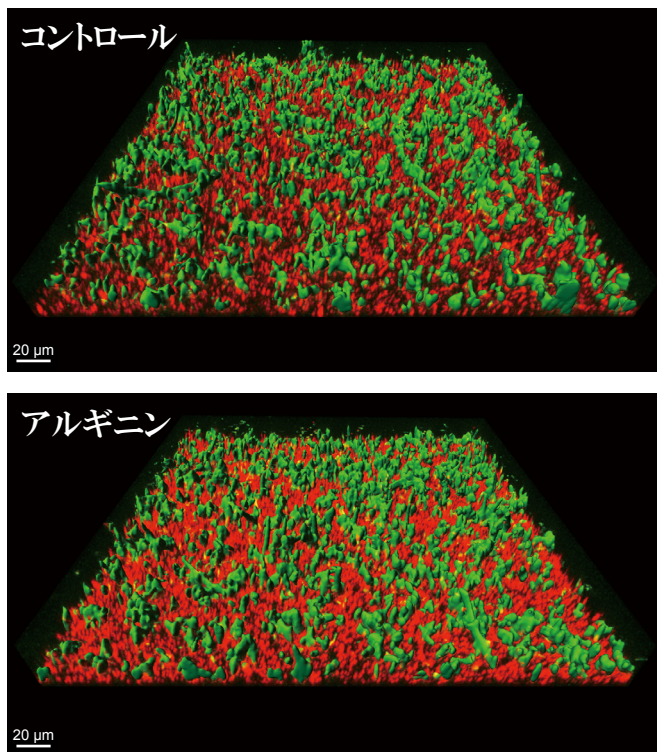


図7 *S. gordonii* 各菌株間での単一バイオフィルム量の比較

A. *S. gordonii* 各菌株バイオフィルムの CLSM 像。 *S. gordonii* 各菌株をヘキシジウムイオダイドで生染色後、チャンバースライドを用いて 16 時間培養し底面に形成されたバイオフィルムを CLSM で観察した。 B. 16 時間培養後の *S. gordonii* 各菌株バイオフィルムの定量値。 値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果の平均と標準誤差（バーで表示）を示す（n=10）。

A



B

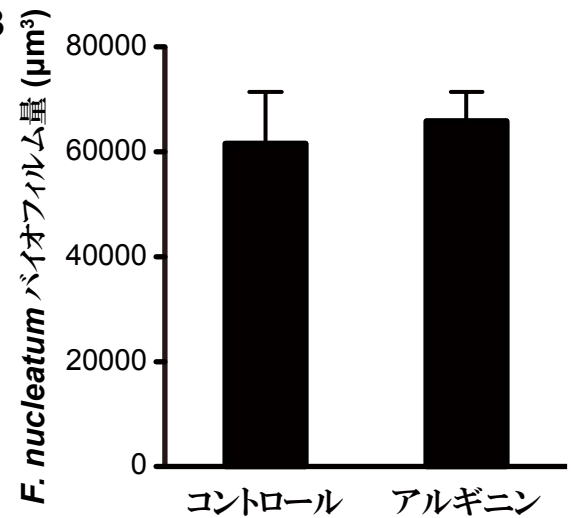


図 8 アルギニンが *S. gordonii* 野生株 -*F. nucleatum* 混合バイオフィーム形成に及ぼす影響

A. アルギニン存在下での *S. gordonii* 野生株と *F. nucleatum* 混合バイオフィームの CLSM 像。所定の方法で *S. gordonii* 野生株のバイオフィームを形成し、浮遊菌を除去した後、FITC で生染色した *F. nucleatum* と 1 mM アルギニン含有 PBS 中で 24 時間共培養し、CLSM でバイオフィームを観察した。B. 24 時間共培養後の *F. nucleatum* バイオフィームの定量値。値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果の平均と標準誤差（バーで表示）を示す（n=10）。

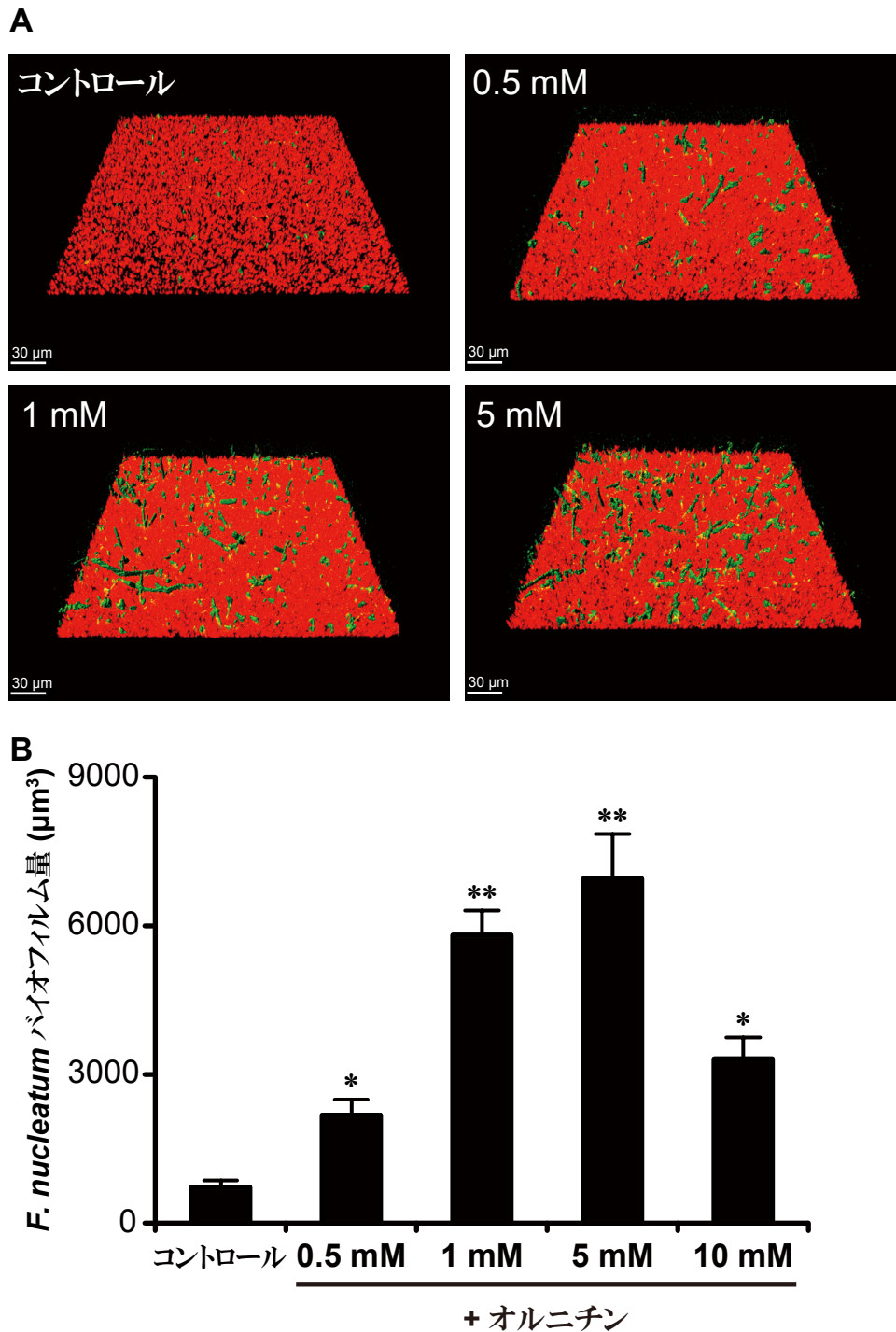


図9 オルニチンが *S. gordonii*  $\Delta\text{arcD}$ -*F. nucleatum* 混合バイオフィルム形成に及ぼす影響

A. オルニチン存在下での *S. gordonii*  $\Delta\text{arcD}$  と *F. nucleatum* 混合バイオフィルムの CLSM 像。所定の方法で *S. gordonii*  $\Delta\text{arcD}$  のバイオフィルムを形成し、浮遊菌を除去した後、FITC で生染色した *F. nucleatum* と種々の濃度のオルニチン含有 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. 24 時間共培養後の *F. nucleatum* バイオフィルムの定量値。値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果の平均と標準誤差（バーで表示）を示す (n=10)。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ 。

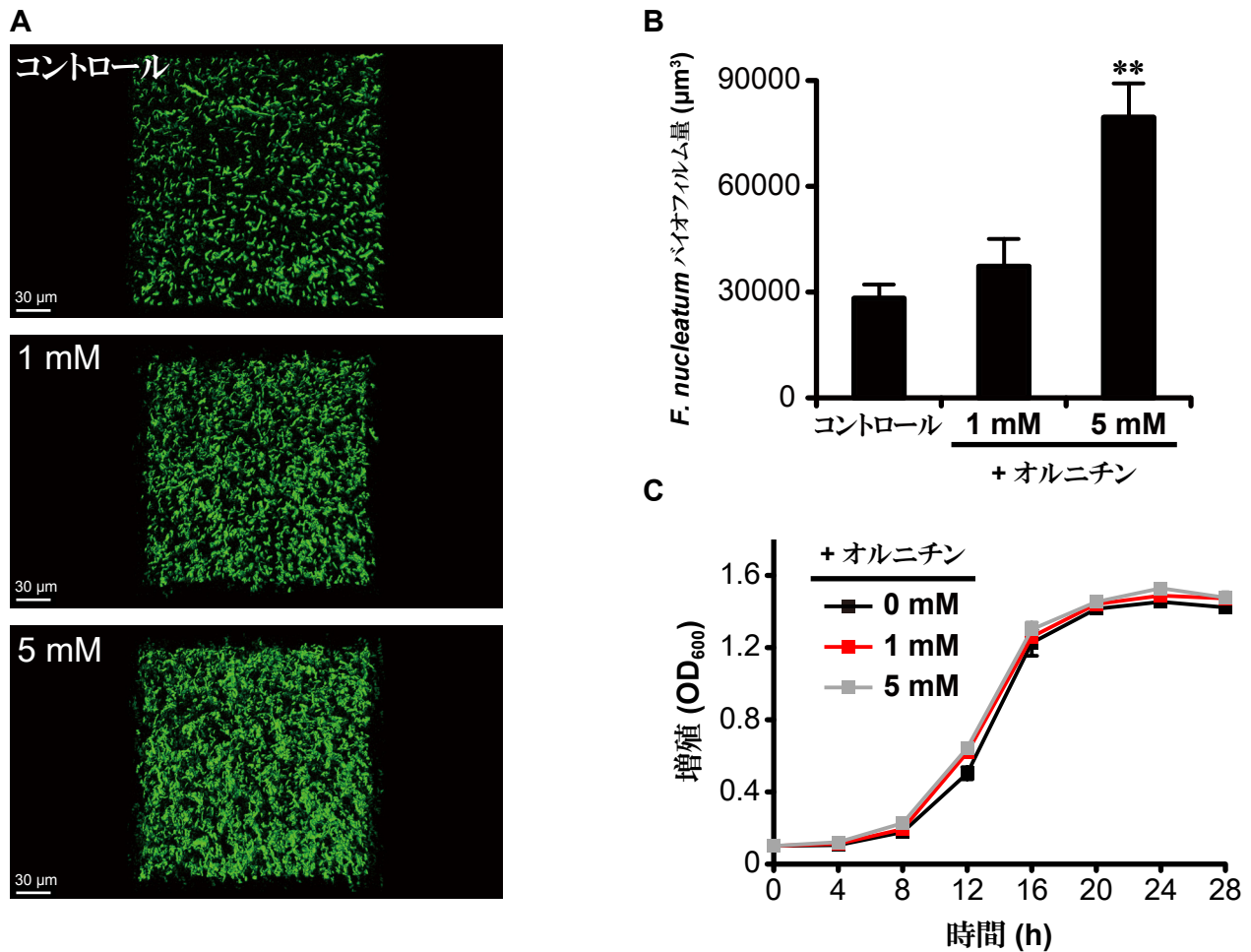


図 10 オルニチンが *F. nucleatum* 単一バイオフィルム形成およびプランクトニックな増殖に及ぼす影響

A. オルニチン存在下での *F. nucleatum* 単一バイオフィルムの CLSM 像。FITC で生染色した *F. nucleatum* を種々の濃度のオルニチン含有 PBS 中で 24 時間培養し、CLSM でバイオフィルムを観察した。B. 24 時間培養後の *F. nucleatum* バイオフィルムの定量値。値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果に関する平均と標準誤差（バーで表示）を示す（ $n=10$ ）。\*\*,  $p < 0.01$ 。C. 種々の濃度のオルニチン存在下での *F. nucleatum* のプランクトニックな生育。値は平均と標準偏差（プロットで表示）を示す（ $n=3$ ）。



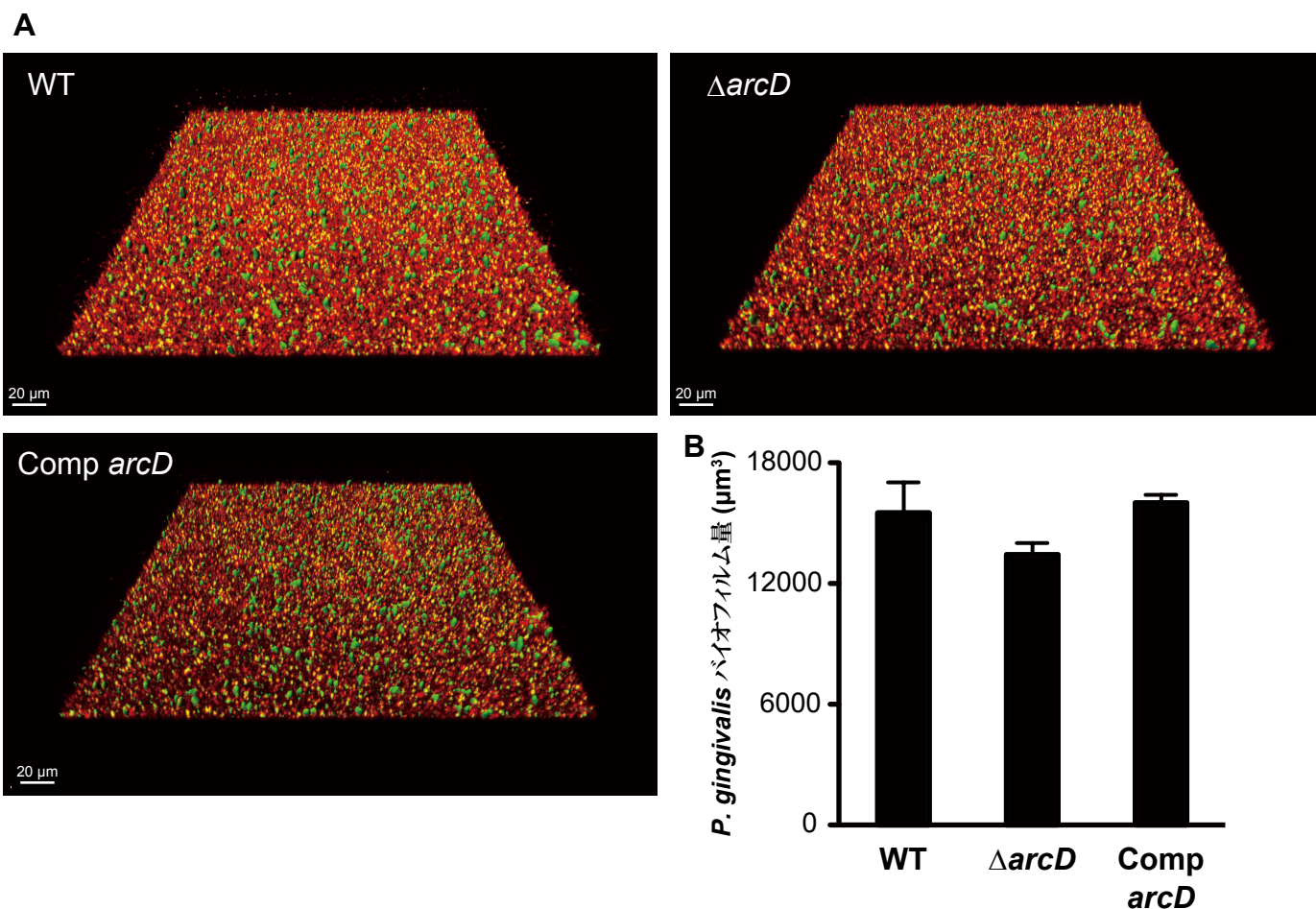


図 11 *S. gordonii* 菌株上に形成された *P. gingivalis* バイオフィルム量の比較

A. 各菌株を用いて形成された混合バイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 像。所定の方法で *S. gordonii* 菌株のバイオフィルムを形成し、浮遊菌を除去した後、FITC (緑色蛍光色素) で生染色した *P. gingivalis* 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. 24 時間共培養後の *P. gingivalis* バイオフィルムの定量値。値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果の平均と標準誤差 (バーで表示) を示す (n=10)。