OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	“Sit down and be quiet ”シグナルの発見 : パラアミノ安息香酸による歯周病菌の制御
Author(s)	久保庭, 雅恵; 坂中, 哲人; 天野, 敦雄
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2018, 62(2), p. 1-4
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/70615
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　62(2)：1 ～ 4，2018

“Sit down and be quiet” シグナルの発見

―パラアミノ安息香酸による歯周病菌の制御―

久保庭　雅恵*，坂中　哲人*，天野　敦雄*

（平成 30 年 3 月 12 日受付）

本総説の一部内容は，平成 30 年 1 月日に開催された大阪大学歯学会第 125 回例会において，平成 30 年度弓倉学術賞の受賞講演（対象論文：Kuboniwa, M., Houser, J. R., Hendrickson, E. L., Wang, Q., Alghamdi, S. A., Sakanaka, A., Miller, D. P., Hutcherson, J. A., Wang, T., Beck, D. A. C., Whiteley, M., Amano, A., Wang, H., Marcotte, E. M., Hackett, M., Lamont R. J. Metabolic crosstalk regulates *Porphyromonas gingivalis* colonization and virulence during oral polymicrobial infection. *Nature Microbiology* 2017;**2**:1493-1499.）として発表した。本研究は，国立研究開発法人日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」），日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究A 26253094，基盤研究B 15H05057）の支援のもと行われた。

はじめに

口腔内に存在する種々の常在菌は，表層タンパクを介したシグナル伝達や共凝集，クオラムセンシングによるシグナル伝達，代謝物質の相互利用など，菌体間のさまざまな相互作用により互いの表現型に影響を及ぼしあい，さらには宿主免疫担当細胞との相互作用や体内環境からの影響も受けつつ，細菌集団としての恒常性を保っている[1, 2]。細菌叢の構成比率が変化し宿主とのバランスが崩れた状態は dysbiosis と呼ばれ，腸内細菌叢の dysbiosis が種々の全身疾患に関与していることが近年活発に報告されているが，口腔の二大疾患と呼ばれるう蝕と歯周病もまた，dysbiosis によって引き起こされる混合感染症である。予防歯科学教室では，歯肉溝に存在する歯肉縁下細菌叢が，その成熟とともに dysbiosis に向かい，歯周病原性を亢進させていくメカニズムについて，プロテオミクス，メタボロミクスの手法を駆使して，基礎研究，臨床研究の双方から研究を展開してきている[3～7]。本稿では，歯面を被覆するペリクル構成タンパク質との特異的結合能を有する口腔レンサ球菌の一種である *Streptococcus gordonii* と，同菌との混合バイオフイルム形成により口腔内定着能を高める歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* との，代謝物質を介した相互作用に関する国際共同研究に焦点をあて，パラアミノ安息香酸（para-amino benzoic acid; pABA）が有するユニークな生理活性について解説する。

pABA による *S. gordonii*–*P. gingivalis* 混合バイオフイルム形成促進効果

本研究の先行研究において，我々はまず，自らのバイオフイルム形成能は有するが，*P. gingivalis* との混合バイオフイルム形成能を喪失した *S. gordonii* の遺伝子変異株をランダムノックアウトライブラリーから選抜することを目指した。独自の工夫により，混合バイオフイルム中の *P. gingivalis* のみを簡便に定量するスクリーニング法を開発し，1000 株を超えるスクリーニングにより，混合バイオフイルム形成に寄与する 10 遺伝子を同定した[8]。このうち，コリスミ酸に結合し，

＊　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

pABA を産生する酵素（Chorismate binding enzyme; Cbe）変異株が最も *P. gingivalis* との混合バイオフイルム形成能を低下させていた。pABA は，グルタミン酸，プテリンとともに葉酸の構成物質であるため，葉酸生合成が *S. gordonii* と *P. gingivalis* との混合バイオフイルム形成に重要な役割を果たすことが推測されたが，その詳細なメカニズムは不明であった。

このメカニズムを解明するべく，まず始めに，*S. gordonii* Cbe 変異株（Δ*cbe* 株）が *P. gingivalis* との混合バイオフイルム形成能を失う現象が，pABA の培地への添加によって回復するかどうかを確認した。ウエルのガラス底面にヨウ化ヘキシジウムで生染色した *S. gordonii* 野生株および Δ*cbe* 株のバイオフイルムをそれぞれ形成させ，培養上清と浮遊細菌を除去後，pABA 含有 PBS 中で FITC にて生染色した *P. gingivalis* と共培養し，混合バイオフイルムの形成状態を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果，*S. gordonii* Δ*cbe* 株と *P. gingivalis* の混合バイオフイルム形成能の回復が確認された。また，*S. gordonii* 野生株においても，pABA の添加による混合バイオフイルム形成能の増強が観察された（図 1）。

次に，pABA による混合バイオフイルム形成促進効果が，*S. gordonii*, *P. gingivalis* のどちらに作用した結果であるのかを確かめるため，*S. gordonii* Δ*cbe* 株と，pABA 含有 PBS で前培養した *P. gingivalis* を用い，pABA 不含 PBS 中で混合バイオフイルムを形成させたところ，形成能が回復することを確認した。一方で，pABA 含有 PBS 中でまず *S. gordonii* Δ*cbe* 株のバイオフイルムを形成させた後，pABA 不含 PBS 中で *P. gingivalis* と共培養しても，混合バイオフイルム形成が回復しないことがわかった。これらのことから，pABA を作用させることで *P. gingivalis* 側に生じる変化が両菌による混合バイオフイルム形成に関与していることが示された。

pABA 刺激によって *P. gingivalis* にどのような変化が生じるのか？

次に，pABA を作用させた *P. gingivalis* 菌体内でどのような代謝変動が生じるのかを，プロテオミクスとメタボロミクスを組み合わせたトランスオミクス解析により詳細に検討した。その結果，環境中に pABA が存在する場合，*P. gingivalis* は pABA を菌体内に取り込み，自らの pABA 生合成経路の活性を低下させる一方，THF 合成を加速させ，THF 誘導体合成経路とその周辺のメチオニン代謝経路，ヒスチジン分解経路，核酸合成経路に大きな変動をきたすことがわかった。そこで，これらの経路上に位置する酵素群の経時的な遺伝子発現情報も加味して考察したところ，pABA の取り込み開始後初期段階の，THF 誘導体生合成反応が進んでいる時点では，メチオニン代謝経路，ヒスチジン分解経路，核酸合成経路が活性化し，シグナル伝達物質である AI-2 の産生やチミジンを含むピリミジン産生が亢進するが，その後 THF–グルタミン酸サルベージ経路が

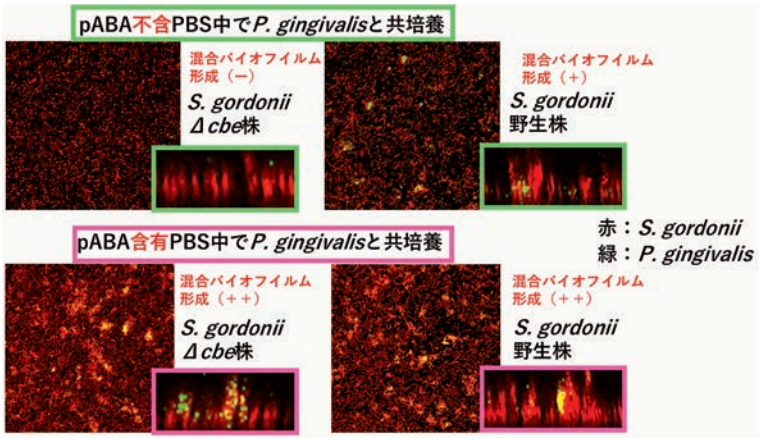

図 1　pABA による *S. gordonii-P. gingivalis* 混合バイオフイルム形成能の増強

ヨウ化ヘキシジウムで生染色した *S. gordonii*（赤）の野生株，および Δ*cbe* 株を生理食塩水中で培養し，唾液コートしたガラス底面にバイオフイルムを形成させた後，FITC で生染色した *P. gingivalis*（緑）と pABA 非含有（上）および pABA 含有（下）生理食塩水中で培養し，混合バイオフイルムを形成させた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて混合バイオフイルム形成状態を観察した *x-y* 平面像および *x-z* 平面の拡大像を示す。

稼働すると，これらの代謝経路が抑制されるという代謝変動が推察された（図 2）。さらに興味深いことに，pABA を作用させた *P. gingivalis* では，トランスケトラーゼの発現量が抑制されることでビタミン B_6（Pyridoxal phosphate; PLP）の産生量が低下し，ポリアミン産生酵素群をはじめとするいくつかの PLP 依存性酵素の産生物質が顕著に減少していることが明らかとなった（表 1）。

マウスモデルにおいて，pABA は *P. gingivalis* の口腔内への定着を促進する一方，病原性を抑制した

線毛は，*P. gingivalis* の口腔内定着に重要な役割を果たす[9]。プロテオーム解析から，pABA は *P. gingivalis* の線毛発現量を増加させる作用を有することが示されたため，まず *S. gordonii* 野生株，Δ*cbe* 株と *P. gingivalis* との共培養系における線毛遺伝子発現解析を実施

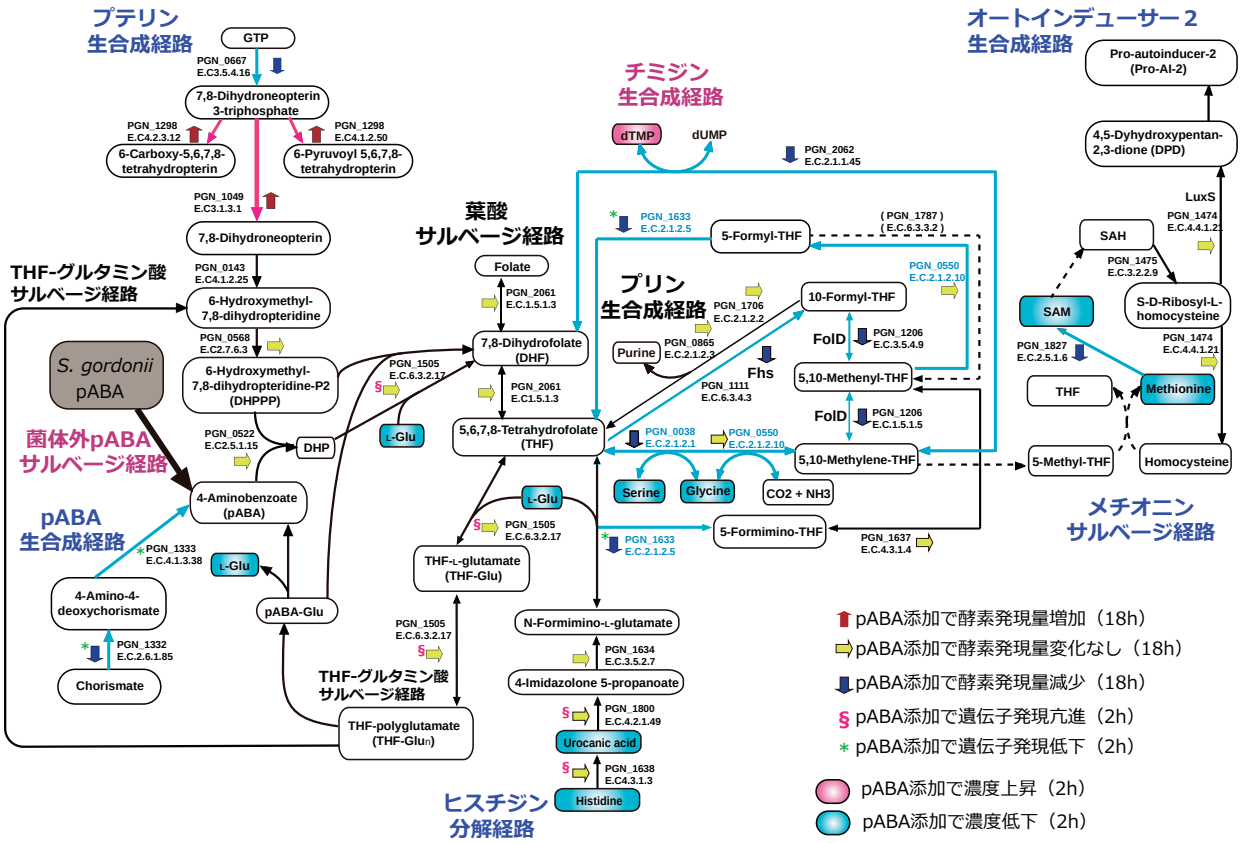

図 2　pABA によって誘発される *P. gingivalis* 菌体内代謝変動

PGN 番号：*P. gingivalis* ATCC33277 株の遺伝子番号。水色文字で表記された遺伝子番号は PLP 依存性酵素を示す。
E.C. 番号：酵素番号

表 1　PLP- 依存性酵素の活性低下により産生量が有意に減少した代謝物質

PLP-依存性酵素名	生成物
ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ［EC:4.1.1.20］	2,6-ジアミノピメリン酸*
グルタミン酸ホルムイミノトランスフェラーゼ［EC:2.1.2.5］	グルタミン酸*
トリプトファン合成酵素 α 鎖［EC:4.2.1.20］	トリプトファン
セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ［EC:2.1.2.1］	グリシン
アスパラギン酸-1-デカルボキシラーゼ［EC:4.1.1.11］	β-アラニン
1-アミノシクロプロパンカルボン酸シンターゼ［EC:4.4.1.14］	1-アミノシクロプロパンカルボン酸
グルタミン酸デカルボキシラーゼ［EC:4.1.1.15］	GABA
アルギニンデカルボキシラーゼ［EC:4.1.1.19］	アグマチン

*酵素反応が逆回りする場合基質となる

した。その結果，*S. gordonii* 野生株との共培養時には *P. gingivalis* の線毛遺伝子発現が亢進する一方，Δ*cbe* 株との共培養時にはそのような現象は観察されなかった。そこで，pABA を作用させた *P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への付着能力やマウス口腔感染モデルにおける口腔内定着率を確認したところ，pABA を作用させた *P. gingivalis* は歯肉上皮細胞への付着能力を高め，感染後 3 週目においても口腔内定着数が有意に増加していることが確認された。

続いて，pABA を作用させた *P. gingivalis* を用いて，マウス口腔感染モデルにおける歯槽骨吸収量を測定した。すると，予想に反して，歯槽骨吸収は pABA を作用させることで抑制されることが明らかとなった。さらに，背部中央への皮下注射によるマウス感染実験において，*S. gordonii* Δ*cbe* 株と *P. gingivalis* を混合感染（5×10^9 total bacteria）させたマウスでは，*S. gordonii* 野生株と *P. gingivalis* との混合感染や，それぞれの株の単一感染結果と比較して，顕著に高い致死率を示した。また，感染菌量を少量（2.5×10^9 total bacteria）にしても，同様の結果が得られた。通常，我々が使用した *P. gingivalis* ATCC33277 株は，感染局所に限局的な膿瘍を形成することはあっても宿主を死に至らしめることはないことから，その詳細なメカニズムは不明であるが，pABA 産生機能を喪失した *S. gordonii* が近傍に存在することで，*P. gingivalis* ATCC33277 株の病原性が著しく亢進していることが示唆された。

おわりに

以上のことから，*S. gordonii* 由来の pABA が，隣接する *P. gingivalis* のバイオフイルム形成能を高める一方で病原性を減弱させるという多面的な生理活性を示し，パートナー菌種の表現型を変化させる鍵となる代謝物質であることが示された。今後は，代謝物質を介した菌体間相互作用についての研究をさらに推進し，歯周病発症に至る過程で重要な生理活性を発揮する複数の代謝物質を同定およびプロファイリングすることで，先制医療を可能とするスクリーニング検査の開発につなげたいと考えている。

謝辞

本研究は，University of Louisville の Prof. Richard J. Lamont, University of Washington の Dr. Murray Hackett, The university of Texas at Austin の Prof. Marvin Whiteley および Prof. Edward Marcotte との国際共同研究により実施されました。これらの諸先生方に深甚なる謝意を表します。また，研究遂行に関して，幅広いご援助とご協力をいただきました予防歯科学教室の皆様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 Microbiology*. **24**, 477–89.
2）Kuboniwa, M. and Lamont, R. J.（2010）: Subgingival biofilm formation. *Periodontology 2000*. **52**, 38–52.
3）Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Takeuchi, H., Hashino, E., Amano, A.（2015）: Arginine-ornithine antiporter ArcD in *Streptococcus gordonii* controls arginine metabolism and biofilm development with *Fusobacterium nucleatum* by ornithine cross-feeding. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 21185–21198.
4）Kuboniwa, M., Sakanaka, A., Hashino, E., Bamba, T., Fukusaki, E., Amano, A.（2016）: Prediction of periodontal inflammation via metabolic profiling of saliva. *Journal of Dental Research*, **95**, 1381–6.
5）Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Hashino, E., Bamba, T., Fukusaki, E., Amano, A.（2017）: Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Scientific Reports*, **7**, 42818.
6）Maeda, K., Nagata, H., Ojima, M., Amano, A.（2015）: Proteomic and transcriptional analysis of interaction between oral microbiota *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*. *Journal of Proteome Research*, **14**, 82–94.
7）Kuboniwa, M., Hendrickson, E. L., Xia, Q., Wang, T., Xie, H., Hackett, M., Lamont, R. J.（2009）: Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiology*, **9**, 98.
8）Kuboniwa, M., Tribble, G. D., James, C. E., Kilic, A. O., Tao, L., Herzberg, M. C., Shizukuishi, S., Lamont, R. J.（2006）: *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Molecular Microbiology*. **60**, 121–39.
9）Amano, A.（2010）: Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology 2000*. **52**, 12–37.