

最近のトピックス

歯周ポケットから分離される酪酸産生性糖非分解性嫌気性グラム陽性桿菌のアルギニンを中心としたアミノ酸代謝 Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic anaerobic Gram-positive rods in periodontal pockets

新潟大学・医歯学系・口腔生命科学系列,
口腔環境・感染防御学分野
上松 弘幸, 星野 悦郎
Oral Ecology in Health and Infection, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Hiroyuki Uematsu and Etsuro Hoshino

【はじめに】

歯周疾患における細菌性の病原性は種々研究されている。近年、歯周ポケット内に存在する細菌が産生する酪酸 (butyrate) が問題視され、研究されてきている。酪酸は実際、歯周ポケットから検出される²⁾ においのする有機酸である。この酪酸に、病原性のあることが指摘されているが¹⁴⁾、特に、ヒト歯肉繊維芽細胞の増殖抑制やタンパク質合成を抑制すること⁷⁾、ヒトの内皮細胞の増殖を抑制すること^{12,15)}、ヒト及びマウス T,B 細胞にアポトーシス⁸⁻¹⁰⁾ を誘導することが報告されている。このような酪酸を産生する歯周ポケット内の細菌種としては *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas gingivalis* といったグラム陰性の桿菌が考えられてきた。

ところが筆者らの検索によれば歯周ポケット内には酪酸を産生する糖非分解嫌気性グラム陽性桿菌 (Asaccharolytic Anaerobic Gram-positive Rods: AAGPRs) が多数存在する¹⁶⁾。これらの細菌種は人工培地での増殖が極めて悪く、厳密な嫌氣的培養や増殖因子の研究などによりその存在が明らかになってきている。これらの細菌種は歯周ポケット内で多数を占めることから、歯周ポケットから組織内に進入する際、酪酸が病原因子として作用すると推測される。それらの細菌種は *Eubacterium nodatum*, *E. minutum*, *E. infirmum*, *E. sulci*, *E. saphenum*, *Filifactor alocis* である。*E. nodatum* は 1980 年に Moore らが報告した細菌種である⁵⁾。*E. minutum* は我々の研究室のポコらが 1996 年に報告して

いる¹¹⁾。*E. infirmum* は Cheeseman らが 1996 年に報告している⁴⁾。*E. sulci*, *Fi. alocis* は当初 1985 年に Cato らが *Fusobacterium* 属の新菌種として報告し³⁾、Jarava らが 1999 年に 16SrRNA Gene の検討から現在のグラム陽性桿菌に移行した⁶⁾。*E. saphenum* は筆者らが 1993 年に報告した新菌種である¹⁸⁾。以上のように、酪酸を産生する AAGPR は多数存在し、酪酸というひとつの病原因子を考えても、通説とは異なり、グラム陽性桿菌も疾患に関与していることが明らかである。

歯周ポケット内の環境は、浸出液としての血清あるいは白血球や細菌由来のタンパク質分解酵素による歯周組織の炎症、破壊によるタンパク質、ペプチド、アミノ酸が供給される。いわば糖分解性というよりも糖非分解性の環境下にある。そのため、歯周ポケット内に多く存在する糖非分解性の AAGPR が歯周ポケット内での重要な生態学的役割を果たしていることが期待されるが、生化学的な代謝については殆ど知られていない。

【酪酸産生基質の比較】

Prevotella loescheii のように糖を分解する細菌種で酪酸を産生する場合はピルビン酸経路であることが推測され、*Porphyromonas gingivalis* は Glu-Glu (グルタミン酸ジペプチド) を取り込み菌体内で代謝して酪酸を産生することがわかっている¹³⁾。*Fusobacterium nucleatum* などは、リジンから 3-keto-5-aminohexanoate pathway により酢酸と酪酸が産生される経路がわかっているが¹¹⁾、他のアミノ酸については報告がない。

我々の検索では酪酸産生性 AAGPRs は 3 つのグループに分けられた¹⁹⁾。

アルギニンとリジンを利用 : *E. nodatum*¹⁷⁾, *E. minutum*
アルギニンのみを利用 : *Fi. alocis*

リジンのみを利用 : *E. infirmum*, *E. sulci*, *E. saphenum*

すなわち *E. nodatum*, *E. minutum* はアルギニン、リジンによって増殖が促進し、洗菌ではアルギニンからは酪酸 (butyrate) と、リジンからは酢酸 (acetate) と酪酸が検出され、他のアミノ酸は代謝されなかった。*Fi. alocis* はアルギニンのみで増殖が促進し、洗菌ではアルギニンから酪酸が産生された。他のアミノ酸は代謝されなかった。*E. infirmum*, *E. sulci*, *E. saphenum* ではリジンのみで増殖が促進し、洗菌ではリジンから酢酸と酪酸が産生された。他のアミノ酸は代謝されなかった。(Table 洗菌代謝の結果)

アルギニンとリジンはトリプシン分解物のC末端のアミノ酸で歯周ポケットでペプチド分解物として供給されている。

E. minutum は洗菌による代謝で中間代謝産物と思われる、シトルリン、オルニチンが検出され、arginine deiminase pathway による代謝が考えられ事実酵素活性が検出された。またオルニチンから酪酸が産生されていることがわかった。

一方 *Fi. alocis* は中間代謝産物としてのシトルリンが検出されず、酵素活性でも直接オルニチンまで代謝されていた。またオルニチン添加で増殖が促進され酪酸が産生されることから、オルニチンが酪酸に代謝される過程でエネルギーを獲得しており、アルギニンの全く新しい代謝経路が存在すると思われた(図参照)。リジン代謝については今後の課題である。

【まとめ】

以上のように酪酸を産生する糖非分解性グラム陽性桿菌が、多数歯周ポケットに存在すること。そして酪酸産生の栄養気質として、トリプシン分解産物のC末端のアルギニンとリジンを利用していることがわかってきた。よって酪酸産生という病原性ひとつとっても、従来のグラム陰性桿菌のみでなく、AAGPRを中心とした、グラム陽性桿菌の重要性がクローズアップされてきた。

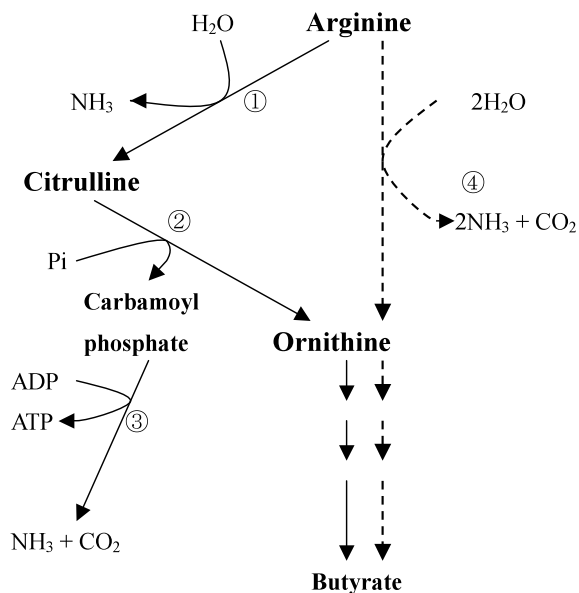


図 . Proposed pathway of arginine to ornithine. in *E. minutum* and *E. nodatum* (—), and in *Fi. alocis* (-----). 1: arginine deiminase; 2: ornithine carbamoyltransferase; 3: carbamate kinase; 4: Enzymatic conversion of arginine to ornithine and ammonia.

Table
Amino acid utilization of washed microorganisms of AAGPR.

AAGPR	Organisms ^b	Substrate ^a			
		Arginine		Lysine	
		Metabolic products (mM)			
		Acetate	Butyrate	Acetate	Butyrate
<i>Eubacterium minutum</i> ATCC700079 ^T	9.5	^c	1.2	7.4	7.9
<i>Filifactor alocis</i> ATCC35896 ^T	15.8		0.4		
<i>Eubacterium in fi rmum</i> NCTC12940 ^T	6.8			0.7	0.7
<i>Eubacterium sulci</i> ATCC35585 ^T	6.5			5.0	2.8
<i>Eubacterium saphenum</i> ATCC49989 ^T	22.8			1.1	1.1

^a The concentration of each amino acid was 10 mM.
From the other amino acids, no metabolic products were detected.
^b Cell concentration (mg/mL) in the reaction mixture.
^c Not detected (< 0.05 mM).

【参考文献】

- 1) Barker HA, Kahn JM, Hedrick L.: Pathway of lysine degradation in *Fusobacterium nucleatum* J Bacteriol, 152, 201-207. 1982
- 2) Botta GA, Radin L, Costa A, Schito G, Blasi G: Gas-liquid chromatography of the gingival fluid as an aid in periodontal diagnosis. J Periodont Res, 20, 450-457, 1985.
- 3) Cato EP, Moore LVH, Moore WE.: *Fusobacterium alocis* sp. nov. and *Fusobacterium sulci* sp. nov. from the human gingival sulcus. Int J Syst Bacteriol, 35, 475-447, 1985
- 4) Cheeseman SL, Hiom SJ, Weightman AJ, Wade WG : Phylogeny of oral asaccharolytic *Eubacterium* species determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison and proposal of *Eubacterium infirmum* sp. nov. and *Eubacterium tardum* sp. nov.. Int J Syst Bacteriol, 46, 957-959, 1996.
- 5) Holdeman LV, Cato EP, Burmeister JA, Moore WEC: Descriptions of *Eubacterium timidum* sp. nov., *Eubacterium brachy* sp. nov., and *Eubacterium nodatum* sp. nov. isolated from human periodontitis, Int J Syst Bacteriol, 30, 163-169, 1980.
- 6) Jalava J, Eerola E: Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov.. Int J Syst Bacteriol, 49, 1375-1379, 1999.
- 7) Jeng J-H, Chan C-P, Ho Y-S, Lan W-H, Hsieh C-C, Chang M-C: Effects of butyrate and propionate on the adhesion, growth, cell cycle kinetics, and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. J Periodontol, 70, 1435-1442, 1999.
- 8) Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K: Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. Infect Immun, 65, 35-41, 1997.
- 9) Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K: Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun, 67, 22-29, 1999.
- 10) Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K: Volatile fatty acid, metabolic by-product of periodontopathic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and RAJI B lymphoma cells and splenic B cells. Infect Immun, 66, 2587-2594, 1998.
- 11) Poco SE JR, Nakazawa F, Sato M, Hoshino E: *Eubacterium minutum* sp. nov., isolated from human periodontal pockets. Int. J Syst Bacteriol, 46, 31-34, 1996.
- 12) Pollanen MT, Overman DO, and Salonen, JI: Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. J Periodont Res, 32, 326-334, 1997.
- 13) Takahashi N, Sato T, Yamada T: Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol, 2000; 182: 4704-4710.
- 14) Tonetti M, Eftimiadi C, Damiani G, Buffa P, Buffa D., Botta GA: Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. J Periodont Res, 22, 190-191, 1987.
- 15) Tse CS, Williams DM: Inhibition of human endothelial cell proliferation in vitro in response to n-butyrate and propionate. J Periodont Res, 27, 506-510, 1992.
- 16) Uematsu H, Hoshino E: Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. J Periodont Res, 27, 15-19, 1992.
- 17) Uematsu H, Hoshino E.: Degradation of arginine and other amino acids by *Eubacterium nodatum* ATCC 33099. Microb Ecol Health Dis, 9, 305-311, 1996.
- 18) Uematsu H, Nakazawa F, Ikeda T, Hoshino E: *Eubacterium saphenum* sp. nov., isolated from human periodontal pockets. Int J Syst Bacteriol, 43, 302-304, 1993.
- 19) Uematsu H, Sato N, Hossain MZ, Ikeda T, Hoshino E: Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic anaerobic Gram-positive rods in periodontal pockets. Arch Oral Biol, 48,423-429, 2003.