

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17028

研究課題名（和文）歯肉縁下プラーク形成に関与するフソバクテリウムの共凝集分子の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of fusobacterial coaggregation factors associating with subgingival plaque formation

研究代表者

多田 彩乃（Tada, Ayano）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80779463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：F. nucleatumは多様な口腔細菌と共凝集し、口腔バイオフィルムの成熟に重要な役割を果たしている。F. nucleatumの外膜タンパク質FadAを認識する抗体を作製し、本菌種と共凝集する口腔内細菌の網羅的解析を行った結果、F. nucleatumはA. naeslundiiと強固な共凝集体を形成することが明らかになった。また、A. naeslundiiの培養上清中にはF. nucleatumの共凝集能を増強する活性があり、この増強作用はF. nucleatumの死菌では確認できないため、F. nucleatumが共凝集シグナル分子を感知し、生理学的変化を起こした結果であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

F. nucleatumは歯周病関連細菌であり、単独でのバイオフィルム形成能は低いですが、多様な口腔細菌と共凝集することで強固で複雑な口腔バイオフィルム形成と成熟に重要な役割を果たしている。また、F. nucleatumは大腸癌など様々な全身疾患との関連性が報告され、注目されている。しかしながら、本菌種がどのように他の口腔内細菌を認識し、自己の凝集能を制御しているのか、そのメカニズムは解明されていない。本研究によるF. nucleatumの共凝集の分子メカニズムの解明は新たな歯周疾患の治療および予防法の開発に多大な情報を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Fusobacterium nucleatum plays an important role in oral biofilm formation by coaggregating with diverse oral microbes. We prepared VHH antibody to outer membrane protein FadA of F. nucleatum and used for pull-down assay to identify the oral bacteria that coaggregate with this oral anaerobe. The results showed that F. nucleatum preferentially aggregates with Actinomyces naeslundii. In addition, we found that the cell-free culture supernatant of A. naeslundii enhances the coaggregative property of F. nucleatum and this effect was not observed when paraformaldehyde-fixed F. nucleatum. These results indicate that F. nucleatum alter its coaggregative property in response to the signaling molecules produced from oral microbiota.

研究分野：口腔細菌

キーワード：F. nucleatum 共凝集 バイオフィルム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔には700種に及ぶ細菌が存在して口腔細菌叢を形成しており、ヒト生理機能維持に重要な菌種がいる一方で、齲蝕に関連する *Streptococcus mutans* や歯周病の発生に關与する *Porphyromonas gingivalis* などヒトに病原性を示す菌種も存在する。歯周病は歯肉縁下プラークの蓄積による歯肉炎症や歯槽骨の破壊などを特徴とする口腔疾患であり、高齢者の誤嚥性肺炎のリスク要因となる (*Dent Clin North Am.* 58:771, 2014)。成人の70-80%は歯周病に罹患しているとの調査結果があり、歯周病の予防は緊急の課題である。

偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *F. nucleatum* は歯周病関連細菌として認知されており、代謝産物である酪酸がマクロファージなど単球細胞のアポトーシスを誘導することで歯周病の進展に寄与すると考えられている。*F. nucleatum* は明確な病原因子を産生しないが、他の口腔細菌や歯周病原細菌と共凝集する性質を持つ (*Microb Ecol.* 63:532, 2012)。この共凝集活性が多種多様な細菌によるバイオフィルム形成を可能にし、歯肉縁下プラーク形成に重要な役割を果たしている。実際の口腔内において *F. nucleatum* に結合する口腔細菌や共凝集因子の網羅的な同定は、歯周病の原因となる歯肉縁下プラーク形成のメカニズムや新たな歯周病予防戦略を考える上で極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、健康成人から採取した歯肉縁下プラークを用い、*F. nucleatum* と直接的または間接的に共凝集する口腔細菌をメタ 16S ribosomal DNA (rDNA)解析により同定する。この目的のため、外膜タンパク質遺伝子 *fapA2* を改変し、表層に標識分子として FLAG tag を発現した *F. nucleatum* を作製する。この遺伝子改変 *F. nucleatum* と歯肉縁下プラーク由来細菌を共凝集させ、免疫磁気ビーズを用いて共凝集体を回収する。このサンプルより抽出した DNA を用いてメタ 16S rDNA 解析を行い、共凝集体に含まれる細菌を網羅的に同定する。

3. 研究の方法

(1) *F. nucleatum* の共凝集活性により形成される微生物コンソーシアムの解明

. FLAG tag 標識 *F. nucleatum* の作製

遺伝子改変が可能な *F. nucleatum* ATCC23726株を実験に用いた。本菌株の外膜タンパク質遺伝子 *fap2* の3'末端に3 x FLAG tag をコードする遺伝子を in-frame で融合し、ゲノム上の *fap2* 遺伝子と allelic exchange を行うことにより表層に FLAG 標識 Fap2 を発現した菌株を作製した。FLAG tag が表層に提示されていることを FITC 標識抗 FLAG tag 抗体を用いた免疫染色で確認した。

. 歯肉縁下プラークの採取

インフォームドコンセントを得た被験者から歯肉縁下プラークを採取した。プラークの一部を BHIS 培地で嫌気培養し、残りのデンタルプラークは 0.5% Tween20 含有リン酸緩衝液で懸濁後、微弱な sonication によりプラークを分散した。培養後の菌体もしくは分散処理前後のサンプルより DNA を抽出し、培養液は菌分離のため保存した。

3. *F. nucleatum* が結合するプラーク内細菌の網羅的解析

上記で作成した FLAG 標識組換え *F. nucleatum* の菌体とプラーク培養液またはプラーク分散菌液と混合した。室温で30分間保温後、FLAG Tag 用の免疫磁気ビーズと混合し、マグネットにより FLAG 標識組換え *F. nucleatum* に結合した細菌群を回収した。ビーズ結合分画と非結合分画より DNA を抽出した。抽出した DNA を用いてメタ 16S rDNA 解析を行い、*F. nucleatum* がどのような

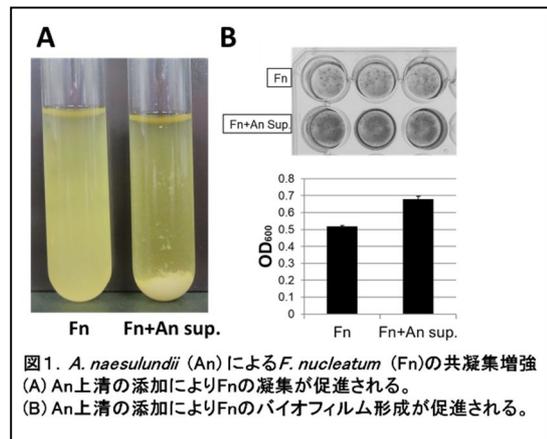
細菌と共凝集するするのかを調べた。

(2). *F. nucleatum*と*A. naeslundii*の凝集アッセイ

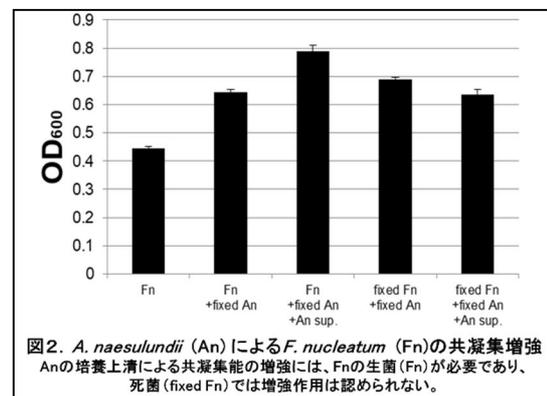
網羅的解析により*F. nucleatum*と*A. naeslundii*が強固に共凝集することが明らかになったため、*F. nucleatum* ATCC 25586株、*F. nucleatum* ATCC 23726株、*A. naeslundii* CDC X600株バイオフィルムアッセイにより凝集度を調べた。24ウェルプレートで*F. nucleatum*と*A. naeslundii*とを共培養し、ウェル底に形成したバイオフィルムを定量した。また、*A. naeslundii*の菌体もしくは培養上清による凝集促進効果を検証するため、*F. nucleatum*の生菌または4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した*F. nucleatum*の死菌を*A. naeslundii*の培養上清を含む培地で培養し、バイオフィルム形成量を比較した。

4. 研究成果

*F. nucleatum*の外膜タンパク質 FadA を認識するアルパカ VHH 抗体を作製し、免疫沈降法と次世代シーケンサーによるメタゲノム解析により本菌種と共凝集する口腔内細菌の網羅的解析を行った。その結果、*F. nucleatum*は*A. naeslundii*と強固な共凝集体を形成することが明らかになった。また、興味深いことに*A. naeslundii*の培養上清中には*F. nucleatum*の共凝集能を増強する活性があることを見出した(図1)。この凝集促進効果は*F. nucleatum* ATCC25586株、ATCC23726株ともに確認でき、ATCC25586株の方がより凝集が増強された。



*A. naeslundii*の培養上清による*F. nucleatum*の凝集能増強作用は、処理開始から4時間以降で出現し、この作用は*F. nucleatum*の死菌では確認できないため、単なる物理化学的效果ではなく、*F. nucleatum*が*A. naeslundii*の培養上清中の何らかのシグナル分子を感知し、生理学的変化起因するものと考えられた(図2)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto T, Ugai H, Nakayama-Imaohji H, Tada A, Elahi M, Houchi H, Kuwahara T.	4. 巻 50
2. 論文標題 Characterization of a recombinant Bacteroides fragilis sialidase expressed in Escherichia coli.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anaerobe.	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagao T, Nakayama-Imaohji H, Elahi M, Tada A, Toyonaga E, Yamasaki H, Okazaki K, Miyoshi H, Tsuchiya K, Kuwahara T.	4. 巻 41
2. 論文標題 L-histidine augments the oxidative damage against Gram-negative bacteria by hydrogen peroxide.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Med.	6. 最初と最後の頁 2847-2854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijmm	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yagi H, Nakayama-Imaohji H, Nariya H, Tada A, Yamasaki H, Ugai H, Elahi M, Ono T, Kuwahara T.	4. 巻 119
2. 論文標題 Ethanolamine utilization supports Clostridium perfringens growth in infected tissues.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microb Pathog.	6. 最初と最後の頁 200-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田彩乃、石川正夫、渋谷耕司、桑原知巳
2. 発表標題 チモキノンのFusobacterium nucleatum混合バイオフィルムに対する効果
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田彩乃、桑原知巳
2. 発表標題 Fusobacterium含有バイオフィルムに対するチモキノンの洗淨効果
3. 学会等名 第39回日本歯科薬物療法学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----