

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10456

研究課題名（和文）口腔菌叢培養モデルを基にした新規口腔健康指標の構築

研究課題名（英文）Construction of a novel oral health indicator based on an oral microbiota culture model

研究代表者

真下 千穂（Mashimo, Chiho）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80368159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔メタゲノム解析の結果、健康な口腔状態を維持するためには、いくつかの細菌種の働きが重要であることが明らかとなってきた。これらの細菌が持つ共通の特性が硝酸還元活性である。この中でも、特にRothia属細菌が口腔・全身健康増進に貢献していることがわかってきた。しかし、Rothia属細菌に対する遺伝子改変技術がないため、遺伝子レベルでの働きを明らかにすることができていない。本研究では、口腔内からRothia属細菌を分離し、遺伝子改変技術基盤の構築を行った。このことにより、Rothia属細菌を中心とした口腔細菌叢の変動を分子レベルでモニターできる指標の構築が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、口腔の主な硝酸還元菌であるRothia属細菌の働きを遺伝子レベルで解析することが可能となった。体内の硝酸イオン動態は個体の健康維持に重要であり、特に、entero-salivary nitrate metabolismでは口腔細菌の働きが必須である。Rothia属細菌は口腔における高い硝酸還元活性を保有する代表菌であるので、Rothia属細菌を遺伝子レベルでコントロールすることにより、口腔の硝酸イオンを中心とした細菌叢バランスの変化を捉えるモデル実験系を確立できる。最終的には口腔硝酸還元活性と全身健康の増進の間を結ぶ指標を作る可能性ができたと考える。

研究成果の概要（英文）：The results of oral metagenome analysis have revealed that the activity of several bacterial species is crucial for maintaining a healthy oral state. A shared characteristic of these bacteria is their nitrate-reducing activity. They reduce nitrate ions in saliva, producing nitrite ions and nitric oxide, which have bactericidal effects. Among these, it has been found that bacteria of the Rothia spp. particularly contribute to the promotion of oral and overall health. However, due to the lack of genetic modification techniques for Rothia spp., their functions at the genetic level have not been elucidated. In this study, we isolated Rothia spp. from the oral cavity and established a foundation for genetic modification techniques. As a result, it became possible to create genetically modified strains. This enables the construction of indicators to monitor the fluctuations of oral microbiota centered around Rothia spp. at the molecular level.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔善玉菌 硝酸還元菌 Rothia属細菌 遺伝子改変

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔健康人や高齢者の口腔細菌叢を対象とした大規模な菌叢解析(メタゲノム解析)が行われ、口腔細菌叢の全体像が見えてきた。特に注目すべき新たな知見は、う蝕・歯周病の病態増悪を進行させる「口腔悪玉菌」だけでなく、健康な口腔に多く存在し、口腔だけでなく全身の健康にも貢献している「口腔善玉菌」の存在すること、保有する口腔細菌叢をエコタイプに基づいてグループ化すると、う蝕・歯周病のハイリスクグループが存在することが明らかになってきた。(図1)つまり、口腔健康の維持・増悪は口腔細菌叢バランスの変動を伴った口腔環境の変化によって起こる可能性が高いことが示唆された。さらに、良好な口腔細菌叢は、血圧・心臓血管疾患・Ⅱ型糖尿病の低リスク因子であることも明らかになってきた。[1]

「口腔善玉菌」として、いくつかの細菌種があげられてるが、共通する特性は高い硝酸還元活性を有するという点である。口腔から亜硝酸イオン生成を指標としたスクリーニング解析で、*Actinomyces*、*Rothia*、*Veillonella* 属細菌が分離されてきている。[2] その中でも、*Rothia* 細菌が高い硝酸還元活性を示すことが報告されている。また、我々のこれまでの結果からも、*Actinomyces*、*Rothia* 属細菌が硝酸還元により生成する一酸化窒素が歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*) を高効率で殺菌することを示してきた。

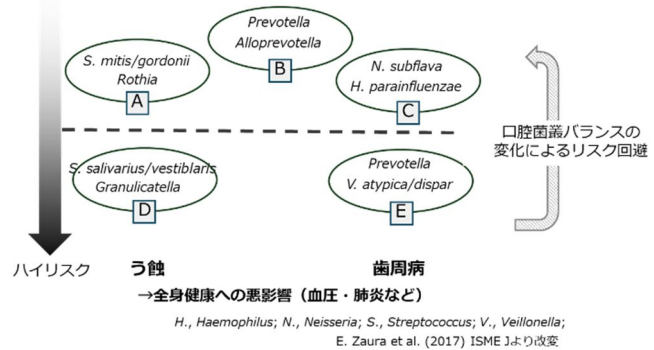


図1 ヒト口腔菌叢のエコタイプに基づいた分類

2. 研究の目的

Rothia 属細菌は、これまでう蝕や歯周病の病態発症・進行に影響が少ないと考えられていた菌が、近年の研究により、口腔内を健康に保つためにプラスに働く「口腔善玉菌」としての役割が明らかになってきた。(図2)



図2 *Rothia*属細菌の硝酸還元とその作用

本研究では、*Rothia* 属細菌が持つ硝酸還元活性を調節すると細菌叢バランスはどのように変化するのかを明らかにすることを目的に実験を遂行した。具体的には、*Rothia* 属細菌では遺伝子改変ができないので、口腔より高い硝酸還元活性を有する *Rothia* 属細菌を分離し、その中で、遺伝子改変が可能な株を分離する。で得られた菌株を利用して、新たな遺伝子改変技術基盤を構築する。で構築した実験系を使い、硝酸還元性を欠損した株を作製する。で作製した遺伝子欠損株を用いて、遺伝子発現調節などを行い、口腔細菌叢における *Rothia* 属細菌の働きを評価していく。の結果を統合して、口腔および全身健康を見据えた新たな口腔健康指標の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 口腔から *Rothia* 属細菌の分離・同定

3人の健康なボランティアの唾液・歯垢・頬粘膜サンプルを採取した。各サンプルはリン緩衝生理食塩水(PBS)で1000倍希釈し、*Rothia* 属細菌用選択培地 Oral *Rothia* species selective medium (ORSM) [3] を用いて分離・培養を行った。ORSM上に発育したコロニー形態により細菌種の鑑別を行った。さらに、*Rothia* 属細菌に特異的なプライマーを用いて種の同定を行った。*Rothia dentocariosa* 特異的にPCR増幅がされた株を選び、さらに16S rRNA遺伝子全長の配列を決定し、BLAST解析により菌株の同定を行った。

(2) 遺伝子改変可能な株の分離

(1)で得られた株に対してBroad host range plasmid pJRD215を形質転換し、その効率を測定した。最も高い形質転換効率を有する株を *R. dentocariosa* LX16と命名し、以下の研究に用いた。

(3) 全ゲノム配列決定

R. dentocariosa LX16の培養液から細菌ゲノムDNAを抽出後、Ligation sequencing kit SQK-LSK110 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK)を用いてライブラリーを構築し、MinIONフローセル(FLO-MIN106 R9.41revD, Oxford Nanopore Technologies)を用いて、ナノポアシーケンサー(Nanopore GridION X5 platform (Oxford Nanopore Technologies))を用いたロン

グリードシーケンシングおよび Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina, Tokyo, Japan) を用いた Illumina MiSeq platform (Illumina) によるショートリードシーケンシングを行った。得られたリードは De brujin graph を使った Unicycler により、de novo アセンブリを実行した。アノテーションは DDBJ Fast Annotation and Submission Tool を使用した。

(4) トランスポゾンミュータジェネシス

トランスポゾンミュータジェネシスは Ez-Tn5™ Tnp Transposome™ Kit (Ez-Tn5) (Epicentre Biothechnologies, Madison, WI, USA) を用いて行った。Ez-Tn5 の薬剤耐性遺伝子を選択マーカーとしてカナマイシン耐性株をスクリーニングした。必要に応じて、得られた transposants の形質変化のスクリーニングを行った。例えば、硝酸還元性欠損株のスクリーニングは Griess 法を用いた。

(5) Ez-Tn5 挿入位置の決定

(4) で得られた transposants からゲノム DNA を抽出後、Ligation sequencing kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies) を用いてライブラリーを構築後、MinION フローセル (FLO-MIN106 R9.41revD, Oxford Nanopore Technologies) を用いて、ナノポアシークエンサー (Nanopore GridION X5 platform (Oxford Nanopore Technologies)) によりゲノム塩基配列の決定を行った。In Mut-finder[4] を利用して、得られたリードからゲノム上の挿入位置を確定した。

(6) 遺伝子欠損株の作製

5-fluoroorotic acid (5-FOA) を counter-selection marker とした遺伝子改変技術基盤を構築するために、*R. dentocariosa* LX16 の 5-FOA 感受性を確認した。細菌が *pyrE/F* (orotate phosphoribosyl transferase /orotidine 5-phosphate decarboxylase) 遺伝子を保有する場合、これらの酵素の働きにより 5-FOA が細胞毒性のある 5-FUMP (5-fluorouridine monophosphate) に変換されるため、5-FOA を含む培地上では発育が出来ない。*R. dentocariosa* LX16 は 5-FOA 感受性であったので、(3) で得られた transposants から 5-FOA 耐性株をスクリーニングし、本遺伝子を利用した遺伝子改変技術を構築することとした。具体的には、*pyrE/F* 株を作製するため、*pyrE/F* 遺伝子の上流および下流の 500 bp の相同領域 (*pyrE* もしくは *pyrF* 遺伝子領域は欠損) をゲノム上に組み込む一段階目の相同組み換えを行った。その後、5-FOA を含む培地で二段階目の組み換えを行い、*pyrE* もしくは *pyrF* 遺伝子が欠失した株を作製した。

4. 研究成果

(1) 口腔より、ORSM 培地によるスクリーニングを行い、*R. dentocariosa* を 8 株分離した。(図 3) 分離した株の属特異的 PCR 法および 16S rRNA 遺伝子の配列を決定し、系統樹解析を行った。(図 4)

(2) 遺伝子改変可能株の樹立
(1) で分離された株を対象に、プラスミドの形質転換・トランスポゾンミュータジェネシスなどを行い、実際に遺伝子改変が可能なる株を樹立し、*R. dentocariosa* LX16 と命名した。*R. dentocariosa* LX16 における pJRD215 の形質転換効率は 7.4×10^3 CFU/μg であった。さらに、*R. dentocariosa* LX16 の全ゲノム配列を決定し、現在 DDBJ に遺伝情報を登録中である。

(3) 遺伝子改変の可能性を探るために、トランスポゾンミュータジェネシスを行い、約 1,600 株の transposants を得た。得られた全ての菌株に対して、ナノポアシークエンスを利用した方法により、ゲノム上の挿入配列を決定した。Ez-Tn5 は *R. dentocariosa* LX16 ゲノム全体に網羅的に挿入されていることが確認できた。現在は、この実験結果について学会発表を行うことを計画中である。また、得られた transposants から硝酸還元性、5-FOA 耐性などの形質のスクリーニングを行い、これらの性質に関連する遺伝子が欠損した株を得た。(図 5, 6) 現在、硝酸還元性を欠失した株を用いて、歯周病原細菌 (*P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) などに対する殺菌効果の詳細なメカニズムを調べている。結果が出次第、学会発表と論文作成を行う予定である。

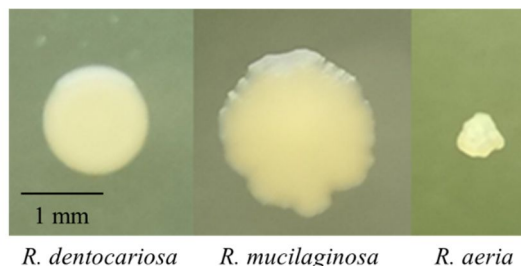


図3 ORSM培地上でのRothia属細菌のコロニー形態

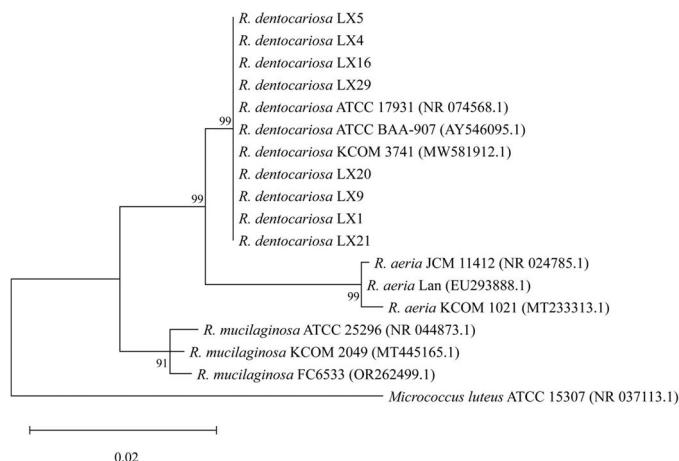


図4 *R. dentocariosa*臨床分離株の系統樹解析

(4) 遺伝子欠損株の作製

pyrE/F株を作製するため、*pyrE*もしくは*pyrF*遺伝子上流および下流の500 bpの相同領域(*pyrE*もしくは*pyrF*遺伝子領域は欠損)をゲノム上に組み込む段階目の相同組み換えを行った。その後、5-FOAを含む培地で二段階目の組み換えを行い、*pyrE*もしくは*pyrF*遺伝子が欠失した株を作製した。これらの変異株を利用することにより、single crossover integration / pop-out/recombinationにより、いかなる遺伝子の欠失も可能となった。

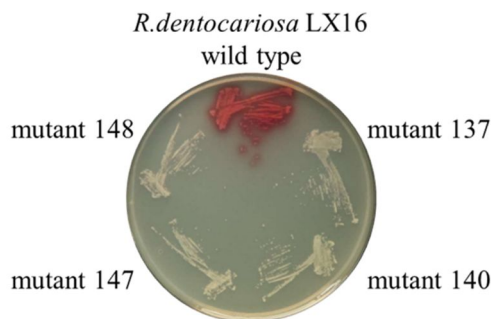


図5 トランスポゾンミュータジェネシス (結果)
R. dentocariosa LX16硝酸還元欠損株 (一部)

本研究の課題遂行により、口腔および全身の健康増進に貢献する「口腔善玉菌 *R. dentocariosa*」を遺伝学的に研究する方法が確立した。これまでは、口腔細菌叢において *Rothia* 属細菌の役割を観察する場合、全体の細菌数に対する *Rothia* 属細菌数の増減レベルでしか評価する方法がなかった。今回の結果により、遺伝子レベルでの *Rothia* 属細菌の挙動を明らかにすることが可能となった。*Rothia* 属細菌を遺伝子レベルで動かすことができれば、口腔細菌叢がどのように動くのか、硝酸還元性がどのように影響するのかをモニターすることができると考える。

今後、*Rothia* 属細菌を中心とした口腔細菌叢モデル系を作製することにより、口腔における硝酸還元性がどのように口腔健康や全身健康に反映されているのかをみる事ができる、これまでとは異なる新たな評価系となるはずである。口腔から全身健康をみるための新たな方法の確立が期待できる。

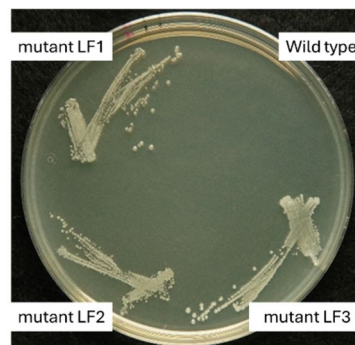


図6 トランスポゾンミュータジェネシス (結果)
R. dentocariosa 5-FOA耐性株 (一部)

- [1] E. Zaura *et.al* (2017) ISME.J 11:2128
- [2] Y. Sato-Suzuki *et.al* (2020) Sci.Rep 10:16652
- [3] O. Tsuzukibashi *et.al* (2017) J.Microbiol.Methos 134:21
- [4] R. Song *et.al* (2021) BMC Genomics 22:908

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 Hiroki Takigawa, Chiho Mashimo, Takayuki Nambu, Hugo Maruyama, Toshinori Okinaga	4. 巻 57
2. 論文標題 Effect of Brazilian propolis from the state of Bahia on oral bacteria.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 125-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hugo Maruyama, Ayako Masago, Takayuki Nambu, Chiho Mashimo, Kazuya Takahashi, Toshinori Okinaga	4. 巻 9
2. 論文標題 Inter-site and interpersonal diversity of salivary and tongue microbiomes, and the effect of oral care tablets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 1477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12688/f1000research.27502.1	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 Takayuki Nambu, Dan Wang, Chiho Mashimo, Hugo Maruyama, Kosuke Kashiwagi, Kazushi Yoshikawa, Kazuyo Yamamoto, Toshinori Okinaga.	4. 巻 7
2. 論文標題 Nitric oxide donor modulates a multispecies oral bacterial community - an in vitro study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7090353	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 Hugo Maruyama, Ayako Masago, Takayuki Nambu, Chiho Mashimo, Toshinori Okinaga	4. 巻 54
2. 論文標題 Amplicon sequence variant-based oral microbiome analysis using QIIME 2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 273-281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Daisuke Namikawa, Hugo Maruyama, Ayako Masago, Chiho Mashimo, Takayuki Nambu, Kazuya Takahashi, Toshinori Okinaga	4. 巻 55
2. 論文標題 Species-specific growth inhibitory effect of propolis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 83-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Takayuki Nambu, Dan Wang, Chiho Mashimo, Hugo Maruyama, Makoto Taniguchi, Yao Huang, Kazuya Takahashi, Toshinori Okinaga	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete genome sequence of Actinomyces oris strain K20, isolated from an oral apical lesion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00541-22	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀧川博樹、真下千穂、南部隆之、円山由郷、沖永敏則
2. 発表標題 ブラジル連邦共和国バイーア州産プロポリスの口腔細菌への影響
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黄堯、南部隆之、真下千穂、円山由郷、高橋一也、沖永敏則
2. 発表標題 pH による口腔細菌叢変化についての解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並河大裕、円山由郷、眞砂彩子、真下千穂、南部隆之、沖永敏則、高橋一也
2. 発表標題 プロポリスが表示細菌種特異的な増殖抑制効果
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南部隆之、真下千穂、円山由郷、吉川一志、山本一世、沖永敏則
2. 発表標題 紫色LED 照射によるブラク菌叢の変動
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 口腔細菌叢の多様性に対する舌ブラシの影響
2. 発表標題 眞砂彩子、円山由郷、南部隆之、真下千穂、高橋一也
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	沖永 敏則 (Okinaga Toshinori) (60582773)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	南部 隆之 (Takayuki Nambu) (80367903)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関