

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791975

研究課題名(和文) バイオフィーム形成ロシア・ミュースラジノーサの遺伝子解析

研究課題名(英文) Transposon mutagenesis of biofilm-forming *Rothia mucilaginosa*

研究代表者

山根 一芳 (YAMANE, Kazuyoshi)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40388369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに難治性根尖性歯周炎の症例から分離したロシア・ミュースラジノーサが、菌体外多糖(EPS)を産生してバイオフィームを形成することにより疾患の難治化に関与していることを報告してきた。本研究では、その内の1株(DY-18株)からランダムミュータジェネシスを用いて、EPS産生性の低下した変異株を得ることができた。さらに、DY-18株のバイオフィーム形成遺伝子を網羅的に解析するため、バイオフィームを形成しているDY-18株と、振盪培養し、培養菌液の粘度が低い状態の同株とで遺伝子の発現レベルを比較した結果、いくつかのストレス応答遺伝子がバイオフィーム形成に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Clinical isolate (strain DY-18) of *Rothia mucilaginosa* from persistent apical periodontitis produce a large amount of exopolysaccharide (EPS). In this study, to identify the genes involved in biofilm formation in *R. mucilaginosa*, we established EPS non-producing mutants from strain DY-18 by random mutagenesis. The viscosity of culture medium in these mutants were lower than the parent strain culture. Scanning electron microscopic observations on cell surface revealed that these mutants lacked or had significantly decreased meshwork-like structures, which is typical for biofilm-forming bacteria. We compared genes expression profiles of strain DY-18 between in static culture producing large amount of EPS, and shake culture, EPS non-producing condition, by microarray. The results in this study indicate that expression of stress response genes in the static culture is higher than that in the shaking growth condition and suggest that these genes might involve in biofilm formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：バイオフィーム *Rothia mucilaginosa* 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 感染症におけるバイオフィーム形成菌の重要性

自然界の多くの細菌は、バイオフィームを形成して生存に不利な環境中で定着し、生き残る。これらバイオフィーム形成細菌によって引き起こされる感染症は、バイオフィーム感染症と呼ばれ、現在多くの細菌感染症にバイオフィームが関与していることが報告されている(Costerton JW *et al.* Science 1999)。口腔領域においても、プラークをバイオフィームとして捉える動きが活発化してきている。我々はこれまで、歯周病病巣から優位に分離される *Prevotella nigrescens* に通常のプラークとは異なり、シクロース非依存性に exopolysaccharide (EPS) を産生して、バイオフィームを形成する株があることを報告し、EPS 産生株は菌体周囲に網目状の構造物をもつこと、非産生株と比較して強い膿瘍形成誘導能をもつこと、EPS はヒト好中球に対して貪食抵抗因子として働くがそれ自身にはほとんど免疫活性化作用がないことなどを明らかにしてきた (Yamane K *et al.* Oral Microbiology and Immunology 2005)。これらの結果は、EPS 産生性が病原性、特に組織侵襲性に深く関与しており、口腔感染症の成立、慢性化、難治化に関わる重要な因子であることを強く示唆している。バイオフィームの主要な構成要素の一つである EPS は、菌体を周辺環境から保護し、物理的なバリアとなる。この物理的なバリアにより、病巣内の細菌は食作用などの宿主免疫機構から保護され、病巣で長期に生存するようになる。また、バイオフィームは抗菌剤や消毒薬が菌体へ到達するのを阻害する。実際、バイオフィーム形成症例では適合抗菌剤の連用によっても病巣から起炎菌は除菌されにくい。このことから病巣にバイオフィームが形成された感染症は感染状態が持続、反復し、難治化すると考えられる。

### 2) 難治性根尖性歯周炎とバイオフィーム感染症

難治性根尖性歯周炎は、腫脹や疼痛を繰り返し、患者の生活の質 (QOL) の低下を招くだけでなく、歯の喪失の原因となる。我々はこれまでに数回の根管治療にもかかわらず、病巣から細菌が除去できない、難治性根尖性歯周炎の病巣から EPS を産生してバイオフィームを形成する細菌が分離されることを報告している。2008 年には、難治性根尖性歯周炎から EPS を産生する *Escherichia hermannii* を分離、同定し、2009 年には3つの難治症例から純培養状態で分離される *Bacillus subtilis* がバイオフィームを形成することを (Yamane K *et al.* Journal of Endodontics 2009) 報告している。最近では、

難治性根尖性歯周炎の症例から分離された *Rothia mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*) の複数の株が EPS 産生菌に特徴的な網目状構造物を有していることを明らかにし (Yamane K *et al.* Journal of Osaka Dental University 2010)、根尖性歯周炎の難治化に細菌のバイオフィーム形成による貪食抵抗性が関与していることを報告している。

### 3) 難治性根尖性歯周炎から分離した *R. mucilaginosa* DY-18 株のゲノム解析

我々は難治性根尖性歯周炎から分離したバイオフィームを形成する *R. mucilaginosa* DY-18 株の全ゲノム配列を決定し、報告した (Yamane K *et al.* Sequencing 2010)。DY-18 株のゲノムは 2.2Mbp あまりの大きさの環状 DNA からなり、アノテーションの結果から 2,052 の遺伝子が含まれることを予測している。また、*R. mucilaginosa* は、これまで *Staphylococcus* や *Stomatococcus* などに分類され、これらの細菌やレンサ球菌との鑑別が困難であった経緯から口腔ではマイナーな細菌であるというイメージがあるが、分子生物学的な分類法により *Rothia* に再分類され、これらの技術を使った検出法が発達するにつれて、口腔や上気道部の常在菌としてだけでなく、心内膜炎、髄膜炎、腹膜炎などの多くの日和見感染症の原因になっていることが明らかになり、社会的にも注目を集めている菌種である。

## 2. 研究の目的

バイオフィームを形成する *R. mucilaginosa* DY-18 株をモデルとして、難治性根尖性歯周炎を引き起こすバイオフィーム形成菌のバイオフィーム形成遺伝子を明らかにすること

## 3. 研究の方法

### 1) バイオフィーム非形成変異株の樹立と変異部位の解析

菌体周囲に網目様の構造物を産生し、バイオフィームを形成する DY-18 株から通法に従ってコンピテントセルを調製した。このコンピテントセルを用いてカナマイシン耐性遺伝子をもつトランスポゾン (Epicentre 社) を DY-18 株のゲノムにエレクトロポレーション (BTX 社) し、本基金により購入したラボ密度計 (DMA4100M Antonparl 社) 自動粘度計、走査型電子顕微鏡を用いてバイオフィーム非形成株をスクリーニングした。ランダムミュータジェネシスによって樹立した、バイオフィーム非形成変異株のトランスポゾン挿入箇所の遺伝子は、次世代シーケンサー GS Junior system (Roche 社) を用いてダイレクトシーケンシングし、トランスポゾン挿入部位の決定と、挿入部位のアノテーションを実行している。

### 2) バイオフィーム形成遺伝子の予測

全ゲノム配列からバイオフィームの合成

経路、形成調節経路、分泌経路などをパスイ解析して、バイオフィーム形成に關与する遺伝子を予測した。

### 3) バイオフィームと浮遊状態における発現遺伝子の比較

当初、親株とロックアウト株の菌体から抽出した mRNA を用いて遺伝子の発現レベルを比較する予定であったが、培養条件による、菌液の粘度の変化が明らかになったため、それぞれの培養条件における発現遺伝子をマイクロアレイで比較した。静置培養し、バイオフィームを形成している DY-18 株と、振とう培養し、培養菌液の粘度が低い同株からそれぞれメッセンジャー RNA を抽出し、我々が明らかにした DY-18 株の全ゲノム配列の情報を基に作製したマイクロアレイでその発現レベルを比較した。

## 4. 研究成果

### 1) バイオフィーム非形成変異株の樹立と変異部位の解析

カナマイシン耐性遺伝子をもつトランスポゾンを用いたランダムミュタジェネシスにより、親株と比較して培養菌液の密度、粘度が低下した変異株 10 株を得ることができた。また、これらの菌株の細胞表面を、走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、菌体周囲の網目様構造物の欠失又は減少が確認できた。現在、これらの菌株からゲノム DNA を抽出し、シーケンシングしてトランスポゾン挿入部位の決定と、挿入部位のアノテーションを実行している。

### 2) バイオフィーム形成遺伝子の予測

DY-18 株のゲノムの解析をさらに進めたところ、DY-18 株のゲノム上には、主要シグマ因子 ( primary sigma factor ) と extracytoplasmic function (ECF) sigma factor が 1 つずつ計 2 つのシグマ因子遺伝子しか存在しないことが明らかになった。これは *R. mucilaginosa* の標準株である ATCC 25296 株がもつ 3 つのシグマ因子より、さらに 1 つ少なかった。ECF シグマ因子は、環境ストレス応答や病原因子の産生に重要な役割を果たしていることが分かっている。DY-18 株の ECF シグマ因子も酸化ストレスへの応答に關与するレドックスモチーフを含むことから、周囲環境の酸化ストレスへの応答機構に關係していることが示唆された。

### 3) バイオフィームと浮遊状態における発現遺伝子の比較

DY-18 株のバイオフィーム形成遺伝子を網羅的に解析するため、静置培養し、バイオフィームを形成している DY-18 株と、振とう培養し、培養菌液の粘度が低い状態の同株で発現レベルを比較した結果、いくつかのストレス応答遺伝子が、これらの培養条件によって変動していることが明らかになった。このことから、*R. mucilaginosa* のストレス応答機構が、バイオフィーム形成性に關与することが示唆された。

### 4) 今後の展開

本研究によって、多くのバイオフィーム非形成変異株を樹立することが出来た。また、マイクロアレイを用いた遺伝子発現比較解析により、ストレス応答遺伝子のバイオフィーム形成性への關与について、さらなる知見を得ることができた。したがって、*R. mucilaginosa* のバイオフィーム形成関連遺伝子の解明という本研究の目的は予定通り進行したと言える。しかし、バイオフィーム形成に直接關与する遺伝子や、分泌機構についてはゲノム上の遺伝子から予測できるものの、その全貌を明らかにすることはできなかった。今後さらにトランスポゾンライブラリを充実させると同時に、RNA シークエンシングなどの手法を用いて、さらに候補遺伝子を増やしていく必要があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 9 件)

1 山根一芳, 円山由郷, 南部隆之, 真下千穂, 山中武志, 福島久典. 口腔感染症の病院論が変わった 歯界展望特別号: 189 (2013) 査読有.

2 円山由郷, 山根一芳, 南部隆之, 真下千穂, 山中武志, 福島久典. 口腔アーキアによって疾患は起こるか? 歯界展望特別号: 189 (2013) 査読有.

3 真下千穂, 南部隆之, 円山由郷, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. 広宿主域接合プラスミド pJRD215 を基盤にした新規プラスミドの作製と口腔 *Actinomyces* 属細菌への応用 *Bacterial adherence & biofilm* 26: 61-64 (2013) 査読有.

4 安岡大志, 山根一芳, 福島久典. バイオフィーム形成 *Streptococcus constellatus* のゲノム解析 歯科医学 76(2): 1-10 (2013) 査読有.

5 Yamanaka T, Furukawa T, Yamane K, Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Inoue J, Kamei M, Yasuoka H, Horiike S, Leung KP, Fukushima H. Biofilm-forming capacity on clinically isolated *Streptococcus constellatus* from an odontogenic subperiosteal abscess lesion. *Journal of Bacteriology & Parasitology* (2013) doi:10.4172/2155-9597.1000160 査読有.

6 Omae A, Yamane K, Matsumoto N. Biofilm formation of *Actinomyces oris* strain MG-1 on an orthodontic wire. *Journal of Osaka Dental University* 47(1): 75-82 (2013) 査読有.

7 Mashimo C, Kamitani M, Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Tatami T, Inoue J, Kamei M, Morita S, Fukushima H. Identification of the genes involved in the biofilm-like structures on *Actinomyces oris* K20, a clinical isolate from an apical lesion. *Journal of Endodontics* 39(1): 44-48 (2013) doi:

- 10.1016/j.joen.2012.08.009. 査読有.
- 8 Yamane K, Nambu T, Yamanaka T, Ishihara K, Tatami T, Mashimo C, Walker CB, Leung K.-P., Fukushima H. Pathogenicity of exopolysaccharide-producing *Actinomyces oris* isolated from an apical abscess lesion International Endodontic Journal 46(2): 145-154 (2013) doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02099.x. 査読有.
- 9 Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Maruyama H, Yoshida M, Hayashi H, Fukushima H. Identification of disulphide stress-responsive extracytoplasmic function sigma factors in *Rothia mucilaginosa*. Archives of Oral Biology 58(6): 681-689 (2013) doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.017. 査読有.

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1 山中武志, 山根一芳, 南部隆之, 真下千穂, 福島久典. *Prevotella intermedia* の熱ショックタンパクとバイオフィルム形成. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会. 2013 年 9 月 22 日. 岡山市.
- 2 南部隆之, 真下千穂, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. 口腔アクチノバクテリアは硝酸依存的に *P. gingivalis* を殺す. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会. 2013 年 9 月 21 日. 岡山市.
- 3 山中武志, 小幡登, 円山由郷, 南部隆之, 真下千穂, 山根一芳, 福島久典. *Prevotella intermedia* のチタンプレート上でのバイオフィルム形成. 第 539 回大阪歯科学会例会. 2013 年 6 月 8 日. 枚方市.
- 4 Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Genetic analysis of biofilm-forming *Streptococcus constellatus*. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. 2013 年 3 月 21 日. Seattle, Washington, USA.
- 5 南部隆之, 真下千穂, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. 口腔アクチノマイセスにおけるバイオフィルム欠損株の同定と特徴づけ. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18 日. 千葉市.
- 6 真下千穂, 南部隆之, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. pJRD215 を基盤にしたクローニング・発現用プラスミドの作製と *Actinomyces* 属細菌への応用. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18 日. 千葉市.
- 7 Nambu T, Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Fukushima H. Characterization of Tn5 insertion mutants of oral *Actinomyces* affected in biofilm formation. Biofilms 5. 2012 年 12 月 12 日. Paris, France.
- 8 安岡大志, 山根一芳, 福島久典. バイオフィルム形成 *Streptococcus constellatus* のゲノム解析. 大阪歯科学会例会. 2012 年 12 月 8 日. 枚方市.
- 9 Yamanaka T, Yamane K, Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Leung KP, Fukushima H. Sucrose independent exopolysaccharide productivity and biofilm formation of oral commensal bacteria as pathogenesis of chronic inflammation in the oral cavity. Clinical Microbiology and Microbial Genomics. 2012 年 11 月 12 日. San Antonio, USA.
- 10 円山由郷, 山根一芳, 南部隆之, 真下千穂, 山中武志, 福島久典. 口腔アーキアによって疾患は起こるか? 日本歯科医学会総会. 2012 年 11 月 10 日. 大阪市.
- 11 山根一芳, 円山由郷, 南部隆之, 真下千穂, 山中武志, 福島久典. 口腔感染症の病因論が変わった. 日本歯科医学会総会. 2012 年 11 月 10 日. 大阪市.
- 12 大前有紀, 山根一芳, 南部隆之, 松本尚之. 矯正線表面への *Actinomyces oris* MG 1 株の付着性. 日本矯正歯科学会大会. 2012 年 9 月 28 日. 盛岡市.
- 13 Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Development of new plasmids for cloning and expression in oral *Actinomyces* spp. The 4th EMBO Meeting 2012. 2012 年 9 月 24 日. Nice, France.
- 14 山根一芳, 南部隆之, 真下千穂, 山中武志, 福島久典. 口腔膿瘍から分離した *Streptococcus intermedius* のゲノム解析. 歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 16 日. 郡山市.
- 15 山根一芳, 山中武志, 真下千穂, 吉田 匡宏, 林宏行, 南部隆之, 円山由郷, 福島久典. バイオフィルム形成 *Streptococcus intermedius* のゲノム解析. 日本歯科保存学会. 2012 年 06 月 29 日. 宜野湾市.

## 6. 研究組織

研究代表者

山根 一芳 (YAMANE, Kazuyoshi)

大阪歯科大学 歯学部 講師

研究者番号: 40388369