

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861544

研究課題名(和文) 協調と競合の相反関係による歯周病原細菌種の共生機構

研究課題名(英文) Cooperative and competitive interactions among periodontal pathogens

研究代表者

渡辺 孝康 (Watanabe, Takayasu)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：70725514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌とされるPorphyromonas gingivalis, Tannerella forsythiaおよびTreponema denticolaの3菌種間で、代謝経路の共有など協調的な相互作用がみられた一方で、細菌の獲得免疫機構を担うことで知られるclustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) を介した競合的な相互作用も示唆され、各細菌種の生存戦略の一端が垣間見えた。

研究成果の概要(英文)：Among three periodontal pathogens Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola, we demonstrated cooperative interactions such as complementation of metabolic pathways as well as competitive interactions in which clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs), bacterial genomic regions responsible for acquired immunity, were involved. Our findings would be a clue for elucidation of survival strategies of the three pathogens.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔細菌学 歯周病原細菌 ゲノム解析 CRISPR

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界第2位の死因である「感染症」は、複数の細菌種が関わる「polymicrobial disease」が80%を占めるといわれ、その発症・進行機序は複雑である。Polymicrobial diseaseの代表例である歯周病は、歯の喪失の主たる原因であり、動脈硬化症・糖尿病など全身疾患への悪影響も指摘されている。口腔に生息する600種以上の細菌のなかでも、*P. gingivalis*、*T. forsythia* および *T. denticola* の3菌種は、深い歯周ポケットからの分離率が高頻度であることから「red complex」と呼称され、最も重要な歯周病原細菌として認識されているが、これらの細菌種による歯周病の発症・進行機序は未だに解明されていない。そのため、3菌種のそれぞれにおいて、病原因子の同定や菌株のゲノム配列決定などが行われてきた。例えば、*P. gingivalis* はタンパク分解酵素・線毛・赤血球凝集素などによって、ヒト免疫系を介して歯周組織を脆弱化させる。*T. denticola* も *P. gingivalis* と同様に病原因子に関する報告が多くあるが、*T. forsythia* の病原因子の知見は乏しい。また、細菌の病原性獲得に重要な進化・多様化機構に関しては、3菌種ともほとんど報告がない状態である。

(2) 細菌において、バクテリオファージやプラスミドなど外的要因の菌体内定着を防ぐ獲得免疫機構として clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) が近年盛んに研究されており、前述の3菌種のうち *P. gingivalis* においてはその存在が確認されているが、残り2菌種におけるその存在は不明である。また、CRISPRに関しては近傍の CRISPR 関連 (cas) 遺伝子の一群が必要とされることなど、その機能発揮における仕組みが明らかになりつつあるものの、本来であれば免疫対象となるはずのバクテリオファージが細菌ゲノムに取り込まれた状態であるプロファージに、CRISPRが入り込んでいるものが腸内細菌種で発見され、CRISPRの機能解明を複雑にしている。

2. 研究の目的

(1) 歯周病に関わる前述の3菌種の相互作用を、ゲノム情報から明らかにする。このとき、ゲノム上における CRISPR の存在、およびそれらの機能を明らかにすることで、相互作用解明の一助とする。

(2) ゲノム情報だけでなく転写発現段階でのトランスクリプトーム情報から、3菌種の相互作用の一端を明らかにする。

(3) 前述の CRISPR 機能に関連して、種々の細菌種における CRISPR 保有プロファージの分布を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* 5株、*T. forsythia* 19株および *T. denticola* 14株の完全またはドラフトゲノム配列におけるゲノム構造、遺伝子組成、CRISPRの存在およびその免疫対象を調べた。

(2) 歯周炎およびインプラント周囲炎を有する患者12人より同患部由来のプラーク試料を採取し、細菌RNAを抽出して高速シーケンサーによりその塩基配列を網羅的に決定した。取得データから、試料中に存在する細菌種の組成、細菌遺伝子の組成を調べ、3菌種の相互作用にかかわる遺伝子発現を調べた。

(3) 米国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) 管理下の GenBank データベースに収載された種々の細菌種ゲノム配列を取得し、CRISPRとプロファージを同定して CRISPR 保有プロファージの分布を調べた。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* については、トランスポゾンなど可動性遺伝因子の頻繁な移動によるゲノム構造の大規模な再構成、およびバクテリオファージなどの外来性遺伝子の侵入に対する獲得免疫機構である Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) の一部が可動性遺伝因子そのものを標的としていることが報告されている一方で、*T. forsythia* は CRISPR の一部が *P. gingivalis* や *T. denticola* のゲノム配列そのものを標的とすることで、自己の染色体内にこれらが侵入するのを防いでいると考えられた。このように *P. gingivalis* と *T. forsythia* は、同一環境に生息するにもかかわらず、一方は可動性遺伝因子を標的として自己の染色体の再構成を制御し、もう一方は他菌種からの遺伝子を排除するといった、同じ環境にある菌であっても全く異なる進化・多様化機構を保有していると考えられる。

(2) 16S rRNA由来の塩基配列断片から、インプラント周囲炎と歯周炎は細菌叢の構成細菌種の種類や存在量に違いがみられるものの、いずれの疾患においても優占種は似通っていることがわかった。その中には、*P. gingivalis* や *T. denticola* も含まれており、red complex として歯周病への関与が高いと位置づけられる両菌種が、歯周炎だけでなくインプラント周囲炎においてもその発症や進行に関与している可能性が示唆された。その一方で、インプラント周囲炎・歯周炎のそれぞれに特異的な細菌種も検出され、それらの存在が両疾患の発症・進行における差異をもたらしている可能性も考えられた。

(3) 作成した系統樹において CRISPR 保有バ

ロファージを有する細菌種が広く分布していることがわかった。その中には *Clostridium difficile* をはじめとする腸内細菌種もみられ、ヒト腸内など種々の環境における CRISPR 保有プロファージの普遍的分布が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Watanabe T*, Minegishi K*, Furukawa A, Uchida K, Suzuki Y, Akashi T, Maruyama F, Nakagawa I, Eishi Y (*equal contribution). Genetic profiles of *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates. Sci. Rep. 査読有. Vol. 5, 2015, p. 9832, doi:10.1038/srep09832.
- ② 渡辺孝康, 村瀬一典, 中川一路, 丸山史人. 原核生物の獲得免疫に見られる新機構から紐解かれてきたゲノム進化. 化学療法領域. 査読有. Vol. 31, 2015, pp. 118-128, https://www.iyaku-j.com/iyaku/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=30615
- ③ Endo A, Watanabe T, Ogata N, Nozawa T, Aikawa C, Arakawa S, Maruyama F, Izumi Y, Nakagawa I. Comparative genome analysis and identification of competitive and cooperative interactions in a polymicrobial disease. ISME J. 査読有. Vol. 9, 2015, pp. 629-642, doi:10.1038/ismej.2014.155.
- ④ Haobam B, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Tanaka M, Oda S, Watanabe T, Aikawa C, Maruyama F, Nakagawa I. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A *Streptococcus* invasion. Cell. Microbiol. 査読有. Vol. 16, 2014, pp. 1806-1821, doi:10.1111/cmi.12329.

[学会発表] (計7件)

- ① 渡辺孝康, 野澤孝志, 丸山史人, 中川一路, 関崎勉. CRISPR を保有するバクテリオファージの系統学的普遍性. 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日~25 日, 大阪国際交流センター.
- ② Shiba T, Watanabe T, Kachi H, Maruyama F, Takeuchi Y, Koyanagi T, Maruyama N, Murase K, Izumi Y, Nakagawa I. Dissimilarities of functional keystone

species in co-occurrence network enable discrimination of intractable polymicrobial infectious diseases. SMBE Satellite Workshop on Genome Evolution in Pathogen Transmission and Disease, 2016 年 2 月 22 日~25 日, Shiga Lake Hotel, Nagano, Japan.

- ③ 渡辺孝康, 芝多佳彦, 加地博一, 村瀬一典, 竹内康雄, 丸山史人, 和泉雄一, 中川一路. メタトランスクリプトーム解析による臨床症状の類似した 2 疾患の細菌学的比較. 第 9 回細菌学若手コロッセウム, 2015 年 11 月 23 日~25 日, KKR ホテル敬天閣.
- ④ 渡辺孝康, 野澤孝志, 丸山史人, 中川一路. CRISPR による腸内細菌プロファージの利己的進化機構. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日~28 日, 長良川国際会議場.
- ⑤ 渡辺孝康. CRISPR/Cas システムの新規機能と微生物ゲノム編集への適用. 第 9 回茨城大学遺伝子実験施設公開シンポジウム (招待講演), 2014 年 12 月 4 日, 茨城大学.
- ⑥ 渡辺孝康, 野澤孝志, 丸山史人, 中川一路. CRISPR を保有するバクテリオファージの系統学的普遍性. 環境微生物学系学会合同大会 2014, 2014 年 10 月 22 日~24 日, アクトシティ浜松.
- ⑦ 渡辺孝康, 野澤孝志, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路. CRISPR による *Porphyromonas gingivalis* のゲノム進化制御. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, 福岡国際会議場.

[図書] (計1件)

- ① Maruyama F, Watanabe T, Nakagawa I. *Streptococcus pyogenes*: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet]. *Streptococcus pyogenes* Genomics. 2016, オンライン出版.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 孝康 (WATANABE, Takayasu)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：70725514

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし