

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11876

研究課題名(和文) 口腔硝酸還元性を基にした口腔健康指標の開発

研究課題名(英文) Development of new oral health index based on oral nitrate reduction activity

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔メタゲノム解析の結果、健康な口腔状態と関連するいくつかの細菌(特に Rothia属・Actinomyces属細菌)が明らかとなってきた。我々は、Rothia属細菌が口腔内で「善玉菌」として働く要因の一つが、Rothia属細菌が保有する高い硝酸還元活性であると考えている。我々は、口腔に存在する Rothia属細菌の全ゲノム配列を解析し、硝酸還元に関連する遺伝子の働きを明らかにした。また、新たな口腔健康水準を示す指標を作成するために、口腔環境と細菌叢の変動を同時にモニターできる新たな実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、口腔健康に貢献するRothia属細菌の働きの一端が遺伝子レベルで明らかになった。Rothia属細菌を口腔善玉菌のひとつのモデルと考えて、その働きを遺伝子改変・他菌種との相互関連性など多方面からアプローチしていくことができる基盤が整ったと言える。また、口腔に物質を添加した後の環境変化と個々の細菌の変化を捉えるモデル実験系を確立できた。この方法を利用すれば、どのような条件を整えば、口腔善玉菌(悪玉菌)が増えるのか(減るのか)をin vitroの実験において推測できると考える。

研究成果の概要(英文)：A result of oral metagenomic analysis have revealed that some bacterial species (especially Rothia and Actinomyces) related to healthy oral conditions. We understand one of the factors that some Rothia species act as "good bacteria" in the oral cavity is their high nitrate reduction activity. We determined the whole genome sequences of oral Rothia species, and clarified genes involved in the nitrate reduction. In addition, in order to create a new indicator of oral health level, we established a new experimental system for simultaneous monitoring the changes oral environmental condition and oral microbiota.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔細菌叢 硝酸還元 口腔健康 メタゲノム解析 ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

口腔を対象にメタゲノム解析を行った結果、歯周病患者だけでなく歯周組織健常者の口腔常在細菌叢の全貌が見えてきた。特に注目すべき新たな知見は、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 *Rothia* 属細菌が、口腔内を健康に保つためにプラスに働き、いわゆる『口腔善玉菌』としての役割が示唆された点である。歯周組織健常者口腔常在菌のコアメンバーとして存在し、歯周病発症と強い負の相関が認められることが報告されてきている。しかしながら、これまで、*Rothia* 属細菌による感染症としては、易感染性宿主における日和見感染症事例や嚢胞性線維症 (CF) 増悪との関連性が報告されているが、その役割は全く不明であった。

我々は、*Rothia* 属細菌が口腔善玉菌として働く要因のひとつは、高い硝酸還元性ではないかと考え、歯周病原細菌への殺菌効果を明らかにしてきた (図1)。しかし、*Rothia* 属細菌の詳細な特性はわからないままであるので、その遺伝的背景や口腔環境変化への適応性を調べる必要性があると考えた。

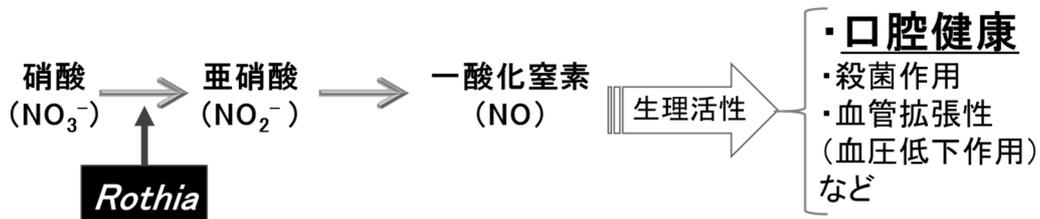


図1 *Rothia*属細菌の硝酸還元とその作用

## 2. 研究の目的

*Rothia* 属細菌の殺菌効果は、口腔にある硝酸イオンを利用したものである。個人差はあるが、ヒトの唾液中には硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) が 0 ~ 5 mM 程度の濃度で存在している。唾液中に含まれる硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) は口腔硝酸還元菌の働きにより、亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) を経て、一酸化窒素 (NO) へと変化していく。この NO がラジカルであるために、強力な殺菌効果を発揮するのである。本研究では、(1) *Rothia* 属細菌の遺伝学的背景を明らかにし、どのようなメカニズムで硝酸還元性を発揮しているのかを明らかにする。(2) 口腔環境の変化を反映しつつ、口腔細菌叢全体における *Rothia* 属細菌の変動を評価できるようなモデル実験系の構築を試みる。モデル実験系が構築できれば、様々な口腔環境下における硝酸還元菌の働きを評価できる。最終的には、口腔硝酸還元活性を基にした口腔健康 (病態) レベルの指標が作成でき、口腔健康増進に寄与することができると思う。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試菌株および培養方法

口腔善玉菌として *Rothia mucilaginosa* ATCC25296 株、NUM-Rm 6502 株、6504 株、*Rothia aeria* JCM 11412 株を試験菌として選択した。培養には HIB および HIA を用い、好気条件下、37℃、一晚培養を行った。

### (2) 硝酸還元活性の測定

コロニー形成が認められた HIA 上に 1 mM 硝酸カリウム ( $\text{KNO}_3$ ) 含有 1.5 % w/v 寒天溶液 10 ml を重層し、10 分間室温で放置した。その後、0.5 mL of 1 % w/v sulphanilamide および 2.5 %

v/v phosphoric acid 含有 1.5 % w/v 寒天溶液 10 ml を重層し、10 分間放置したのち、色調の変化により硝酸還元活性の強弱を確認した。硝酸還元活性が認められた株に対して、詳細な硝酸および亜硝酸還元活性を NOx アナライザー ENO-20 (酸化窒素分析システム) (エイコム) にて測定した。

### (3) *Rothia* 属細菌の全ゲノム配列決定

*Rothia* 属細菌培養液より Nucleo Spin Tissue kit (Macherey-Nagel) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。20 kb SMRTbell ライブラリーを作製し、PacBio RS II システム (Pacific Biosciences) を使用して塩基配列の決定を行った。SMRT 分析ソフトウェア断層的ゲノムアセンブリプロセス (HGAP) アルゴリズムを使用して、リードの *de novo* アセンブリを行った。アノテーションは RAST を使用した。

### (4) *Rothia* 属細菌の遺伝子改変

一晚培養した菌液を冷却 10 % グリセロールで洗浄後、菌体を回収し、エレクトロポレーションにて 100 ng pJRD215 (Km 耐性) を形質転換した。カナマイシンを添加した HIA に菌液を接種し、生育したコロニーにより形質転換可能かどうかの判断を行った。また、pJRD215 プラスミド内部の配列を標的としたコロニー PCR を行い、菌体内のプラスミドの有無を確認した。

### (5) 低濃度スクロース添加条件下における口腔細菌叢の次世代シーケンス解析

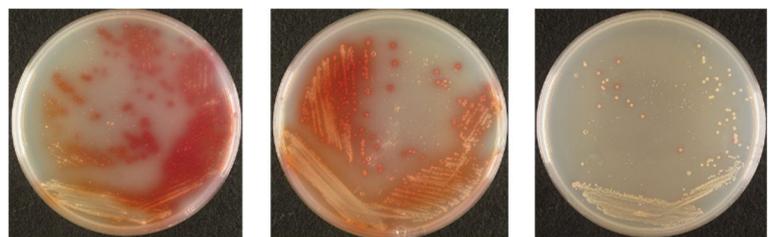
歯周組織健康者 3 名のボランティアから唾液サンプルの採取を行った。サンプルは採取後直ちに氷上に置き、ホモジナイズを行った後に培養実験に供した。唾液サンプルを口腔細菌叢の状態を恒常的に維持できる改変 SHI 培地に接種し、最終濃度 0 ~ 0.1 % (w/v) になるようにスクロースを添加し、嫌気条件下 37 °C、20 時間震盪培養を行った。

培養後、菌体を回収し、QIAamp UCP Pathogen Mini Kit と Pathogen Lysis Tube S (Qiagen) を用いて DNA の抽出を行った。イルミナ社が提供する 16S メタゲノムシーケンシングライブラリー準備ガイドに従って、細菌の 16S rDNA 増幅 (V3-V4 領域) とライブラリー構築を行った。塩基配列のデータは CLC Workbench ソフトウェアで分析し、OTU クラスタリングを Human Oral Microbiome Database (HOMD、バージョン 14.51) のリファレンスシーケンスを使用して実行した。配列データは、R ベースの Rhea パイプラインを用いて分析した。研究プロトコルは大阪歯科大学医の倫理委員会によってレビューおよび承認された (承認番号: 110965)。

## 4. 研究成果

### (1) *R. mucilaginosa* 株間における硝酸還元活性の多様性

*R. mucilaginosa* ATCC 25296 株、NUM-Rm 6502 株、6504 株における硝酸還元活性を測定し、各々の菌株による多様性が存在することを明らかにした。現在は、さらに口腔から *Rothia* 属細菌を分離し、硝酸還元活性バリエーションの詳細な解析を行っている。まとめ次第、学会発表と論文公表を行う予定である。



ATCC25296株 NUM-Rm 6502株 NUM-Rm 6504株  
図2 *R. mucilaginosa* 3株における硝酸還元活性の多様性

### (2) 硝酸還元活性を保有する菌株の全ゲノム配列の決定および変異株の作製

口腔に常在する細菌で高い硝酸還元活性を保有する細菌 (*Actinomyces naeslundii* および *R. aeria*) を同定し、全ゲノム配列を決定した。この結果は論文公表を行うとともに、DDBJ に登録

を行った。現在は全ゲノム配列の情報より、硝酸還元活性に関連する遺伝子を抽出し、各々の遺伝子変異株を作製している段階である。遺伝子の欠損により硝酸還元に関連する一連の表現型がどのように変化するかを明らかにしていく予定である。

### (3) *Rothia* 属細菌の遺伝子改変技術基盤の構築

*Rothia* 属細菌での遺伝子改変についての研究報告はこれまでになく、既存の技術を用いて遺伝子変異株を作製するのは困難な細菌である。我々は、これまでに構築した様々な遺伝子改変技術を応用して、*R. mucilaginosa*, *R. aeria*, *R. dentocariosa* のいくつかの株において、遺伝子改変可能な株を同定した。現在は、安定して遺伝子改変（欠損株の作製、遺伝子導入など）ができる精度の高い実験系を構築中である。まとめ次第、学会発表と論文公表を行う予定である。

### (4) 低濃度スクロース添加条件下における口腔細菌叢の次世代シーケンス解析

口腔環境を微量に変化させることによって、細菌叢がどのように変動するのか、その中でも硝酸還元菌数はどのように変動するのかをモニターすることができるモデル実験系の構築を *in vitro* 口腔細菌培養システムを用いて試みた。日常的に口腔に投与される物質としてスクロースを上げ、唾液によるクリアランス作用を考慮して、低濃度スクロースによる口腔細菌叢への影響を評価した。その結果、口腔への低濃度の物質の投与であっても、口腔環境の変化は被検者ごとに異なる応答をみせた。同様に、口腔細菌叢の変動パターンも個人によって異なり、その変化は種レベルまで評価できた。今回の実験条件では、硝酸還元菌の変化を追うことはできなかった。被検者が3名で

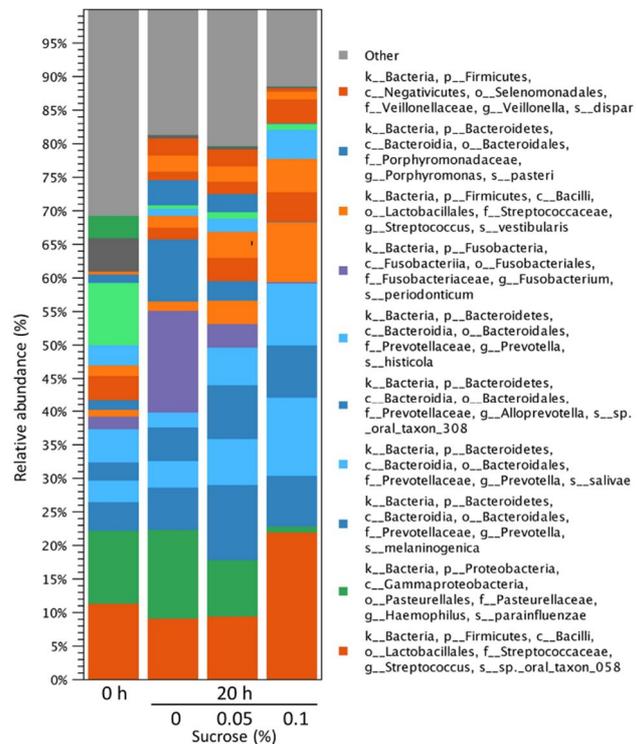


図3 低濃度スクロース添加による口腔菌叢の変動(一部)

あったため、統計的な有効性は見いだせなかったが、口腔環境状態・細菌叢・特定の細菌の変動などを経時的にモニターすることができた。本実験系を用いることで、口腔環境と細菌叢の変動を同時に評価できる新たな系が確立できたと考える。

本研究課題の遂行により、口腔健康増進に寄与するひとつの条件である口腔常在菌による硝酸還元作用メカニズムの一端が初めて明らかになった。*Rothia* 属細菌への遺伝子改変技術が構築できたので、今後、遺伝子レベルで口腔善玉菌としての働きを明らかにできると考える。また、口腔状態と細菌叢の両者を同時にモニターできる実験系も構築できた。この系は口腔健康を評価するひとつの物差しとなり、新たな口腔健康増進法の開発に重要な一助となることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kobayashi T, Uchibori S, Tsuzukibashi O, Uezato C, Goto H, Mashimo C, Nambu T, Umezawa K, Ohta M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Primer design for the identification of ten oral Actinomyces species using multiplex PCR.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Dentistry and Oral Health	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） dx.doi.org/10.16966/2378-7090.249	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 Enomoto A, Nambu T, Mashimo C, Nakatani K, Komuro A, Nakajima Y, Honda M, Ito Y, Hara T, Kusano K, Yamada Y, Botticelli D, Baba S.	4. 巻 4
2. 論文標題 A preliminary study of the effect of room-temperature incubation on phylogenetic composition of salivary microbiota.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science & Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 24-30
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zhang H, Komasa S, Mashimo C, Sekino T, Okazaki J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of ultraviolet treatment on bacterial attachment and osteogenic activity to alkali-treated titanium with nanonetwork structures	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 4633-4646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJN.S136273	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 Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Komasa S, Okazaki J, Nambu T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Genome sequence of Actinomyces naeslundii strain ATCC 27039, isolated from an abdominal wound abscess.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e01443-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.01443-16.	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 Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Mugita N, Morioka H, Takahashi K, Komasa Y, Mashimo C.	4. 巻 4
2. 論文標題 Complete genome sequence of Rothia aeria type strain JCM 11412, isolated from air in the Russian space laboratory Mir.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e01444-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.01444-16	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 Nambu T, Wang D, Mashimo C, Maruyama H, Kashiwagi K, Yoshikawa K, Yamamoto K, Okinaga T.	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 E353
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 Masago A, Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K.	4. 巻 54
2. 論文標題 Influence of tongue brushing on oral microbiome diversity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	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) 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 Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T.	4. 巻 134
2. 論文標題 Isolation and identification methods of Rothia species in oral cavities.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 21-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2017.01.005	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真下千穂、南部隆之、円山由郷、沖永敏則
2. 発表標題 口腔菌叢培養モデルによるスクロース依存的に変動する細菌群の同定
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南部隆之、真下千穂、円山由郷、沖永敏則
2. 発表標題 口腔菌叢培養モデルを用いた一酸化窒素感受性細菌の同定
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本温子、南部隆之、真下千穂、円山由郷、馬場俊輔、沖永敏則
2. 発表標題 唾液サンプルの保存条件における細菌叢変化
3. 学会等名 第71回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 円山由郷、南部隆之、真下千穂、沖永敏則、川添堯彬
2. 発表標題 ゲノム解析から明らかとなった口腔細菌叢バランスに関わる因子
3. 学会等名 第8回臨床ゲノム医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山根一芳, 南部隆之, 真下千穂, 円山由郷, 山中武志
2. 発表標題 口腔でショ糖非依存性にバイオフィルムを形成するActinomyces orisのゲノム解析.
3. 学会等名 第12回ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Honghao Zhang, 小正聡, 真下千穂, 関野徹, 岡崎定司
2. 発表標題 アルカリ処理によりナノ構造制御された純チタン金属表面への UV 処理が細菌の接着および硬組織分化誘導に与える影響について
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真下千穂、円山由郷、山中武志、山根一芳、王宝禮、南部隆之
2. 発表標題 口腔由来Rothia属細菌における硝酸還元性についての検討
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Matsumura Y, Enomoto Y, Okinaga T.
2. 発表標題 The effect of metal nanocomposite beads on oral bacterial flora.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
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	馬場 俊輔  (Baba Shunsuke)  (40275227)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	
研究 分担者	南部 隆之  (Nambu Takayuki)  (80367903)	大阪歯科大学・歯学部・講師   (34408)	