

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：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592724

研究課題名(和文) ストレプトコッカス・インターメディウスのバイオフィーム関連遺伝子の検索

研究課題名(英文) Genome sequence analysis of biofilm-forming *Streptococcus constellatus*

研究代表者

福島 久典 (FUKUSHIMA, Hisanori)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50103099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：走査電顕とフローセルを用いたスクリーニングの結果、骨膜下膿瘍から分離したストレプトコッカス・コンステラタスが菌体外多糖(EPS)を産生し、バイオフィームを形成していることが明らかになった。本菌株のゲノムをパイロシーケンシングした結果、十分な冗長度のもとに塩基配列が得られた。配列から遺伝子の機能を予測したところ、EPS合成と輸送に関与する遺伝子、バイオフィーム形成の調節に関与すると考えられているストレス応答系の遺伝子などと相同性の高い領域が存在した。これらの遺伝子は、ストレプトコッカス・コンステラタスのバイオフィーム形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We isolated *Streptococcus constellatus* strain H39 from an apical abscess lesion. Scanning electron micrographs revealed that strain H39 had dense meshwork-like structures around the cells, which are a characteristic of exopolysaccharide-producing bacteria. Strain H39 grown in flow chambers formed biofilm. We reported a draft genome sequencing of strain H39 which can be used for further genetic study on biofilm formation mechanisms. The genome sequencing was performed by pyrosequencing. The putative gaps between contigs were closed by sequencing of polymerase chain reaction amplicons over the gaps. A high-quality draft genome sequence indicated that strain H39 had 3 ribosomal RNA genes, 45 transfer RNA genes and 1,926 putative protein-coding genes. We also found that strain H39 possessed genes encoding exopolysaccharide biosynthesis proteins and ABC-type polysaccharide transport proteins. These genes might contribute to the biofilm formation of *S. constellatus*.

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 ストレプトコッカス ゲノム

1. 研究開始当初の背景

1) 歯科領域におけるバイオフィーム

バイオフィーム形成菌における EPS 産生メカニズムの遺伝学的なバックグラウンドについては、一般医科でのバイオフィーム感染症の原因菌である緑膿菌や大腸菌で盛んに研究され、膨大な数の報告がある (Costerton JW *et al.* Annu Rev Microbiol 1987; 41: 435-464)。

一方で歯科の領域では「歯垢(歯肉縁上歯垢、歯肉縁下歯垢ともに)はバイオフィームである」という概念が広まっている (Marsh PD. Caries Res 2004; 38: 204-211)。歯垢は確かにバイオフィームであり、コミュニティを形成して言葉(グラム陰性菌ではホモセリンラクトン)が飛び交い、水路や栄養供給路がつくられている。そして時間の経過とともに歯垢は成熟して歯垢構成細菌はバイオフィームモードになり、遺伝子を変化させる。その結果、歯垢の外側につくられたマトリックスが宿主側の貪食や消毒剤や抗生物質から歯垢自身を守り、まさに歯垢はバイオフィームと言える。しかしバイオフィーム内のどの細菌が形成過程で重要な役割を果たしているのかを特定することは、mixed infection であるために困難である。

2) 菌体外多糖(exopolysaccharide: EPS)産生細菌の重要性

口腔細菌が産生するヨード可染物質や粘性物質についての報告は 1960 年台には散見できるが、口腔細菌が産生する EPS についてはその後見られておらず、わずかに *Capnocytophaga ochracea* の EPS 産生に関する報告 (Dyer JK *et al.* Can J Microbiol 1985; 31: 1-5) のみである。我々は EPS を産生する *Prevotella nigrescens* と非産生株の系を用いてマウスソケイ部での膿瘍形成能を比較した。その結果、EPS 産生菌の方が 100 倍から 1,000 倍強いことを明らかにした。また精製した EPS には膿瘍形成能はみられなかった。さらに精製 EPS と非産生株を混合してマウスに接種すると膿瘍が形成されることを明らかにした (Yamane K *et al.* Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 1-9)。

3) EPS 産生関連遺伝子の検索

我々は難治性根尖性歯周炎から分離した EPS 産生の *Escherichia hermannii* にトランスポゾンによる変異導入を行い、EPS 産生 KO 株を得た。トランスポゾンが挿入された周辺を DNA walking で読み込み、ABC transporter である *wzt* 遺伝子が EPS 産生関連遺伝子であることを明らかにした。また KO 株に親株の *wzt* 遺伝子を含むプラスミドを挿入して complementation を起こさせると KO 株が大量の EPS を産生することを確認した (Yamanaka T *et al.* FEMS immunol microbiol 2010 59: 456-465)。また、我々は歯周ポケットから分離した EPS を産生する、*Prevotella intermedia* strain 17 と strain 17 由来で EPS 産生能を欠く strain 17-2 を用いて、マ

イクロアレイ法で発現遺伝子を比較した。その結果、熱ショックタンパクと ABC transporter に関連する遺伝子が EPS 産生に関連することが明らかになった (Yamanaka T *et al.* BMC Microbiol 2010)。さらに、我々は、バイオフィーム形成遺伝子解明の一助とするため、難治性根尖性歯周炎から分離した、EPS 産生の *Rothia mucilaginosa* の全ゲノム配列を決定した (Yamane K *et al.* Sequencing 2010 ID 457236)。

3) 口腔感染症における Anginosus group レンサ球菌の重要性

我々は上記以外の口腔バイオフィーム形成菌として、種々の口腔感染症から Anginosus group レンサ球菌を数多く見出している。Anginosus group に属する *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* は、口腔、胃腸、泌尿生殖器ばかりでなく、様々な膿瘍の病巣から分離される。また慢性歯周炎からも分離され、他の口腔レンサ球菌と同様に、感染性心内膜炎の原因菌としても注目されている。

2. 研究の目的

バイオフィームを形成する Anginosus group レンサ球菌のバイオフィーム形成機構を明らかにすること

3. 研究の方法

1) 走査型電子顕微鏡とフローセルを用いたスクリーニング

講座で保存している、種々の口腔感染症から分離した Anginosus group レンサ球菌の菌体表層を走査型電子顕微鏡で観察し、EPS 産生菌に特徴的な網目様構造物をもつ菌株をスクリーニングした。また、それらの菌株を、本基金で購入したフローセルを用いて培養し、そのバイオフィーム形成性を評価した。

2) ゲノムシーケンシング

スクリーニングの結果得られたバイオフィーム形成株のからゲノム DNA を抽出し、ゲノム解析に供試した。精製したゲノム DNA を Rapid Library Nebulizers を使用して物理的に、ランダムに断片化したのちフラグメントを精製し、ゲノムライブラリーを調製した。ゲノムライブラリーを鋳型として emulsion PCR によりビーズ上で DNA を増幅した。エンリッチメントしたビーズを pico titer plate に充填し、ゲノムシーケンサー (GS Junior, Roche Diagnostics) でパイロシーケンシングして塩基配列を決定した。

3) Contig 構築とアノテーション

パイロシーケンシングにより得られたリードを GS de novo Assembler Software (version 1.1.03.24) (Roche Diagnostics) を用いてアセンブルし、contig を構築した。アノテーションに必要な contig 間のギャップクローズのため、コンティグ両端の配列からプライマーを設計し、PCR した。増幅産物は、

増幅プライマーを用いて Sanger 法でシーケンシングした。これらの結果から構築した配列のコーディング領域を Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP ; <http://www.migap.org/>) を用いて決定後、NCBI BLAST を用いて相同性解析することで遺伝子機能を予測し、EPS 産生に関連する領域を検索した。

4. 研究成果

走査型電子顕微鏡とフローセルを用いたスクリーニングの結果、閉鎖性の骨膜下膿瘍から分離し、研究室で保存している Anginosus group レンサ球菌の 1 株が EPS を産生し、バイオフィルムを形成していることが明らかになった。

この菌株のバイオフィルム形成遺伝子検索の一助とするため、全ゲノム配列の解読を試みた。パイロシーケンシングの結果、35,026,349bp の塩基をシーケンシングできた。また、平均リード長は 457bp であった。アセンブルの結果、55 の contig を構築することができ、その後のギャップクローリングによって 40 の contig が構築できたが、複数箇所、単一の PCR 増幅産物が得られない部分があり、完全な全長決定には至らなかった。これは、該当部分に繰り返し配列が存在するためであると考えられ、今後コスミド構築など、今回試みた方法とは異なる戦略による配列解読が必要であることが明らかになった。Anginosus group レンサ球菌には *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. constellatus* の 3 菌種が存在し、その表現形質による鑑別は困難であることが知られている。そこで我々は得られたゲノム情報に含まれる 16S リボソーム RNA 遺伝子, *recN* 遺伝子, *groEL* 遺伝子, *tuf* 遺伝子を用いて系統樹解析による同定を試みたところ、供試菌株は *S. constellatus* の配列とクレイドを形成することが明らかになった。*S. constellatus* にはさらに亜種として subsp. *pharyngis* と subsp. *constellatus* があることが知られており、本菌株は系統解析の結果から subsp. *constellatus* に分類されると考えられる。本亜種は未だゲノム全長が決定しておらず、2 亜種がそれぞれの種として独立する可能性もあることから、全配列決定が急務であると考えている。遺伝子予測の結果、contig 1 と 8 上にバイオフィルム形成に関与すると考えられる多糖の合成遺伝子を、contig 9 上には分泌輸送経路の遺伝子が存在することが明らかになった。また、バイオフィルム形成調節に関与すると考えられるストレス応答系のオートインデューサー 2 を産生する *luxS* タンパクをコードする遺伝子と相同性の高い領域を得ることができた。

また、本菌株を様々な培養条件で培養し、バイオフィルム形成性を比較したところ、嫌気条件(窒素 80%、水素 10%、二酸化炭素 10%)で培養した時と、好気条件で 10%の二酸化炭

素のみ添加して培養した時ではバイオフィルム形成性が異なることが明らかになった。Anginosus group レンサ球菌は二酸化炭素要求性が強く、嫌気条件で発育が良いことが知られているが、本結果により酸素の有無によって、バイオフィルム形成性を変化させ、自信を保護している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 12 件)

堀池周司, 山中武志, 福島久典. *Prevotella intermedia* の GroEL と DnaK がバイオフィルム形成に及ぼす影響 歯科医学 76(2): 89-100 (2013) 査読有.

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.

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.

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.

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 歯科医学 76(2): 1-10 (2013) 査読有.

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.

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.

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.

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.

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.

Fujihira T, Yamane K, Yoshida M, Nambu T, Hayashi H. Analysis of genes involved in exopolysaccharide production of *Rothia mucilaginosa* clinically isolated from a persistent apical periodontitis lesion. Journal of Osaka Dental University 46(1): 157-164 (2012) 査読有.

Ogiso K, Nambu T, Kotsu Y, Fukushima H, Ueda M. Isolation of a biofilm-defective mutant of *Actinomyces* from a patient with gingivitis. Journal of Osaka Dental University 46(1): 91-99 (2012) 査読有.

〔学会発表〕(計 22 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. 堀池周司, 山中武志, 福島久典. *Prevotella intermedia* の GroEL と DnaK がバイオフィルム形成に及ぼす影響. 第 539 回大阪歯科学会. 2013 年 6 月 8 日. 枚方市.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. Yamanaka T, Sugimori C, Yamane K, Nambu T, Mashimo C, Fukushima H. Production of polyclonal antibodies raised against *Prevotella intermedia* GroEL and DnaK proteins. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011 年 9 月 6-10 日. 札幌市.

18. Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Fukushima H. Gene expression profiles of *Rothia mucilaginosa* grown under diamide stress. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology.

2011年9月6-10日. 札幌市.

19. Yamane K, Yamanaka T, Nambu T, Mashimo C, Fukushima H. Pathogenicity of exopolysaccharide-producing *Actinomyces oris* isolated from apical abscess lesion. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011年9月6-10日. 札幌市.

20. Mashimo C, Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Genetic analysis of a gram negative wide hostrange plasmid pJRD215 and its application to oral *Actinomyces* spp. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011年9月6-10日. 札幌市.

21. Maruyama H, Shin M, Prieto E, Oda T, Fukushima H, Atomi H, Takeyasu K. Coupling of genome architecture and transcriptional regulation by TRMB-like proteins in Archaeal chromosomes. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011年9月6-10日. 札幌市.

22. 藤平智広, 山根一芳, 吉田匡宏, 山中武志, 福島久典, 林宏行. 難治性根尖性歯周炎から分離した *Rothia mucilaginosa* DY-18 株のバイオフィルム形成関連遺伝子の検索. 日本歯科保存学会春季学術大会. 2011年6月9日 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 久典 (FUKUSHIMA, Hisanori)

大阪歯科大学 歯学部 教授

研究者番号: 50103099

(2)研究分担者

山根 一芳 (YAMANE, Kazuyoshi)

大阪歯科大学 歯学部 講師

研究者番号: 40388369

(3)研究協力者

KAI P. LEUNG

U.S. Army Dental and Trauma Research Detachment, Institute of surgical research Director of Science