

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861552

研究課題名(和文)口腔の硝酸還元活性を支えるフローラの解明

研究課題名(英文)Oral bacterial species having nitrate reducing activity

研究代表者

南部 隆之(NAMBU, Takayuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80367903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの口腔には、唾液中に含まれる硝酸イオンを還元し、亜硝酸イオンや一酸化窒素を生成する細菌群(硝酸還元菌)が常在している。次世代シーケンス法と培養法を併用することで、この口腔の硝酸還元活性を支えるフローラの解明を目指した。主要な硝酸還元菌であるActinomyces属、Rothia属を含め4種の全ゲノムを決定した。Rothia属を高効率で分離する培地を開発することで、Rothia属細菌の硝酸還元活性の網羅的比較を行い、株間で活性の大きな違いがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There is a diverse microbiota in the oral cavity, in which specific oral bacteria are able to reduce nitrate to nitrite. We have determined complete genome sequences of four strains including nitrate reducing Actinomyces and Rothia species. Additionally, through the development a novel selective medium for isolating oral Rothia species, we compared the nitrate reducing activities of Rothia species.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔細菌学 硝酸還元

1. 研究開始当初の背景

我々は、食品摂取によって獲得した硝酸イオン (NO_3^-) とその還元物である亜硝酸イオン (NO_2^-) を口腔を經由して全身に循環させる仕組みを備えており、近年この機構がヒトの生理機能や特定の疾患の発症に大きく影響していることが明らかとなってきた。我々は、硝酸イオンを主に緑色葉野菜の摂取により得ている。腸管での消化吸収により血流へと入った硝酸イオンは、全身を循環し最終的に尿として排出される。しかし、その約 25% は唾液腺を介して 10~20 倍に濃縮され、濃度 5~10 mM の硝酸イオンを含んだ唾液として口腔内へと放出される。この硝酸イオンの一部は口腔内で亜硝酸イオンへと還元され、未還元硝酸イオンと共に消化管での吸収を経て再び全身へと送られる。以前、この亜硝酸イオンはニトロソアミン体生成を介した発がんの原因物質と疑われ、国連食糧農業機関 (FAO) や世界保健機関 (WHO) の指導のもと硝酸塩含有食品の摂取制限が推奨されていた。しかし、現在では大規模なコホート研究によりその仮説は否定され、逆にこの口腔由来の亜硝酸イオンは、ヒトの一酸化窒素合成 (NOS) 系の相補的機構として、一酸化窒素 (NO) への更なる還元を通して血管拡張作用 (血圧抑制) や血小板凝集抑制作用に関与する重要な役割を担っていることが示されている。また、脳や心臓血管疾患、II 型糖尿病、齲蝕などに対するリスク低下因子としても強い関心が寄せられている。

口腔での亜硝酸イオンの生成は、我々自身ではなく口腔に常在する硝酸還元菌によって行われている。実際、クロールヘキシジンによる殺菌的洗口により、血圧が約 3.5 mmHg 上昇する例が報告されている。亜硝酸イオン生成を指標としたスクリーニング解析から、口腔の硝酸還元菌として *Actinomyces*, *Rothia*, *Veillonella* 属細菌が分離され、中でも *Actinomyces* と *Rothia* 属細菌が高い硝酸還元活性を示すと報告されている。一方、我々は近年のメタゲノム解析から歯周病発症と強い負の相関が報告されている *Actinomyces* と *Rothia* 属細菌が、硝酸還元により生成された一酸化窒素を介して歯周病原菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* など) を高効率で殺菌することを示している。これと矛盾せず、歯周病患者の唾液の亜硝酸イオン濃度は、健常人より約 3 割も低いことが報告されている。このように *Actinomyces* や *Rothia* 属細菌などの口腔に常在する硝酸還元菌が、硝酸イオンより生成する亜硝酸イオンや一酸化窒素を介してヒトの生理機能や疾患に大きく関与していることが推測されるが、我々の口腔内の硝酸還元活性を支えているのは本当に *Actinomyces* や *Rothia* 属細菌が中心なのか、未だ直接的な証明がなされていない。また、活性を支える重要な種は何か、それは個人差

のあるヒトのフローラ間でも共通か、経時的なフローラの変動と口腔の硝酸還元活性の相関はあるか、歯周病患者における *Actinomyces* や *Rothia* 属細菌の比率低下が亜硝酸イオン生成量の低下の原因かなど、興味深く重要な問題が未解析のままとなっていた。

2. 研究の目的

口腔の硝酸還元活性は、個人間で約 10 倍も異なる例や、数ヶ月ほどの単位で変化する例が報告されている。また、歯周病患者では唾液中の亜硝酸イオン濃度が健常人より約 3 割も低いとの報告もある。次世代シーケンズ技術の確立などにより細菌種のゲノムや個人間の口腔フローラ組成を比較的容易に解析できるようになったことから、本研究では口腔の主要な硝酸還元菌 *Actinomyces*, *Rothia* の計 5 種の全ゲノムを決定すると共に、フローラ解析を行うこととした。また、分離した硝酸還元菌を用いて、硝酸還元活性を網羅的に解析することにより、種間や株間で硝酸還元活性にどの程度違いがあるかを導き出すこととした。

3. 研究の方法

分離された菌株の全ゲノム解読には、ロングリード解析を得意とする次世代シーケンサーである Pacific Biosciences 社の PacBio RS II を用いた。培養液から DNA を抽出し、シーケンサー用サンプルを調製した PacBio RS II より得られたリードをアセンブリし、菌株によって 1~5 本のコンティグが得られた。PCR とサンガーシーケンズによりギャップクローズを行い、環状ゲノムを得た。データは、DDBJ に登録した。

唾液やプラーク中の菌叢解析には、多くのリード数を得ることができる Illumina 社の MiSeq を用いた。口腔サンプルを同意のもと被験者から採取し (倫理承認, 大歯医倫 110710 号), Qiagen 社の QIAamp UCP Pathogen Mini Kit を Lysis tube S と組み合わせることで細菌 DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅し、MiSeq 解析に供した。得られたリードは、Qiagen 社の CLC Microbial Genomics Module を用いて解析した。

in vivo および *in vitro* の硝酸還元活性は、エイコム社の NO_x メーターである ENO-30 を用いて、硝酸イオンや亜硝酸イオン濃度を算出することにより求めた。

4. 研究成果

硝酸還元菌の遺伝的背景を探るため、

Rothia mucilaginosa strain NUM-Rm6536, *Rothia aerea* type strain JCM 11412, *Actinomyces naeslundii* strain ATCC 27039 の3株の全ゲノムを決定し、データベースへの登録と論文発表を行った。また現在、*Rothia dentocariosa* を1株、*Actinomyces oris* を1株解析中で、本年度中に決定予定である。このゲノム解読により、口腔常在の *Actinomyces*, *Rothia* 属の主要な5種全てのゲノム解読が完了するだけでなく、我々が選抜した菌株は全て遺伝子改変が可能なものを選抜しており、今後、硝酸還元遺伝子群、亜硝酸還元遺伝子群のノックアウト作成が可能となる。メタゲノム解析と相補的にこれらの株を用いた *in vitro* 解析も重要となると考えている。また、我々の研究室で保存しているバイオフィーム形成能が欠損した *Prevotella intermedia* strain 17-2 の全ゲノムも決定し、データベース登録と論文発表を行った。今後、殺菌される側の細菌において、バイオフィームの有無がその殺菌に影響するかどうか、解析を進める予定である。

また、日本大学松戸歯学部の瀧橋講師との共同研究のもと、*Rothia* 属を高効率で分離することができる培地の作成に至った。この培地を用いて唾液中より *Rothia* 属細菌を50株ほど分離し、それらの硝酸還元活性を網羅的に解析した。その結果、株間で硝酸還元活性が大きく異なる事が明らかとなり、そのデータをまとめて論文にて発表した。

加えて、次世代シーケンサーMiSeqによる菌叢解析の系を確立し、口腔の硝酸還元活性と菌叢との相関を調べているところである。この内容については、南部が代表である科研費基盤C(H28~30, 課題番号16K11469)へと引き継ぎ、研究を進めているところである。

本研究課題の遂行により、これまで「口腔の硝酸還元菌」とひと括りにされていた集団が、種やそれより細かい異なる活性をもつ単位の集合として見えてきた。少なくとも、採取したサンプルにおいて、属レベルのフローラ解析で口腔の硝酸還元活性の個人差や経時変化、歯周病患者における亜硝酸イオン生成能の低下について説明することは難しくそうである。今後の研究により、主要な硝酸還元菌を種あるいは株レベルで特定できれば、それらを増やす(あるいは減らさない)戦略がとれるようになるばかりではなく、活性発現の調節法の探索なども可能となるであろう。

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6件)

(1) Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T. Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities. J Microbiol Methods. 134, 21-26. 2017. 査読有. DOI:10.1016/j.mimet.2017.01.005.

(2) Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Komasa S, Okazaki J, Nambu T. Genome sequence of *Actinomyces naeslundii* strain ATCC 27039, isolated from an abdominal wound abscess. Genome Announc. 4, e01443-16. 2016. 査読有. DOI: 10.1128/genomeA.01443-16.

(3) Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Mugita N, Morioka H, Takahashi K, Komasa Y, Mashimo C. Complete genome sequence of *Rothia aerea* type strain JCM 11412, isolated from air in the Russian space laboratory Mir. Genome Announc. 4, e01444-16. 2016. 査読有. DOI:10.1128/genomeA.01444-16.

(4) Nambu T, Yamane K, Maruyama H, Mashimo C, Yamanaka T. Complete genome sequence of *Prevotella intermedia* strain 17-2. Genome Announc. 3, e00951-15. 2015. 査読有. DOI: 10.1128/genomeA.00951-15.

(5) Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Mashimo C. Complete genome sequence of *Rothia mucilaginosa* strain NUM-Rm6536, isolated from a human oral cavity. Genome Announc. 3, e01122-15. 2015. 査読有. DOI: 10.1128/genomeA.01122-15.

(6) Mashimo C, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Nambu T. Variations of nitrate-reducing activity in oral *Rothia mucilaginosa*. J Oral Tissue Engin. 13, 18-26. 2015. 査読有. DOI: org/10.11223/jarde.13.18.

[学会発表](計19件)

(1) 栗田 麻祐子, 岡田 正弘, 南部 隆之, 松本 尚之. ステンレス基板上に形成した TiO₂ コーティング層の改良ゾルゲル法による結晶制御. 第75回日本矯正歯科学会学術大会. 2016年11月9日. アスティとくしま(徳島県・徳島市).

(2) Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Atomi H, Takeyasu K, Higashibata H, Wang PL. The roles of TrmBL2 protein on chromosome architecture and protection in *Thermococcus kodakarensis*.

11th International Congress on Extremophiles. 2016年9月14日. Kyoto, Japan.

(3) 山中 武志, 南部 隆之, 円山 由郷, 王 宝禮, 真下 千穂, 山根 一芳. *Prevotella intermedia* strain 17 と 17-2 間でのゲノム比較によるバイオフィルム関連遺伝子の検討. 第 58 歯科基礎医学会学術大会. 2016年8月25日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市).

(4) Mugita N, Nambu T, Takahashi K, Morioka Y, Mashimo C, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Wang PL, Komasa Y. Detachment of oral biofilm by cysteine proteases. Biofilms 7. 2016年6月26日. Porto, Portugal.

(5) Nambu T, Morioka Y, Mugita N, Mashimo C, Yamane K, Maruyama H, Yamanaka T, Takahashi K, Komasa Y, Wang PL. Sporocidal activity of pure performic acid synthesized the DBD plasma. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016年3月24日. 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市).

(6) Mashimo C, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Wang PL, Nambu T. Variations of nitrate-reducing activity in oral *Rothia* spp. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016年3月23日. 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市).

(7) Mugita N, Nambu T, Takahashi K, Wang PL, Komasa Y. The effect of plant cysteine proteases, papain and actinidin, on oral biofilm removal. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016年3月23日. 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市).

(8) 栗田 麻祐子, 岡田 正弘, 南部 隆之, 松本 尚之. 高い抗菌性の発現を目指したゾルゲルコーティング法の改良. 第 74 回日本矯正歯科学会大会. 2015年11月18日. 福岡国際会議場・マリンメッセ (福岡県・福岡市).

(9) 真下 千穂, 南部 隆之. 口腔 *Rothia* 属細菌における硝酸還元活性の株間差異についての検討. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015年9月12日. 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).

(10) 南部 隆之, 真下 千穂. 形質転換可能な *Rothia* 属菌株の分離とゲノム解読. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015年9月12日. 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).

(11) Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Yamane

K, Yamanaka T, Takeyasu K, Yan J. The role of histone and TrmB-like 2 (TrmBL2) in chromosome organization of *Thermococcus kodakarensis*. Gordon Research Conference. Archaea; Ecology, Metabolism and Molecular Biology. 2015年7月26日. Newry, MA, USA.

(12) 栗田 麻祐子, 岡田 正弘, 南部 隆之, 松本 尚之. 高い抗菌性の発現を目指したゾルゲルコーティング法の改良. 第 57 回近畿東海矯正歯科学会学術大会. 2015年6月7日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市).

(13) 栗田 麻祐子, 岡田 正弘, 南部 隆之, 松本 尚之. 改良ゾル-ゲル法により結晶相を制御した光触媒性矯正歯科用ブラケットの開発. 第 73 回日本矯正歯科学会大会. 2014年10月20日. 幕張メッセ (千葉県・千葉市).

(14) 南部 隆之. *Rothia mucilaginosa* の 2 面性. 第 56 回歯科基礎医学会. 2014年9月27日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市).

(15) 真下 千穂, 南部 隆之, 円山 由郷, 山根 一芳, 山中 武志, 福島 久典. 口腔 *Actinomyces* 属および口腔 *Rothia* 属細菌用遺伝子改変システムの開発. 第 56 回歯科基礎医学会. 2014年9月27日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市).

(16) Yamanaka T, Yamane K, Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Obata N, Leung K-P, Fukushima H. Effect of macrolides on *Prevotella intermedia* biofilm on titanium implants. IADR/PER Congress 2014. 2014年9月12日. Dubrovnik, Croatia.

(17) Maruyama H, Takeyasu K, Atomi H, Nambu T, Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H, Kent NA. The role of Histone and TrmB-like proteins in chromosome organization of *Thermococcus kodakarensis*. 10th International Congress on Extremophiles. 2014年9月10日. Saint Petersburg, Russia.

(18) Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Development of genetic engineering systems in *Actinomyces* spp. FEBS EMBO Paris 2014. 2014年8月30日. Paris, France.

(19) 栗田 麻祐子, 岡田 正弘, 南部 隆之, 松本 尚之. 改良ゾル-ゲル法により結晶相を制御した酸化チタンコーティングの開発. 第 8 回ナノ・バイオメディカル学会. 2014年5月2日. ホテルグランピア和歌山 (和歌山県・和歌山市).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

南部 隆之 (NAMBU Takayuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80367903