

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07068

研究課題名(和文)古細菌(アーキア)を標的とした口腔内微生物の検出・同定と口腔内の健康との関連調査

研究課題名(英文) Detection and identification of Archaea in dental plaque, and investigation of the association between oral health and Archaea

研究代表者

松見 理恵(Matsumi, Rie)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90397597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、歯周病患者から採取した口腔内の縁下プラーク由来のDNAから次世代シーケンサーを用いてアーキアが存在が確認できた。さらに、これまでに報告のあったMethanobrevibacter属のみならず、他のアーキアグループの存在も明らかとなり、口腔内においても多様なアーキア叢が構築されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study confirmed that DNA obtained from subgingival plaque in patients with periodontitis contained archaeal genomes. Archaeal groups such as Crenarchaeota and DPANN were included in addition to the genus Methanobrevibacter, which was previously reported. The results suggest that a diverse Archaeome may be formed in the oral cavity.

研究分野：微生物学

キーワード：アーキア 古細菌 口腔 歯周病 縁下プラーク

1. 研究開始当初の背景

口腔内には様々な微生物がフローラを構成して存在し、これらが種々の口腔関連疾患を引き起こすことが知られている。過去には、う蝕や歯周疾患の発症に関連する特定の細菌種が同定され、これらを原因菌としたう蝕や歯周疾患の発症メカニズムの解明が試みられてきた。しかし、最近では口腔内の常在細菌叢バランスが、口腔疾患を有するヒトと口腔疾患を持たない健康なヒトでは異なり、多種多様な細菌叢がネットワークを構築し口腔状態を変化させている可能性が示唆され始めている。すなわち、健康な口腔の維持のため、常在細菌叢のバランス改善がますます重要と考えられるようになってきている。このことから、今後の歯科予防医学分野において、口腔微生物の全体像の把握を正確に行うことは必要不可欠な要素である。

原核生物は大きく細菌とアーキア(古細菌)の2ドメインに大別されるが、口腔内ではこれまで細菌に焦点が当てられてきた。しかし、ヒト口腔内においても歯周病患者からアーキアが検出された報告があり、アーキアが細菌と協働して口腔環境を制御して、口腔の健康に関与している可能性が示唆される。

また近年、従来極限環境にのみ生息すると考えられてきたアーキアは、検出方法などの改良により様々な生態系に普遍的に生息していることが次々と明らかにされており、細菌とともに物質循環を介して生態系の維持に重要な役割を担っていることが分かってきた。このような事実を踏まえると、これまでほとんど検出されなかった口腔内においても、アーキアに標的を絞った検出方法を応用することで、アーキアが普遍的に検出される可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、口腔内のアーキアを標的とした検出方法を確立し、アーキアと細菌の相互作用及びアーキアと口腔内の健康との関連性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 微生物群集DNA

本研究で用いた微生物群集DNAサンプルは、九州大学大学院歯学研究院口腔予防医学分野において以前に細菌叢解析研究に用いられたものである(文献1、2)。被験者(35-76歳、平均57.6歳)は歯科医院に訪れた歯周病患者21名で、治療開始時に歯科医師が各被験者の口腔診査および口腔内各部位(唾液、舌苔、縁下プラーク)の検体採取を行った。また、歯科治療終了後(20-30ヶ月、平均26ヶ月)についても同様に口腔診査および口腔内各部位の検体採取を行った。採取された各検体はビーズを用いた加温破碎法にて菌体を破壊し、フェノールおよびフェノール/クロロ

ホルム処理後、エタノール沈殿を行うことによって微生物群集DNAを得た。

(2) PCR法によるアーキアの検出

アーキア検出の検出用PCRプライマーとして、(i)アーキア16S rRNAの共通配列(A109F 5'-TCCAGGCCCTACGGG-3'およびA934R 5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3')、(ii)ヒト口腔内や腸内において存在が報告されているアーキアの一つであるメタン菌のマーカ遺伝子methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*)の配列(LuR 5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3'及びLuF5'-GGTGGTGTMGGATTCACARTAYGCWACAGC-3')を用いた。微生物群集DNAを鋳型として、PCRを行いアガロースゲル電気泳動にてDNA断片の増幅を確認した。増幅が確認された場合は、そのDNA断片についてDye terminator法を用いて塩基配列を決定した。

(3) 次世代シーケンサーによるアーキアおよび細菌の微生物叢の解析

アーキアおよび細菌の16S rRNA 遺伝子のV3-V4領域の共通プライマー(Pro341F: 5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3', Pro805R: 5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3')にシーケンスアダプター配列およびサンプル識別用のタグ配列を付加)を用いて微生物群集DNAを鋳型として網羅的に増幅した。DNA増幅断片を精製後、各サンプルを等濃度ずつ混合し、これを鋳型としてIon PGM Hi-Q View OT2 Kit-400 (Thermo Fisher Scientific)を用いてエマルジョンPCRを行ない、シーケンステンプレートを得た。Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて次世代シーケンサー Ion PGM (Thermo Fisher Scientific)により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は解析言語Rを用いてクオリティチェックを行い、リードを選別した。タグ配列の情報によって全リードを各検体に割り振り、RDP (Ribosomal Database Project) データベースを利用して各配列が由来する微生物種を推定し、カウントした。

なお本研究は、九州大学医系地区臨床研究倫理審査委員会において実施許可を受け(許可番号19B-3)、被験者から研究参加に対する同意を得たのちに実施した。

4. 研究成果

(1) PCR法による口腔内アーキアの検出

アーキア特異的な16S rRNAの共通配列プライマーA109F、A934Rを用いて、治療開始時の縁下プラーク由来の微生物群集DNAについてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動にて検出を行なったところ、すべてのサンプルについて予想されるサイズでのDNA断片が得られた。この増幅断片がアーキアか否か

を確認するために、これらの DNA 断片についてサブクローニングを行い、各サンプルにつき 10 クローンを Dye terminator 法により塩基配列を決定した。その結果、多くが細菌由来の配列であることが判明した。PCR 条件などをさらに最適化していくことによりアーキアのみを検出できる可能性はあるが、今回のサンプルのように様々な種類の微生物群を含む場合、アーキアの 16S rRNA に特異的なプライマーセットであっても、細菌由来の 16S rRNA を増幅してしまう可能性が示された。

次に、アーキアの一種であるメタン菌のマーカー遺伝子 (*mcrA*) のプライマー (LuF, LuR) を用いて、同様に治療開始時の縁下プラーク由来の微生物群集 DNA について PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動にて検出を行った。その結果、21 被験者中 5 サンプルについて DNA 断片の増幅が確認された。これらの DNA 断片の塩基配列を決定したところ、口腔内に存在が確認されているメタン菌の一種である *Methanobrevibacter oralis* の *mcrA* 遺伝子配列であった。本プライマーセットは特異的に *mcrA* 遺伝子を増幅できることを確認した。しかし、一方でメタン菌のみに特化したプライマーセットであるため、他のアーキアの検出を考えた場合には使用が困難である。

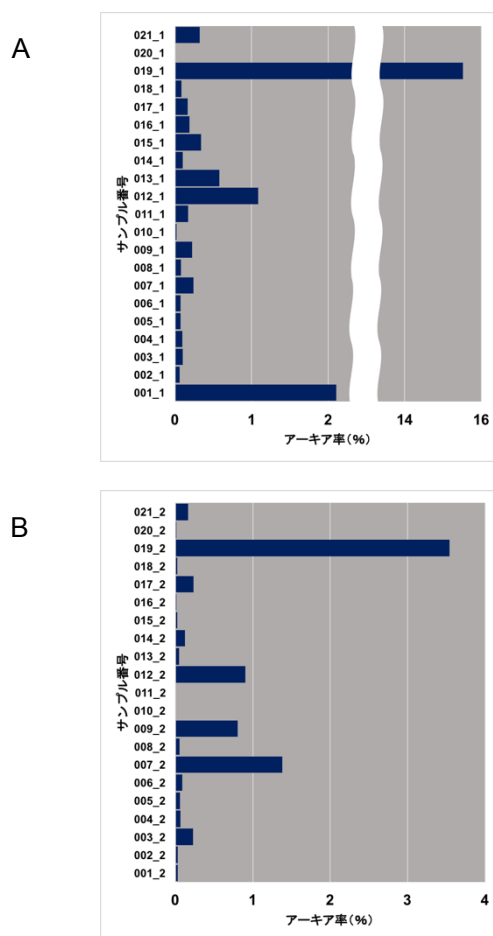
(2) 次世代シーケンサーによる微生物叢の解析

本研究で用いた微生物群集 DNA は、これまでに当研究室において次世代シーケンサーを用いた細菌叢の網羅的な解析が行われている (文献 1、2)。しかしながら、これまで本サンプル中からアーキアは検出されていない。アーキアあるいはメタン菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法による検討の結果、本サンプル中にもアーキアの存在が確認できたため、さらに詳細な検討をすることとし、次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行った。以前に実施した 16S rRNA の V1-V2 領域のプライマーでは、アーキアが検出できなかったことから、本研究ではアーキアおよび細菌に共通な 16S rRNA の V3-V4 領域のプライマーを用いた。その結果、歯周病患者の治療開始時に採取された縁下プラーク由来 DNA において、アーキアの存在が確認された。各サンプルで得られた全塩基配列に対するアーキアの割合は 0.1-15% (平均 1%) であった (図 1 A)。また、これまでに口腔内に存在するアーキアとして報告例のある *Methanobrevibacter* 属に加え、さらに *Methanobrevibacter* 以外の *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* および DPANN (*Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanohaloarchaeota*, *Nanoarchaeota*) 群など幅広いアーキアグループが検出された (図 2 A)。しかしながら、今回の被験者 21 名においては、歯周状態の指標である歯周ポケットの深さやプロービング時の出血の有無と縁下プラーク由来 DNA 中の

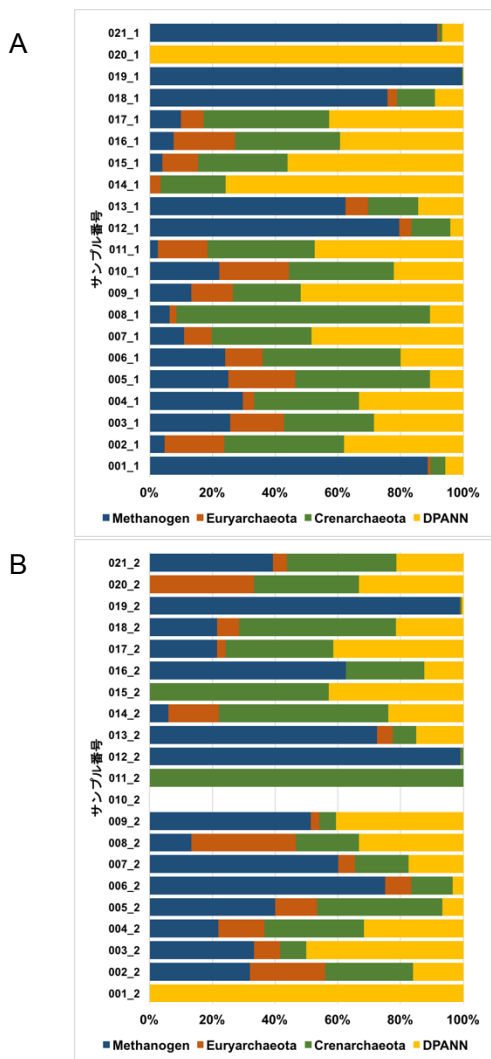
アーキアの割合には特に相関は認められなかった。今後、被験者数を増やすなどさらなる検討が必要である。また、20-30 ヶ月間 (平均 26 ヶ月) の歯周病治療を終えて採取された縁下プラーク由来 DNA についても同様にアーキア・細菌叢解析を行い、全塩基配列に対するアーキアの割合を求めた結果、0-3.54% (平均 0.37%) となった (図 1 B)。アーキアの構成比率に関しては、治療開始前と終了後の各被験者の比率には違いが認められるものもあった (図 2 A, B) が、全被験者の平均ではほとんど変化がないことが分かった (図 3)。さらに、口腔内でも縁下プラークとは異なる細菌叢構成が認められる唾液、舌苔についても治療開始前と終了後のサンプルの解析を行ったが、アーキアはほとんど検出されなかった。本研究により、*Methanobrevibacter* 属のみならず他のアーキアについても、口腔内の縁下プラークに特異的に存在していることが示唆された。

(文献 1) Yamanaka W, Yamashita Y. et al. PLoS One. 2012;7(8)

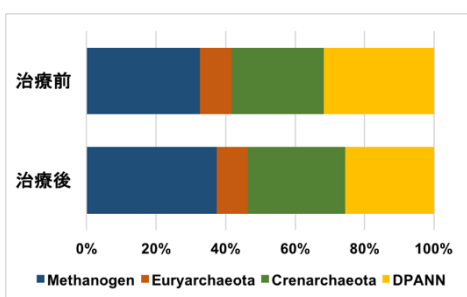
(文献 2) Kageyama S, Yamashita Y. et al. PLoS One. 2017;12(4)



(図 1) 治療開始時(A)及び終了後(B)の縁下プラーク由来 DNA 中のアーキアの割合



(図2) 治療開始時(A)及び終了後(B)の縁下プラーク由来 DNA 中のアーキアの構成比率



(図3) 治療開始時及び終了後の縁下プラーク由来 DNA 中の全被験者平均のアーキア構成比率

本研究により、次世代シーケンサーを用いて縁下プラーク由来の DNA からアーキアが存在が確認できた。さらに、過去に報告のあった *Methanobrevibacter* 属のみならず、他のアーキアグループの存在も示され、口腔内においても多様なアーキア叢が構築されている可能性が示唆された。

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 1 件)

Gehring AM, Astling DP, Matsumi R, Burkhart BW, Kelman Z, Reeve JN, Jones KL, Santangelo TJ. Genome Replication in *Thermococcus kodakarensis* Independent of Cdc6 and an Origin of Replication. *Front Microbiol.* 2017 Oct 27;8:2084. doi: 10.3389/fmicb.2017.02084. eCollection 2017 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松見 理恵 (MATSUMI, Rie)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：90397597

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()