

令和 2 年 5 月 21 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：16K11469

研究課題名(和文) 口腔内硝酸還元活性に個人差をもたらす菌叢の解明

研究課題名(英文) Analysis of oral microbiota that causes individual differences in 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) 3,500,000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。我々は、口腔の硝酸還元活性を支える細菌叢の解明を目指し解析を行った。硝酸塩溶液を用いたin vivo解析では、口腔内硝酸還元活性に明確な「個人差」が存在すること、全ゲノム解析では、硝酸代謝経路を明らかにした。また、細菌叢を培養することで、硝酸還元により生じたNOにより口腔細菌叢が大きく変動する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、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。現在、解析中であるが、主要な硝酸還元菌が特定できれば、今後の研究によりそれらを増やす(あるいは減らさない)戦略がとれるようになるばかりでなく、血圧調節、脳や心血管疾患、II型糖尿病、齲蝕、歯周病などとの関係を探るモデル系を構築することが可能となるはずである。

研究成果の概要(英文)：Nitrate-reducing bacteria that reduce nitrate contained in saliva and produce nitrite and nitric oxide are resident in the human oral cavity. We conducted an analysis aiming at elucidation of the microbiota supporting the nitrate-reducing activity in the oral cavity. In vivo analysis using nitrate solution revealed a clear individual difference in oral nitrate-reducing activity, and whole-genome analysis revealed nitrate metabolism pathway. In addition, it was shown that by culturing the oral microbiota, NO produced by nitrate reduction could significantly change the oral microbiota.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：マイクロバイオーーム 硝酸還元菌 16S rRNA遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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 ( $\text{NO}_3$ ) とその還元物である亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2$ ) 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。硝酸イオンは主に緑色葉野菜の摂取により得ており、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、未還元の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。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 (図 1)。

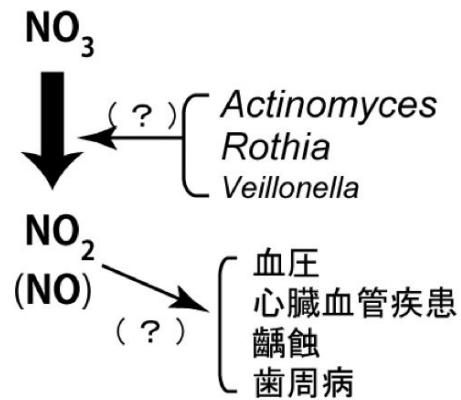


図 1 硝酸還元と疾患との関係

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齲蝕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齲蝕病原菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* など) を高効率で殺菌することを示している。

### 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。次世代シーケンシング技術の確立や新たな選択培地の開発により個人間の口腔菌叢を比較的容易に解析できるようになったことから、本研究では口腔内硝酸還元活性の「個人差」に着目し、被験者毎の活性と口腔菌叢を横断的かつ経時的に解析することで、口腔の硝酸還元活性を支える菌叢の解明を目指した。

具体的には、(1)異なる口腔内硝酸還元活性をもつ被験者を選定し、その細菌叢を解析する。(2)口腔内硝酸還元活性を経時的に追跡調査する。(3)次世代シーケンサーによる菌叢解析で、硝酸還元菌の比率と口腔内活性との相関を探る。(4)硝酸還元により生じた NO による口腔菌叢の変化を確認する。これら(1)～(4)の結果を統合し、口腔内硝酸還元活性の「個人差」を生み出す原因を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔サンプルの採取

口腔サンプル(唾液、歯間プラーク、舌苔)は、24歳から52歳までの30人の健康なボランティアから滅菌ボトル、デンタルフロス、滅菌綿棒を使用して採取した。各被験者のプラークは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いてピペティングすることによりフロス等から取り除き、滅菌プラスチックチューブに移した。サンプルはすぐに氷上に置き、嫌気性チャンパー内でピペティングによりホモジナイズした。培養実験は、歯垢の採取後1時間以内に行った。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:111011)。

#### (2) 硝酸還元菌の全ゲノム配列決定

硝酸還元菌の培養液からの細菌ゲノム DNA 調製は Nucleo spin tissue kit (Macherey-Nagel) を用いて行った。20 kb SMRT bell ライブラリーを準備し、PacBio P6-C4 ケミストリーを使用した単一分子リアルタイム (SMRT) セルで PacBio RS II システム (Pacific Biosciences) を使用してゲノムのシーケンスを行った。SMRT 分析ソフトウェアの階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 アセンブリを行い、コンティグを生成した。また、アノテーションには RAST を使用した。

#### (3) NO ドナーによる処理と口腔細菌叢培養

口腔サンプルを NO ドナーであるニトロプルシドナトリウム (SNP) 溶液と最終濃度 0~100 mM となるよう混合し、嫌気性条件下 37 °C で 1 時間インキュベートした。遠心後のペレットを元の口腔細菌叢の状態を維持したまま培養できる改変 SHI 培地に懸濁し、嫌気性条件下で振とうしながら 37 °C で 20 時間培養した。

#### (4) 口腔サンプルの次世代シーケンシング解析

口腔細菌叢は、16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の次世代シーケンシングによって評価した。QIAamp UCP Pathogen Mini Kit と Pathogen Lysis Tube S (Qiagen) を使用して、酵素的、化学的、機械的溶解により DNA を凍結細菌ペレットから抽出した。イルミナが提供する 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) とら

イブラリー構築を行った。各サンプルを等モル量でプールした後、イルミナ MiSeq プラットフォーム（イルミナ）で 2x250 bp ペアエンドシーケンスを行った。シーケンスは、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を行い、多次元距離行列の可視化は、ノンメトリック多次元スケールリング (NMDS) によって実行した。また、PERMANOVA 検定により統計的有意を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 個人間の硝酸還元活性の違いの確認

被検者に 100 mM 硝酸塩溶液（食品添加物グレード）を 1 分間保持してもらい、吐出後の唾液中の NOx 濃度を NOx メーター（ENO-30）で測定した（図 2）。NO<sub>2</sub> と NO<sub>3</sub> の変動比率をもとに、高い硝酸還元能を示すサンプルの抽出を行った。このサンプルの細菌叢の特徴について、現在解析を進めているところであり、まとも次第、学会発表と論文発表を行う予定である。

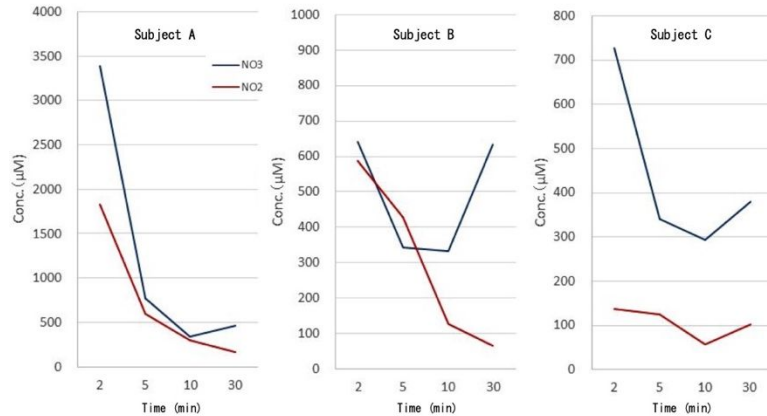


図 2 硝酸還元能の個人差（一部）

##### (2) 硝酸還元活性をもつ細菌株の同定とゲノム決定

高い硝酸還元能をもつことを確認した *Rothia aeria* と *Actinomyces naeslundii* の全ゲノムを決定し、論文発表を行うとともにゲノムデータを DDBJ に登録した。加えて、硝酸還元に関連した代謝パスウェイを明らかにした（図 3）。これにより、順方向の硝酸還元、亜硝酸還元の経路だけでなく、逆方向の酸化反応系やアンモニア合成系の存在が明らかとなった。加えて、発生した NO などのラジカルを除去する系の存在も確認した。現在、これらの遺伝子の変異株を作成中であり、欠失株による表現型の確認を計画している。

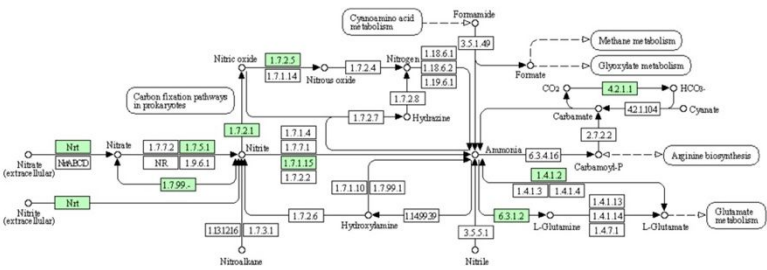


図 3 *Rothia aeria* における窒素代謝マップ

##### (3) 硝酸還元で生じる NO による口腔細菌叢変化

口腔の硝酸還元や免疫細胞の応答により生じた NO により、口腔細菌叢がどのように変化するかを *in vitro* 口腔細菌叢培養システムを用いて解析した。10 名の被験者から採取した歯間プラークを NO ドナーであるニトロプルシドナトリウム (SNP) に曝露し、改変 SHI 培地にて培養した。サンプルの 16S rRNA 遺伝子をシーケンスすることにより、添加した SNP 濃度に応じて歯垢コミュニティにおける多様性の減少と多様性の濃度依存的な変化が示された（図 4）。また、曝露にตอบสนองして有意に変化した 8 菌種 (OTU) を特定した（図 5）。この中で、NO ドナーの *Fusobacterium nucleatum* 細胞への曝露は、細菌叢分析の結果と矛盾せず生存率の低下を示した。一方、SNP への曝露により *Campylobacter concisus* 細胞の NO 耐性に加えてテトラゾリウ

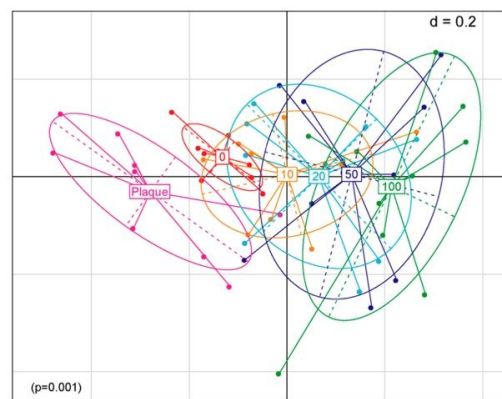


図 4 NO による口腔細菌叢の変化

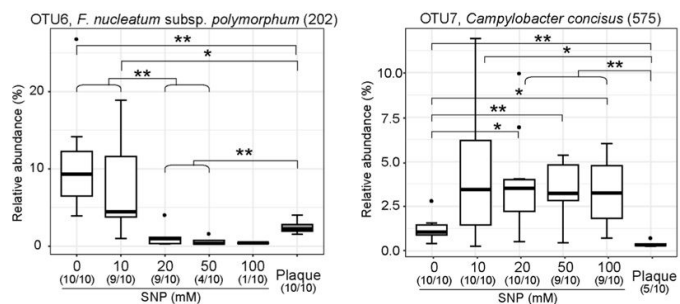


図 5 NO によって有意に変動する細菌種

ム塩還元活性の増加が確認された。この結果は、口腔プラークの細菌叢が NO への曝露に伴って代謝レベルでも存在比でも変化することを示している。故に生体においても、硝酸塩が細菌叢の構成に影響を与えるだけでなく、生じた NO によっても細菌叢が大きく変化する可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

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 Enomoto A, Nambu T, Kashiwagi K, Okinaga T, Baba S	4. 巻 54
2. 論文標題 Impact of short-term saliva storage at room temperature on the microbial composition	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Enomoto A, Nambu T, Mashimo C, Taniguchi M, Nakatani K, Komuro A, Nakajima Y, Honda M, Ito Y, Hara T, Kusano K, Yamada Y, Botticellie 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 Mugita Naho, Nambu Takayuki, Takahashi Kazuya, Wang Pao-Li, Komasa Yutaka	4. 巻 82
2. 論文標題 Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2017.04.035	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 Hiroki Morioka, Takayuki Nambu, Kazuya Takahashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Bactericidal effect of performic acid on salivary bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 11-15
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 Tsuzukibashi Osamu, Uchibori Satoshi, Kobayashi Taira, Umezawa Koji, Mashimo Chiho, Nambu Takayuki, Saito Masanori, Hashizume-Takizawa Tomomi, Ochiai Tomoko	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 ~ 26
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 T Kobayashi, S Uchibori, O Tsuzukibashi, C Uezato, H Goto, C Mashimo, T Nambu, K Umezawa, M Ohta	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 2378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.16966/2378-7090.249">http://dx.doi.org/10.16966/2378-7090.249</a>	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 Chiho Mashimo, Kazuyoshi Yamane, Takeshi Yamanaka, Hugo Maruyama, Pao-Li Wang, Satoshi Komasa, Joji Okazaki, Takayuki Nambu	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 Takayuki Nambu, Osamu Tsuzukibashi, Satoshi Uchibori, Kazuyoshi Yamane, Takeshi Yamanaka, Hugo Maruyama, Pao-Li Wang, Naho Mugita, Hiroki Morioka, Kazuya Takahashi, Yutaka Komasa, Chiho Mashimo	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 南部隆之
2. 発表標題 口腔細菌パターンを“健康型”へと変える試み
3. 学会等名 日本歯科保存学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王丹, 南部隆之, 吉川一志, 沖永敏則, 山本一世
2. 発表標題 紫色LED照射とin vitro培養による歯間プラークの菌叢変動
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2019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 日本細菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南部隆之, 真下千穂, 円山由郷, 吉川一志, 山本一世, 沖永敏則
2. 発表標題 紫色LED 照射によるプラーク菌叢の変動
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Okinaga T
2. 発表標題 Identification of nitric oxide-sensitive oral bacteria by culturing plaque-derived microbiota
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

〔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	真下 千穂  (Mashimo Chiho)  (80368159)	大阪歯科大学・歯学部・講師    (34408)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	王 宝禮  (Wang Pao-Li)  (20213613)	大阪歯科大学・歯学部・教授     (34408)	