

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05793

研究課題名(和文) 口腔の健康維持に寄与する主要口腔細菌群の遺伝子操作系の開発と遺伝子機能の解明

研究課題名(英文) Development of genetic manipulation systems and elucidation of gene functions of bacteria that contribute to oral health

研究代表者

松見 理恵 (MATSUMI, Rie)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90397597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「口腔健康細菌群」の遺伝子機能解明に必要な遺伝子操作系の構築に超好熱性アーキアのトキシン-アンチトキシン(TA)システムの利用を考え、本システムの基本的な毒性を評価した。超好熱性アーキア由来のTAシステムについてトキシン遺伝子を大腸菌内で発現誘導させることにより、トキシンの毒性の有無を評価した。その結果、トキシンの多くが大腸菌に対し強い毒性を示した。またオペロンを構成しているアンチトキシンのほとんどがこれらトキシンの毒性を中和した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、超好熱性アーキアのTAシステムが中温性の細菌である大腸菌において機能していることを証明した。今後、本TAシステムを用いて口腔内の健康維持に重要と考えられている細菌群(口腔健康細菌群)の遺伝子操作系の構築し、遺伝子機能を解明することにより口腔予防システムの確立につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：To construct a genetic manipulation system for elucidating the gene functions of "bacteria group for oral health", the toxin-antitoxin (TA) systems from a hyperthermophilic archaea was evaluated. The toxin toxicity was examined by inducing expression of the toxin genes in *E. coli*. Many of them were highly toxic to *E. coli*, but most of the antitoxin neutralized the toxicity of the toxins.

研究分野：微生物学

キーワード：口腔細菌 遺伝子操作系 超好熱菌 アーキア トキシン-アンチトキシンシステム

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の平均寿命が年々延び、また高齢者の増加が顕著である近年、健康で長寿を迎えるために栄養を摂取する最初の消化器系である口腔内の健康を保つことは重要な課題である。口腔内には様々な細菌が存在し、これらの中に口腔関連疾患を引き起こす細菌が知られている。これまでにう蝕や歯周疾患発症に関連する種々の細菌が同定され、発症機構が解明されてきた。一方、最近では口腔内において多種多様な細菌叢がネットワークを構築して口腔状態を変化させており、常在細菌叢バランスが「口腔疾患を有する人」と「歯周組織が健康な人」では異なることが示唆されている。また、疫学調査において口腔疾患と全身疾患が相互に関連するという結果も認知され始めている。超高齢化を迎えた我が国にとって、口腔疾患に対し効率的な予防システムを確立することは健康維持に有効な手段であり、健康な口腔内に高い割合で存在する細菌群「健康細菌群」が、どのような機構で口腔内の健康維持に寄与しているのかを解明することは、将来の口腔予防の鍵になると考えられる。これまで口腔関連疾患の原因細菌に関する研究が精力的に行われてきた反面、健康な口腔内の細菌に関する研究は初期段階にある。この課題を進めるには、検証手段の構築を含めた「健康細菌群」の機能解明が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究は、「口腔健康細菌群」の機能を明らかにするための検証手段である遺伝学的解析手法を構築し、どの遺伝子がどのようなメカニズムで口腔の健康維持に寄与するのかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

いくつかの口腔病原性細菌において抗生物質耐性遺伝子をマーカーとした相同組換えによる遺伝子操作系が確立されており、これらは健康細菌群にも応用可能であると考えられる。しかし、本遺伝子操作系の場合、菌種ごと抗生物質ごとにマーカー遺伝子を選定する必要があり、さらに複数の遺伝子の破壊を行う場合、抗生物質耐性マーカー数に限界がある。そこで、マーカー遺伝子の1つにトキシン-アンチトキシン(TA)システムを利用した **single cross-over recombination** による「健康細菌群」の遺伝子操作手法の構築を検討することとした。TAシステムとは、ほとんどの原核生物が保有し、その数や種類は菌種により異なる **mobile genetic elements** の1つである。DNA上に近接してコードされるトキシンおよびアンチトキシンから構成され、ストレス条件下などで働き、その細胞自身の増殖を抑制するなど、細胞の生体防御システムの1つと考えられている(図1)。

今回、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (Tko)由来の Type II TA システムの利用を試みることにした。本菌は、Type II TA システムの数が多く、49種類存在すると推定されており、また重複遺伝子は存在せず、大きく5つの family を有する。

### (1) Tko 由来トキシンの *Escherichia coli* に対する毒性の評価

Tko ゲノム上に存在する49種類の Type II TA システムについて、トキシン遺伝子を *E. coli* 用の発現ベクターに1種類ずつクローニングした。得られたプラスミドのDNA配列を解析し、目的の配列であることを確認後、タンパク質発現用 *E. coli* に形質転換した。形質転換体をLB液体培地にて対数増殖初期まで培養した後、培養液を段階希釈し、LB寒天培地上にスポットした。Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 添加によりタンパク質発現誘導し、生育を観察すること

によりトキシンの毒性を評価した (図 2)。

#### (2) Tko 由来アンチトキシンのトキシンに対する中和作用の評価

トキシンとオペロンを構成するアンチトキシンを共に *E. coli* 用の発現ベクターにクローニングし、プラスミドをタンパク質発現用 *E. coli* に形質転換した。方法 (1) と同様に、形質転換体を液体培養後、培養液を寒天培地上にスポットし、IPTG 誘導により生育を観察した。

#### (3) HEPN トキシンの重要なアミノ酸残基の同定

近年新規に報告された HEPN (Higher Eukaryote and Prokaryotes Nucleotide-binding domain)-MNT(minimal nucleotidyltransferases) ペアの TA システムは、超好熱性菌を中心に分布している。Tko ゲノム上にも HEPN-MNT が 8 組存在し、その中で HEPN トキシンの 5 つが実際に *E. coli* の生育を阻害した (表 1)。これら HEPN トキシンについて活性に重要なアミノ酸残基を調べた。候補となるアミノ酸残基を部位特異的変異導入によりアラニン残基に置換した後、方法 (1) と同様に、生育を観察することにより毒性の変化を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 多くの Tko 由来トキシンは *E. coli* に対して毒性を示す

超好熱性アーキア由来タンパク質のトキシンが、*E. coli* に対して毒性を示すかを調べるために、*E. coli* 内に各トキシン遺伝子を挿入した発現ベクターを形質転換し、形質転換体の生育を評価した。その結果、49 種類中約 75% のトキシンが *E. coli* の生育を完全に阻害した (表 1、図 3)。

#### (2) Tko 由来アンチトキシンはトキシンの毒性を中和する

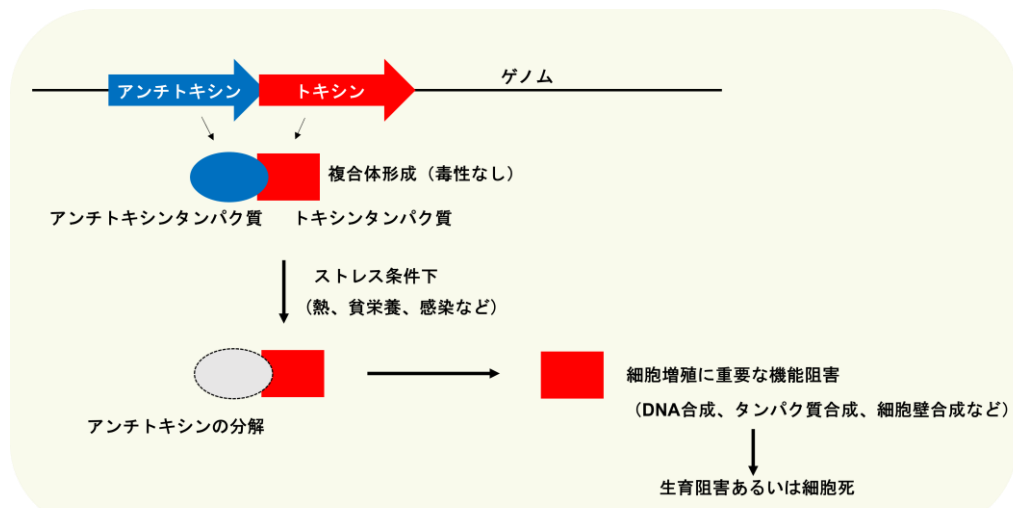
トキシン遺伝子とオペロンとして存在するアンチトキシンにより、トキシンの毒性が中和されるかをトキシンとアンチトキシンをオペロンとして挿入した発現ベクターを *E. coli* 内に形質転換し、形質転換体の生育を評価することにより確認した。毒性を示したトキシンの 90% 以上がアンチトキシンとの共発現により *E. coli* の生育が確認され、毒性を中和した (表 1)。これらより、超好熱菌由来タンパク質が中温性細菌においてもトキシン単独およびオペロンとして機能することが確認でき、中温性である口腔細菌への応用可能性が示唆された。

#### (3) HEPN トキシンの機能に重要なアミノ残基の同定

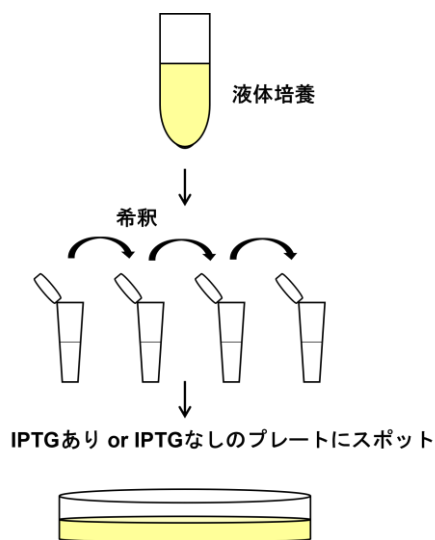
8 種の HEPN トキシンは COG (Clusters of Orthologous Groups) において 3 つに分類 (COG1895, COG2445, COG2250) される。それぞれ分類されたトキシンについてアミノ酸配列比較を行い (図 4)、保存されている残基の中でトキシンの毒性に寄与すると考えられるアミノ酸残基をアラニンに置換し、*E. coli* の生育の変化を調べた (表 2)。その結果、TK1475, TK1710 (COG2445) は HEPN の典型的な RN<sub>X</sub><sub>4</sub>HXY の活性モチーフを持ち、アルギニンあるいはヒスチジンのアラニン置換により、毒性が消失した。COG2250 に属する TK0963 は HEPN トキシンの典型的な活性モチーフは有さないものの、ヒスチジン、アルギニン、チロシン残基が活性に重要なことが分かった。COG1895 に属するトキシンにも典型的なモチーフは存在しないが、ヒスチジン、アルギニン、チロシン残基が保存されている。しかしながら、TK1072 は TK1127 とは異なり保存されているヒスチジン残基(H59)をアラニンに置換しても *E. coli* は生育せず、毒性が消失しなかった。代わりに 10 残基 C 末端側の保存性のないヒスチジンがトキシンの毒性に重要な残基であることが判明した。また、アルギニンのアラニン置換は TK1072, TK1127 とともに、*E. coli* の生育は完全

には復活せず、毒性が残存していた。COG1895 は他の HEPN トキシンと異なる活性機構を持つ可能性が考えられた。

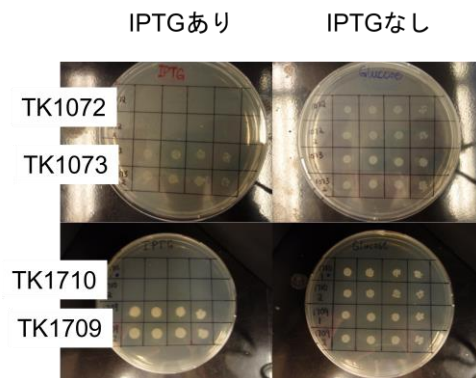
本研究により、超好熱性アーキア *T. kodakarensis* 由来 Type II TA システムの多くが実際に機能を有することを確認した。また、その機能は中温性細菌である *E. coli* においても有することが分り、今後「口腔健康細菌群」の遺伝子操作系のマーカー遺伝子として使用できる可能性を見出した。



(図1) TypeII トキシン-アンチトキシン(TA)システム



(図2) 毒性評価方法



(図3) 毒性評価結果の例

IPTG ありのプレート上の *E. coli* の生育を確認  
 毒性あり (*E. coli* 生育阻害)  
 毒性なし (*E. coli* 生育)

vapBC (AbrB-PIN)

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0017	TK0016	-	+
TK0192	TK0191	+	+
TK0335	TK0334	-	+
TK0457	TK0456	-	±
TK0733	TK0734	±	+
TK0888	TK0889	-	+
TK0909	TK0910	-	+
TK0997	TK0998	-	+
TK1013	TK1014	-	+
TK1028	TK1027	+	+
TK1076	TK1075	+	+
TK1291	TK1290	±	+
TK2229	TK2228	-	+
TK2261	TK2262	-	+

vapBC (COG2886-PIN)

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0213	TK0212	-	+
TK0917	TK0918	±	+
TK2154	TK2155	-	+
TK2305	TK2306	-	+

vapBC (RHH-PIN)

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0373	TK0374	±	±
TK0695	TK0696	-	+
TK0973	TK0972	-	+
TK1752	TK1751	-	+
TK1762	TK1763	+	+

vapBC (-)

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0065	TK0066	-	+
TK0127	TK0128	-	+
TK0138	TK0137	±	+
TK0177	TK0176	+	+
TK0344	TK0343	+	+
TK0543	TK0542	+	+
TK1184	TK1185	-	+
TK1255	TK1256	+	+
TK1645	TK1644	-	+
TK1996	TK1995	-	+
TK2006	TK2005	-	+
TK2068	TK2067	+	+

hicBA

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0372	TK0371	-	+
TK1510	TK1511	-	+

reIBE

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0792	TK0791	-	+
TK0966	TK0965	-	+

mazEF

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK1068	TK1069	-	+
TK1815	TK1816	+	±

HEPN-MNT

アンチトキシン	トキシン	トキシン	オペロン
TK0063	TK0064	+	+
TK0222	TK0221	+	+
TK0341	TK0340	±	+
TK0962	TK0963	-	+
TK1073	TK1072	-	+
TK1128	TK1127	-	+
TK1476	TK1475	-	+
TK1709	TK1710	-	+

(表1) Tko 由来 TA システムの毒性評価

IPTG ありのプレート上の *E. coli* の生育状況にて評価

-: 毒性あり (*E. coli* 生育阻害)

±: 若干毒性あり

+: 毒性なし (*E. coli* 生育)

(TKXXXX は遺伝子の Locus tag)

(↓図4) Tko 由来 HEPN の COG 分類とアミノ酸配列

のアライメント (\*は保存残基)

アラニン置換した残基を色 (表2 参照) で示す

COG1895

```
TK1072 --MISEEIEKHKIAEELSSAYLLLENGKLRDSDISRAYSMFHAAKALLLLKGINFRKHSGVIRMFGLHFDVSGFIERPYAKYLYTAFSLRSKADYDVVYEPTEHEAENVVETAERFLERIKSVLEEKNGQESPGP
TK1127 --MNADEIRALLRKAERLAASRELFERGHYFAISSAYVMFYCARALLLSKGIPTKSHAGVHAQLGKEFVKTGEMPARLYTGYFALNMRHTADYDFVYTERDAREVLRVAEFLAFKSYLKGNDAD-----
TK0064 MEPPQRELRALSIRKARSFLESSRNLEMGIYDAGALVMAYLAMFHAARALLFKDGRWREKSHACISAYLREFYVKGPLLDVQWVRYLDYVNRNRHQTQYDVGFSPDPEEITDILPKIEEFIVGVKLY-----
TK0340 -----MLSIKRAEWELEAKRNREPGSYRTSLMASYLAMFHAARAVLFRDGRWREKSHYCVARYLEEFYVKTGKLEGVVVELLDHRELREHEDQYDVSYTTFEDEVKDLKVAEFVIVKSLIGEQ-----
```

COG2250

```
TK0963 ---MSYKEWLKKAEDLILSRLSLSEGIYDYAFAHQQAERKALKAFVWSSKPIKKTWDIGELIILCSQIDG--EFMELFELDVLDTAYAVEARVPTLAEFD---REEAERAELEALIALSVKSKITSP-----
TK0221 MHYEEVEVILQRSDEYMLRADSADFDEEYDAIFLTFQAIQFYLKALIKYADVRLRTHSVRELLAALGKAEKAVDFIRSHRSLRELEDAVIGARYEPRRYREDAEIMEFVREVPDVEGLADEFERKSH
```

COG2445

```
TK1475 --MRVELIRSKIEEIELESKLVVEHLFEDFETPQSLSGLIKDGIIYKRVFAIQNVIDICAIINSDKLGIPKEEDVFEGVLRGGIISGGLAQKLRIMKGFRRVLRVIRYGRINDELAFEALREHLDIYEFETIEKFLBQQK-
TK1710 MEYDRDVRTVLMGKRNALFNHELAELDEEFLRNKHYSASKYNLVVAIEACIDIAVHLISKNLRKLPKSDAFKVLQENNVISNEIARRLILMARFRNLVHIIWIDIDRMIYRITENITDIEKFLSHIRKILGGDK
```

TK1072	TK1127	TK0340	TK0963	TK1475	TK1710
H59A -	H58A +	H52A +	H56A +	R99A +	R101A +
G61A -	G60A +	R81A +	G59A -	N100A -	N102A -
R64A -	H62A -	R84A +	R91A +	H104A +	H106A +
H69A +	K85A -	H85A ±	Y92A +	Y106A +	Y108A ±
R91A ±	R90A ±		H96A -	D111A -	D126A ±
D95A ±	D94A ±				
Y96A ±	Y95A +				

(表2)

Tko 由来 HEPN のアラニン変異  
体による毒性の変化  
赤色: 毒性が消失  
緑色: 毒性が減少  
青色: 毒性に影響なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ihara Yukari, Takeshita Toru, Kageyama Shinya, Matsumi Rie, Asakawa Mikari, Shibata Yukie, Sugiura Yuki, Ishikawa Kunio, Takahashi Ichiro, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification of Initial Colonizing Bacteria in Dental Plaques from Young Adults Using Full-Length 16S rRNA Gene Sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSystems	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） 10.1128/mSystems.00360-19	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 Kageyama Shinya, Takeshita Toru, Takeuchi Kenji, Asakawa Mikari, Matsumi Rie, Furuta Michiko, Shibata Yukie, Nagai Kiyoshi, Ikebe Masahiko, Morita Masaru, Masuda Muneyuki, Toh Yasushi, Kiyohara Yutaka, Ninomiya Toshiharu, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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） 10.3389/fmicb.2019.01780	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 Ogata Koji, Takeshita Toru, Shibata Yukie, Matsumi Rie, Kageyama Shinya, Asakawa Mikari, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 61
2. 論文標題 Effect of coffee on the compositional shift of oral indigenous microbiota cultured <i>in vitro</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 418 ~ 424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.18-0269	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原田明佳、永田麻梨子、沖啓輔、松見理恵、金井保、跡見晴幸、沼田倫征、石野園子、石野良純
2. 発表標題 超好熱性アーキアにおける損傷塩基修復経路に関する研究
3. 学会等名 極限環境生物学会第21回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮元梨紅、石野園子、松見理恵、山上健、沼田倫征、石野良純
2. 発表標題 超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> はoriC依存のDNA複製能を有するか？
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rie Matsumi, Yoshizumi Ishino, John N. Reeve
2. 発表標題 The 49 Type II Toxin-antitoxin Systems in <i>Thermococcus kodakarensis</i>
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Meika Harada, Mariko Nagata, Keisuke Oki, Rie Matsumi, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tomoyuki Numata, Miyako Shiraishi, Sonoko Ishino, Yoshizumi Ishino
2. 発表標題 Reconstitution of Endonuclease Q-mediated and Endonuclease V-mediated Repair Pathways for Deaminated Base Repair in the Hyperthermophilic Archaeon, <i>Thermococcus kodakarensis</i>
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 明佳, 永田 麻梨子, 沖 啓輔, 松見 理恵, 金井 保, 跡見 晴幸, 沼田 倫征, 石野 園子, 石野 良純
2. 発表標題 <i>Thermococcus kodakarensis</i> におけるEndoVおよびEndoQ依存的損傷塩基修復機構の再構成系構築と両酵素の遺伝子欠失株作製による細胞内機能解析
3. 学会等名 極限環境生物学会第20回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 直人, 沖 啓輔, 松見 理恵, 石野 園子, 沼田 倫征, 山上 健, 石野 良純
2. 発表標題 超好熱性アーキアMethanopyrus kandleri由来ファミリーD DNAポリメラーゼの生化学的解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石野 園子, 松見 理恵, John N. Reeve, 石野 良純
2. 発表標題 超好熱アーキアThermococcus kodakarensisのoriCおよびorc1/cdc6欠失変異体の単離とその性質
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 明佳, 永田 麻梨子, 沖 啓輔, 松見 理恵, 金井 保, 跡見 晴幸, 沼田 倫征, 石野 園子, 石野 良純
2. 発表標題 アーキアの損傷塩基修復経路の生化学的、遺伝学的研究
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山浦 昂大, 松見 理恵, John Reeve, 石野 良純
2. 発表標題 超好熱性アーキアThermococcus kodakarensisにおけるIA型DNAトポイソメラーゼ機能の遺伝学的解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------