

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18975

研究課題名(和文) 健口マイクロバイオームをモデル化する：オミックスと嫌気培養法による相乗解析

研究課題名(英文) Modeling of the healthy oral microbiome using the synergistic analysis by omics and anaerobic culture methods

研究代表者

眞島 いづみ (Mashima, Izumi)

奥羽大学・歯学部・講師

研究者番号：60770782

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)：本研究課題遂行の結果、以下の研究成果を得た。(1)健口(健康な口腔)マイクロバイオーム優勢菌群は、Veillonella(ベイオネラ)属細菌と判明した。(2)口腔Veillonellaの分布と出現頻度を、新菌種提唱も含め、菌種レベルで同定した。(3)口腔Veillonella全菌種のゲノム情報を解析し、遺伝学的全代謝経路を明らかにした。(4)これまでは、乳酸のみを栄養源とすると報告されていたVeillonella属細菌が、フルクトースも利用できることを初めて明らかにした。本研究の成果は、健口マイクロバイオームのモデルに、優勢菌としてのVeillonella属細菌の応用を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管マイクロバイオームのdysbiosis(失調・破綻)が大腸癌や肥満、2型糖尿病などの全身疾患を誘発することが報告されている。しかし、そのdysbiosisの原因である口腔マイクロバイオームのdysbiosisや、さらにその解明に不可欠な健口な口腔マイクロバイオームに関する研究は殆ど進んでいなかった。本研究はその健口マイクロバイオームの構成を明らかにし、さらにそのモデルとしてVeillonella属細菌が応用できることを示した。また、将来的な腸管マイクロバイオームdysbiosisの一次予防法確立にも繋がることから、学術的にも社会的にも意義深い研究成果となった。

研究成果の概要(英文)：This study has revealed the followings. (1) Veillonella species were identified as a majority of healthy human oral microbiome. (2) The distribution and frequency of oral Veillonella at species level was clarified including the establishment of novel species. (3) The genetical metabolic pathways in all oral Veillonella spp. were identified by the complete or draft genome analysis. (4) It was first report that oral Veillonella could utilize the fructose as one of energy sources besides the lactate. The results of this study showed that oral Veillonella species could be realized to apply as a majority for the model of the human healthy oral microbiome.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：健口 口腔マイクロバイオーム Veillonella属細菌 新菌種 ゲノム解析 新規エネルギー代謝経路
フルクトース代謝 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

腸管マイクロバイオームの dysbiosis (失調・破綻) は抗生物質の内服や、食事内容、ストレス等により引き起こされることが知られているが、「口腔マイクロバイオーム」は最も重要な要因として報告されている¹。すなわち、口腔マイクロバイオームの状態が、腸管マイクロバイオームの dysbiosis と強く関係していることから、腸管マイクロバイオームの dysbiosis を解明するには、口腔マイクロバイオームの正確な理解が不可欠である。

さらに近年、マイクロバイオームはその構成細菌によるメタボライト (代謝産物) の影響を強く受けることが報告されているが²、口腔マイクロバイオームと、そのメタボローム (全代謝産物) の関連を解析している研究は少ない。

また、口腔マイクロバイオームの dysbiosis が歯周病等の口腔感染症を誘発する³ことは報告されているが、健康な口腔 (以下健口) マイクロバイオームを解析した研究は非常に少なく、これを裏付けるメタデータ量が乏しいことも指摘されている。口腔マイクロバイオームの多様な dysbiosis を解明するためには、健口マイクロバイオームを正しく把握し、そのモデル化を図ることが急務の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、健口マイクロバイオームをライフステージごとにモデル化することである。そのために本研究では、口腔マイクロバイオームのデータが乏しい、日本人を含むアジア圏の被験者を対象として解析を進める。

また、健口マイクロバイオーム構成菌により産生されたメタボライト情報を融合し、「健口」なマイクロバイオームを統合的に評価する。

3. 研究の方法

(1) 健口マイクロバイオーム構成細菌の解析と同定

①被験者の選定と唾液サンプル採取

日本を含むアジア圏の国々において、「健口」な被検者候補の選定を行った。「健口」な被検者はユニバーサルな全身状態の健康基準をクリアし、かつ口腔診査の結果をもとに、ライフステージ (年齢層) ごとに選別を行った。各コホートの被検者から採取した刺激唾液サンプルは、解析まで -80°C で保存した。

②16S rRNA メタゲノム解析

唾液サンプルから全 DNA を抽出し、ライブラリー調整後、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子のメタゲノム解析を行い、健口マイクロバイオーム構成細菌の属 (genus) レベルの同定を行った。

また各被検者の口腔清掃状態を Simplified Oral Hygiene Index (OHI-S) で評価し、OHI-S の結果別にその構成細菌の解析を行った。

(2) 嫌気培養法による優勢細菌の菌種 (species) レベルの同定

16S rRNA 遺伝子では属レベルまでの細菌の同定は可能だが、その塩基配列の類似性から菌種レベルでの同定は困難であることが報告されている⁴。上記 (1) で明らかになった優勢細菌 *Veillonella* 属 (詳細は後述) の菌種を同定するために、同唾液サンプルを分散、希釈後、Rogosa 選択培地を用いて嫌気下、 37°C で培養を行った。得られたコロニーに対して、*rpoB* 遺伝子を用いた PCR (Polymerase Chain Reaction) により菌種の同定を行い、その分布と出現頻度の解析を行った^{5,6}。

また、上記過程で分離されたが、既報菌種に属さない *Veillonella* 属未同定株について、複数の Housekeeping 遺伝子を用いた塩基配列解析、全ゲノム解析及び表現型に関する各種試験を行い、新菌種として提唱、登録を行った⁷。

(3) 口腔 *Veillonella* 全菌種の比較 Pan-genome 解析

新菌種を含めた口腔 *Veillonella* 全菌種の全ゲノム⁸ もしくはドラフトゲノムを用いて、比較 Pan-genome 解析を BPGA pipeline⁹ を用いて行った。また、得られたデータを KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースと参照し、口腔 *Veillonella* に保存されている遺伝子を用いて、すべての代謝経路を同定した。

(4) 口腔 *Veillonella* の新規エネルギー代謝経路解析

①増殖曲線解析

これまで *Veillonella* 属細菌は乳酸のみをエネルギー源として生育することが報告されていたが、上記 (3) の結果より、フルクトース代謝経路も遺伝学的に保存していることが初めて明らかになった (詳細は後述)。そこで *Veillonella atypica* (以下

V. atypica) 標準株を用い、実際のフルクトース代謝能の評価を行った。TYH 液体培地をコントロールとし、それぞれ乳酸添加 (TYHL)、フルクトース添加 (TYHF)、乳酸とフルクトースを添加 (TYHFL) した培地を用い、嫌気下、37°C で増殖曲線を詳細に検討した。

②メタボローム解析

上記①において、それぞれ最も良好な発育を示した TYHL (1%)、TYHF (0.25%) の対数増殖期、TYHFL においては対数増殖期及び定常期の *V. atypica* の菌体細胞を収集し、徐タンパク後、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計) を用いてメタボローム解析を行い、フルクトース代謝経路における各中間代謝産物の同定と、その定量解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 健口な被検者からの唾液サンプリングは、タイ人児童、及び日本人児童より完了し、口腔マイクロバイオーム構成細菌の解析を行った。

その結果、口腔清掃状態が悪化するにつれて、*Veillonella* 属細菌が優勢細菌として増加することが明らかになり、その傾向はタイ人及び日本人児童の両者において共通して確認された。さらに本傾向は、タイ人児童において、その出身地方の食習慣や文化に依存しなかった (図 1)¹⁰。この結果から、本属細菌は、口腔マイクロバイオームの dysbiosis を知る上で、重要な役割を担うことが示唆された。

その後、新型コロナウイルスの世界的感染拡大により、他のコホートからの唾液サンプリングを中断せざるを得なくなった。そのため、上記 *Veillonella* 属細菌を健口マイクロバイオームの優勢細菌群として以降の解析を進めた。

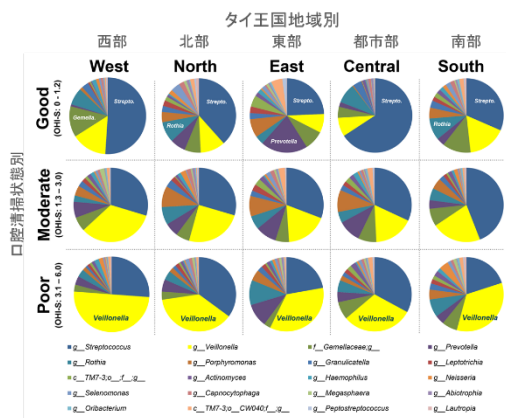


図1. 健口なタイ児童の唾液マイクロバイオーム解析結果 (参考文献10より引用)

- (2) 健口マイクロバイオームの優勢細菌群である *Veillonella* 属細菌を、培養及び PCR を用いて菌種レベルで同定した結果、*V. rogosae* が最も多く分布しており、口腔清掃状態が悪化するに従って、*V. parvula* の出現頻度が高いことが明らかになった^{5, 10}。本研究成果より、*Veillonella* 属細菌の中でも、*V. parvula* の増加が口腔マイクロバイオームの dysbiosis の指標の一つとして応用できる可能性が示唆された。

また、タイ児童、及び日本人児童由来サンプルの両者から既報菌種には属さない *Veillonella* 属細菌の未同定株を複数分離した。各種表現型と遺伝型の解析結果、そのうち日本人児童由来の一株を *Veillonella nakazawae* と命名し、新菌種として登録、発表を行った⁷。またタイ児童由来の未同定株に関しても、*Veillonella burapaensis* と命名し、近日中に新菌種として提唱 (投稿) 予定である。また、両新菌種の標準株は、国際微生物保存機関 (CCUG, JCM) に寄託し、受理された。

- (3) また新菌種を含めた口腔 *Veillonella* 全 8 菌種標準株の比較 Pan-genome 解析の結果¹¹、得られた Core (全株共通)、Accessory (2 株以上に共通)、Unique (1 株のみ) の各遺伝子ファミリーは図 2(a) のようになった。またそのうち、*V. rogosae* が最も多い Accessory ゲノムを

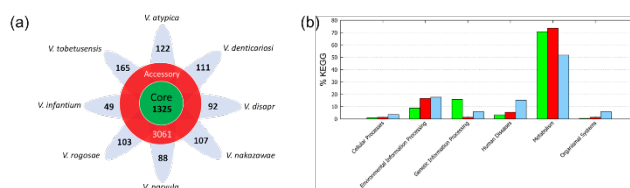


図2. 口腔 *Veillonella* 全 8 菌種標準株の Pan-genome 解析結果

- (a) Core, Accessory, Unique な遺伝子ファミリーの数
(b) Core, Accessory, Unique な遺伝子ファミリーの分布 (大分類)
緑: Core, 赤: Accessory, 水色: Unique (参考文献11より引用)

保存していたことから、*V. rogosae* が口腔 *Veillonella* の中でもその最も代表的な性状を保有していることが示唆された。本結果は、*V. rogosae* が口腔内に最も多く分布、出現しているという上記の研究成果を支持するものと考えられた。

さらにいずれの遺伝子ファミリーにおいても、代謝に関わる遺伝子が最も多く同定された (図 2 (b))。本研究では、これまで *Veillonella* 属細菌には報告されていない炭水化物代謝に着目して解析を進めた結果、フルクトース代謝に関わる酵素遺伝子群をすべて Core ゲノムで保存していることが初めて明らかになった (図 3)。これまででは乳酸のみをエネルギー源として生育すると報告されてきた *Veillonella* 属細菌だが、本研究成果から、フルクトースもエネルギー源として利用できる可能性が示唆された。

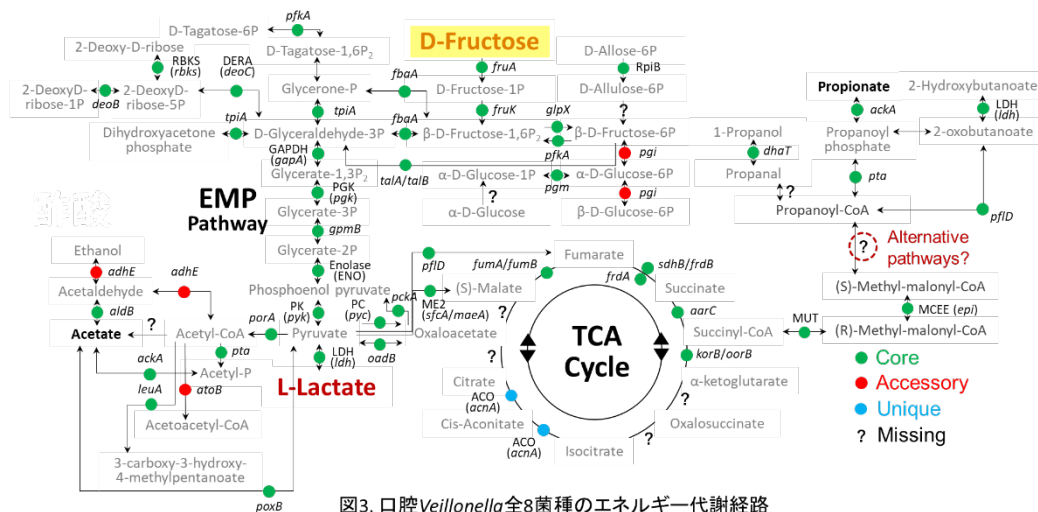


図3. 口腔 *Veillonella* 全8菌種のエネルギー代謝経路 (参考文献11より引用)

(4) 増殖曲線解析の結果、*V. atypica* は 1-2%TYHL が最も良い増殖を示したが、TYHF でも増殖し、0.25%TYHF で最も良い増殖が確認された。また、TYHFL では、0.25%TYHL よりもその増殖率及び速度が増加し、定常期の延長が明らかになった。また、メタボローム解析の結果、図 3 に示すフルクトース代謝の各中間代謝産物は全て定量的に同定され、TYHFL 培養の定常期で最も高濃度を示した。

本結果から、口腔 *Veillonella* のフルクトース代謝経路が機能し、それをエネルギー源として実際に利用できることが初めて明らかになった。また、乳酸-フルクトース共栄養下では、フルクトースが口腔 *Veillonella* の増殖率とライフスパンを延長させる作用を担うことが確認された。本発見は、今後の口腔マイクロバイオーム構成細菌間における代謝ネットワークの新しい解明に重要な役割を担うことが考えられる。

本研究では、嫌気培養法を併用することで *Veillonella* 属細菌の菌種レベルでの解析を可能にした。さらに、健口マイクロバイオームのモデルに、優勢菌としての *Veillonella* 属細菌を応用できると同時に、その代謝経路を制御することで、プロバイオテクスとしての活用の可能性も示唆された。

今後は、新型コロナウイルスの感染収束を見極めた後、健康なヒト由来の唾液採取を再開し、ライフステージ毎の健口マイクロバイオーム構成細菌の追認を行う。また、唾液由来メタボライトと、乳酸及びフルクトースを栄養源とした際の口腔 *Veillonella* のメタボライトの比較解析を行う。それらの結果から、優勢メタボライトを明らかにすることで、健口マイクロバイオームの統合的なモデル化を完成させる。

<参考文献>

1. Pérez-Chaparro PJ *et al.*, Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review *J Dent Res* 2014, 93:846-58.
2. Blancher E *et al.*, Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity *J Immunol* 2017, 198:572-80.
3. Darveau RP *et al.*, *Porphyromonas gingivalis* as potential community activist for disease *J Dent Res* 2012, 91:816-20.
4. Stackebrandt E and Goebel BM., Taxonomic note: A place for DNA/DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology *Int J Syst Bacteriol* 1994, 44:846-49.
5. Djais AA, Theodora CF, Mashima I *et al.*, Identification and phylogenetic analysis of oral *Veillonella* species isolated from the saliva of Japanese children *FI000Res*, 2019, 8:616
6. Theodora CF, Djais AA, Mashima I *et al.*, Phylogenetic study of oral *Veillonella* isolates from saliva of children in Hokkaido *Dent J Heal Sci Univ Hokkaido* 2019, 38:37-46
7. Mashima I *et al.*, *Veillonella nakazawae* sp. nov., an anaerobic Gram-negative coccus isolated from the oral cavity of Japanese children *Int J Syst Evol Microbiol*, 2021, 71:004583
8. Mashima I *et al.*, Complete genome sequence of *Veillonella nakazawae* JCM 33966^T(=CCUG 7459^T), isolated from the Oral Cavity of Japanese children, *Microbiol Res Announc* 2021, 10:00279-21
9. Chaudhari MN *et al.*, BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline *Sci Rep* 2016, 6:24373

10. Mashima I *et al.*, Characterization of the salivary microbiome in healthy Thai children, *Asia Pac J Trop Med*, 2019, 12:163-69.
11. Mashima I *et al.*, Comparative pan-genome analysis of oral *Veillonella* species, 2021, 9:1775.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mashima I, Theodorea CF, Djais AA, Kunihiro T, Kawamura Y, Otomo M, Saitoh M, Tamai R, Kiyoura Y	4. 巻 71
2. 論文標題 Veillonella nakazawae sp. nov., an anaerobic Gram-negative coccus isolated from the oral cavity of Japanese children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary 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) 10.1099/ijsem.0.004583	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 該当する
1. 著者名 Mashima I, Nakazawa F, Tamai R, Kiyoura Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Veillonella nakazawae JCM 33966T (=CCUG 74597T), Isolated from the Oral Cavity of Japanese Children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	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/MRA.00279-21	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 該当する
1. 著者名 Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Vichayanrat T, Scannapieco FA, Nakazawa F.	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of the salivary microbiome in healthy Thai children	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Tropical Medicine	6. 最初と最後の頁 163-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1995-7645.257116	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 該当する
1. 著者名 Djais AA, Theodorea CF, Mashima I, Otomo M, Saitoh M, Nakazawa F.	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification and phylogenetic analysis of oral Veillonella species isolated from the saliva of Japanese children	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.18506.3	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 該当する

1. 著者名 Theodora CF, Djais AA, Mashima I, Otomo M, Saitoh M, Nakazawa F.	4. 巻 38
2. 論文標題 Phylogenetic study of oral Veillonella isolates from saliva of children in Hokkaido	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido	6. 最初と最後の頁 37-46
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mashima I, Akiyama TM, Tomida J, Kutsuna R, Washio J, Takahashi N, Nakazawa F, Sato T, Kawamura Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft genome sequences of two Veillonella tobetsuensis clinical isolates from intraoperative bronchial fluids of elderly patients with pulmonary carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00397-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00397-19	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 Mashima I, Liao YC, Lin CH, Nakazawa F, Haase EM, Kiyoura Y, ScannapiecoFA	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparative pan-genome analysis of oral Veillonella species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9081775.	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 該当する

1. 著者名 眞島いづみ	4. 巻 4
2. 論文標題 口腔細菌ゲノム情報から見出す予防歯科医学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 46-49
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 眞島いづみ、中澤太、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 Veillonellaにおけるフルクトース代謝経路の発見
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞島いづみ、Theodorea CF、中澤太、Djais AA、國弘忠生、河村好章、齋藤正人、大友麻衣子、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 日本人児童口腔から分離された新菌種Veillonella nakazawaeの提唱
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞島いづみ、Liao YC、中澤太、河村好章、玉井利代子、清浦有祐、Haase EM、Scannapieco FA
2. 発表標題 Expression of Glycolysis in Veillonella spp. by substrates control
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞島いづみ、Yu-Chieh Liao、中澤太、河村好章、Elaine Haase、Frank Scannapieco
2. 発表標題 口腔Veillonellaによる新規う蝕予防法確立に向けた基礎的研究
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞島いつみ、Yu-Chieh Liao, 中澤太、河村好章、玉井利代子、清浦有祐、Elaine Haase, Frank Scannapieco
2. 発表標題 超高齢社会に根差した新規う蝕予防法の開発-遺伝子編集プロバイオティクスの応用化を目指して-
3. 学会等名 第35回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞島いつみ、中澤太、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 口腔Veillonella解糖系の証明
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞島いつみ
2. 発表標題 口腔Veillonellaの新規エネルギー代謝経路の探索
3. 学会等名 第67回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞島いつみ、清浦有祐
2. 発表標題 比較Pan-genome解析から考察する口腔Veillonella全菌種の糖代謝能
3. 学会等名 第69回奥羽大学歯学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mashima I, Liao YC, Lin CH, Nakazawa F, Haase EM, Kiyoura Y, Scannapieco FA
2. 発表標題 Exploring the bacterial features of oral Veillonella by comparative pan-genome analysis
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞島いつみ、中澤太、清浦有佑
2. 発表標題 比較Pan-genome解析による口腔Veillonella新規エネルギー代謝経路の発見
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mashima I, Liao YC, Lin CH, Nakazawa F, Haase EM, Kiyoura Y, Scannapieco FA
2. 発表標題 口腔Veillonellaにおける新規エネルギー代謝経路の発見と評価
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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			
米国	University at Buffalo, SUNY			
タイ	Mahidol University			
インドネシア	Universitas Indonesia			
台湾	National Health Research Institutes			