

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22722

研究課題名（和文）ロングリードシーケンスを基盤とした高解像度口腔マイクロバイオーム解析系の構築

研究課題名（英文）Development of oral microbial community analysis with high resolution and accuracy based on a long-read sequencing technology

研究代表者

竹下 徹（Takeshita, Toru）

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50546471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では第三世代ロングリードシーケンサーを用いて細菌rrnaオペロン領域全体を解読する簡便ながら高度な菌種識別が可能な新たな口腔微生物群集解析系の確立を目指した。細菌rrnaオペロン領域の網羅的増幅に適したプライマー配列を選択したのち、既知の細菌種のゲノムDNAおよび口腔細菌群集由来のDNA検体を用いて本領域の増幅が可能なことを確認した。さらに実際にロングリードシーケンサーを用いて細菌群集検体の解析を行い本領域の高い塩基配列多様性を確認した。これらの結果からロングリードシーケンサーとrrnaオペロン領域を利用した本解析系が高精度かつ高解像度な細菌群集解析法として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により第三世代ロングリードシーケンサーを用いてrrnaオペロン全体を解析する新たな細菌群集解析系の有用性が明らかとなった。本解析系の使用により細菌群集を構成する菌種の高精度な識別はもちろん、ある部位から別の部位、あるいは別の個体への細菌の移行などを正確かつ簡便に追跡することも可能になる。本解析系は口腔常在微生物叢研究においてこれまでの手法では見えてこなかった発見をもたらす新たな切り口をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study developed a microbial community analysis with high resolution and accuracy based on nucleotide sequences of rna operon a long-read sequencing technology. We determined primer sequences which cover bacterial rna operon comprehensively and confirmed that they can amplify the regions from bacterial and bacterial community DNA in PCR approach. We also determined bacterial composition of oral microbiota samples by using this approach with a 'third-generation' long-read sequencer, which showed a wide variety of nucleotide sequences of rna operon. These results suggests that nucleotide sequences variation of rna operon and a long-read sequencer would be useful for a microbial community analysis with a high taxonomic resolution.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：常在微生物叢 rRNA ロングリードシーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場により 16S rRNA 遺伝子を用いた網羅的細菌群集解析が容易になり、健康状態と関連する口腔マイクロバイームの特徴が明らかになってきている。一方で読み取り長が短い従来の次世代シーケンサーは解読長が 400 塩基弱と本遺伝子の三分の一程度に過ぎず、菌種間の配列多様性が不十分であるため近縁種の多くは識別できていない。したがって疾患発症や健康維持に決定的な役割を果たす菌種やその組み合わせが未だ見落とされている可能性がある。

1 分子の DNA の伸長反応をモニターする「次世代」ロングリードシーケンサーは 10000 塩基を優に超える配列情報の取得が可能であり、課題であった解読精度の問題についても近年克服しつつある。この DNA シーケンサーを用いれば 16S rRNA 遺伝子全長はもちろん隣接する 23S rRNA 遺伝子およびその間の Internal transcribed spacer (ITS) 領域まで含めた *rna* オペロン領域全体の解読が十分に可能であり、多数的可変領域を含まれることから菌種はもちろん菌株をも識別可能な細菌群集解析法になりうると考えた。

2. 研究の目的

本研究はロングリードシーケンサーを用いて *rna* オペロン領域を解読し利用する簡便でありながら高度な菌種識別が可能な新たな口腔マイクロバイーム解析系の確立を目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 細菌 *rna* オペロン領域の網羅的増幅に用いるプライマー配列の検討

微生物群集に存在する細菌 *rna* オペロン領域を網羅的に回収可能なリバースプライマーを選択するため、公開されている 22351 の *rna* オペロン領域塩基配列情報 (文献) を用いて既報の 23S rRNA 遺伝子の共通配列 (文献) の保存性の検証を行った。

(2) 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域を用いた細菌群集解析法の検討

本研究室が所有する 35 の口腔細菌株 (21 菌種) を培養後集菌したのち DNA を抽出し、フォワードプライマーとして 16S rRNA 遺伝子の 8F 配列 (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') を、リバースプライマーとして 23S rRNA 遺伝子の 129r2 配列 (表 1) を用いて PCR 法により 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域 (約 2000 塩基) を増幅した。増幅断片を精製後、キャピラリー DNA シーケンサーにて塩基配列を決定した。続いて唾液から抽出した DNA を鋳型として 8F 配列と 129r2 配列を用いて細菌群集 DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域を KOD DNA polymerase (東洋紡) を用いて PCR 法にて増幅した。増幅断片は精製後、ロングリードシーケンサー PacBio Sequel (PacBio) を用いて塩基配列を決定した。取得した塩基配列から Circular consensus sequence (CCS) を取得し、解析ソフトウェア DADA2 を用いてエラー補正をしながら塩基配列を分類した。16S rRNA 遺伝子領域を eHOMD に登録されている口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に対して相同性検索を行い、各配列の由来する菌種を決定し、それぞれの菌種の細菌群集に占める構成比率を算出した。

(3) 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域および 23S rRNA 遺伝子を用いた細菌群集解析法の検討

既知の 20 菌種から抽出され均等に混合された mock community DNA (ATCC MSA-2002) と 34 名の被験者から取得した口腔 4 検体 (唾液、舌苔、縁上歯垢、縁下歯垢) から抽出した DNA を鋳型として、8F 配列と 2241r 配列をプライマーとして細菌群集 DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子全長と 23S rRNA 遺伝子の前半約 2/3 に該当する 2200 塩基、および両遺伝子間の ITS 領域を含めた計 5000 塩基程度の DNA 断片について KOD ONE PCR Master Mix (東洋紡) を用いて PCR 法にて増幅した。増幅断片は精製後、ロングリードシーケンサー PacBio Sequel II (PacBio) を用いて塩基配列を決定した。取得した塩基配列から CCS を取得し、解析ソフトウェア DADA2 を用いてエラー補正をしながら塩基配列を分類した。mock community DNA については ATCC の掲載している各菌種の塩基配列に、口腔検体については expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) に登録されている口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に対して相同性検索を行い、各配列の由来する菌種を決定し、それぞれの菌種の細菌群集に占める構成比率を算出した。

4. 研究成果

(1) 細菌 *rna* オペロン領域の網羅的増幅に用いるプライマー配列の検討

本研究でリバースプライマーの候補とした 23S rRNA 遺伝子内の細菌共通配列を表 1 に示す。塩基配列が公開されている 22351 の *rna* オペロン領域塩基配列におけるそれぞれの細菌共通配列の有無を確認したところ、検討した 5 つの配列のうち 457r (19980 配列) 以外は概ね大半の細菌の *rna* オペロン領域を回収しうることが確認された (129r2, 21388 配列; 189r 20830 配列; 2241r, 21310 配列; 2490r, 21978 配列)。さらに 129r2, 2241r について 16S rRNA 遺伝子の 8F 配列をフォワードプライマーとして口腔細菌種から抽出した DNA および唾液から抽出した DNA を鋳型として PCR 法を用いて *rna* 領域が増幅できることを確認した。

(2) 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域を用いた細菌群集解析法の検討

研究開始年度の時点で使用可能であった PacBio Sequel でのデータ出力量を考慮し、まず 23S rRNA 遺伝子領域を含めない 2000 塩基程度の塩基配列情報を用いた解析系の構築を試みることにした。16S rRNA 遺伝子の 8F 配列と 23S rRNA 遺伝子の 129r2 配列を用いて本研究が所有する 35 の口腔細菌株 (21 菌種、11 菌株の *Streptococcus mutans* を含む) の同領域が PCR 法で増幅可能であることを確認した。さらに ITS 領域は 16S rRNA 遺伝子に比べ配列多様性が大きいこと、同一菌種の異なる菌株でも ITS 領域の配列に差異が認められることを確認した。一方で *Neisseria flavescens* と *Neisseria subflava* のように ITS 領域の配列においても差異が少ない菌種も認められた。

続いて被験者ごとに異なるタグ配列を付与した選択された 8F プライマーを用いて 77 名の唾液検体から 16S rRNA 遺伝子全長および ITS 領域を増幅し、ロングリードシーケンサー PacBio Sequel を用いて得られた増幅断片群の塩基配列を解読した。塩基配列から CCS を取得することで、22 万強の 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域を含む高精度な塩基配列が得られた。DADA2 を用いたエラー補正解析を行うことで 4256 の異なる塩基配列が存在することが明らかとなった。16S rRNA 遺伝子部分を eHOMD (文献) に登録されている口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に対して相同性検索を行うと 134 の菌種との一致が認められた。*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* 等通常の口腔で高い割合を示す菌種が優勢であることが確認された。

取得した塩基配列の分析により 16S rRNA 遺伝子全長よりも ITS 領域を加えた配列のほうが高い配列多様性が見られることが確認された。また本集団から検出された *Streptococcus mutans* は 10 の ITS タイプに分類され、多くは前述の 11 菌株の *S. mutans* 由来の塩基配列とも一致した。以上の結果から ITS 領域の配列を加えることでより高い解像度での菌種の識別ができることが示唆された。一方で 16S rRNA 遺伝子領域からは *Granulicatella adiascens* に該当するものとして 300 を超える 16S-ITS 配列が認められたように、ITS 領域の配列多様性が想定以上に大きいことも明らかとなった。同一ゲノム内の異なる *rrna* オペロンごとでの塩基配列の違いも 16S-ITS 塩基配列の多様性に寄与している可能性が考えられ、16S-ITS 塩基配列から得られた解析結果の解釈には注意が必要であることが示唆された。

表 1 本研究でプライマーの候補とした 23S rRNA 遺伝子に存在する塩基配列

配列名	塩基配列
129r2	GGTTBYCCCATTCRG
189r	TACTDAFATGTTTCASTTC
457r	CCTTTCCTCACGGTACT
2241r	ACCGCCCCAGTHAAACT
2490r	CGACATCGAGGTGCCAAAC

(3) 16S rRNA 遺伝子全長と ITS 領域および 23S rRNA 遺伝子を用いた細菌群集解析法の検討

データ出力量が PacBio Sequel の 7 倍に増加した PacBio Sequel II を用いて既知の 20 菌種を含む mock community DNA (ATCC MSA-2002) と 34 名の被験者から取得した口腔 4 検体 (唾液、舌苔、縁上歯垢、縁下歯垢) から抽出した DNA とについてタグ配列を付与した 8F プライマーと 2241r プライマーを用いて各検体から *rrna* オペロン領域を網羅的に増幅・回収した。DNA 精製後等濃度になるよう調整し混合したのち PacBio Sequel II を用いて増幅断片群の塩基配列を解読した。

塩基配列解読によりおよそ 180 万の高精度な CCS 配列が得られ、DADA2 を用いたエラー補正解析により約 12000 種類の *rrna* オペロン配列 (5000 塩基弱) の存在を確認した。mock DNA から取得した

16S rRNA 遺伝子の配列解析により mock DNA 検体に 5% ずつ含まれる 20 菌種のうち、16 菌種が比較的均等に検出された (図 1)。さらに実際の口腔検体の解析において 16S rRNA 遺伝子部位の塩基配列から同一の菌種由来とみられる場合も ITS 領域および 23S rRNA 遺伝子領域の配列は異なる場合があることを確認した。異なる被験者間では完全に一致した *rrna* オペロン全体の配列の共有は少なかった一方で、同一被験者では異なる部位から採取された検体でも多くの場合同一の *rrna* オペロン配列が認められた。過去に報告されていたとおり唾液検体の細菌構成は舌苔により類似しており、縁上歯垢および縁下歯垢の細菌構成とは大きく異なっていることも示された。一方、次世代シーケンサーによる解析では検出されたにもかかわらず本解析系で検出

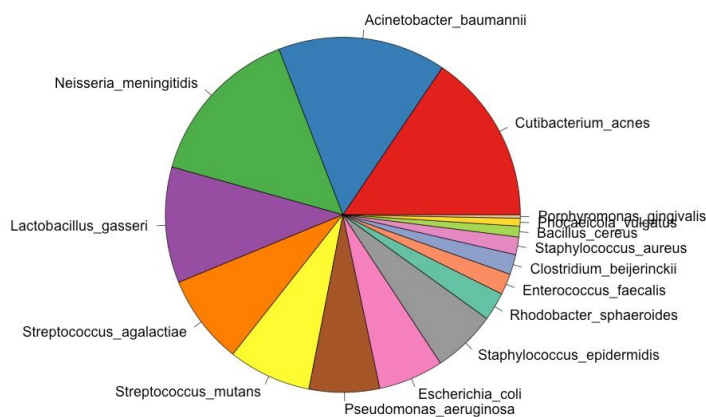


図1 本解析で得られたmock community DNA に占める各菌種の構成比率

できない菌種も一部認められた。以上の結果から使用するプライマーや PCR 増幅条件については改善の余地もあるものの *rrna* オペロン全体を利用した本解析系が菌種よりも詳細なレベルでの細菌構成決定に有用である可能性が示された。

< 引用文献 >

Benítez-Páez A, Sanz Y. Multi-locus and long amplicon sequencing approach to study microbial diversity at species level using the MinION™ portable nanopore sequencer. *Gigascience*. 2017 Jul 1;6(7):1-12.

Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Mar;72(3):2221-5.

Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *mSystems*. 2018 Dec 4;3(6):e00187-18.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeshita Toru, Matsumoto Koichiro, Furuta Michiko, Fukuyama Satoru, Takeuchi Kenji, Ogata Hiroaki, Asakawa Mikari, Kageyama Shinya, Hata Jun, Ninomiya Toshiharu, Inoue Hiromasa, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Airflow limitation and tongue microbiota in community-dwelling elderly individuals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00616~2020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/23120541.00616-2020	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, Nagao Yuka, Ma Jiale, Asakawa Mikari, Yoshida Ryoji, Takeshita Toru, Hirotsue Akiyuki, Yamashita Yoshihisa, Nakayama Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Compositional Shift of Oral Microbiota Following Surgical Resection of Tongue Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 600884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.600884	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 Oku Saori, Takeshita Toru, Futatsuki Toshiko, Kageyama Shinya, Asakawa Mikari, Mori Yasuo, Miyamoto Toshihiro, Hata Jun, Ninomiya Toshiharu, Kashiwazaki Haruhiko, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Disrupted tongue microbiota and detection of nonindigenous bacteria on the day of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008348	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 Zhang Daixi, Takeshita Toru, Furuta Michiko, Kageyama Shinya, Asakawa Mikari, Nambu Koki, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 6
2. 論文標題 Tongue Microbiota Composition and Dental Caries Experience in Primary School Children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e01252-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.01252-20	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹下徹、影山伸哉、朝川美加李、柴田幸江、山下喜久
2. 発表標題 ロングリードシーケンサーを用いた初期付着プラークの構成細菌の同定
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 我々が飲み込んでいる口腔常在微生物叢の構成と健康状態との関連
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究協力者	古田 美智子 (Furuta Michiko)		
研究協力者	二宮 利治 (Ninomiya Toshiharu)		

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
---------	---------