

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592032

研究課題名（和文） 高解像度細菌叢解析による口腔微生物環境の恒常性維持メカニズムの解明

研究課題名（英文） Maintenance mechanism of oral homeostasis revealed by fine scale analysis of microbiota

研究代表者

丸山 史人（MARUYAMA FUMITO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30423122

研究成果の概要（和文）：

口腔は多くの異物に曝され、体内に侵入してくる細菌の最初の門戸となる。この口腔細菌叢解析を高精度に行い、どのように口腔微生物環境の恒常性が維持されているのかのメカニズムを明らかとすることを目的とする。口腔環境は複雑かつ変動が大きく、細菌種、特に古細菌については、正確なデータは存在しない。そこで、健全な口腔細菌叢と、う蝕、歯周病時の細菌叢との比較解析から、各状態に特異的な構成種を明らかとし、そのなかでも重要な役割を果たすと考えられる種についてはゲノム解析をすることで細菌叢による口腔恒常性維持機構の解明を目指した。その結果、10歳程度の子供では、すでに細菌叢は、大人と変わらない状態であることが判明した。その一方で、単離株のゲノム解析を行った結果、細菌の獲得免疫機構であるCRISPRが口腔というニッチにおいて、細菌の生存に極めて重要であることがわかった。これらの知見は、引き続きメタゲノム解析の基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：

The oral cavity is exposed to many complex substances and is the first door for bacteria to invade the body. The goal of this study is to perform the oral flora analysis precisely and is intended to clarify the mechanism that how constancy of the oral microbial environment is maintained. The oral environment changes complicatedly, and there is no data about Archaea. Therefore comparative bacterial community analysis was carried out using normal oral flora, caries and periodontal disease, aimed at the elucidation of the oral constancy maintenance mechanism through isolation and genome determination of the key bacteria to the homeostasis. As a result, in the children of around 10 years old, the bacteria were not different with those of an adult. On the other hand, as a result of the genome analysis of the isolated strains, bacterial survival in the niche could be affected greatly by CRISPR which was a bacterial acquired immunity mechanism. The knowledge becomes the base of future metagenome analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学
キーワード：細菌叢、新型シーケンサー、恒常性

1. 研究開始当初の背景

口腔は常に外来異物に曝されており、多くの病原体の侵入経路となる。口腔には400-700種類の細菌種が生息していると考えられており、このうち60%以上が培養できない未知の細菌種で占められている (PNAS 96:14547-14552, 101: 4250-4255, 101:6176-6181, 104:11889-11894)。この細菌叢は病態によって異なることが明らかとなっており、口腔細菌が起因すると考えられる心内膜炎や骨粗鬆症といった全身疾患の発症、糖尿病の悪化、早産児の低出生体重との関連なども報告されている。さらに、これらの口腔細菌の代謝産物が、細菌間でのコミュニケーション (Quorum sensing) やバイオフィーム形成、さらに宿主細胞と相互作用し、炎症応答を引き起こすことなどが判明している。そこで、健康状態と口腔細菌叢との関連性の解明を目指したメタゲノムプロジェクトが2006年にアメリカで開始された。しかし、口腔細菌叢の動的な変化・複雑さ、またどのような種がどれだけ存在するのかといった正確な情報の欠如、また個々の細菌種に対する知識の欠如のために有益な情報が引き出せていないのが現状である (Nat. Med. 14:706-709)。

これまでに、申請者らは、口腔の2大疾患であるう蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* NN2025 株のゲノム解析を行い (BMC genomics 10:358)、さらに歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* のゲノム解析を行っている。また、口腔常在細菌叢で代表的なレンサ球菌属の分類基準種である *S. pyogenes* に着目し、病原性の解析を進めている (Cell. Microbiol. in press)。しかしながら、実際には、上記の種だけではなく、う蝕と歯周病の原因菌に限っても、その他の多くの種が存在することが報告されている。これらの菌種同定には、培養法または16S rRNA 遺伝子の解析が行われているが、現在までの知見では、数多くの臨床サンプルで多数検出される菌が、原因菌と目されている状況であり、コッホの原則から外れてしまう感染症であると考えられている。また動物モデルとしても雑食性であるヒトの口腔内を再現できるモデルは、霊長類以外では存在しないため、現在までのところ適切な実験系は存

在しない。健康な口腔細菌叢だけでなく、う蝕、歯周病患者から採取した試料にも、培養できない細菌種が多数いることがわかっているが、不十分な菌種しか解析されておらず、構成種もそれぞれの現存量もほとんど未知である。これらの中に結果でなく本当の原因菌が存在する可能性があり、これを発見することは、極めて興味深いことであり、う蝕、歯周病を発生する可能性を予測するうえでも必須である。そのため、高精度な細菌叢解析、健康な口腔環境との比較を行い、各状態における特異的な構成種、さらにそのなかでも重要な役割を果たしていると考えられる種とそのゲノム解析を通じた役割を決定することが健全な口腔環境が微生物学的にどのように維持されているのかを明らかにするうえでも必須であると考えられる。

2. 研究の目的

口腔は多くの異物に曝され、体内に侵入してくる細菌の最初の門戸となる。この口腔細菌叢解析を高精度に行い、どのように口腔微生物環境の恒常性が維持されているのかのメカニズムを明らかとすることを目的とする。口腔環境は複雑かつ変動が大きく、細菌種、特に古細菌については、正確なデータは存在しない。そこで、健康な口腔細菌叢と、う蝕、歯周病時の細菌叢との比較解析から、各状態に特異的な構成種を明らかとし、そのなかでも重要な役割を果たすと考えられる種についてはゲノム解析をすることで細菌叢による口腔恒常性維持機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、最初に「口腔にはどんな細菌種がどれだけ生息するのか」という口腔環境に生息する微生物を理解するうえで基盤となる結果を高精度に得る。口腔では、この基本的と考えられるデータが未だ欠落しており、特に、古細菌のデータについては歯周病との関連がある種が一部報告されているものの、多様性の報告はほぼ皆無である。そこで、当研究室で独自に開発した細菌、古細菌の両者を網羅する16S rRNA 遺伝子の universal primer を用いて、健康な母子の16組32人、う蝕と歯周病のそれぞれ16人の歯面プラーク、唾液を試料とし、一人約32,000配列について多様性解析を行い、定量的に比較する。これにより、母子については、母、子のそれぞれで特異的な構成種、また共通する構成種を明らかにする。さらにこれら健康な口腔試料とう蝕、歯周病試料の間で、特異的な構成種を明らかにするとともに、各特異的な構成種において、量的に重要な構成種を重要な役割を果たしている種と仮定し、単離、ゲノム

配列の決定を4株(母,子,う蝕,歯周病についてそれぞれ1株ずつ)について行う.この高解像度細菌叢解析および重要な種のゲノム解析に基づき,口腔の微生物学的な恒常性がどのように維持されているのかを明らかにするとともに,健全性の評価基準となるマーカーの探索を行う.

4. 研究成果

Roche 454 シーケンサーを用いて,最小1500本程度(400bp)の16S rRNA配列を取得したのち,細菌叢解析を行った.母子間において,特異的な細菌種を属レベルでは見つけることが出来なかった.しかしながら,検出される種の多様性については,子供のほうが高いようであった.今回サンプリングした子供は,7-10歳であったため,大人と細菌叢はもう変わらない状態であったと考えられる.その一方で,参考となる単離株のゲノム解析からは,細菌種が有するCRISPRが口腔の恒常性に大きく関与していることが示唆された.

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16件)

- ① D. Takamatsu and F. Maruyama. Diversity and Universality of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters in *Streptococcus suis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:2493. 2013. (査読無)
- ② M. Okura, D. Takamatsu, F. Maruyama, T. Nozawa, I. Nakagawa, M. Osaki, T. Sekizaki, M. Gottschalk, Y. Kumagai, and S. Hamada. Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*: Potential Mechanisms for the Generation of Capsular Variation. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:2796-2806. 2013. (査読有)
- ③ K. Minegishi, C. Aikawa, A. Furukawa, T. Watanabe, T. Nakano, Y. Ogura, Y. Ohtsubo, K. Kurokawa, T. Hayashi, F. Maruyama, I. Nakagawa, Y. Eishi. Complete genome sequence of *Propionibacterium acnes* isolate from sarcoidosis patient. **Genome Announc.** 1:e00016-12. 2013. (査読有)
- ④ Y. Ohtsubo, F. Maruyama, H. Mitsui, Y. Nagata, M. Tsuda. Complete Genome Sequence of *Acidovorax* sp. KKS102, a Polychlorinated Biphenyl-Degrading strain. **J. Bacteriol.** 194:6970-1. 2012. (査読有)
- ⑤ M. Jorquera, N. Saavedra, F. Maruyama, A. Richardson, D. Crowley, R. Catrilaf, E. Henriquez, M. Mora. Phytate addition to soil induces changes in the abundance and expression of *Bacillus* β -propeller phytase genes in the rhizosphere. **FEMS Microbiol. Ecol.** 83:352-60. 2012. (査読有)
- ⑥ -T. Nozawa, C. Aikawa, A. Goda, F. Maruyama, S. Hamada, I. Nakagawa. The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A *Streptococcus* infection. **Cell. Microbiol.** 14:1149-1165. 2012. (査読有)
- ⑦ C. Aikawa, N. Furukawa, T. Watanabe, K. Minegishi, A. Furukawa, Y. Eishi, K. Oshima, K. Kurokawa, M. Hattori, K. Nakano, *F. Maruyama, I. Nakagawa and T. Ooshima. Complete Genome Sequence of the serotype k *Streptococcus mutans* LJ23. **J. Bacteriol.** 194:2754. 2012. (査読有)
- ⑧ L. Nonaka, F. Maruyama, M. Miyamoto, M. Miyakoshi, K. Kurokawa, M. Masuda. Novel conjugative transferable multiple drug resistance plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from marine aquaculture environment. **Microb. Environ.** 27:263-272. 2012. (査読有)
- ⑨ -A. Aoki, Y. Shibata, S. Okano, F. Maruyama, A. Amano, I. Nakagawa, *Y. Abiko. Transition metal ions induce carnosinase activity in PepD-homologous protein from *Porphyromonas gingivalis* TDC60 with type II fimA. **Microb. Pathog.** 52:17-24. 2012. (査読有)
- ⑩ N. Tajima, S. Sato, F. Maruyama, N. Kaneko, V. Sasaki, K. Kurokawa, H. Ohta, Y. Kanasaki, H. Yoshikawa, S. Tabata, M. Ikeuchi and *N. Sato. Genomic structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain GT-S. **DNA Res.** 18:393-399. 2011. (査読有)
- ⑪ F. Maruyama, *T. Watanabe, T. Nozawa, A. Aoki, S. Okano, Y. Shibata, K. Oshima, K. Kurokawa, M. Hattori, I. Nakagawa, Y. Abiko. Complete Genome Sequence of the Periodontogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* TDC60. **J. Bacteriol.** 193:4259-4260. 2011. (査読有)
- ⑫ T. Nozawa, N. Furukawa, C. Aikawa, T. Watanabe, B. Haobam, K. Kurokawa, *F. Maruyama, I. Nakagawa. CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*. **PLoS One** 6:e19543. 2011. (査読有)
- ⑬ C. Aikawa, F. Maruyama, I.

- Nakagawa. The dawning era of comprehensive transcriptome analysis in cellular microbiology. **Front. Microbiol.** 1: 118. 2010. (査読有)
- ⑭ -H. Mori, F. Maruyama, K. Kurokawa. VITCOMIC: visualization tool for taxonomic compositions of microbial communities based on 16S rRNA gene sequences. **BMC Bioinfo.** 11: 332. 2010. (査読有)
- ⑮ -I. Takahashi, F. Maruyama, Y. Kurashima, Y. Goto, T. Obata, I. Nakagawa, *H. Kiyono. Commensal *Proteobacteria* in colonic CD11b⁺ cells induce intestinal T cell responses. **Int. Immunol.** 22: supplement, Thursday iv9. 2010. (査読無)
- ⑯ A. Sakurai, F. Maruyama, J. Funao, T. Nozawa, C. Aikawa, N. Okahashi, S. Shintani, S. Hamada, *T. Ooshima, I. Nakagawa. The specific behavior of intracellular *Streptococcus pyogenes* undergone the autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. **J. Biol. Chem.** 285: 22666-22675. 2010. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 3 件)

- ① 渡辺孝康、中川一路、丸山史人. 2013. 原核生物の新規な獲得免疫機構 CRISPR/Cas システム. 化学と生物. in press (査読有り)
- ② 森宙史、丸山史人、*黒川顕. 2010. 第 2 章メタゲノムデータベース. メタゲノム解析技術の最前線. Metagenomics: a new frontier of bacterial community researches. CMC 出版, 東京. p.42-53. (査読無)
- ③ 森宙史、丸山史人、黒川顕. 2010. 第 8 章 メタゲノムインフォマティクス. 難培養微生物研究の最新技術 II - ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望 - Current Technology and Perspectives for Yet-uncultivated Microbial Resources CMC 出版, 東京. p.82-91. (査読無)

[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]

- 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・細菌感染制御学分野ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/grad/bac/index.html>
- 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・環境遺伝生態学分野ホームページ
<https://www.facebook.com/pages/Microbial-Genomics-and-Ecology/135689926563239>

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 史人 (MARUYAMA FUMITO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 30423122

(2)研究分担者

- 桜井 敦朗 (SAKURAI ATSUO)
東京歯科大学・小児歯科講座・助教
研究者番号: 90431759
- 中川 一路 (NAKAGAWA ICHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 70294113
- 黒川 顕 (KUROKAWA KEN)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号: 20343246

(3)連携研究者

なし