

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：34408
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23792118
研究課題名（和文） バイオフィーム形成能を高度に維持するアクチノマイセス菌株のゲノム解読と変異解析
研究課題名（英文） Genome sequencing and mutational analysis of the <i>Actinomyces</i> strains with enhanced biofilm phenotype
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

研究成果の概要（和文）：

口腔細菌 *Actinomyces* のバイオフィーム形成機構の解明を目指し、バイオフィーム形成能を高度に維持している K20 株、MG-1 株のゲノム解析と遺伝学的解析を行った。K20 株のゲノムを解読し、得られたゲノムデータを公共データベースにアップした（DDBJ, BABV01000001-BABV01000771）。また、変異解析によりバイオフィーム関連遺伝子をいくつか同定し発表するに至っている。

研究成果の概要（英文）：

To find out the mechanism of biofilm formation of oral *Actinomyces*, genome and genetic analysis were carried out for two strains of K20 and MG-1 keeping enhanced biofilm phenotype. The genome of the strain K20 was almost completely sequenced and the given data was uploaded to the public database (DDBJ, BABV01000001-BABV01000771). Additionally, I have identified some biofilm-related genes by mutation analysis and have reported this.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：口腔細菌学・バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

細菌は固形物表面に付着し、自身を覆うマトリックスを産生することによりバイオフィームを形成する。歯面においても、700～19,000 種ともいわれる口腔細菌が複雑に相互作用することで口腔バイオフィームが形成され、う蝕や歯周疾患のみならず、化膿性炎症の難治化も引き起こす。数ある口腔細菌の中で、本研究で用いる *Actinomyces oris* は、2009 年に *Actinomyces* 属細菌の再分類により新たに定義された種で、これまで精力的に研究が行われてきた代表的な *A. viscosus*, *A. naeslundii* 菌株の多くが、この *A. oris*

に再分類されている。ここ数年の先進的な解析法の導入により、この *A. oris* が初期口腔バイオフィーム形成の鍵となる細菌であることが明らかとなってきた。*in vivo* での fluorescence in situ hybridization (FISH) を用いた解析からは、プラーク中で *A. oris* がバイオフィーム底部を覆っていること、さらに歯肉縁下プラークでは最深部は *A. oris* のみから構成されている可能性が報告されている。また、*in vitro* の解析では、*A. oris* が *Streptococcus oralis*, *S. gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* sp. などの多くの口腔細菌と相互作用することが報告されている。これらの

報告より, *A. oris* は初期口腔バイオフィルム形成のプラットフォームとなっているものと考えられる。

これまで *A. oris* におけるバイオフィルム形成に関する解析は, 線毛解析を中心に一部の菌株で行われているが, これらの菌株は長期に保存, 継代されておりバイオフィルム形成能は比較的低いレベルであることが分かっていた。研究開始当初, 私は口腔分離臨床株の中で実験室環境下で継代を繰り返しても高度にバイオフィルム形成能を維持している *A. oris* K20 株を用い, *A. oris* のバイオフィルム形成機構を解明すべく本菌株の解析を開始していた。ゲノム配列が決定されている *A. oris* MG-1 株との比較ゲノムを行うため, pyrosequence 法を用いて K20 株のゲノム配列を解読し, 約 1,300 のコンティグからなる K20 株のドラフトゲノム配列を得ることが出来た。また, 遺伝子改変ツールの構築にも取り組み, K20 株におけるトランスポゾンによる変異導入や相同組換えを利用した部位特異的変異導入の系を構築するに至っていた。

2. 研究の目的

我々のグループで単離していた *A. oris* K20 株を供試菌として, 次に示す 2 つの方向からバイオフィルム形成に関与する遺伝子の同定を目指した。1 つ目は, K20 株ゲノムの完全決定である。既に pyrosequence 法を用いて K20 株のドラフトゲノム配列を得ており, 本研究課題において未解読のギャップ領域をサンガー法を用いて連結していき, 完全長ゲノムを取得する。そして, 既にゲノム配列が明らかになっている *A. oris* MG-1 株と配列比較等のバイオインフォマティクス解析を行い, バイオフィルム形成に関わる遺伝子領域を推測する。2 つ目は, トランスポゾン Tn5 を用いたランダム変異導入によるバイオフィルム欠損株の単離である。多くの欠損株を得て, 変異部位を決定することにより, *A. oris* のバイオフィルム形成機構の概要を明らかにできるものと考えた。

3. 研究の方法

Actinomyces oris のバイオフィルム形成機構の解明を目指し, 高度にバイオフィルム形成能を維持している K20 株を供試菌として用い, 次の 2 つの実験系列を並行して遂行した。1 つ目は, 既にドラフト情報が得られている K20 株ゲノムの完全解読である。得ら

れたゲノム情報を既知の MG-1 ゲノム情報と *in silico* 解析で比較し, バイオフィルム形成に関わる遺伝子や発現制御系を抽出した。2 つ目は *in vitro* の実験系で, トランスポゾンを用いた変異導入によりバイオフィルム欠損株を単離し, その原因遺伝子を同定した。これらの 2 系列の実験系を互いに補完的に進めることで, *A. oris* のバイオフィルム形成性を多面的に解析することが可能となった。

4. 研究成果

Actinomyces oris のバイオフィルム形成機構の解明を目指し, バイオフィルム形成能を高度に維持している K20 株, MG-1 株を供試菌として用い, 次の 2 つの実験系列を並行して実施した。1 つ目は, 既にドラフト情報が得られている K20 株ゲノムの解読である。その高い GC 含量のため完全解読には至らなかったが, コンティグ配列の連結を進め, 得られたゲノムデータを公共データベースにアップするに至っている (DDBJ, BABV01000001-BABV01000771)。また, 得られたゲノム情報を既知の MG-1 ゲノム情報と *in silico* 解析で比較し, バイオフィルム形成に関わる遺伝子や発現制御系をいくつか同定し発表した。2 つ目は, トランスポゾンを用いた変異導入によるバイオフィルム欠損株の単離とその原因遺伝子の同定である。MG-1 株において 40 株のバイオフィルム欠損株を得ており, そのうち 12 株においてトランスポゾン挿入部位の決定に至っている。

本研究課題の遂行により, 初期付着細菌である *Actinomyces* 属細菌のバイオフィルム形成に関わる重要な遺伝子候補がいくつか同定されてきた。本研究課題をさらに進めることで, この細菌種のゲノムレベルでの分子解剖を可能にし, 口腔プラークの初期形成段階の機構の解明にも大きなインパクトを与えるものと確信している。そして, 本研究課題で明らかになったバイオフィルム関連遺伝子の機能発現の全容を明らかにし, これを阻止することによってバイオフィルム形成を制御する方法の開発につながるものと考えている。

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 7 件)

(1) Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Maruyama H, Yoshida M, Hayashi H, Leung KP, Fukushima H. Identification of disulphide stress-responsive extracytoplasmic function sigma factors in *Rothia mucilaginosa*. Archives of Oral Biology. 58, 681-689. 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.017.

(2) Yamanaka T, Furukawa T, Yamane K, Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Inoue J, Kamei M, Yasuoka H, Horiike S, Leung KP, Fukushima H. Biofilm-forming capacity on clinically isolated *Streptococcus constellatus* from an odontogenic subperiosteal abscess lesion. Bacteriology & Parasitology. 4, 1000160. 2013. 査読有, DOI: 10.4172/2155-9597.1000160.

(3) Mashimo C, Kamitani H, Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Sugimori-Shinozuka C, Tatami T, Inoue J, Kamei M, Morita S, Leung KP, Fukushima H. Identification of the genes involved in the biofilm-like structures on *Actinomyces oris* K20, a clinical isolate from an apical lesion. Journal of Endodontics. 39, 44-48. 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.joen.2012.08.009.

(4) Yamane K, Nambu T, Yamanaka T, Ishihara K, Tatami T, Mashimo C, Walker CB, Leung KP, Fukushima H. Pathogenicity of exopolysaccharide-producing *Actinomyces oris* isolated from an apical abscess lesion. International Endodontic Journal. 46, 145-154. 2013. 査読有. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2012.02099.x.

(5) Ogiso K, Nambu T, Kotsu Y, Fukushima H, Ueda M. Isolation of a biofilm-defective mutant of *Actinomyces* from a patient with gingivitis. Journal of Osaka Dental University. 46, 91-99. 2012. 査読有.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009436540>

(6) Fujihira T, Yamane K, Yoshida M, Nambu T, Hayashi H. Analysis of genes involved in exopolysaccharide production of *Rothia mucilaginosa* clinically isolated from a persistent apical periodontitis lesion. Journal of Osaka Dental University. 46, 157-164. 2012. 査読有.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009436547>

(7) Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T,

Mashimo C, Sugimori C, Nambu T, Obata N, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms. BMC Infectious Diseases. 11, 228. 2011. 査読有. DOI: 10.1186/1471-2334-11-228.

[学会発表] (計 21 件)

(1) Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Genetic analysis of biofilm-forming *Streptococcus constellatus*. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. 2013年3月21日. Seattle, Washington, USA

(2) 南部 隆之, 真下 千穂, 山根 一芳, 山中 武志, 福島 久典. 口腔アクチノマイセスにおけるバイオフィーム欠損株の同定と特徴づけ. 日本細菌学会. 2013年3月18日. 千葉市.

(3) 真下 千穂, 南部 隆之, 山根 一芳, 山中 武志, 福島 久典. pJRD215を基盤にしたクローニング・発現用プラスミドの作成と *Actinomyces* 属細菌への応用. 日本細菌学会. 2013年3月18日. 千葉市.

(4) 大黒 健二, 田村 真奈美, 南部 隆之, 福島 久典, 阿部 貴志, 向 由紀夫. アユ冷水病菌の完全ゲノム配列決定とニジマス冷水病菌との比較ゲノム解析. ゲノム微生物学会. 2013年3月8日. 滋賀県長浜市.

(5) Nambu T, Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Fukushima H. Characterization of Tn5 insertion mutants of oral *Actinomyces* affected in biofilm formation. Biofilms 5. 2012年12月12日. Paris, France.

(6) Yamanaka T, Yamane K, Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Leung KP, Fukushima H. Sucrose independent exopolysaccharide productivity and biofilm formation of oral commensal bacteria as pathogenesis of chronic inflammation in the oral cavity. Clinical microbiology and microbial genomics. 2012年11月12日. San Antonio, USA.

(7) 円山 由郷, 山根 一芳, 南部 隆之, 真下 千穂, 山中 武志, 福島 久典. 口

腔アーキアによって疾患は起こるか？ 日本歯科医学会総会. 2012年11月10日. 大阪市.

(8) 山根 一芳, 円山 由郷, 南部 隆之, 真下 千穂, 山中 武志, 福島 久典. 口腔感染症の病因論が変わった. 日本歯科医学会総会. 2012年11月10日. 大阪市.

(9) 大前 有紀, 山根 一芳, 南部 隆之, 松本 尚之. 矯正線表面への *Actinomyces oris* MG-1 株の付着性. 日本矯正歯科学会大会. 2012年9月28日. 郡山市.

(10) Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Development of new plasmids for cloning and expression in oral *Actinomyces* spp. The 4th EMBO meeting 2012. 2012年9月24日. Nice, France.

(11) 真下 千穂, 南部 隆之, 円山 由郷, 山根 一芳, 山中 武志, 福島 久典. 広宿主域接合プラスミド pJRD215 を基盤にした新規プラスミドの作製と口腔 *Actinomyces* 属細菌への応用. 第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会. 2012年7月13日. 大阪市.

(12) 山根 一芳, 山中 武志, 真下 千穂, 吉田 匡宏, 林 宏行, 南部 隆之, 円山 由郷, 福島 久典. バイオフィルム形成 *Streptococcus intermedius* のゲノム解析. 日本歯科保存学会平成24年度春季大会 2012年6月29日. 宜野湾市.

(13) 小木曾 一貴, 南部 隆之, 高津 兆雄, 福島 久典, 上田 雅俊. *Actinomyces oris* におけるバイオフィルム関連遺伝子の同定. 日本歯周病学会. 2011年9月24日. 下関市.

(14) Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Fukushima H. Gene expression profiles of *Rothia mucilaginosa* grown under diamide stress. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月10日. 札幌市.

(15) Yamanaka T, Sugimori C, Yamane K, Nambu T, Mashimo C, Fukushima H. Production of polyclonal antibodies raised against *Prevotella intermedia* GroEL and DnaK proteins. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月10日. 札幌市.

(16) Yamane K, Yamanaka T, Nambu T, Mashimo

C, Fukushima H. Pathogenicity of exopolysaccharide-producing *Actinomyces oris* isolated from an apical abscess lesion. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月10日. 札幌市.

(17) Mashimo C, Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Genetic analysis of a Gram negative wide host-range plasmid pJRD215 and its application to oral *Actinomyces* spp. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月10日. 札幌市.

(18) Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, K-P Leung, Fukushima H. Characterization of the diamide stress stimulon in *Rothia mucilaginosa*. Eurobiofilms 2011. 2012年7月7日. Copenhagen, Denmark.

(19) Fujihira T, Yamane K, Nambu T, Yoshida M, Mashimo C, Yamanaka T, K-P Leung, Fukushima H, Hayashi H. Genetic analysis of exopolysaccharide-producing *Rothia mucilaginosa* isolated from a persistent apical periodontitis lesion. Eurobiofilms 2011. 2012年7月7日. Copenhagen, Denmark.

(20) Ogiso K, Nambu T, Yamanaka T, Yamane K, Mashimo C, Kotsu Y, K-P Leung, Fukushima H, Ueda M. Construction of mutants with reduced biofilm formation from *Actinomyces oris* MG-1 by transposon mutagenesis. Eurobiofilms 2011. 2012年7月6日. Copenhagen, Denmark.

(21) 小木曾 一貴, 南部 隆之, 高津 兆雄, 福島 久典, 上田 雅俊. 歯肉炎病巣より分離された *Actinomyces* からの付着能欠損株の単離. 日本歯周病学会. 2011年5月28日.

6. 研究組織

(1) 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