

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592790

研究課題名(和文) 歯垢形成過程における初期付着菌アクチノマイセス属の役割とその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of the initial colonizer *Actinomyces oris* in dental plaque formation.

研究代表者

真下 千穂 (MASHIMO, Chiho)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80368159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯垢(デンタルプラーク)における初期付着菌である*Actinomyces*属細菌の働きを明らかにすることを目標にして、バイオフィーム形成菌である*A. oris* K20株が保有する遺伝子を網羅的に解析し、バイオフィーム形成に関連する候補遺伝子を同定した。また、*Actinomyces*属細菌がもつ遺伝子の機能解析に必要な遺伝子改変ツールの構築と整備を行った。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that oral *Actinomyces* spp. plays important roles for oral multispecies biofilm development as an initial colonizer. To identify gene(s) responsible for the extracellular polymeric substances (EPS) production, transposon mutagenesis was performed against a clinical isolate of *A. oris* strain K20. We reported the identification of genes that were predicted to be involved in the EPS biosynthesis and were essential for biofilm formation. We also developed the genetic engineering systems in *Actinomyces* spp. based on pJRD215 with high transformation efficiency.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔細菌 バイオフィーム アクチノマイセス属細菌 初期付着菌

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する細菌の多くは、固体表面に付着・定着後、EPS (Extracellular Polymeric Substances、菌体外多糖・タンパク・核酸などを含む) を産生することによりバイオフィルムを形成する。このバイオフィルムが人体内に形成された場合、慢性持続性感染症や再燃・難治性感染症の発症要因として極めて重要となる。

口腔内には口腔常在菌叢が存在し、その構成細菌は 700 種類以上と言われている。口腔内では、これらの細菌が相互に関連し合い、複雑なバイオフィルム・歯垢 (デンタルプラーク) を形成し、その結果として、う蝕・歯周病などの持続性感染症を引き起こすと考えられている。そこで、細菌がバイオフィルムを形成する過程 (特に EPS を産生する遺伝学的な背景) を明らかにすることで、歯垢形成の制御が可能となり、最終的には口腔感染症の予防・治療に役立つことができると考える。近年の新たな手法を用いた研究により、本研究で対象としている *Actinomyces* 属細菌は歯面 (エナメル質上のペリクル) に最初に付着する細菌 (初期付着菌、イニシャルコロナイザー) であることが明らかになってきた。Fluorescence in situ hybridization (FISH) を用いて、初期の歯垢形成過程を観察した研究では、*Actinomyces* 属細菌がバイオフィルム底部に集塊を形成し、この部分を基盤として、その上層に *Streptococcus* 属細菌などを含む口腔細菌群が付着していた。また、本菌は *Streptococcus*、*Fusobacterium* 属細菌などとも相互に関連しながら口腔バイオフィルムを構築することも明らかになってきた。

Actinomyces 属細菌が歯垢バイオフィルム形

成において重要な役割をすることが明らかになってきたが、*Actinomyces* 属細菌に焦点を絞った遺伝子レベルでの研究はほとんどない。そこで、我々は、研究室で保存していた *Actinomyces* 臨床分離株の中から、バイオフィルム形成能を有し、かつ病原性の高い株を選抜し、その菌株の遺伝学的背景を明らかにすることにした。最終的に選抜された株 *A. oris* K20 株は、実験環境下で継代培養を繰り返しても EPS の産生が失われず、かつマウスに対して膿瘍形成を誘導する高病原性を有するものであった。さらに、同時期に並行して、本菌株のドラフトゲノム配列決定のプロジェクトが行われ、ゲノム配列情報が利用できる状況になり、研究基盤が整ってきた状況であった。

2. 研究の目的

歯垢形成の初期段階における初期付着菌の働きを明らかにするために、*A. oris* K20 株の EPS 産生能に焦点を絞り、その遺伝学的な背景を明らかにすることを目標とした。*A. oris* K20 株が保有するバイオフィルム形成に関与する遺伝子を同定し、その機能を解明するために、2つの方向性により研究を進めることにした。具体的には(1)*A. oris* K20 株が保有する遺伝子を網羅的に調べるために、ランダムに遺伝子を欠損させたノックアウト株を作製し、バイオフィルム形成に関連する遺伝子 (群) の抽出を行う。(2) (1)で絞り込まれた遺伝子の機能を証明するための遺伝子改変ツール (具体的には、クローニングベクター・遺伝子発現ベクター) の構築を行い、遺伝子改変システムの基盤を整備する。

3. 研究の方法

(1) バイオフィルム形成能欠損株の作製

トランスポゾンを用いた変異導入を行い、*A. oris* K20 株ゲノム上の遺伝子をランダムにノックアウトした菌株のプールを作製する。このプールよりバイオフィルム形成能を失った菌株をスクリーニングし、バイオフィルム形成関連候補遺伝子を同定する。

(2) *Actinomyces* 属細菌用遺伝子改変ツールの構築

Actinomyces 属細菌で利用できる遺伝子改変ツールは現在のところ、プラスミド pJRD215 のみである。今後、*A. oris* K20 株が保有する遺伝子の機能を解明するためには遺伝子改変した菌株の作製が必要となる。そこで、pJRD215 全長配列を決定し、その情報を基に改良型クローニングプラスミドおよび発現ベクターを作製し、*Actinomyces* 属細菌に対応した遺伝子改変システムを構築した。

4. 研究成果

A. oris K20 株を対象にバイオフィルム形成関連遺伝子の網羅的探索をおこなうために、トランスポゾンを用いたランダムミュタジェネシスを行った。その結果、5つの候補遺伝子を同定した。これらの遺伝子は polysaccharide deacetylase、Spo0J containing ParB-like nuclease domain、残り3つは hypothetical proteins をコードするものであった。そのうちの1遺伝子、polysaccharide deacetylase 遺伝子周囲を広範囲に調べた結果、糖代謝に関与する複数の遺伝子が存在し、クラスターを形成していることが推測された。

プラスミド pJRD215 の全長は 10,317bp で、複製・接合・薬剤耐性に関与する遺伝子などを

保有していた。*Actinomyces* 属で形質転換に必要であると推測される領域以外を削った pCMDs と pCMDk を作製した。これらのプラスミドを *A. oris* K20 株を含む口腔アクチノマイセス属細菌に応用したところ、オリジナルである pJRD215 よりも高い形質転換効率を示し、遺伝子改変ツールとして利用価値が高いことがわかった。さらに、新たに構築したプラスミドなどを用い、口腔アクチノマイセス属細菌の遺伝子欠損などを行うことに成功し、遺伝子改変技術の基盤が整備された。

本研究課題の遂行により、口腔アクチノマイセス属細菌の歯垢形成における初期付着菌の遺伝学的な働き的一端が初めて明らかになった。また、本菌種を対象にした遺伝子レベルでの研究方法の基盤も整えることができた。本研究課題では、歯垢形成過程の初期に寄与する細菌を中心にした研究を可能にした。このことは、口腔バイオフィルム形成を制御する新たな方法の開発に重要な一助になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- (1) Mashimo C, Nambu T. Variations of nitrate-reducing activity in oral *Rothia mucilaginosa*. *Journal of Oral Tissue Engineering*, 2015; 13:18-26. 査読有. DOI: <http://doi.org/10.11223/jarde.13.18>
- (2) Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Mashimo C. Complete genome sequence of *Rothia mucilaginosa* strain NUM-Rm6536, isolated from the human oral cavity. *Genome announcements*, 2015; 3: pii: e01122-15. 査読有. DOI:

- 10.1128/genomeA.01122-15.
- (3) Nambu T, Yamane K, Maruyama H, Mashimo C, Yamanaka T. Complete genome sequence of *Prevotella intermedia* strain 17-2. *Genome announcements*, 2015; 3: pii: e00951-15. 査読有. DOI: 10.1128/genomeA.00951-15.
- (4) 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*, 2013; 39:44-8. 査読有. DOI: 10.1016/j.joen.2012.08.009. Epub 2012 Oct 13.
- (5) Nambu T, Yamane K, Yamanaka T, Mashimo C, Maruyama H, Yoshida M, Hayashi H, Fukushima H. Identification of disulphide stress-responsive extracytoplasmic function sigma factors in *Rothia mucilaginosa*. *Archives of Oral Biology*, 2013;58:681-689. 査読有. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.017. Epub 2013 Feb 8.
- (6) 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*, 2013; 46:145-54. 査読有. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2012.02099.x. Epub 2012 Aug 17.
- (7) 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. *Bacterial adherence & biofilm*, 2012; 26:61-64. 査読無.
- (8) 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. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 2012; 4:1-5. 査読有. DOI:10.4172/2155-9597.1000160.
- [学会発表] (計 14 件)
- (1) 真下千穂, 円山由郷, 山根一芳, 山中武志, 王宝禮, 南部隆之. Variations of nitrate-reducing activity in oral *Rothia* spp. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 24 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市天王寺区).
- (2) 真下千穂, 南部隆之. 口腔 *Rothia* 属細菌における硝酸還元活性の株間差異についての検討. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2015 年 9 月 12 日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター

- (新潟県・新潟市中央区)。
- (3) 真下千穂, 南部隆之, 円山由郷, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. 口腔 *Actinomyces* 属および口腔 *Rothia* 属細菌用遺伝子改変システムの開発. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2014 年 9 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市博多区)。
- (4) Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Development of genetic engineering systems in *Actinomyces* spp. FEBS EMBO Paris 2014. 2014 年 8 月 30 日, Paris, France.
- (5) 真下千穂, 南部隆之, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. *Actinomyces* 属細菌用クローニング・発現プラスミドの作製. 第 87 回日本細菌学会総会. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014 年 3 月 28 日, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)。
- (6) 南部隆之, 真下千穂, 円山由郷, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. 口腔 *Actinomyces* と *Rothia* は硝酸依存的に *P. gingivalis* を殺す. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014 年 3 月 28 日, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)。
- (7) Mashimo C, Nambu T, Maruyama H, Yamane K, Yamanaka T, Fukushima H. Development of new plasmids for cloning and protein expression in *Actinomyces* spp. The 5th EMBO meeting 2013. 2013 年 9 月 24 日, Amsterdam, the Netherlands.
- (8) 南部隆之, 真下千穂, 山根一芳, 山中武志, 福島久典. 口腔アクチノバクテリアは硝酸依存的に *P. gingivalis* を殺す. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 21 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市北区)。
- (9) 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製と *Actinomyces* 属細菌への応用. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18 日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市美浜区)。
- (10) 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. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18 日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市美浜区)。
- (11) 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
- (12) 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.
- (13) 真下千穂, 山根一芳, 南部隆之, 山中武志, 吉田匡宏, 林宏行, 福島久典. *Actinomyces* 臨床分離株におけるバイオフィーム形成関連遺伝子の網羅的解析. 第 535 回大阪歯科学会例会. 2012 年 10 月 13 日, 大阪歯科大学 (大阪府・枚方市)。
- (14) 真下千穂, 南部隆之, 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, 大阪ガーデンパレス (大阪府・大阪市淀川区).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

真下千穂 (MASHIMO, Chiho)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 80368159