様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　３３９０２
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５９３１３５

研究課題名（和文）歯周病細菌性因子の解明を目指したプラーク由来臨床株の分離とそのゲノム解析

研究課題名（英文）Genome sequencing of clinical strains isolated from dental plaque for investigation of polymicrobial factors in periodontal pathogenesis

研究代表者

林　潤一郎（Hayashi, Jun-ichiro）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：３０３５０９３７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病細菌性因子の全容解明の為には歯垢細菌叢の網羅的研究が求められるが、リファレンス情報の充実は不可欠である。本研究では、歯周病患者の歯垢から新菌種を含む臨床株を分離し、そのゲノム解析を行うこととした。既知菌種との16S相同性が98.7%以下の株を17株分離し、特に相同性の低かった3株については新菌種候補としてゲノムのドラフト配列の決定を行った。平行して、齲蝕病巣由来の既知菌種（B. dentium JCM 1195, S. inopinata JCM 12537, P. denticolens JCM 12538）について全ゲノム配列の決定を行い、公的データベースに登録した。

研究成果の概要（英文）：To unravel the complex polymicrobial mechanisms involved in periodontitis, it is necessary to enhance the reference informations on the public databases for evaluation the pathogenic potential of the whole community. The aim of this study was to isolate clinical strains including novel species from dental plaque of patients with periodontitis and to determine the genome sequences. Seventeen strains that showed 16S homology of less than 98.7% to known species were isolated and three of those with particularly low homology were determined draft genome sequences as candidates of novel strain. On the other hands, complete genome sequencing of three known stains isolated dental caries, B. dentium JCM 1195, S. inopinata JCM 12537 and P. denticolens JCM 12538, was also performed. These strains are classified under the family bifidobaceriaceae. The sequence data for the genome have been deposited in DDBJ/GenBank/EMBL under the accession no AP012326, AP012334 and AP012333, respectively.

研究分野：　歯周病学

キーワード：　歯周病　プラーク細菌叢　臨床株　16SrRNA解析　ゲノム解析

１．研究開始当初の背景

歯周炎は、歯垢（プラーク）に起因する炎症性疾患で、歯の喪失の二大原因の一つである。プラーク中のいわゆる歯周病原細菌の持つ病原性因子の作用により炎症が惹起され、歯周組織の破壊、特に歯根膜と歯槽骨の喪失を特徴としている。この分野の先人の研究で、歯周病原細菌として多くの細菌種が歯周病との関連を指摘されてきた。中でも、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* の３菌種は極めて多くの基礎的、臨床的研究により歯周病の原因菌として指示されている。しかし、プラークは 700 菌種とも 900 菌種とも言われる複雑な細菌叢で構成されており、その全容の解明は未だなされていない。未だ培養できていない未知の菌種が約半数近く存在しており、それらの菌種と疾患との関係は不明である。歯周病の病因を細菌学的に解明するためには、口腔細菌叢の全体像を、未知菌種も含め、より詳細に把握する必要がある。

近年、目覚ましい解析技術の向上により、大規模な核酸塩基配列の決定が可能になった。その技術を細菌叢研究に応用したメタゲノム解析がさまざまな環境の細菌叢について実施され、ヒトの常在細菌叢についても Human Microbiome Project（HMP）等の国際プロジェクトが進行し、その理解に重要な役割を果たしている。研究代表者らのグループは現在、歯周炎患者プラークのメタゲノム解析を進めており、これまでに 5 被験者 7 サンプルについてメタゲノム解析を行った。その結果、約 244 万の予測遺伝子が得られ、そのうちの約 80 万遺伝子についての機能が推定された。それらの機能カテゴリーの比較から、歯周炎患者のプラークでは健常者のプラークと比較して、防御機構のカテゴリーに分類される遺伝子が多いこと、歯肉縁下プラークでは歯肉縁上プラークと比較して、細胞運動性に関する遺伝子が多いことなどが判明した（未発表）。

メタゲノム解析では、得られた塩基配列データの基本解析として公的データベース上の遺伝子情報を参照に相同性検索を行い、その結果から各遺伝子の機能を推定する。したがって、メタゲノム解析の解析精度は、そのデータベースの充実度合いに依存する。研究代表者らのグループで行ったプラーク細菌叢のメタゲノム解析では、得られたメタゲノムリードのうち、公的データベース中の配列情報と有意な配列類似度をもつ割合は約 30%であった。これは腸内細菌の場合が 60%以上であることと比べると、全ゲノム配列解析が実施された口腔細菌の数が極端に少ないことを意味する。従って、タゲノム解析や 16S 解析によって、口腔細菌叢のが関与する疾患の病態モデルの解明するためには、より多くの菌種からのゲノム情報を取得し、公的データベースを充実させる必要がある。このような背景から、研究代表者らは、歯周病に関連した細菌叢から臨床株の生菌分離を行い、全ゲノム解析を実施すると同時に、これまでに培養、同定されていなかった未知の口腔細菌についても新菌種候補として解析することとした。

２．研究の目的

プラークに棲息する細菌の半数は未分離であることから、歯周炎に関わる菌種菌株とその関与因子は、未だその全容が不明である。従って、口腔由来細菌のゲノム解析を行い、その結果を公的データベースに反映させることは、将来的な、歯周病の病因の解明に大いに貢献するものと考える。本研究では、以下の二つの目的で研究を実施した。

（１）　プラーク由来の新菌種の分離

本研究では、プラーク由来の新菌種の分離を含めた臨床株の獲得を１つの目標としている。まず、本研究では、歯周病患者および健常者よりプラークのサンプリングを行い、プラーク細菌の臨床株を生菌分離し、16S 解析により菌種の推定と系統解析を行う。分離された菌株の中で、約 1,400～1,500 bp の 16S 配列が既知の配列との相同性が 98.7%以下の菌株については、性状試験や DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果により、新菌種として提唱する。その菌株は、次世代シークエンス装置を用いて全ゲノム配列を決定する。また、他の環境からの分離が報告されている菌種であっても、これまでに口腔内から分離された報告がない菌種については、分離源の異なる臨床株としてドラフト（概要）配列を決定する。

（２）　既知口腔関連菌種のゲノム解析

本研究の２つ目の目的として、口腔由来の既知菌種や標準株のゲノム解析を実施する。ゲノム配列は個別細菌の性質に関わる研究のみでなく細菌叢を網羅的に解析する研究においても、重要な基礎情報となる。病原性や生物学上重要な機能や特徴を有する菌種だけでなく、系統的に広範囲にわたる種類から遺伝情報を得、それを集積することで、データベースの利用価値は向上する。口腔由来の細菌は分離同定されている既知菌種でも、全ゲノム配列の決定が終了している株は 30%程度と推定される。本研究では、データベースの充実を図るため、これまでに分離された口腔細菌からいくつかの菌株を選択し、全ゲノム配列の決定を行う。

３．研究の方法

（１）プラーク由来の新菌種の分離

①被験者の選択およびインフォームド・コンセント

次の２つのグループから被験者を募集する。

１）歯周病患者：愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、特記すべき全身疾患を有さず、慢性歯周炎患者。

２）健常者：愛知学院大学歯学部附属病院口臭外来、成人矯正外来等を受診し、特記すべ

き全身疾患を有さない、歯周組織健常者。インフォームド・コンセントは、説明用の文書を用いて口頭による説明を行う。同意は文書で得る。

②サンプリング

歯周病患者からは、刃部を鈍化させたグレーシータイプキュレットを用い、歯周ポケット最深部の歯肉縁上プラークと歯肉縁下プラークを採取する。健常者からは、最も沈着量の多い部位の歯肉縁上プラークを採取する。採取したサンプルは、ただちに嫌気パック（アネロパック、三菱ガス化学）し、嫌気状態にて冷蔵（4℃）にて輸送する。それらのサンプルは、24 時間以内に培養あるいは 20%（v/v）グリセロールを用いた凍結処理（Morita et al., Microbes Environ, 2007）を行う。

③生菌分離

各サンプルは、事前に窒素ガスでバブリングにより脱気した生理食塩水によって 10^{-4} まで段階希釈する。各段階希釈液 100 μl を BL 寒天培地と EG 寒天培地に塗沫し、37℃で 48 時間、嫌気培養する。

④コロニー計測、純化継代培養、16S 解析

形成されたコロニーを計測し、新たな各寒天培地を用いて純化する。純化したコロニーを用いて、16S 配列のコロニーPCR を行い、精製した鋳型 16S について、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI 3730 シークエンサー（共に Applied Biosystems）にて塩基配列の決定を行う。得られた 1,500 bp 以上の配列について相同性検索と系統解析を行う。

⑤新菌種候補の解析

既知菌種との16S相同性が98.7%未満の菌株については新菌種候補として、詳細な性状試験とドラフト配列の決定などにより新菌種であるかについての検討を行う。新菌種と推定された菌株については、ゲノム DNA の抽出を行ない、ショットガン法による全ゲノム配列の決定を行う。

⑥既知菌種の分離株への対応

既知菌種との16S相同性が98.7%以上の菌株のうち、これまで口腔からの分離の報告がない臨床株については、ドラフト配列の決定を行う。得られた塩基配列データを可能な限りアッセンブルした後、全ゲノム配列の決定している株のデータをもとにコンティグ配列の並び順を推察し、ドラフト配列を生成する。

⑦新菌種候補の全ゲノム解析

DNA 配列の決定には、パイロシースエンス法を応用した次世代シークエンサーを用いる。リダンダンシー（冗長度）は 10 とする。専用ソフトウェアにて配列のアッセンブリを行い、コンティグ配列を得る。ギャップ領域はクローニングして、直接、サンガー法にて配列の決定を行い、最終的に制度の高い完成配列を得る。

⑨データベース登録

本研究で得られた DNA 配列は、公的データベースに登録し、リファレンス情報として利用できるようにする。

（２）既知口腔関連菌種の全ゲノム解析

①全ゲノム解析を行う細菌株

以下の 3 菌種について全ゲノム解析を行う。

１）*Bifidobacterium dentium* JCM 1195^{T}

２）*Scardovia inopinata* JCM 12537^{T}

３）*Parascardovia denticolens* JCM 12538^{T}

②全ゲノム解析

ゲノム DNA の抽出を行ない、ショットガン法による全ゲノム配列の決定を行う。１）の⑦の通りに実施する。

４．研究成果

（１）プラーク由来の新菌種の分離

１）サンプリングおよび生菌分離

４名の歯周病患者よりプラークを採取し、生菌の分離を行った。健常者からのサンプリングは実施しなかった。分離作業により合計で 60 株の継代可能な菌株を分離、純化した。

２）16S 配列の相同性検索

分離した 60 株について 16S 解析を行った。コロニーPCR にて増幅した 16S 遺伝子を鋳型にして、塩基配列の決定を行い、その配列データを元に、相同性検索を行ったところ、既知菌種と 98.7%以下の相同性しか持たない菌株が 17 株得られた。これらの株のうち特に相同性が低い３株を新菌種候補として以後の解析を行うこととした。

３）完全 16S 配列の決定

得られた 3 株については 16S 遺伝子について完全な配列の決定を行った。その結果、２株は *Streptococcus* 属、１株は *Veillonera* 属の近縁種であると推定された。

４）性状試験と全ゲノム解析

新菌種候補 3 株について、全ゲノムの塩基配列の決定を行うこととし、まず、ショットガン法にてドラフト配列を得た。現在、全ゲノム配列の決定と併せて性状試験の実施中である。解析は終了しておらず、研究期間中に新菌種として配列情報をデータベースに登録することはできなかった。

（２）既知口腔関連菌種の全ゲノム解析

１）本研究で解析を行った菌株

本研究では *B. dentium* JCM 1195^{T}、*S. inopinata* JCM 12537^{T} 、*P. denticolens* JCM 12538^{T}について全ゲノム解析を行った。これらの菌種はいずれもヒトの齲蝕病巣から分離された菌株で、かつては *Bifidobacterium* 属に分類されていた近縁種である。*Bifidobacterium* 属は腸内細菌として知られるが、*B. dentium* JCM 1195^{T}は、腸内のみならず、活動性の高い齲蝕病巣からも検出され、齲蝕の病原性と関連すると考えられている。BANA 分解活性を示す酵素を産生することから、歯周病との関連も考えられている。*S. inopinata* JCM 12537^{T}は、齲蝕病巣やプラーク中から検出される他、胃の低酸症患者からも分離したとの報告がある。*P. denticolens*

JCM 12538^{T}は、齲蝕病巣やプラーク中からだけでなく、近年ではインプラント周囲炎病巣からの分離も報告されている。

２）*B. dentium* JCM 1195^{T}のゲノムの概要

B. dentium JCM 1195^{T}のゲノムは、プラスミドを含まない環状染色体からなり、全塩基配列のサイズは 2,635,669 bp であった。１カ所の clustered regularly interspaced short palindromic repeats（CRISPR） 領域とその上流に５つの CRISPR 関連遺伝子が見られた。タンパク質をコードしていると予想される遺伝子は 2,141 個であった。それらのうち 1307 個は *B. adolescentis* ATCC15703^{T}に保存されており、残りの 834 個の遺伝子では、炭水化物の利用に関する遺伝子クラスターが多数含まれていた。

３）*S. inopinata* JCM 12537^{T}のゲノムの概要

S. inopinata JCM 12537^{T}のゲノムは、プラスミドを含まない環状染色体からなり、全塩基配列のサイズは 1,797,862bp であった。１カ所の CRISPR 領域とその上流に 3 つの CRISPR 関連遺伝子が見られた。このゲノムサイズは *bifidibacterium* 属の菌種に比べて小さかった。

４）*P. denticolens* JCM 12538^{T}のゲノムの概要

P. denticolens JCM 12538^{T}のゲノムは、プラスミドを含まない環状染色体からなり、全塩基配列のサイズは 1,890,857 bp であった。１カ所の CRISPR 領域とその上流に７つの CRISPR 関連遺伝子が見られた。タンパク質をコードしていると予想される遺伝子は 1,548 個であった。*P. denticolens* JCM 12538^{T}は、*Bifidobacteriaceae* 科の系統樹上で *S. inopinata* JCM 12537^{T}と近縁の菌株であるため、両者のゲノムを比較したところ、1,070 個の遺伝子が保存されていた。

５）公的データベースへの登録

これらの菌株のゲノム配列情報は DDBJ/GenBank/EMBL に登録された。アクセッション番号は、*B. dentium* JCM 1195^T、*S. inopinata* JCM 12537^T 、*P. denticolens* JCM 12538^{T}の順でそれぞれ、AP012326、AP012334、AP012333 である。

（３）研究成果のまとめ

本研究で第一の目的とした新菌種臨床株の分離は、候補株を 3 株分離し、ゲノム配列の解析を開始したが、研究期間中に解析が終了しなかった。しかし、同時平行で解析を進行していた既知菌種のゲノム解析は、3 菌株のゲノム解析を終了した。これらの配列情報は、系統分類や臨床的解析など、今後のこれらの菌株の研究において、極めて有用な情報となると思われる。

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６件）

① Iwamura Y, Hayashi J, Sato T, Murakami T, Kikuchi T, Fujimura T, Takahashi E, Sasaki Y, Sato S, Okada K, Aino M, Noguchi T, Shimazaki Y, Mitani A, Fukuda M.: Assessment of oral malodor and tonsillar microbiota after gargling with benzethonium chloride: a randomized controlled clinical study. *J Periodont Res* 投稿中

② Toh H, Hayashi J, Oshima K, Nakano A, Takayama Y, Takanashi K, Morita H, Hattori M.: Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium dentium* Strain JCM 1195T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc.* 3(2): e00284-15, 2015

③ Oshima K, Hayashi J, Toh H, Nakano A, Omori E, Hattori Y, Morita H, Honda K, Hattori M.: Complete Genome Sequence of *Scardovia inopinata* JCM 12537T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc.* 3(3): e00481-15, 2015

④ Oshima K, Hayashi J, Toh H, Nakano A, Shindo C, Komiya K, Morita H, Honda K, Hattori M.: Complete Genome Sequence of *Parascardovia denticolens* JCM 12538T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc.* 3(3): e00485-15, 2015

⑤ Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y, Kubo K, Kamei H, Kikuchi T, Mitani A, Hayashi J, Nishihara T, Maeda H, Noguchi T.: Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in interleukin-1 receptor antagonist knockout mice. *Infect Immun.* 82(5): 1904-1913, 2014

⑥ Kamei H, Ishihara Y, Fuma D, Niwa T, Kamiya Y, Yokoi T, Suzuki M, IzawaA, Mizutani H, Hayashi J, Sakaki Y, Noguchi T, Kojima T.: Interleukin-1 receptor gene variants are associated with aggressive periodontitis in the Japanese. *Arch Oral Biol.* 59(7): 756-763, 2014

〔学会発表〕（計２件）

① 岩村侑樹，福田光男，林潤一郎，佐藤聡太，藤村岳樹，高橋枝里，佐々木康行，村上多恵子，佐藤孝至，嶋﨑義浩，三谷章雄：唾液および咽頭部細菌叢の T-RFLP 法による解析データと口臭との関連．第 5 回日本口臭学会学術大会（大阪）2014 年 7 月

② 岩村侑樹，福田光男，三谷章雄，林潤一郎，佐藤聡太，高橋伸行，藤村岳樹，

岡田康佑，村上多惠子，佐藤孝至，嶋崎義浩，野口俊英：T-RFLP 法による咽頭領域の細菌叢解析と口臭との関連. 第57 回春季日本歯周病学会　(岐阜) 2014 年 5 月

６．研究組織

(1)研究代表者
林　潤一郎（HAYASHI, Jun-ichiro）
愛知学院大学・歯学部・講師
　研究者番号：30350937

(2)研究分担者
森田　英利（MORITA, Hidetoshi）
麻布大学・獣医学部・教授
　研究者番号：70957294

石原　裕一（ISHIHARA, Yuichi）
松本歯科大学・歯学部・教授
　研究者番号：50261011

亀井　英彦（KAMEI, Hidehiko）
愛知学院大学・歯学部・講師
　研究者番号：50421243

(3)連携研究者
服部　正平（HATTORI, Masahira）
東京大学・新領域創成科学研究科・教授
　研究者番号：70175537