

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861847

研究課題名(和文)人類進化モデルを用いた口腔細菌叢の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of oral bacterial flora using human evolution model

研究代表者

宮之原 真由(Miyahara, Mayu)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：70460186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チンパンジー口腔にはミュータンスレンサ球菌群の*S. troglodytae*および*S. dentirosetti*が存在し、さらにミチスグループの新菌種を*S. panodentis*と命名した。研究代表者は*S. troglodytae* TKU31株の全遺伝子を解析し、*S. mutans*と類似の病原遺伝子を持つ事を明らかにした。ピロシーケンス法ではチンパンジー口腔細菌叢はヒトと類似のコアマイクロバイームを持つことが明らかとなった。チンパンジーの口腔診査の結果では、う蝕が少なく、歯垢の蓄積が顕著であることを考慮すると、人類のう蝕起源は砂糖摂取が重要な因子である可能性が改めて示唆された。

研究成果の概要(英文)：We collected the dental plaque by the sterilized tooth brush, and analyzed them by the culture and metagenomic methods. As the results, we found two similar bacteria (*Streptococcus troglodytae* and *S. dentirosetti*) to *S. mutans* and *S. sobrinus* as the group of mutans streptococci. Moreover, we found a new species of the group of mitis streptococci, and named as *S. panodentis*. We analyzed whole genome sequence of the *S. troglodytae* TKU31, and these pathogenic genes were similar to those of *S. mutans*. We found the core microbiome of the oral flora in chimpanzees was similar to that in humans. Momoi et al., described that the dental caries was few, but huge accumulation of the dental plaque in the oral cavity of chimpanzees. Consequently, we confirmed an important factor for the human dental caries progression could be the consumption of the sugar, as previously described. We also supposed to be the oral microbiota coevolve with their host.

研究分野：予防歯科学

キーワード：人類進化モデル チンパンジー 口腔微生物叢 ピロシーケンス法 ホールゲノムシーケンス ミュータンスレンサ球菌 う蝕 歯周疾患

1. 研究開始当初の背景

う蝕(虫歯)は農耕文明と共に起こり、ミュータンスレンサ球菌と砂糖摂取により起こる文明病とも考えられ、その起源を推定することは重要と思われる(Gibbons, A, How sweet it is; Gene show how bacteria colonized human teeth, Science 2013)。ヒトのう蝕病原菌である *S. mutans* の遺伝子と、他の動物から得たミュータンスレンサ球菌群の遺伝子を比較、解析した結果、その起源が1万年前と計算され、糖、および炭水化物の摂取により *S. mutans* が出現したとする説もある(Comeji, OE, et al., Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*, Mol. Biol. Evol. 2012)。

口腔内細菌は、共生、拮抗しながら生息しており、複雑な細菌叢を形成し、口腔細菌叢における常在細菌のバランスは歯周組織の健康状態と密接な関連があると考えられている(竹下徹, 口腔フローラの常在細菌構成バランスは口腔の健康状態と関連する. J. Oral Biosci, 2011)。

ヒト口腔細菌の菌種は現在400種類ほどあると考えられていたが、近年、ピロシーケンシング法を用いたメタゲノム解析では、未知の細菌が多く存在することが報告され(Keijser B. J. et al., Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults, J. Dent. Res, 2008.)。これら細菌の口腔疾患との関連および未知の細菌の培養による検出が、今後の課題として持ち上がってきた。

チンパンジーはヒトと最も近縁の動物で、両者を比較することにより、人類の将来を予測する「人類進化モデル」として様々な分野の研究が行われている。京都大学霊長類研究所との共同研究で種々の歯科領域の研究プロジェクトを組み、本課題を検討したい。

2. 研究の目的

チンパンジー口腔細菌を調べ、ミュータンスレンサ球菌群の新菌種(*S. troglodytae*)およびミュータンス連鎖球菌の選択培地に生育する細菌種を調べ、チンパンジー11個体中4個体から *S. troglodytae*, 3個体から *S. dentirousetti* が分離され、論文に発表した(Microbiol. Immunol. 2013, 57, 359)。しかし、ミュータンス菌が存在するにも係らず重篤なう蝕は認められなかった。本研究では、(1)チンパンジーの口腔細菌叢を培養不可能な口腔細菌を含め、ピロシーケンシング法を用いてメタゲノム解析し、構成菌種、量的比率を網羅的に調べる。(2)従来用いられた培養法により、分離された細菌の生化学的性状および遺伝子解析を行い、う蝕病原性

を調べる。一方、重篤なう蝕は認められなかった現象から、ヒトおよび他の動物の口腔細菌叢、口腔状態および社会歯科学的背景からう蝕に係わる因子について検討し、う蝕予防に役立てたい。

3. 研究の方法

京都大学霊長類研究所で飼育されているチンパンジーは年間に一度、鶴見大学歯学部探索歯学講座および保存修復学講座が、ボランティアとして全身麻酔下でチンパンジーの口腔内診査を実施し、健康管理をしている。

(1)ピロシーケンシング法によるチンパンジー口腔細菌叢の解析

チンパンジー5個体について口腔内診査と同時に滅菌歯ブラシを用い、ブラッシング歯垢を採取した。歯垢はメタゲノム解析をするため、プロメガ自動DNA抽出装置を用いてDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子のV1-V3領域をコードするバーコードプライマーを用いて増幅した。Roche 454 ピロシーケンサーにより遺伝子配列を解析した。得られたデータはキメラ配列を除外した後、CD-HIT program を用い、クラスター分析し、EZ-Cloudにより菌種を同定した。(2) *S. troglodytae* TKU31 の全遺伝子解析

チンパンジー口腔から分離された *S. troglodytae* TKU31 株を対象とし、プロメガ Genomic DNA extraction kit を用いてDNAを抽出した。Roche GS FLXを用いて菌体全遺伝子をピロシーケンシングした。得られたドラフト scaffold 配列からアセンブル作業と Gap closing により全ゲノム配列を決定した。MiGAP (DDBJ)によりアノテーションし、Clustal W および BLAST により他のレンサ球菌遺伝子と比較した。

(3)新菌種の同定

ミュータンス連鎖球菌の選択培地に生育する細菌を調べ、16S rRNA 遺伝子が既知の細菌と3%以上異なるものを新菌種と考え、詳細に細菌の生化学的性状およびハウスキーピング遺伝子の解析を行った。クラスター分析およびEZ-Cloudにより分類学的位置を決定した。

4. 研究成果

(1)ピロシーケンシング法によるチンパンジー口腔細菌叢の解析

5個体より平均 419.8 ± 22.9 OTUs が得られた。Chao1, Shannon, Simpson および good lib. coverage の平均はそれぞれ、 617.5 ± 77.2 , 4.95 ± 0.19 , 0.016 ± 0.007 , 0.96 ± 0.08 であった。フローラを構成する菌種はチンパンジーとヒトでは類似し、

最も優占する Phylum は Proteobacteria で 42.9%、次いで Firmicutes が 22.9%、Bacteroides が 18.5%、Fusobacteria が 11.1%、Actinobacteria が 3.0% であった。その他、SR1, TM7, Synergistetes が 0.9, 0.7, 0.02% であった。同様の方法で属 (Genus) レベルでヒト (n=1) と比較検討すると、チンパンジーでは *Neisseria*、*Fusobacteria*、*Capnocytophaga*、*Aggregatibacter* が多く、*Streptococcus* が少なかった (図 1)。

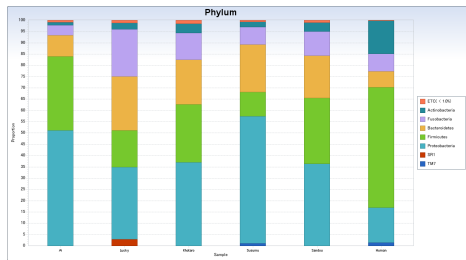


図 1. Phylum レベルでのチンパンジーおよびヒトの口腔細菌叢

(2) *S. troglodytae* TKU31 の全遺伝子解析

ミュータンスレンサ球菌の新菌種を見つけ、*S. troglodytae* と命名し Int J Syst Evol Microbiol. (2013) に発表した。本研究はこの菌の全遺伝子を調べ、ヒトう蝕病原菌の *S. mutans* と比較した。その結果、*S. troglodytae* の遺伝子は、全長 2,097,874 bp、DNA GC 含量は 37.18% であった。アノテーションの結果、CDS は 2,082 で、*S. mutans* の遺伝子と非常に類似していた。病原因子遺伝子として、グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (gtfB, gtfC および gtfD)、グルカン結合タンパク遺伝子 (gbpA, gbpB, gbpC および gbpD) を持っていた。セロタイプを決定する rhamnose-glucose polysaccharide 遺伝子は *S. mutans* LJ23 株 (セロタイプ k) と最も類似していた (図 2)。

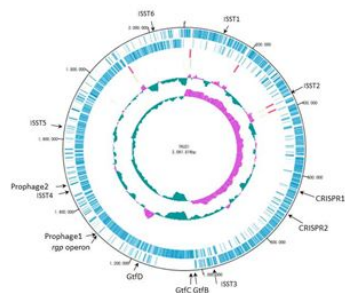


図 2. *Streptococcus troglodytae* TKU31 の全遺伝子

(3) ミチスグループに属する新菌種を発見し、*Streptococcus panodentis* と命名し

た (Microbiol. Immunol. 2015,)。ミチスグループに属する細菌は、病原性がなく、むしろ病原菌の侵入を防ぐ働き of 口腔常在菌から病原性のある肺炎レンサ球菌が含まれ、今後この菌の遺伝子を調べることにより、ミチスグループの中で唯一病原性を示す *S. pneumoniae* の病原性獲得のメカニズム解明に寄与するものと思われる (図 3)。

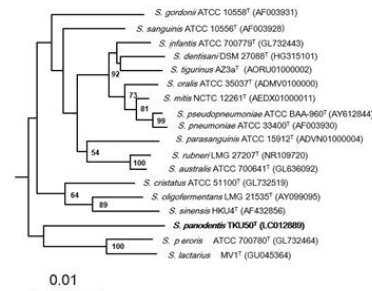


図 3. 16S rRNA 遺伝子による *S. panodentis* の分類学的位置

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 2 件)

Okamoto M, Naito M, Miyano-hara M, Imai S, Nomura Y, Saito W, Momoi Y, Takada K, Miyabe-Nishiwaki T, Tomonaga M, Hanada N. Complete genome sequence of *Streptococcus troglodytae* TKU31 isolated from the oral cavity of a chimpanzee (*Pan troglodytes*). Microbiol Immunol 2016; 60: 811-16、査読有、DOI:10.1111/1348-0421.12453.

Okamoto M, Imai S, Miyano-hara M, Saito W, Momoi Y, Nomura Y, Ikawa T, Ogawa T, Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Watanabe A, Watanabe S, Hayashi M, Tomonaga M, Hanada N. *Streptococcus panodentis* sp. nov. from the oral cavities of chimpanzees. Microbiol Immunol 2015; 59: 526-32、査読無、DOI:10.1111/1348-0421.12290.

(学会発表)(計 4 件)

Masaaki Okamoto, Mayu Miyano-hara, Susumu Imai, Yoshiaki Nomura, Wataru Saito, Yasuko Momoi, and Nobuhiro Hanada. Pyrosequencing analysis of the oral flora in chimpanzee (*Pan troglodytes*) 2016 Annual Meeting of the Korean Academy Preventive Dentistry and Oral Health October 29th - 30st 2016, Seoul National University,

Global Convention Plaza, Seoul,
(Korea)

今井奨、岡田彩子、岡本公彰、宮之原真由、
太田一正、桃井保子、友永雅乙、花田信弘、
ヒトおよびチンパンジー由来ミュータンス
レンサ球菌のバイオフィルム形成能とエナ
メル質脱灰能の比較、第30回日本バイオ
フィルム学会学術集会、2016年7月2日第
一三共本社ビル10F会議室(東京都中央区)

岡本公彰、宮之原真由、今井奨、野村義明、
齋藤涉、桃井保子、花田信弘、チンパンジー
口腔微生物叢の解析、第65回口腔衛生学会
2016年5月27日~29日、東京医科歯科大
学 M&D タワー(東京)

Susumu Imai, Ayako Okada, Msaaki Okamoto,
Mayu Miyanohara, Kazumasa Oota, Yoshiaki
Nomura, Yasuko Momoi, and Nobuhiro Hanada,
Biofilm formation and demineralization by
mutans streptococci from humans and
chimpanzees, 第63回 JADR 学術大会, 2015
年10月30日~31日、福岡国際会議場(福
岡県福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮之原 真由 (MIYANOHARA, Mayu)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号: 70460186