

## 静置培養時と振盪培養時の *Rothia mucilaginosa* の遺伝子発現の比較

古 森 賢 山 根 一 芳 王 宝 禮  
ふる もり ただし やま ね かず よし おう ほお れい

抄録：口腔感染症から分離される細菌には，sucrose 非依存性に菌体外マトリックスを産生する株が存在する。これらの細菌の産生する菌体外マトリックスは貪食抵抗因子として働くだけでなく，菌体を周囲の環境から保護し，疾患の慢性化，難治化に重要な役割を果たすことが分かっている。我々はこれまでに数回の根管治療にもかかわらず，持続的に単一の細菌種が分離される難治性根尖性歯周炎の病巣から *Rothia mucilaginosa* DY-18 株（DY-18 株）を分離し，この菌株が菌体外マトリックスを産生することで治療に抵抗して病巣で長期に生存することを明らかにしてきた。本研究では DY-18 株のバイオフィーム形成について更に詳細に検討し，その遺伝学的な背景を明らかにすることを目的に，浮遊状態の細胞と，バイオフィーム形成状態の細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ分析した。

培養菌液の粘度から EPS の産生量を経時的に測定すると，種菌接種 30 時間後から 42 時間後まで粘度が著しく上昇していた。また，種菌接種 36 時間後の振盪培養した浮遊状態と，静置培養したバイオフィーム形成状態の培養菌液の粘度を比較したところ，振盪培養では粘度上昇が認められず，静置培養時とは菌体外マトリックスの産生量に大きな差があることが示された。そこで DY-18 株のゲノム情報を基にマイクロアレイをデザインし，浮遊状態とバイオフィーム形成状態の細胞における遺伝子の発現量を測定した。その結果，バイオフィーム形成状態で DNA polymerase III subunit beta, signal transduction histidine kinase, molecular chaperone をコードする遺伝子が有意に発現上昇していることが明らかになった。これらの遺伝子は，DY-18 株のバイオフィーム形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

### 緒 言

根尖性歯周炎は，細菌や真菌の残存が原因となって起こる疾患で，治療のためには残存する病原微生物のコントロールが鍵となる。<sup>1</sup> 特に通常の歯内治療を施しても症状がなくなる難治性根尖性歯周炎の症例の多くは，何らかの原因で根管内および根尖部の感染制御が困難な状態になっている。感染制御が困難になる原因の 1 つに，感染している細菌の環境抵抗性が挙げられる。「チェアーサイド嫌気培養システム」を用いて難治性根尖性歯周炎病巣を検査すると，難治症例からはほぼ全症例で細菌あるいは真菌が分離され，特に治療に抵抗した残存微生物として *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus oralis*, *Pseudomonas aeruginosa* (以下，*P. aeruginosa* と略す) などが単独または優勢に検出されている。<sup>2</sup> これらの環境抵抗性が強い残存菌

に加え，難治性根尖性歯周炎病巣には，菌体外多糖を産生してバイオフィームを形成する細菌が存在する。数回の根管治療にもかかわらず，細菌検査の結果が陰性にならず，疼痛，腫脹を繰り返す根尖性歯周炎の病巣から分離した細菌を走査型電子顕微鏡で観察すると，菌体表面にバイオフィーム形成菌に特徴的な網目様構造物が存在する。<sup>3-5</sup> 近年のメタゲノム解析によると，根尖性歯周炎の病巣には，これまで考えられてきたような特定の細菌種ではなく，症例毎に異なる細菌が存在しており，残存する細菌は Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes など広い taxa に亘っていることが明らかになっている。<sup>6</sup> これらのことから残存細菌の効率的な除去のためには，細菌の種類のみならず，表現型に着目した定着メカニズム解明が必要になっている。

*Rothia mucilaginosa* (以下，*R. mucilaginosa* と略す) は旧名を *Stomatococcus mucilaginosus* といい，

2000年にCollinsら<sup>7</sup>により *Rothia* 属に再分類された細菌である。通性嫌気性グラム陽性の集塊状、二連を示す球菌で、血液寒天培地上では白色または半透明の非溶血性のコロニーを形成する。生化学性状が *Streptococcus* 属や *Staphylococcus* 属、*Enterococcus* 属の細菌に類似しているが、分子生物学的手法により、これらの細菌との鑑別が比較的容易にできるようになったため、多くの感染症でも見出されるようになってきている。<sup>8</sup> 口腔内及び上気道部の常在菌であると同時に、<sup>9, 10</sup> 心内膜炎、<sup>11</sup> 髄膜炎、<sup>12</sup> 腹膜炎<sup>13, 14</sup> などの感染症を引き起こすだけでなく、*cystic fibrosis* などの肺疾患、<sup>15</sup> 菌血症からの分離も報告される日和見感染症の病原体である。<sup>16~18</sup> 我々はこれまでに骨破壊が著しい難治性根尖性歯周炎患者の病巣で、持続的に純培養状態で分離された菌株を、16 S ribosomal RNA の配列を基に *R. mucilaginosa* と同定し、DY-18 株（以下、DY-18 株と略す）と名付けてその性状を報告した。<sup>19</sup> また、DY-18 株は菌体外マトリックスとしてガラクトース、マンノース、ラムノース、グルコースを主成分とする菌体外多糖を産生する。<sup>20</sup> この菌体外多糖はバイオフィルムの重要な構成要素になっているだけでなく、本菌の病原性に深くかかわっている。本菌株は *Rothia* 属としてははじめて全ゲノムの配列が決定された菌株で（Gen Bank/EMBL/DBJ database, accession number: NC\_013715）、pyrosequencing 法によるホールゲノムシーケンシングから、本菌のゲノムは、長さが 2.2 Mbp、GC 含量が 59.6% の環状 DNA で、CDS の予測とアノテーションにより、そこには 1,900 個余りの機能遺伝子がコードされていることが分かっている。<sup>21</sup>

本研究では、DY-18 株のバイオフィルム形成について詳細に検討し、その遺伝子発現をマイクロアレイ解析することで、根尖性歯周炎病巣に残存する細菌のバイオフィルム形成にかかわる遺伝子を同定した。

## 実験材料および方法

### 1. 供試菌

大阪歯科大学口腔治療学講座の吉田らが難治性根尖性歯周炎病巣から分離し、講座で保存している DY-18 株<sup>19</sup> を実験に供試した。供試菌の使用に際しては、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存している DY-18 株を、5% 綿羊脱線維血と 0.5% yeast extract (Difco, Detroit, MI, USA) を添加した trypticase soy agar (TSA-blood; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) に塗抹し、好気条件下で培養した。各実験にはグラム染色性、形態を確認し

て使用した。

### 2. 走査型電子顕微鏡

Trypticase soy agar without dextrose (BBL Microbiology Systems) 上で発育した DY-18 株のコロニーを 0.1 M の phosphate buffer saline (ヤトロン, 東京; 以下、PBS と略す) で洗浄し、ガラス紙 (GA 55, Toyo Roshi, 東京) に固着させた。2% glutaraldehyde (和光純薬工業株式会社, 大阪市) で 2 時間前固定後、PBS で洗浄した。前固定した試料を 1% osmic acid (和光純薬工業株式会社) で  $4^{\circ}\text{C}$ 、1 時間後固定し、PBS で洗浄後、通法に従って上昇エタノール系列で脱水した。ついで 2-methyl-2-propanol (和光純薬工業株式会社) を用いて凍結乾燥 (ID-2 型凍結乾燥装置, エイコー・エンジニアリング, 東京) 後、白金パラジウムで 10 nm の金属コーティング (E-1030 イオンコーター, 日立製作所, 東京) を施し、走査型電子顕微鏡 (S-4800 型, 日立製作所) を用いて観察した。

### 3. 静置培養と振盪培養

TSA-blood 上で発育した DY-18 株を trypticase soy broth (TSB; BBL Microbiology Systems) に接種して 24 時間好気培養した。培養菌液を 1/200 の割合で新たな TSB に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  で静置して培養したものを静置培養菌液、Bio-Shaker (BR-3000 LF, Taitec, 大阪市) を用いて内容液が十分に攪拌される速度である毎分 110 回で振盪して培養したものを振盪培養菌液とした。

### 4. 培養菌液の粘度測定

培養菌液の粘度は Automated micro-viscometer (Anton Paar, Graz, Austria) を用いて 6 時間毎に測定した。測定は粘度計の取扱説明書に基づき、各サンプルで 5 回測定した平均をサンプルの粘度とした。各条件で独立した 3 つのサンプルを準備し、菌接種直後の菌液 (0 時間) との検定には Student's *t*-test を用いた。細菌未接種の培地の粘度および静置培養時と振盪培養時の菌液粘度は、菌接種 36 時間後に同様に測定した。

### 5. メッセンジャー RNA の抽出

菌接種 36 時間後の静置培養菌液と振盪培養菌液から  $12,000 \times g$ 、5 分間の遠心 (CR 21, 日立製作所) で菌体を回収し、RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) を室温で 5 分間作用させた。再び  $12,000 \times g$ 、5 分間の遠心ののち、20 mg/mL lysozyme, 0.2 mg/mL N-acetyl muramidase, 1 mg/mL protease K を含む細胞溶解液に懸濁し、室温で 30 分間作用させた。溶解菌液からの RNA の精製には RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、Gene Quant pro (GE Healthcare

Life Sciences, 東京) を用いて十分な量とクオリティーの RNA が精製できていることを確認した。RNA は 2 回の独立した培養実験 (Experiment 1 と 2) から回収し、マイクロアレイ解析に供した。

## 6. マイクロアレイ解析

DY-18 株の custom oligonucleotide microarray は、The Institute for Genomic Research の Microbial Database 上に登録されている、DY-18 株の遺伝子情報を基に Maskless Array Synthesizer (Roche NimbleGen Systems, Madison, WI, USA) を用いて作製した。データベース上の 1992 の open reading frames (ORFs) の配列から、60 mer のプローブを 1 ターゲットあたり 9 つデザインし、1 プローブあたり 4 つのテクニカルレプリケートを設けてアレイ上に固定した。抽出した各サンプルの RNA から Invitrogen Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Roche NimbleGen Systems) と Random Hexamer Primers (Roche NimbleGen Systems) を用いて逆転写反応後、cDNA を NimbleGen One-Color Labeling Kit (Roche NimbleGen Systems) を用いて Cy3 dyes でラベルした。ラベルした cDNA を NimbleGen's Hybriwheel Hybridization Chambers (Roche NimbleGen Systems) を用いて、アレイ上に 42°C, 20 時間の条件でハイブリダイズした。励起波長 532 nm における蛍光シグナルは NimbleGen MS200 Microarray Scanner (Roche NimbleGen Systems) を用いて画像化し、NimbleScan v 2.6 software (Roche NimbleGen Systems) を用いて蛍光強度を解析した。

## 7. 発現遺伝子の解析

### 1) 統計処理

蛍光強度は Roche NimbleGen Microarray soft wears (Roche NimbleGen Systems) を用いて Robust Multichip analysis algorithm でノーマライゼーションしたのち、振盪培養時の遺伝子発現量と静置培養時の遺伝子発現量を比較した。発現の比較には Student's *t*-test を用い、Bonferroni 補正後  $p \leq 0.05$  だったものを有意差ありとした。有意差のあったターゲット中、2 つの繰り返し実験間で共通して 1.2 倍以上変化したものをインフォマティクス解析に供した。

### 2) インフォマティクス解析

発現量に変化のあった遺伝子は NCBI BLAST server (NCBI BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いた BLAST 解析で、その機能を予測した。さらに詳細な機能予測は、European Bioinformatics Institute の European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) が提

供する Pfam データベース (<http://pfam.xfam.org/>) を用いてドメイン解析した。

## 実験結果

### 1. 走査型電子顕微鏡像

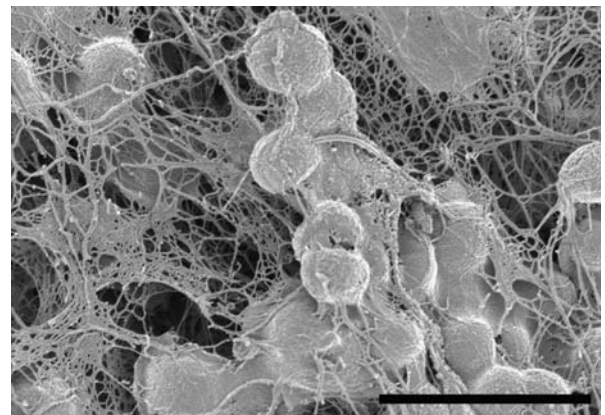
DY-18 株を走査型電子顕微鏡で観察すると、菌体周囲にバイオフィルムを形成する細菌によくみられる網目様構造物が観察された (Fig. 1)。

### 2. 培養菌液の粘度の経時的変化

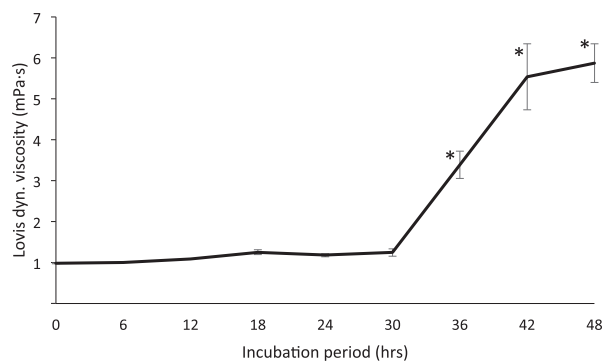
静置培養している DY-18 株の培養菌液の粘度を 6 時間毎に測定した結果、菌接種後 30 時間までは培養菌液の粘度に変化はなく、30 時間から 42 時間にかけて急激に上昇し、42 時間後には約 6 倍に達した (Fig. 2)。

### 3. 静置培養時と振盪培養時の培養菌液の粘度の比較

菌接種 36 時間後の静置培養時と振盪培養時の培養菌

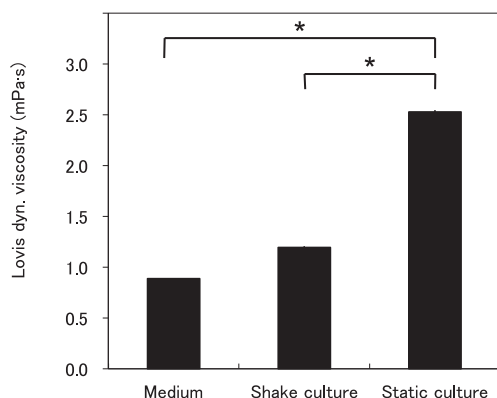


**Fig. 1** Scanning electron micrograph of *Rothia mucilaginosa* strain DY-18 showing dense meshwork-like structures around the cells (Bar=3  $\mu$ m).



**Fig. 2** Viscosity of spent culture media of strain DY-18. Dramatic increase was observed from 30 to 42 hours. Statistical analysis was performed with the Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ), with the bars representing one standard deviation.

液の粘度を比較したところ、静置培養時には培養菌液の粘度が上昇していた。しかし、振盪培養時の菌液の粘度は、菌未接種の培地と大きな変化はなく、静置培養時にみられるような培養菌液の粘度上昇が認められなかった (Fig. 3).



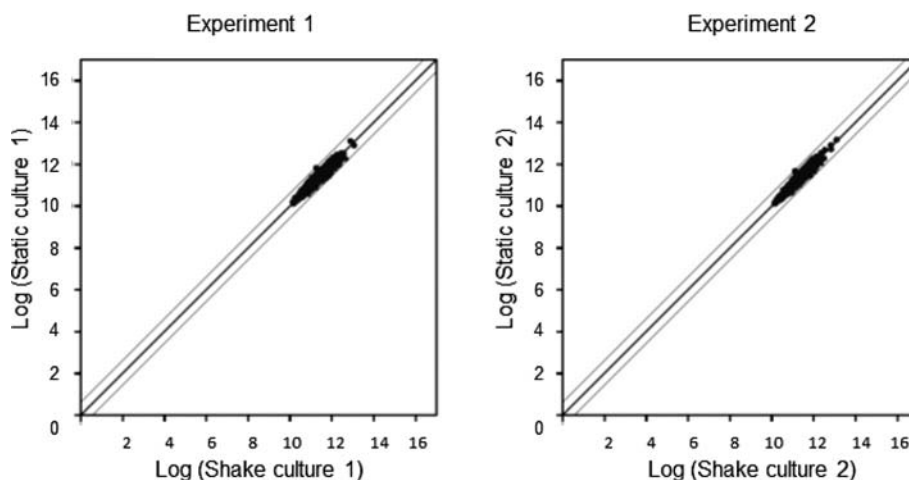
**Fig. 3** Viscosity of spent culture media obtained from static culture was significantly higher than that from shake culture or medium without bacteria. Statistical analysis was performed with the Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ), with the bars representing one standard deviation.

#### 4. マイクロアレイ解析

振盪培養時と静置培養時の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて比較したところ、Experiment 1 では 26, Experiment 2 では 29 の遺伝子に蛍光強度の有意な差が認められた (Fig. 4). その中で 2 つの実験間で共通して変化があり、その変化量が 1.2 倍以上のものは、RMDY18\_00020, 00350, 16800, 08300 の 4 遺伝子であった (Table 1).

#### 5. 遺伝子の機能予測とドメイン解析

変化の認められた 4 遺伝子の機能を BLAST 解析したところ、発現が上昇した遺伝子として DNA ポリメラーゼ遺伝子、シグナルタンパク、分子シャペロンが、減少した遺伝子としてリボタンパク合成に関与する遺伝子が予測された (Table 1). これらの遺伝子を、Pfam 検索を用いてさらに詳しくアノテーションを試みたところ、RMDY18\_00020 遺伝子には DNA polymerase III beta subunit の各ドメインが、RMDY18\_00350 遺伝子には Histidine kinase のドメインが、RMDY18\_16800 遺伝子には HSP70 (DnaK) のドメインが含まれていた (Table 2).



**Fig. 4** Scatter plots of gene expression between cells obtained from shake culture (Shake cultures 1 and 2) and that from static culture (Static cultures 1 and 2).

**Table 1** Genes showing more than a 1.2-fold higher or lower expression level

Gene tag	Putative gene function	Fold-change
RMDY18_00020	DNA polymerase sliding clamp subunit	1.21
RMDY18_00350	Signal transduction histidine kinase	1.22
RMDY18_16800	Molecular chaperone	1.49
RMDY18_08300	Prolipoprotein diacylglycerol transferase	-1.27

**Table 2** Encoded domain in up- or down-regulated genes

Gene tag	Domain	E-value
RMDY18_00020	DNA polymerase III beta subunit, N-terminal domain	1.5e-29
	DNA polymerase III beta subunit, central domain	4.4e-27
	DNA polymerase III beta subunit, C-terminal domain	6.6e-24
RMDY18_00350	HAMP domain	2.4e-09
	His kinase A (phospho-acceptor) domain	4.3e-19
	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP 90-like ATPase	1.4e-22
RMDY18_16800	Hsp70 protein (DnaK)	6.5e-208
	NAD-specific glutamate dehydrogenase	7.7e-128
RMDY18_08300	Prolipoprotein diacylglycerol transferase	3.1e-62

## 考 察

医科領域の重要な病原細菌である *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, 非結核性抗酸菌にはバイオフィルムを形成する菌株がある。これらの細菌の形成するバイオフィルムは dental plaque とは異なり, sucrose 非依存的に形成されることが知られている。<sup>8, 15, 16</sup> 口腔内にも, このような医科領域のバイオフィルム形成細菌と同様に sucrose 非依存性にバイオフィルムを形成する細菌が多く存在する。<sup>22-24</sup> DY-18 株を sucrose 不含の培地で培養し, その菌体表層を走査型電子顕微鏡で観察したところ, 菌体間にバイオフィルム形成菌に特徴的な網目様の構造物が観察できた。このことから DY-18 株は sucrose 非依存性に菌体外多糖を産生し, バイオフィルムを形成できることが示唆された。細菌は菌体外マトリックスを産生してバイオフィルムを形成することによって好中球やマクロファージなどの貪食細胞に対する抵抗性を獲得する。これにより局所に長期間留まることができるようになり, 感染症の慢性化と難治化を招くことが明らかになっている。<sup>25</sup> 実際, 自発痛, 打診痛, 根尖部圧痛などの臨床症状がなく, 根尖部に X 線透過像が認められる慢性根尖性歯周炎の歯の根尖孔上部にはバイオフィルム状の細菌塊が観察されている。<sup>1</sup> また, 難治性根尖性歯周炎から分離した *Escherichia hermannii* (以下, *E. hermannii* と略す),<sup>26</sup> *Streptococcus constellatus*,<sup>27</sup> *Bacillus subtilis* (以下, *B. subtilis* と略す),<sup>3</sup> *Actinomyces oris*<sup>4</sup> などの菌種で菌体周囲に網目様構造物を産生する株がみついている。根尖性歯周炎の病巣は, 口腔と常時交通している場合を除いて sucrose を容易に得られる環境ではないと考えられるが, DY-18 株はそのような環境でもバイオフィルムを形成する能力をもつことが示された。また, 培地中に glucose を添加するこ

とで, DY-18 株の培養菌液の粘度が増加することが分かっている (未発表データ)。DY-18 株は血清中や滲出液中に含まれる glucose から菌体外多糖を産生することで, 根尖性歯周炎病巣内でも長期に生存し, 治療に抵抗するようになると思われる。

バイオフィルムの形成は組織などへの付着, 表面での増殖, 菌体外マトリックスの産生と菌体外への分泌など多段階で起こる。<sup>22</sup> その形成過程は複雑で, 調節系も多岐にわたっているが, 様々な細菌で関与する遺伝子群の解明が少しずつ進んでいる。*Vibrio vulnificus* では *cabABC* オペロン上にある *cabA* の産物が, 菌体外マトリックスを形成する際に, 立体構造を構築する役割をもち, バイオフィルム形成に必須の遺伝子であることが示されている。<sup>28</sup> *B. subtilis* では, バイオフィルム形成に関与する遺伝子として *pgcA* (*yhxB*) が報告されている。<sup>27</sup> 本遺伝子は, グルコース代謝の中間段階である glucose 6-phosphate を  $\alpha$ -glucose 1-phosphate に転移する酵素である  $\alpha$ -phosphoglucosyltransferase をコードしている遺伝子で, この遺伝子を変異させると, バイオフィルム形成が減少することから, 菌体外マトリックスの形成に関与していると考えられている。<sup>29-31</sup> また, バイオフィルム形成の調節系としては, quorum-sensing system や 2 成分制御系, 3 成分制御系, ストレス応答システムが挙げられており, 細菌が環境の変化を感知してバイオフィルムを形成する仕組みが次第に明らかになっている。<sup>32-34</sup> *P. aeruginosa* ではバイオフィルムを構成する alginate の産生が quorum-sensing system により調節されている。<sup>35</sup> またその下流の  $\sigma$  因子はストレス応答タンパクを誘導するとともに, alginate の産生を亢進し, バイオフィルム形成を増強することが分かっている。<sup>36</sup>

口腔細菌でもバイオフィルム形成因子の解明が進行し

ている。*Prevotella nigrescens* では、バイオフィルム形成株をマウスに接種し、膿瘍を形成させ、その膿瘍から再び細菌を回収すると、GroEL, GroES などのストレス応答タンパクの産生量が増加し、バイオフィルム形成が増強することが報告されている。<sup>37</sup> 根尖性歯周炎から分離された菌株では、バイオフィルムを形成する *E. hermannii* に random mutagenesis で transposon を導入して変異株を観察すると、ABC transporter の *wzt* に変異がある株では菌体周囲網目様構造物が消失しており、この *wzt* を強発現させると、菌体外マトリックスの量が増加することから、本菌の菌体外マトリックスは Wzt/Wzm 依存性の膜輸送により細胞外に分泌されることが示唆されている。<sup>5</sup> 今回、DY-18 株の培養条件を変えることで、バイオフィルムを形成した状態（静置培養時）と、非形成状態（振盪培養時）の菌体を得ることができた（Fig. 3）。この2つの培養条件間で遺伝子発現を比較したところ、バイオフィルム非形成時に比べ、バイオフィルム形成時で DNA polymerase sliding clamp subunit (RMDY18\_00020), signal transduction histidine kinase (RMDY18\_00350), molecular chaperone (RMDY18\_16800) の遺伝子に発現増強がみられ、lipoprotein diacylglycerol transferase (RMDY18\_08300) の遺伝子に発現抑制が認められることが明らかになった（Table 1）。また、さらに詳しい機能を知るため、これらの遺伝子をドメイン解析すると、RMDY18\_16800 遺伝子にはストレス応答系の HSP70 (DnaK) のドメインが含まれることが分かった（Table 2）。細菌は周囲の環境が変化すると様々な防御機構を用いて、変化した環境に適応しようとするが、ストレス応答系はその主翼を担う機構の1つである。<sup>38</sup> *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) や *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (以下、*S. enterica* と略す) では、DnaK/DnaJ/GrpE や GroEL/GroES などの分子シャペロンは  $\sigma$  因子と共にストレス応答系を構成している。<sup>38</sup> また、ストレス応答系は病原性制御機構としても働いていることが分かっており、*S. enterica* の *dnaK/dnaJ* は、鞭毛形成や分泌装置の発現を調節する働きをもち、全身感染に必須になっている。<sup>39</sup> 既に述べたように、ストレス応答系はバイオフィルム形成も調節していることが示唆されている。*E. coli* では flow chamber 上に形成されたバイオフィルムでストレス応答に関与する遺伝子の発現が上昇していることが明らかになっており、<sup>40</sup> *Prevotella intermedia* ではバイオフィルム形成時、DnaK/DnaJ, GroEL/GroES が発現上昇していることが報告されている。<sup>41</sup> 今回の結

果もこれらの報告を支持するもので、DY-18 株でも DnaK によるストレス応答系がバイオフィルム形成に関与していることが示唆された。また、DY-18 株では *B. subtilis* のストレス応答遺伝子である *yvcJ* のホモログである RMDY18\_10020 遺伝子に変異すると、菌体周囲の網目様構造物が消失することも報告されており、<sup>42</sup> DnaK だけではなく、その他のストレス応答系もバイオフィルム形成に関係していると考えられる。さらに、DY-18 株はゲノム上に2種類の  $\sigma$  因子遺伝子しか持たないことが分かっている。<sup>43</sup> そのうちの1つは酸化ストレスに対する応答に関与しているが、バイオフィルム形成との詳細な関係については不明であるが、上述したように *P. aeruginosa* の  $\sigma$  因子はバイオフィルム形成に関与していることから、DY-18 株でも複雑な調節機構の存在が示唆される。これらの遺伝子に加え、未だ機能を特定できていない遺伝子がバイオフィルム形成にかかわっていると考えられる。*P. aeruginosa* の alginate 合成には10種類以上の酵素が関与し、alginate が多くの遺伝子によって複合的に合成されていることが明らかになっている。<sup>33, 44</sup> また、alginate では、分泌にも更に多くの遺伝子が関与しており、<sup>37</sup> DY-18 株でも菌体外多糖産生にかかわる複数の遺伝子の存在が推測される。今回明らかになった調節を担うと考えられる遺伝子の詳しい機能の検討に加えて、菌体外マトリックス産生や菌体外への分泌などに関係する遺伝子も含めた更なる候補遺伝子のリストアップと、機能解析が必要であると考えられる。

稿を終えるにあたり、多大なるご助言、ご指導を頂いた大阪歯科大学 福島久典名誉教授、大阪歯科大学細菌学講座の山中武志先生、真下千穂先生、南部隆之先生、円山由郷先生、中央歯学研究所の堀 英明氏に衷心からお礼申し上げます。

本研究の一部は、科学研究費補助金 基盤研究 (C) (16K11573) の助成を受けたものである。また、本研究には大阪歯科大学中央歯学研究所（形態系研究施設）を使用した。

本論文の要旨は第550回大阪歯科学会例会（平成28年4月9日、枚方市）において発表した。

## 引用文献

1. Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung K-P, Walker CB. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod* 1990; 16: 534-538.

2. 濱口隆貢, 吉田匡宏, 戸田忠夫. 難治性根尖性歯周炎に関する細菌学的研究. 日本歯科保存学雑誌 2002; **45**: 282-297.
3. Yamane K, Ogawa K, Yoshida M, Hayashi H, Nakamura T, Yamanaka T, Tamaki T, Hojoh H, Leung K-P, Fukushima H. Identification and characterization of clinically isolated biofilm-forming gram-positive rods from teeth associated with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2009; **35**: 347-352.
4. Yamane K, Nambu T, Yamanaka T, Ishihara K, Tatami T, Mashimo C, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Pathogenicity of exopolysaccharide-producing *Actinomyces oris* isolated from an apical abscess lesion. *Int Endod J* 2013; **46**: 145-154.
5. Yamanaka T, Sumita-Sasazaki Y, Sugimori C, Matsumoto-Mashimo C, Yamane K, Mizukawa K, Yoshida M, Hayashi H, Nambu T, Leung KP, Fukushima H. Biofilm-like structures and pathogenicity of *Escherichia hermannii* YS-11, a clinical isolate from a persistent apical periodontitis lesion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **59**: 456-465.
6. Saber MH, Schwarzbach K, Alonzaiz FA, Kelley ST, Sedghizadeh PP, Furlan M, Levy TA, Simon JH, Slots J. Bacterial flora of dental periradicular lesions analyzed by the 454-pyrosequencing technology. *J Endod* 2012; **38**: 1484-1488.
7. Collins MD, Hutson RA, Båverud V, Falsen E. Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; **50**: 1247-1251.
8. Bergan T, Kocur M. *Stomatococcus mucilaginosus* gen. nov., sp. nov., ep. rev., a member of the family Micrococcaceae. *Int J Syst Bacteriol* 1982; **32**: 374-377.
9. Kobayashi T, Uchibori S, Tsuzukibashi O, Goto H, Aida M. A selective medium for *Rothia mucilaginosa* and its distribution in oral cavities. *J Microbiol Methods* 2012; **91**: 364-365.
10. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 558-563.
11. Bruminhent J, Tokarczyk MJ, Jungkind D, DeSimone Jr JA. *Rothia mucilaginosa* prosthetic device infections: a case of prosthetic valve endocarditis. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 1629-1632.
12. Lee AB, Harker-Murray P, Ferrieri P, Schleiss MR, Tolar J. Bacterial meningitis from *Rothia mucilaginosa* in patients with malignancy or undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2008; **50**: 673-676.
13. Cielo AB, Ullian ME. Peritonitis from *Rothia mucilaginosa* in a chronic peritoneal dialysis patient. *Clin Kidney J* 2013; **6**: 552-553.
14. Hodzic E, Snyder S. A case of peritonitis due to *Rothia mucilaginosa*. *Perit Dial Int* 2010; **30**: 379-380.
15. Lim YW, Schmieder R, Haynes M, Furlan M, Matthews TD, Whiteson K, Poole SJ, Hayes CS, Low DA, Maughan H, Edwards R, Conrad D, Rohwer F. Mechanistic model of *Rothia mucilaginosa* adaptation toward persistence in the CF lung, based on a genome reconstructed from metagenomic data. *PLoS One* 2013; **8**: e 64285.
16. Gordon DF Jr. Reisolation of *Staphylococcus salivarius* from the human oral cavity. *J Bacteriol* 1967; **94**: 1281-1286.
17. Bergan T, Bøvre K, Hovig B. Reisolation of *Micrococcus mucilaginosus* Migula 1900. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 1970; **78**: 85-97.
18. Bowden GH. The components of the cell walls and extracellular slime of four strains of *Staphylococcus salivarius* isolated from human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1969; **14**: 685-697.
19. Yamane K, Yoshida M, Fujihira T, Baba T, Tsuji N, Hayashi H, Sugimori C, Yamanaka T, Mashimo C, Nambu T, Kawai H, Fukushima H. Isolation and identification of *Rothia mucilaginosa* from persistent apical periodontitis lesions. *J Osaka Dent Univ* 2010; **44**: 93-98.
20. 河合 博, 山根一芳, 福島久典. *Rothia mucilaginosa* DY-18 株が産生する菌体外網目様構造物の精製と化学組成解析. 歯科医学 2010; **73**: 45-54.
21. Yamane K, Nambu T, Yamanaka T, Mashimo C, Sugimori C, Leung K-P, Fukushima H. Complete genome sequence of *Rothia mucilaginosa* DY-18: a clinical isolate with dense meshwork-like structures from a persistent apical periodontitis lesion. *Sequencing* 2010; 2010.
22. Costerton JW, Cheng K-J, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; **41**: 435-464.
23. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; **60**: 539-574.
24. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 7-10.
25. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 34-40.
26. 水川健司, 山中武志, 福島久典. 難治性根尖性歯周炎病巣から分離したバイオフィルムを形成する *Escherichia hermannii* の粘性物質産生に関わる遺伝子クラスター 歯科医学 2007; **70**: 151-160.
27. 安岡大志, 山根一芳, 福島久典. バイオフィルム形成 *Streptococcus constellatus* のゲノム解析. 歯科医学 2013; **76**: 75-82.
28. Park JH, Jo Y, Jang SY, Kwon H, Irie Y, Parsek MR, Kim MH, Choi SH. The *cabABC* operon essential for biofilm and rugose colony development in *Vibrio vulnificus*. *PLoS Pathog* 2015; **11**: e 1005192.
29. Lazarevic V, Soldo B, Médico N, Pooley H, Bron S, Karamata D. *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -phosphoglucosyltransferase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**: 39-45.
30. Ren D, Bedzyk LA, Setlow P, Thomas SM, Ye RW, Wood TK. Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance



- of *yveR* for biofilm maintenance. *Biotechnol Bioeng* 2004; **86**: 344-364.
31. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2005; **55**: 739-749.
  32. Valla S, Li J, Ertesvåg H, Barbeyron T, Lindahl U. Hexuronyl C 5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie* 2001; **83**: 819-830.
  33. Shankar S, Ye RW, Schlichtman D, Chakrabarty AM. Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1995; **70**: 221-255.
  34. May TB, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol* 1994; **2**: 151-157.
  35. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; **280**: 295-298.
  36. 福島久典. 口腔感染症におけるバイオフィルム形成菌の役割. 日本歯科医師会雑誌 2005; **58**: 17-28.
  37. 古川智代, 山中武志, 福島久典. *Prevotella nigrescens* の exopolysaccharide 高産生性回復と関連タンパク解析. 歯科医学 2005; **68**: 34-44.
  38. 山本友子. 細胞内寄生性細菌のストレス応答と病原性発現制御機構に関する研究. 日本細菌学雑誌 2011; **66**: 517-529.
  39. Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, Yamamoto T. The DnaK/DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection. *Infect Immun* 2004; **72**: 1364-1373.
  40. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, Haagensen JA, Molin S, Prensier G, Arbeille B, Ghigo JM. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology* 2004; **51**: 659-674.
  41. Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Yamane K, Sugimori C, Nambu T, Mori N, Nishikawa H, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17. *BMC Microbiol* 2009; **9**: 11.
  42. 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. *J Osaka Dent Univ* 2012; **46**: 157-164.
  43. 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*. *Arch Oral Biol* 2013; **58**: 681-689.
  44. Ye RW, Zielinski NA, Chakrabarty AM. Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucosyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1994; **176**: 4851-4857.



## Comparison of gene expression profiles between static and shake culture in *Rothia mucilaginosa*

Tadashi Furumori, Kazuyoshi Yamane and Pao-Li Wang

Department of Bacteriology, Osaka Dental University, 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-1121, Japan

**Abstract** Biofilm formation is an important virulence factor contributing to the chronicity and persistency of oral infections. Biofilms are formed by microbial cells embedded in exopolysaccharides (EPS), which are a component of biofilm. We previously isolated EPS-producing *Rothia mucilaginosa* (strain DY-18) from a persistent apical periodontitis lesion. The aim of the present study was to identify genes relating to biofilm formation. High viscosity of spent culture medium obtained from static culture indicated that strain DY-18 produces large amounts of EPS and forms biofilms. In contrast, the low viscosity shown in shake culture was correlated with the planktonic mode of growth of this strain. Gene expression of strain DY-18 in the biofilm mode (static culture condition) was compared to that in the planktonic mode (shake culture condition) using microarray analysis.

The results suggest that the genes encoding DNA polymerase  $\beta$  subunit beta (gene tag : RMDY18\_00020), signal transduction histidine kinase (RMDY18\_00350), and molecular chaperone (RMDY18\_16800) were significantly up-regulated in the biofilm mode. Bioinformatic analysis showed that RMDY18\_16800 has domains relating to stress response, which has been shown to be a regulator of biofilm formation in other bacteria. The results suggest that these genes might contribute to EPS production and biofilm formation of strain DY-18. **Shika Igaku (J Osaka Odontol Soc) 2016 ; September ; 79(2) : 53-61.**

**Key words** : *Rothia mucilaginosa* ; Biofilm ; Gene expression