

バイオフィーム形成 *Streptococcus constellatus* のゲノム解析

安岡 大志 山根 一芳 福島 久典
やす おか ひろ し やま ね かず よし ふく しま ひさ のり

抄録：*Streptococcus constellatus* は *S. anginosus*, *S. intermedius* とともに *anginosus group* に属するレンサ球菌で、ヒト口腔に常在し、慢性歯周炎、口腔膿瘍から分離されるだけでなく、日和見感染症の原因菌として敗血症や心内膜炎病巣からも検出され、脳膿瘍、肺化膿症、膿胸、腹腔内膿瘍など、全身の化膿性疾患と深く関わっていることが報告されている。

口腔の慢性感染症から分離される細菌には、菌体周囲に菌体外マトリックスを産生してバイオフィームを形成する株が存在する。我々はこれまでに、難治性の根尖性歯周炎病巣から分離した *Bacillus subtilis*, *Rothia mucilaginosa*, 骨膜下膿瘍から分離した *S. constellatus* など、多くの菌種にバイオフィームを形成する菌株が存在し、これらが産生する菌体外マトリックスが、病巣での細菌残存因子になっていることを報告してきた。本研究では病巣に残存し、予後を不良にする細菌のバイオフィーム形成関連遺伝子を明らかにすることを目的に、バイオフィームを形成することが知られている *S. constellatus* H39 株のゲノムを sequencing した。

H39 株のゲノム DNA を通法に従い抽出し、GS Junior System を用いてパイロシークエンシングした。その結果、十分な冗長度のもとにゲノム DNA の配列が得られた。得られた配列データをアセンブルし、コンティグを構築した。コンティグ内の塩基配列からタンパクコード領域を予測し、データベース上で相同性の高い配列を検索した。その結果、H39 株のゲノム上には約 2,000 の遺伝子がアノテーションされ、菌体外多糖合成と輸送に関する遺伝子、バイオフィーム形成の調節に関与すると考えられているストレス応答系の遺伝子などと相同性の高い領域が存在した。これらの遺伝子は、*S. constellatus* H39 株のバイオフィーム形成に重要な役割を果たすと考えられる。

緒言

Anginosus グループ streptococci (AGS) は、*milleri* グループとも呼ばれ、*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* (以下、*S. constellatus* と略す)、*Streptococcus intermedius* (以下、*S. intermedius* と略す) の 3 菌種で構成されるレンサ球菌グループである。主にヒトの口腔、泌尿生殖器などに常在菌として存在しており、^{1,2} 日和見病原体として知られ、³ 口腔内や肝臓などの深部臓器に化膿性疾患を引き起こすだけでなく、他の口腔レンサ球菌と同様に、感染性心内膜炎の原因菌としても知られている。^{1,2} また、最近では難治性の歯周疾患や、^{1,4} 上部消化器癌にも関与していることが報告されるようになり、注目を集めている。⁵

AGS は生化学的な性質による同定や、ランスフィールド群抗原による免疫学的な同定が困難で、近年の分子生物学的な分類法の確立により、菌種や亜種の再分類が進み、さらに新しい種の存在が提唱されている。⁴ 本研究では口腔の膿瘍から分離した講座保存菌株 (以下、H39 株と略す) を用いた。⁶ Yamanaka らは H39 株のハウスキーピング遺伝子の *recN*, *groEL*, *tuf*, 16S ribosomal RNA 遺伝子の配列を用いた分子系統樹により再同定し、本菌株を *S. constellatus* としている。⁷ H39 株は、菌体表面を走査型電子顕微鏡 (以下、SEM と略す) で観察すると、菌体周囲にバイオフィーム形成細菌に特徴的な網目様の構造物が認められることから、バイオフィーム形成株であると考えられている。⁶ バイオフィームの概念は Costerton ら⁸ によって提唱され、現在では

種々の口腔感染症にバイオフィーム形成菌が関与していることが示唆されている。Fukushimaらは歯周ポケットから分離した *Prevotella intermedia* (以下, *P. intermedia* と略す) と *Prevotella nigrescens* (以下, *P. nigrescens* と略す) に菌体外多糖 (exopolysaccharide; 以下, EPS と略す) を産生し, バイオフィームを形成する株があることを報告している。^{9,10} 黒田らは骨膜下膿瘍から分離した *Streptococcus oralis* に,¹¹ Yamaneらは口腔の膿瘍から分離した *Actinomyces oris* にも EPS 産生株があり, 非産生株の標準株に比べ, 強い膿瘍形成誘導能をもつことを明らかにしている。¹² H39 株もマウスのソケイ部に接種すると難治性の膿瘍が形成されることから, この株が単独で膿瘍形成を誘導する能力をもっていることが示されている。¹³

本研究では病巣に残存し, 予後を不良にする細菌のバイオフィーム形成の遺伝学的な背景を明らかにすることを目的に, *S. constellatus* H39 株のゲノムをシークエンシングした。

実験材料および方法

1. 供試菌

口腔の膿瘍から分離し, -80°C で保存している *S. constellatus* H39 株を実験に供試した。供試菌の使用に際しては, -80°C で保存した H39 株を, 5% 綿羊脱線維血と 0.5% yeast extract (Difco, Detroit, MI, USA) を含む trypticase soy agar (以下, TSA と略す, BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) に塗抹し, 10% CO_2 添加条件下で 48 時間培養した。各実験にはグラム染色性, 形態を確認して使用した。

2. Genome DNA 抽出

TSA 上に発育した H39 株を trypticase soy broth (BBL Microbiology Systems) に接種し, 10% CO_2 添加条件下で 24 時間培養した。培養菌液を $5,000\times\text{g}$ で 10 分間遠心 (CR 21, 日立製作所, 茨城) して菌体を回収し, 0.1 M のリン酸緩衝液 (日水製薬, 東京) で 2 回洗浄後, 0.2 mg/mL N-acetylmuramidase (生化学工業, 東京) と 20 mg/mL lysozyme (Wako, 東京) を 30 分間作用させ, 細胞を溶解した。MagExtractor (TOYOBO, 大阪) を用い, 製品プロトコールに従って genome DNA を抽出した。

3. Genome library の作製

H39 株の genome DNA を Rapid Library Preparation Kit (Roche Diagnostics, 東京) に含まれる Rapid Library Nebulizers を使用してランダムに断片化した。MiniElute

PCR Purification Kit (Qiagen, MD, USA) でフラグメントを精製したのち, Rapid Library Preparation Kit を用いてエンドリペアした。フラグメントに RL アダプターをライゲーション後, Agencourt AMPure XP Kit (ベックマン・コールター, 東京) を用いて短断片を除去し, H39 株の genome library とした。

4. Emulsion polymerase chain reaction (以下, emulsion PCR と略す)

精製した H39 株の genome library を鋳型として emulsion PCR をした。GS Junior emPCR Kit (Roche Diagnostics) のプロトコールに従って, キャプチャービーズと鋳型 DNA を混合後, emulsion を調製した。PCR は 94°C , 4 分間の鋳型 DNA の熱変性後, 94°C , 30 秒間の熱変性, 58°C , 4 分 30 秒間のアニーリング, 68°C , 30 秒間の伸長反応を 50 サイクルの反応条件とした。増幅した DNA のみを回収し, エンリッチメントしてパイロシークエンシングに供した。

5. パイロシークエンシング

エンリッチメントしたビーズを定量し, Allegra (ベックマン・コールター, 東京) を用いて pico titer plate (GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit, Roche Diagnostics) に充填した。Pico titer plate をゲノムシークエンサー (GS Junior, Roche Diagnostics) にセットし, パイロシークエンス法により塩基配列を決定した。

6. de novo アセンブリ

パイロシークエンシングにより得られたリードを GS de novo Assembler Software (version 1.1.03.24) (Roche Diagnostics) を用いてアセンブルし, コンティグを構築した。

7. コンティグ間のギャップクローズ

アノテーションに必要なコンティグ間のギャップクローズのため, コンティグ両端の配列からプライマーを設計し, 合成した。5 μL のゲノム DNA 溶液 (10 ng/ μL), 1 μL のプライマー (各 10 μM), 25 μL の GoTaq DNA Polymerase Green Master Mix 溶液 (Promega, 東京), 18 μL の滅菌蒸留水を混合し, MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Japan, 東京) を用いて PCR した。PCR は 94°C , 2 分間の鋳型 DNA の熱変性後, 94°C , 1 分間の熱変性, 60°C , 1 分間のアニーリング, 74°C , 1.5 分間の伸長反応を 35 サイクルし, 74°C , 7 分間最終伸長する反応条件とした。増幅産物は, 1% TAE アガロースゲル (ナカライテスク, 京都) で 100 V, 20 分間, 電気泳動して確認後, ゲルから切り出し, QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 東京) で抽出, 精製し

た。精製産物を鋳型として、増幅プライマーを用いて Sanger 法でダイレクトシーケンシングした。シーケンシング反応には Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Bio-system, CA, USA) を、シーケンスには ABI PRISM 3730 DNA analyzer (Applied Bio-system) を用いた。得られたリードは Sequencher (version 4.7, Gene Codes, MI, USA) を用いてアッセンブルした。

8. アノテーション

構築したコンティグの配列から MetaGeneAnnotator (version 1.0) を用いて protein coding sequences (以下, CDSs と略す) を予測した。transfer RNA (以下, tRNA と略す) と messenger RNA (以下, rRNA と略す) の予測にはそれぞれ tRNAscan-SE (version 1.23) と RNAmmer (version 1.2) を用いた。これらの解析には Microbial Genome Annotation Pipeline (以下, MiGAP と略す, <http://www.migap.org>) を用いた。予測したコーディング領域は NCBI BLAST (version 2.2.18) を用いて相同性解析して、遺伝子機能を予測した。予測した遺伝子から菌体外多糖産生に関わる遺伝子を検索した。

実験結果

1. パイロシーケンシング

H39 株の genome library のパイロシーケンシングの結果、198,265 のリードが得られ、総塩基数は 84,169,816 bp であった (Fig. 1)。

2. アッセンブルとギャップクローニング

パイロシーケンシングによって得られたリードをアッセンブルし、一部をギャップクローニングした結果、37 のコンティグを構築することができた。コンティグ

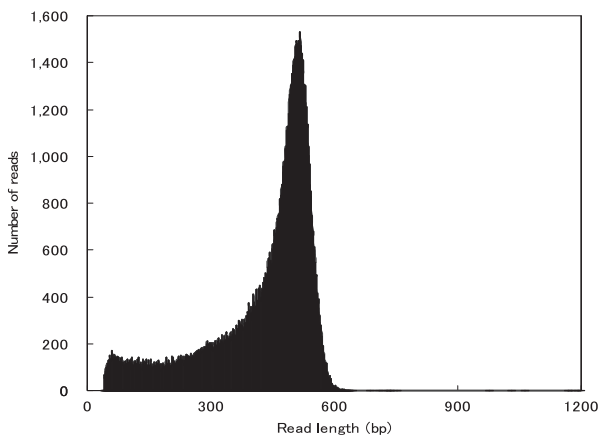


Fig. 1 Size distribution of reads of pyrosequencing

の全長は 1,938,626 bp, 平均コンティグ長は 51,016 bp で、42.0 倍のカバー率で塩基配列が解読できた (Table 1)。

3. アノテーション

MiGAP を用いた遺伝子予測の結果、3 つの rRNA, 45 の tRNA, 1,926 の CDSs を予測することができた。機能予測された H39 株の病原遺伝子としては hemolysin の遺伝子が 3 つ, sortase の遺伝子が 6 つ, hyaluronidase の遺伝子などが見つかった。コンティグ 1 と 8 上には *pgcA* 遺伝子のホモログが見つかり (Fig. 2), コンティ

Table 1 Distribution of contigs assembled from pyrosequencing data

Contig number	Length (bp)
001	297,046
002	292,693
003	171,006
004	169,686
005	99,479
006	99,067
007	93,289
008	84,117
009	82,078
010	74,518
011	64,062
012	52,491
013	47,762
014	47,376
015	46,222
016	42,052
017	38,847
018	34,249
019	27,547
020	21,894
021	12,464
022	8,492
023	6,799
024	5,352
025	4,821
026	4,145
027	1,445
028	1,436
029	1,357
030	1,263
031	1,056
032	1,045
033	922
034	861
035	627
036	559
037	501

Sequence 1	MTWRKSYERW	KQTEHLDEL	KERLIELEGD	EQALEDCFYK	DLEFGTGGM
Sequence 2	MNYKEVYEQW	LNNDFDEET	KADLLSIKDD	EAEIEDRFYK	GLEFGTAGLR
Sequence 3	MTYQDNFKKW	FNFATALPDYL	RKELDSM--D	EKTKEDAFYT	NLEFGTAGMR
Sequence 1	GEIGAGTNRM	NIYTVRKASA	GFAAYISKQG	EAAKRGVVI	AYDSRHKSPE
Sequence 2	GKLGAGTNRM	NKYVMGKAAQ	ALAEITLKNHG	EEAVKRGVAI	SYDVRYSKE
Sequence 3	GLIGAGTNRN	NIYVVRQATE	GLARLIDEKG	ENFKRGRVAI	AYDSRHFSPE
Sequence 1	FAMEAAKTLA	TGGIQTIVFD	ELRPTPELSF	AVRQLNAYGG	IVVTASHNPP
Sequence 2	FAELTCSIMA	AHGIKTYIYN	GIHPTMCSY	AIRKLHCKAG	VMTTASHNPQ
Sequence 3	FAFESAVALA	KHGKISYVFE	SLRPTPELSF	AVRHLKAFAG	IMITASHNPA
Sequence 1	EYNGYKVVGD	DGGQLPPEKA	DIVIEQVNAI	ENELTITVDE	ENKLEKGLI
Sequence 2	EYNGYKAYWE	EGSQILDIDIA	GQIAGHMDEI	VNFEDIKSIP	FEEALESGLA
Sequence 3	PFNGYKVVGE	DGGQMPPHDA	DALTAIYIRAI	ENLFAIEVAD	VEAEKASGLI
Sequence 1	KIIGEDIDKW	YTEKLTISIV	HPLESEEV--	DVKVVFVPLH	GTANKPVRRG
Sequence 2	NYIDASVEED	YYKEVLNLTII	N---EDVDK	SIKVGYTPLN	GTGNIPVREI
Sequence 3	EIIIGENVDE	YLKEVKDVNI	NQQLIDEYGG	DMKIVYVPLH	GTGEMLARRA
Sequence 1	LEALGYKNVT	VVKEQELPDS	NFSTVTPSPN	EEHAAFEYAI	KLGEQGNADI
Sequence 2	LKRRGFENIY	VVKEQEFPPD	DFTTVGYPNP	EFPKAFAYSE	KLKENDCDI
Sequence 3	FAQAGFDSQV	VVEAOCVPPD	DFSTVKSPPN	ENQAALALAE	ELGRKVGADV
Sequence 1	LIATDPDADR	LGIIVKNDQG	KYTVLTGNQT	GALLLHLLYS	EKKKQGLIPD
Sequence 2	LIANDPDCDR	VALEVRNANG	DYVFLNGNKI	GALLSYIIFS	QRSALNNLPE
Sequence 3	LVATDPDADR	VGVEVLKQDG	SYRNLGNGQI	GAIMAKYILE	AHKTAGTLPA
Sequence 1	NGVVLKTIIVT	SEIGRAVASS	FGLDITDLTL	GFKFIGEKIK	EYEASQYTF
Sequence 2	NPVMKSIIVT	GDLSRAIAKK	YGIETVETLT	GFKNICGKAN	EYDRTEKTY
Sequence 3	NAALCKSIVS	TDLVAKIAES	YGATMFNVL	GFKFTAELIQ	EFEKHNHTY
Sequence 1	QFGYEESYGY	LIGDFARDKD	AIQAALLAVE	VCAFYKQGM	SLYEALINLF
Sequence 2	VFGYEESIGF	CYGTFRVDRD	AVSASMMIVE	MAAYFKQGG	TLLDVLNDIY
Sequence 3	MMGFEEESFGY	LKPFVRDVK	AIQAVLVVAE	LAAYYRSRGL	TLADGIEEYI
Sequence 1	NEYGFYREG	KSLTLKGGKQ	AEQIEALIAS	FRQNPQKMA	GKQVTAEDY
Sequence 2	AEFGFYNERQ	VSLELEGVEG	QERIARMMEE	FREHPLTTVG	AMELEKVIDF
Sequence 3	KEYGYIAEKT	ISVTLGSDVG	AEQIKAIMSK	FRDNAPKEFN	ATAITVTEDF
Sequence 1	AVSKRLLTE	SKEEAIDLPK	SNVLKYFLED	GSWFCLRPSG	TEPKVKFYFA
Sequence 2	KD-----	--GYLDFPK	QNCLKYFKD	GSWYALRPSG	TEPKIKLYIY
Sequence 3	KAQTATT-TD	GTVTALTTPP	SDVLKYTLTD	GSWIAVRPSG	TEPKIKFYIA
Sequence 1	VKGSSLEDSE	KRLAVLSEDV	MKTVDIEIVES	TAK	
Sequence 2	SIGKDEKESV	EKLDLIEKVC	REKMSVKK--		
Sequence 3	VVGNSSDAQ	AKIDTIEAEI	NDFVQ----		

Fig. 2 Amino acid alignment of α -phosphoglucosyltransferase (PGM) sequences

Sequence 1: PGM from *Bacillus subtilis*; sequence 2: PGM from contig 001 of strain H39; sequence 3: PGM from contig 008 of strain H39

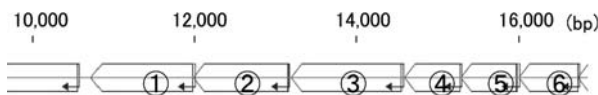


Fig. 3 The putative gene annotated from sequences of contig 003

- ①: glycosyltransferase ;
- ②: glycosyltransferase ;
- ③: exopolysaccharide biosynthesis protein ;
- ④: capsular exopolysaccharide family protein ;
- ⑤: capsular polysaccharide biosynthesis protein ;
- ⑥: capsular polysaccharide biosynthesis protein

グ3上には, exopolysaccharide biosynthesis protein, capsular exopolysaccharide family protein, capsular

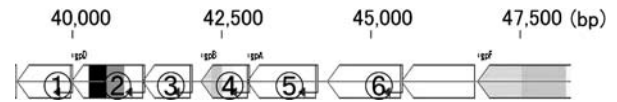


Fig. 4 The putative gene annotated from sequences of contig 009

- ①: ABC-type polysaccharide/polyol phosphate transport system, ATPase component ;
- ②: ABC-type polysaccharide/polyol phosphate export systems, permease component ;
- ③: glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis ;
- ④: lycosyltransferase ;
- ⑤: glycosyltransferase ;
- ⑥: predicted membrane protein

polysaccharide biosynthesis protein, capsular polysaccharide biosynthesis protein の遺伝子が並んだ領域 (Fig. 3) が, コンティグ9上には ABC-type polysaccharide/polyol phosphate transport system の ATPase component と, 同タンパクの permease component の遺伝子が見つかった (Fig. 4).

考 察

Dental plaque は, 細菌がシュクロース依存性に産生した菌体外マトリックスのポリマーに包埋された細菌の共同体であり, バイオフィームと考えられている.¹⁴ *Pseudomonas aeruginosa* (以下, *P. aeruginosa* と略す), *Vibrio cholerae*, 非結核性抗酸菌などの菌種は, 自然界の液体環境下でバイオフィームを形成する, 医科領域の病原体の1例であるが, これらの細菌のバイオフィームは dental plaque とは異なり, シュクロース非依存性に形成される.^{8, 15, 16} 口腔内にも, このような医科領域のバイオフィーム形成細菌と同様のシュクロース非依存性バイオフィームを形成する細菌が多く存在する.^{12, 17, 18}

バイオフィーム形成は, 環境中では決して珍しいものではなく, それ自身には宿主組織を破壊する作用はないと考えられている.¹⁶ しかし, 細菌はバイオフィームを形成することにより, 各種抗生物質や消毒薬の浸透が減少し, 化学療法剤や好中球, マクロファージなどの食細胞, 免疫グロブリンに対して抵抗性を示して, 局所に長期間留まり, 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.¹⁹ H39 株もまたシュクロース非依存性に菌体外マトリックスを産生する菌株で, バイオフィーム形成性が, 本細菌の病巣における長期の残存や, 治療抵抗性に関与していることが示唆されている.⁶ Petersenらは同じ AGS の *S. intermedius* にバイオフィームを形成する株があることを報告している.²⁰ また,

S. intermedius の細胞表層には EPS の他に、ヒト細胞への付着や他の細菌との共凝集に関与し、唾液中のグリコプロテインにも結合するタンパクが存在することが分かっており、細胞表層の構造が病原性に及ぼす影響が示唆されている。²¹ さらに Petersen らは quorum-sensing system を誘導する competence-stimulating peptide が、高濃度で *S. intermedius* のバイオフィーム形成を促進することを示している。²⁰ しかし、*S. intermedius* を含めた AGS のバイオフィーム形成の経路については明らかになっておらず、経路の遺伝学的な背景を捉えるためには、ゲノム上の遺伝子の情報を得る必要がある。そこで我々は、パイロシークエンス法を用いて H39 株のゲノムの塩基配列を決定した。

パイロシークエンス法は DNA 合成の間に放出されるピロリン酸をアデノシン 3 リン酸 (以下、ATP と略す) に変換し、ATP によりルシフェリンを酸化して発光することで検知して DNA をシークエンスする技術である。²² 本技術の進歩によって、微生物のゲノムは高速に、且つ正確に決定できるようになった。²² 今回、H39 株のゲノムを 2 回のパイロシークエンスで解析した結果、42.0 倍の高いカバー率で塩基配列が解読できた。また、この塩基配列を *de novo* でアセンブルし、コンティグ間の配列を PCR 法で増幅してギャップクローニングした結果、37 のコンティグを構築することができた。コンティグの総塩基数はおおよそ 1.93 Mbp で、AGS でゲノムの全長が公開されている *S. intermedius* JTH 08 株 (GenBank, AP 010969.1) と同じであった。遺伝子予測の結果、1,926 の CDSs を予測することができた。予測された病原遺伝子としては、この細菌の不完全溶血性に関与すると考えられる hemolysin の遺伝子が 3 つ、²³ 宿主組織への付着性や、宿主細胞への侵入性に関与する sortase の遺伝子が 6 つ、²⁴ hyaluronidase の遺伝子などが見つかった。²⁵ また、バイオフィームの構成因子の 1 つである菌体外多糖の合成、輸送に関わるいくつかの遺伝子が明らかになった。

バイオフィームは、quorum-sensing system や 2 成分制御系、3 成分制御系、様々なストレス応答システムにより、環境の変化に応じて調節され、形成される。²⁶⁻²⁸ *P. aeruginosa* ではバイオフィームを構成する EPS であるアルジネートの産生が quorum-sensing system により調節されている。²⁹ また、*P. aeruginosa* の σ 因子はストレス応答タンパクを誘導するとともに、アルジネートの産生を亢進し、バイオフィーム形成を増強することが分かっている。³⁰ *P. nigrescens* では、EPS 産生株

をマウスに接種すると、GroEL, GroES などのストレス応答タンパクの産生量が増加し、EPS 産生が促進することが報告されている。³¹ H39 株のゲノム上からも quorum-sensing system の遺伝子として autoinducer 2 を産生する LuxS タンパクをコードする遺伝子が見つかった。Autoinducer 2 のレセプターのホモログは見られなかったので詳しい作用は不明であるが、この遺伝子が H39 株のバイオフィーム形成の調節に関与している可能性がある。

Bacillus subtilis (以下、*B. subtilis* と略す) では、バイオフィーム形成に関与する遺伝子として *pgcA* (*yhxB*) 遺伝子が報告されている。³² 本遺伝子はグルコース代謝の中間段階で glucose 6-phosphate を α -glucose 1-phosphate に転移する α -phosphoglucomutase (以下、PGM と略す) をコードする遺伝子で、この遺伝子を変異させると、バイオフィーム形成が減少することが明らかになっている。³²⁻³⁴ H39 株でもグルコース依存性にバイオフィーム形成が増強することが報告されており、PGM のホモログをコードする遺伝子が存在することが分かっている。⁶ しかし、この遺伝子を変異させても、グルコース依存性のバイオフィーム形成が減弱しないことから、複数の経路の存在が示唆されていた。⁶ 本研究のゲノム解析の結果から、H39 株はゲノム上に 2 つの PGM のホモログをコードする遺伝子をもつことが明らかになった (Fig. 2)。これは上述の示唆を裏付けるものであり、今後更なる変異解析によって、この 2 つの遺伝子の詳細な機能が明らかになると考える。H39 株のゲノム上には、他にも *Bacillus anthracis* が莢膜多糖や、EPS を産生する際に用いる遺伝子と高い相同性を示す領域が存在し (Fig. 3)、³⁵ これらの領域の遺伝子が菌体外マトリックスの産生に関わっている可能性がある。

バイオフィーム形成には、産生した菌体外マトリックスを細胞外に輸送する経路も重要である。水川らは、難治性根尖性歯周炎病巣から分離した *Escherichia hermannii* を SEM で観察すると、菌体表面に網目様の菌体外マトリックスが存在し、random mutagenesis で transposon を導入して ABC transporter の *wzt* 遺伝子に変異を起こすと、この網目様構造物が消失することを明らかにしている。³⁶ また Yamanaka らは *wzt* 遺伝子を強発現させると、菌体外マトリックスの量が増加することから、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を示唆している。³⁷ H39 株のゲノム上にも EPS の輸送に関与すると考えら

れる領域が存在した (Fig. 4). この領域には輸送エネルギーを供給する ATPase をコードする遺伝子と、実際の膜透過を担う permease をコードする遺伝子がタンデムに存在した. これらの遺伝子の詳しい機能については、今後、ノックアウト株を作製することにより、より詳細なバイオフィーム形成、分泌機構が明らかになると考えている.

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細菌学講座の皆様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) (23592724)、若手研究 (B) (24791975) の助成を受けたものである. なお、本研究には大阪歯科大学中央歯学研究所 (歯科生物学施設) を使用した.

本論文の要旨は第 536 回大阪歯科学会例会 (平成 24 年 12 月 8 日、枚方市) において発表した.

引用文献

1. Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 243-244.
2. Piscitelli SC, Shwed J, Schreckenberger P, Danziger LH. *Streptococcus milleri* group: renewed interest in an elusive pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; **11**: 491-498.
3. Ruoff KL. *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri"): the unrecognized pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1988; **1**: 102-108.
4. Whiley RA, Fraser H, Hardie JM, Beighton D. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri* group". *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1497-1501.
5. Narikiyo M, Tanabe C, Yamada Y, Igaki H, Tachimori Y, Kato H, Muto M, Montesano R, Sakamoto H, Nakajima Y, Sasaki H. Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers. *Cancer Sci* 2004; **95**: 569-574.
6. 西村耕一, 山根一芳, 福島久典. 臨床から分離したバイオフィーム形成性 *Streptococcus intermedius* の分子生物学的解析. *歯科医学* 2008; **71**: 131-138.
7. Yamanaka T, Furukawa T, Yamane K, Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Inoue J, Kamei M, Yasuoka H, Horiike S, Leung K-P, Fukushima H. Biofilm-forming capacity on clinically isolated *Streptococcus constellatus* from an odontogenic subperiosteal abscess lesion. *J Bacteriol Parasitol* 2013; (in press)
8. 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.
9. 山本範子, 福島久典, 佐川寛典. *Prevotella nigrescens* 由来 exopolysaccharide の性状. *歯科医学* 1998; **61**: 21-33.
10. 中谷祐子, 福島久典. *Prevotella intermedia* の産生する粘性物質について. *歯科医学* 1992; **55**: 283-293.
11. 黒田 卓. 顎骨骨膜下膿瘍から分離した細菌の粘性物質産生性. *歯科医学* 2004; **67**: 235-244.
12. 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.
13. Furukawa T, Yamanaka T, Yamane K, Mashimo C, Sumita Y, Sugimori C, Walker CB, Leung K-P, Fukushima H. Oral streptococci isolated from acute abscesses produce biofilm-forming materials. *J Dent Res* 2006; **85**: 2323.
14. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; **38**: 204-211.
15. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; **60**: 539-574.
16. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 7-10.
17. Yamane K, Yamanaka T, Yamamoto N, Furukawa T, Fukushima H, Walker CB, Leung K-P. A novel exopolysaccharide from a clinical isolate of *Prevotella nigrescens*: purification, chemical characterization and possible role in modifying human leukocyte phagocytosis. *Oral Microbiol Immunol* 2005; **20**: 1-9.
18. 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.
19. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 34-40.
20. Petersen FC, Pecharki D, Scheie AA. Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide. *J Bacteriol* 2004; **186**: 6327-6331.
21. Petersen FC, Pasco S, Ogier J, Klein JP, Assev S, Scheie AA. Expression and functional properties of the *Streptococcus intermedius* surface protein antigen I/II. *Infect Immun* 2001; **69**: 4647-4653.
22. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001; **11**: 3-11.
23. Marshall R, Kaufman AK. Production of deoxyribonuclease, ribonuclease, coagulase, and hemolysins by anaerobic gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* 1981; **13**: 787-788.
24. Yamaguchi T, Matsumoto M, Sugimoto Y, Soutome S, Oho T. Gene cloning and characterization of *Streptococ-*

- cus intermedius* fimbriae involved in saliva-mediated aggregation. *Res Microbiol* 2009; **160**: 809-816.
25. Pecharki D, Petersen FC, Scheie AA. Role of hyaluronidase in *Streptococcus intermedius* biofilm. *Microbiology* 2008; **154**: 932-938.
 26. Valla S, Li J, Ertesvag H, Barbeyron T, Lindahl U. Hexuronyl C 5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie* 2001; **83**: 819-830.
 27. 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.
 28. May TB, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol* 1994; **2**: 151-157.
 29. 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.
 30. 福島久典. 口腔感染症におけるバイオフィーム形成菌の役割. 日本歯科医師会雑誌 2005; **58**: 17-28.
 31. 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.
 32. Lazarevic V, Soldo B, Médico N, Pooley H, Bron S, Karamata D. *Bacillus subtilis* α -phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**: 39-45.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Scorpio A, Chabot DJ, Day WA, Hoover TA, Friedlander AM. Capsule depolymerase overexpression reduces *Bacillus anthracis* virulence. *Microbiology* 2010; **156**: 1459-1467.
 36. 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ームを形成する *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.
 37. Yamanaka T, Sumita-Sasazaki Y, Sugimori C, Matsu-moto-Mashimo C, Yamane K, Mizukawa K, Yoshida M, Hayashi H, Nambu T, Leung K-P, 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.

Draft genome sequencing of biofilm-forming *Streptococcus constellatus*

Hiroshi Yasuoka, Kazuyoshi Yamane and Hisanori Fukushima

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

Abstract *Streptococcus constellatus*, a member of the anginosus group streptococci, is commonly associated with oral abscesses, bacteremia with subsequent septic shock, and brain abscesses. We isolated *S. constellatus* strain H39 from an apical abscess lesion. Scanning electron micrographs revealed that strain H39 had dense meshwork-like structures around the cells, which are a characteristic of biofilm-forming bacteria. In this study, we reported a draft genome sequencing of strain H39 which can be used for further genetic study on biofilm formation mechanisms. The genome sequencing was performed by pyrosequencing. The putative gaps between contigs were closed by sequencing of polymerase chain reaction amplicons over the gaps. A high-quality draft genome sequence indicated that strain H39 had 3 ribosomal RNA genes, 45 transfer RNA genes and 1,926 putative protein-coding genes. We also found that strain H39 possessed genes encoding exopolysaccharide biosynthesis proteins and ABC-type polysaccharide transport proteins. These genes might contribute to the biofilm formation of *S. constellatus* strain H39. **Shika Igaku (J Osaka Odontol Soc) 2013 ; September ; 76(2) : 75–82.**

Key words : *Streptococcus constellatus* ; Biofilm ; Exopolysaccharide