

背景と目的

*Veillonella*属細菌は、ヒト口腔等から高頻度に分離される偏性嫌気性グラム陰性球菌である。歯科の二大疾患であるう蝕と歯周病の原因は口腔バイオフィームであり、その初期形成期に*Veillonella*属細菌が重要な役割を担うことが示唆されてきたが、培養や菌種の判別が困難である等の理由から、その詳細な研究が進められてこなかった。

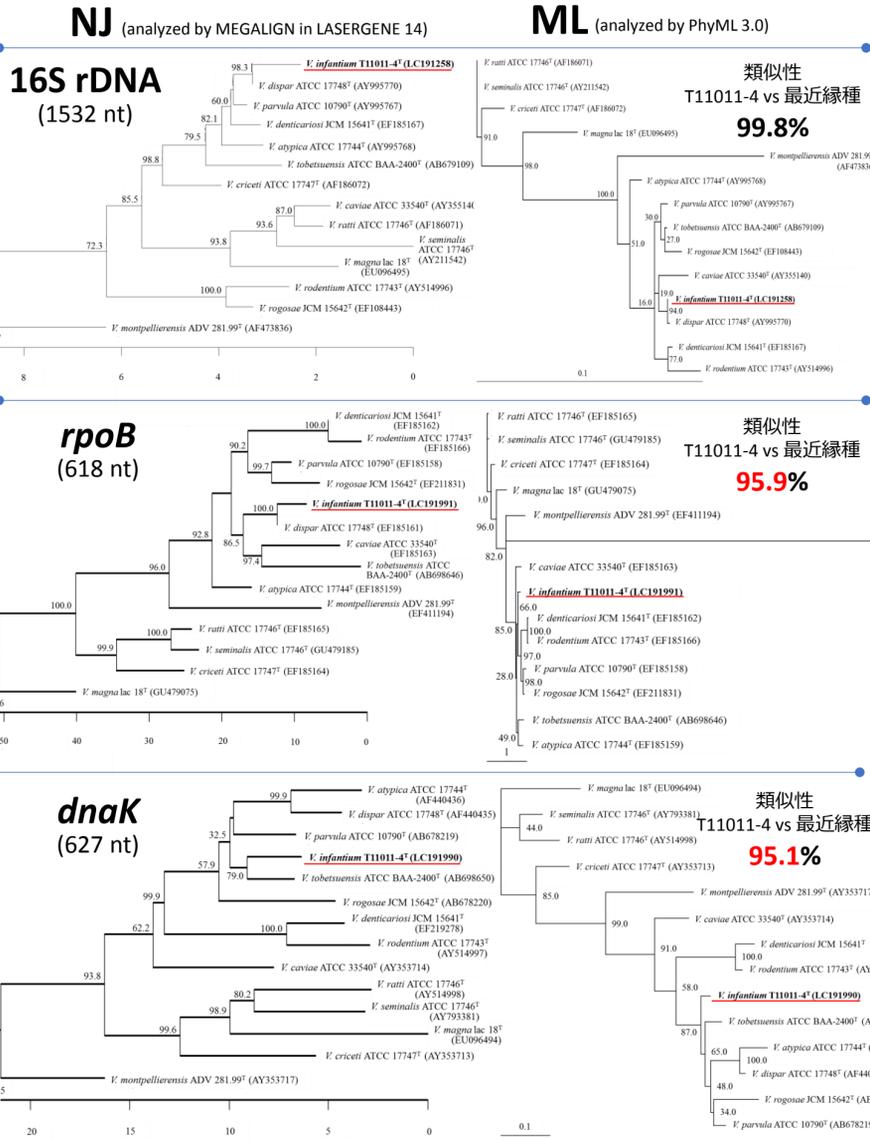
本研究では、口腔バイオフィームにおける*Veillonella*属細菌の生態学的役割の解明を進めるにあたり、以下の項目に従って研究を遂行した。

1. *Veillonella*属細菌種の網羅的系統分類
2. *Veillonella*属細菌由来Autoinducersの同定
3. 上記物質の口腔バイオフィーム初期形成期における作用の解明

結果 1 新菌種*Veillonella infantium*の確立

Pilot Study: ヒト口腔より分離した多数の*Veillonella*属菌種未同定株(教室保存株)を16S rDNA, *rpoB*, 及び*dnaK*遺伝子による系統樹及び類似性解析を行った結果、小児舌苔より分離されたT11011-4株を新菌種候補とした。

系統樹・類似性解析



近縁・標準菌種との特徴比較

Characteristic	1	2	3	4	5
Isolation	Human tongue biofilm	Human saliva	Human oral cavity and respiratory tract	Human and rodent oral cavity and intestinal tract	Human tongue biofilm
Colony color on BHI blood agar	Grayish-white	Grayish-white	Grayish-white	Grayish-white	Grayish-white
Cell diameter (µm)	0.3-0.5	0.3-0.5 ¹	0.3-0.5 ¹	0.3-0.5 ¹	0.3-0.7 ¹
Catalase	-	-	+	-	-
Biochemical profile (Rapid ID 32A and API ZYM)					
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Pyroglutamic acid arylamidase	+	+	+	+	+
Esterase [§]	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	-
Esterase- <i>lipase</i> [§]	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	-
Acid phosphatase [§]	+(5)	+(3)	+(5)	+(5)	+(3)
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase [§]	+(5)	+(3)	+(5)	+(3)	+(3)
DNA G + C contents (mol%)	38.6	39.0 [†]	38.6 [†]	38.6 [†]	38.5 [†]
ANI values vs T11011-4 [†] (%)		84.67	91.88	86.17	85.10

Taxa: 1, Strain T11011-4^T; 2, *V. atypica* ATCC 17744^T; 3, *V. dispar* ATCC 17748^T; 4, *V. parvula* ATCC 10790^T (標準菌種); 5, *V. tobetsuensis* ATCC BAA-2400^T; +, Positive; -, Negative; w, weak.

* Data from Carrier JP (2015).

† Data from Holt et al. (1994); cell diameter generally given for the genus *Veillonella*

‡ Data from Mashima et al. (2013)

§ Numbers in parentheses indicate the strength of the positive reaction (from 1 to 5).

The genome sequence data of close related species referenced from GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=>). The absolute values are corresponding to 100%.

● T11011-4株は、16S rDNA遺伝子解析や生化学的性状試験結果から、確実に*Veillonella*属に属することが確認された。

● 終末代謝産物の測定(GC)において、乳酸を酢酸とプロピオン酸に代謝する*Veillonella*属の特徴的な性質も確認された。

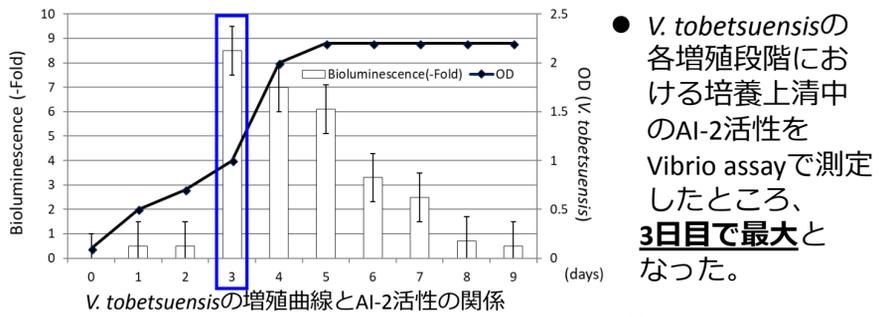
● *rpoB*及び*dnaK*遺伝子解析、ANI解析の結果から、T11011-4株は既報の*Veillonella*属には分類されない新菌種であることが明らかになった。

結果 2

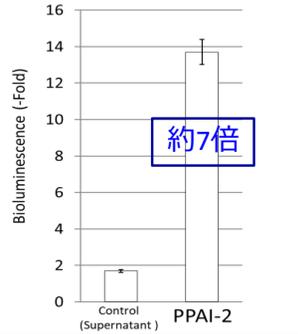
AI-2様分子とCyclic-di-peptide

Pilot Study: 代表的口腔バイオフィーム形成開始菌である *Streptococcus*属4菌種と口腔*Veillonella*属全6菌種(実験当時)を用いてバイオフィームを形成させた結果、*V. tobetsuensis*の存在下で、*S. gordonii*が最も多くのバイオフィームを形成した。本研究では当該バイオフィーム形成促進因子としてautoinducersを中心とした菌体外産生物に着目した。

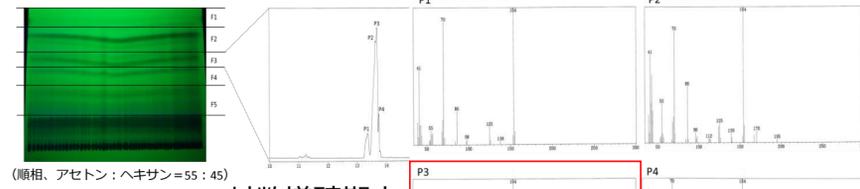
*V. tobetsuensis*由来AI-2様分子の検出と部分精製



- 3日目の培養上清を遠心、限外濾過、凍結乾燥後、Sep-Pak C18 (Waters)で分画し、各画分に対してVibrio assayを行った。
- 最大活性は元の上清中の活性の約7倍を示し、本画分をPPAI-2(Partial Purification of AI-2; AI-2部分精製物)とした。



*V. tobetsuensis*由来Cyclo(-L-Leu-L-Pro)の検出と同定

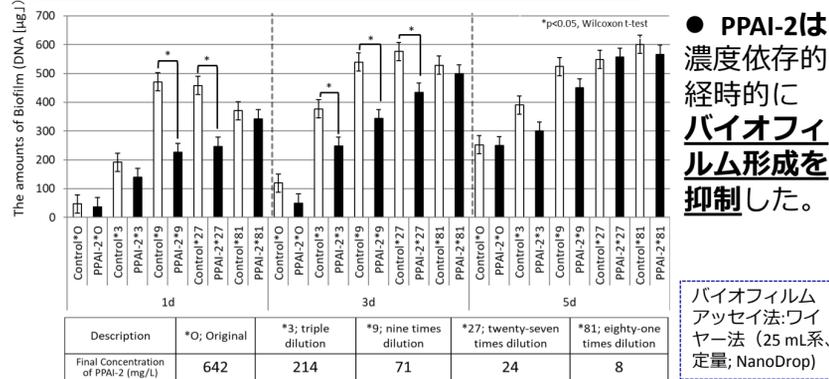


- *V. tobetsuensis*対数増殖期末期の培養上清を遠心濾過後、酢酸エチルで抽出し、TLC展開した。
- TLCの各画分を削り取り、エタノール抽出後、減圧乾燥し、GC分析を行った。
- 画分3(F3)で最大ピークが認められ、P1~P4のMS解析の結果、Cyclo(-L-Leu-L-Pro)がヒット(99%)した。
- Cyclo(-L-Leu-L-Pro)の標準品のGC-MS解析の結果、P3のMSが一致した。
- *V. tobetsuensis*がCyclo(-L-Leu-L-Pro)を産生していることが明らかになった。

結果 3

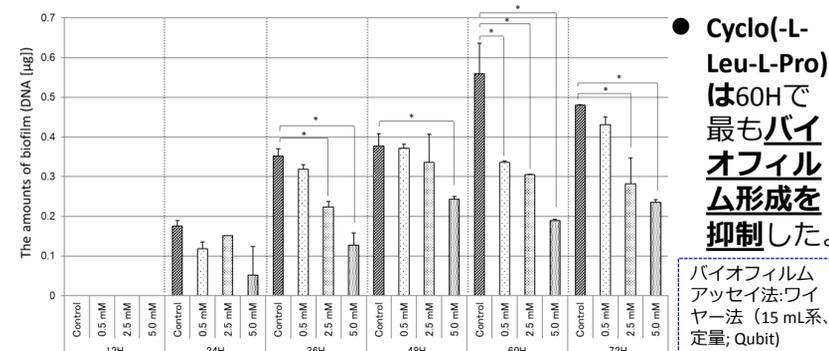
口腔バイオフィーム形成阻害

PPAI-2の*S. gordonii*バイオフィームに対する影響



代表的AI-2の一種として報告されている、4-hydroxy-5-methyl-3-furanoneの検量線を用いて、*V. tobetsuensis*由来AI-2部分精製物の濃度基準の根拠とした。

Cyclo(-L-Leu-L-Pro)の*S. gordonii*バイオフィームに対する影響



考察と結論

- *V. tobetsuensis*由来AI-2及びCyclo(-L-Leu-L-Pro)がう蝕や歯周病の新規的予防及び治療法の確立に応用できる可能性が示唆された。
- *V. tobetsuensis*由来の*S. gordonii*バイオフィーム形成促進には他の因子の存在が考えられる。
- *Veillonella*属細菌の系統分類がさらに進み、今後口腔バイオフィームの形成機序の解明に寄与することが期待される。

命名: ***Veillonella infantium***
(JCM 31738^T, ATCC TSD-88^T)

Mashima et al., IJSEM 68(4):1101-6, 2018