

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名 : (日本語) 発現マッピング法による細菌叢電気相互作用の追跡と制御基盤の構築
(英語) Study and Control of Intercellular electrochemical interactions in microbiome biofilm by Gene Expression Mapping
- 研究開発担当者 (日本語) エネルギー・環境材料研究拠点/ナノ界面エネルギー変換グループ
主任研究員 岡本 章玄
- 所属 役職氏名 : (英語) Global Research Center for Environment and Energy based on Nanomaterials Science, Senior Researcher, Akihiro Okamoto
- 実施期間 : 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

（日本語）

本年度は、これまでに発見している電気生成能を有する口腔細菌（電気細菌）の純粋培養系を用いた基礎的検討の結果から、電子移動に基づいたう蝕の新機構の提案・検討を行った。さらに、九州歯科大学の西原達次教授グループの協力の元、ヒト歯垢の採取を行い、次年度から計画している電気相互作用を追跡するための口腔バイオフィーム解析へ向けたサンプル調整条件の最適化などの準備を進めた。特にう蝕機構に関する成果は当初の計画になかった予想外の成果であり、当初の想定以上に研究計画が順調に進行している。

これまで、う蝕の原因となるバイオフィームの酸性化に関しては、細菌が糖を分解し、生成する乳酸によって引き起こされるということが長年の定説であった。しかし、本研究では電気細菌が電極へと電子移動を行う際にもこのようなバイオフィームの酸性化が進行することを初めて見出した。得られた成果を、第58回歯科基礎医学会やThe 3rd Asia-Pacific Conference of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technologyで発表したところそれぞれ優秀ポスター賞、最優秀発表賞にそれぞれ選ばれた。これまでに考えられてこなかった細菌の電子移動による初となる疾患機構を提案する本成果は、その後の詳細な検討によって様々な新しい機構の解明へと繋がっており、現在論文を準備中である。さらに、見出した電気的な性質を用いた新たな医療材料開発へと今後繋げていく新しい展開が開けた。

口腔バイオフィームの解析技術の開発に関しては、サンプル調整条件の最適化を行い、モデル電気細菌を用いたイメージング解析技術の開発も行った。具体的には、観察処理をする前にヒト歯垢のサンプリングの構造を維持し、長期間保存するための方法、さらにバイオフィームの超薄切片を作製するための処理条件の最適化を行った。特に、生きた状態のバイオフィームの構造を μm オーダーで保持しながら一定時間培養することは、該当分野において新しい試みであり、本研究計画の遂行においても重要な成果であると言える。また、モデル電気細菌を用いて電気代謝を行った際の遺伝子発現量を追跡する方法論を確立し、その一部のデータを論文に報告した（*Electrochemistry*, 2017 in press）。同位体ラベルした窒素や炭素の存在下、電気細菌の電子移動速度を選択的に制御し、同位体元素の取り込み速度を一細胞レベルで追跡した。すると、平滑かつ均一な電極上においても個々の細菌の活性は多様であり、100倍以上の同位体取り込み量の差が観測された。また、電子移動の高速化に伴い細菌活性が著しく変化することから、電子移動と細菌活性が紐づけられることを確認した。さらに検討を進め、一細胞活性を統計的に処理することによって、細菌の代謝経路を特定する方法論を開発した。今後、同様の検討を口腔内の病原細菌でも行うことによって、バイオフィーム内細菌の代謝状態を追跡する手法へと展開する予定である。

(英語)

We proposed and examined a new mechanism of cariogenicity promoted by microbial extracellular electron transfer based on the study of pure culture of oral bacteria. In addition, by the cooperation of Prof. Tatsuji Nishihara group in Kyushu Dental University, we collected dental plaque samples and optimized conditions for oral biofilm analysis to pursue the electrical interaction planned from next year. Our achievements concerning the cariogenicity mechanism are unexpected contents which were not planned in our project at the initial point, indicating that our research is steadily progressing beyond the original expectation.

It has been an established mechanism of cariogenicity for many years that acidification of biofilm causing dental caries is promoted by bacterial fermentation product of lactic acid. However, in our study, we found for the first time that acidification of such biofilm progresses even when the electric bacteria transfer electrons to the electrode at the bottom of biofilm. These results were presented at the 58th Annual Meeting of Japan Association for oral biology and The 3rd Asia-Pacific Conference of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, and they were selected as excellent poster awards and best presentation awards, respectively. This finding that proposes the first disease mechanism due to the microbial extracellular electron transfer of bacteria, and opened up new direction for the development of the dental of new medical materials using the electrical properties.

Regarding to the development of analytical techniques for *in vivo* oral biofilms, conditions for sample treatments were optimized, and our imaging analytical method was developed with the pure culture of model electrogenic bacteria. Specifically, we developed the method for maintaining the micro-scale structure of human dental plaque and preserving it for a long period of time before the observation treatment, and optimizing the processing conditions for producing ultrathin sections of the biofilm. In particular, inoculation technique with maintaining the micro-scale structure of the biofilm in the living state is succeeded for the first time, and an important milestone in our research project. We also established a methodology to monitor the gene expression level while electric metabolism occurs by using model electric bacteria, and have reported some of the data (Electrochemistry, 2017 in press). In the presence of isotope-labeled nitrogen and carbon source, the electron transfer rate of the electric bacteria was controlled, monitoring the uptake rate of the isotope element at the single cell level. Given the bacterial activity changes markedly as the electron transfer speed increases, it was confirmed that the electron transfer activity and the bacterial activity are linked. Further investigations have been made to find a methodology to identify metabolic pathways of bacteria by statistically processing single cell activity. Developed analytical techniques will be carried out with pathogenic bacteria in the oral cavity, and will be further developed for tracking the state of the bacteria in the *in vivo* biofilm.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国際誌 1 件)

1. Saito J, Hashimoto K, Okamoto A, Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Individual Bacterial Cells Reveals Feedback from Extracellular Electron Transport to Upstream Reactions. *Electrochemistry*. 2017 in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in dental cavity is promoted by biofilm acidification via extracellular electron transfer, ポスター, Divya Naradasu, Kazuhito Hashimoto, Akihiro Okamoto, 第 58 回歯科基礎医学会, 2016/8/24-26, 国内
2. Biofilm Acidification promoted via extracellular electron transfer by oral plaque microbe *Streptococcus mutans* UA 159, 口頭, Divya Naradasu, Kazuhito Hashimoto, Akihiro Okamoto, The 3rd Asia-Pacific Conference of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, 2016/8/31-9/2, 国外
3. Extracellular Electron Transfer by oral plaque pathogen: A plausible cariogenesis mechanism, ポスター, Divya Naradasu, Kazuhito Hashimoto, Akihiro Okamoto, つくば医工フォーラム, 2017/1/20, 国内
4. Extracellular Electron Transfer by an oral plaque pathogen: *Streptococcus mutans* UA159, 口頭, Divya Naradasu, Kazuhito Hashimoto, Akihiro Okamoto, 日本化学会第 97 春季年会, 2017/3/16-19, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし