

トヘルペスウイルス再活性化の分子メカニズムの解明.  
第10回日本疲労学会総会・学術集会. 大阪, 5月.

- 6) 小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 鈴木豪<sup>1)2)</sup>, 徳野慎一<sup>3)</sup>, 丹生谷正史<sup>3)</sup>, 三谷圭司<sup>3)</sup>, 小原健幸<sup>1)</sup>, 山本哲生<sup>1)</sup>, 向井保雄<sup>1)</sup> (1陸上自衛隊), 清水邦夫<sup>4)</sup>, 丸山徹<sup>2)</sup> (2自衛隊中央病院), 立花正一<sup>4)</sup> (4防衛医学研究センター), 妻島元太郎<sup>3)</sup> (3防衛医科大), 倉恒弘彦<sup>5)6)</sup> (6関西福祉科学大), 杉野友啓 (総合医科学研究所), 梶本修身<sup>5)</sup> (5大阪市立大), 渡辺恭良 (理化学研究所), 近藤一博. 唾液中ヒトヘルペスウイルス量変化を利用した客観的疲労評価法による, 生理的疲労と慢性疲労症候群との鑑別. 第10回日本疲労学会. 大阪, 5月.
- 7) Kobayashi N, Oka N, Shimada K, Kondo K. Novel human herpesvirus 6 stress-related latent protein induces depression and suicide. 39th Annual International Herpesvirus Workshop 2014. Kobe, July.
- 8) Shimada K, Kobayashi N, Oka N, Osawa M, Kondo K. Human Cytomegalovirus (HCMV) Latency-associated protein ORF152 induces calcium signaling and promotes differentiation of myeloid progenitor cells. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, July.

## 細菌学講座

教授：水之江義充	細菌学, 分子生物学
講師：田寫亜紀子	細菌学, 分子生物学
講師：岩瀬忠行	細菌学, 分子生物学
講師：杉本真也	細菌学, 分子生物学
講師：奥田賢一	細菌学, 分子生物学

### 教育・研究概要

#### I. 分子シャペロンを標的にした新しいバイオフィルム阻害法の開発

大腸菌を用いた遺伝学的な解析から分子シャペロン DnaK がバイオフィルムの形成に必須であることを明らかにした。次に, DnaK の活性を抑える低分子化合物を用いて, バイオフィルム形成を抑制できるか検証したところ, 植物由来のフラボノールである Myricetin が, 大腸菌の増殖を阻害せず濃度依存的にバイオフィルム形成を抑制できることを明らかにした。Myricetin を添加した際には, バイオフィルムの形成に重要な curli の産生が抑制されていた。さらに Myricetin は, MRSA を含む黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成も抑制した。以上より, 分子シャペロン DnaK はバイオフィルム形成に重要で, DnaK がグラム陰性菌のみならずグラム陽性菌の抗バイオフィルム薬の標的となりうることを示された。本研究の一部は, 熊本大学発生医学研究所が推進する「発生医学の共同研究拠点」制度に基づく共同研究として行われた。

#### II. 蛍光プローブチオフラビン T による RNA 代謝の高感度モニター

アミロイド線維の検出試薬として汎用されているチオフラビン T (ThT) が RNA にも強く結合することを見出した。特に, プリン塩基 (アデニンとグアニン) を多く含む RNA に結合した。さらに, 大腸菌の細胞内 RNA の量的変動を ThT で可視化することができた。特に, 休眠状態にあって RNA 合成が低下している “persister” と呼ばれるごく少数の菌を識別するのに有効であった。さらに, 本手法は, 大腸菌のみならず, 黄色ブドウ球菌, 表皮ブドウ球菌, バチルス属細菌, コレラ菌, 緑膿菌など様々な細菌にも適用可能であった。以上より, ThT を用いることで, 遺伝子発現の揺らぎを 1 細胞レベルで観察でき, リアルタイムイメージングへ応用できる可能性を示した。

### Ⅲ. バイオフィームライフサイクル（形成と崩壊）の解析

黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成と崩壊においてマトリクス中の eRNA が重要であることを見出した。黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成の経時変化をグルコース添加または非添加培地で調べたところ、どちらも 8 時間でバイオフィーム量がピークに達したが、24 時間後にグルコース非添加培地ではバイオフィームの崩壊が見られた。細胞外マトリクスの解析から、このバイオフィーム崩壊はマトリクス中の eDNA、eRNA の分解との関連が示唆された。バイオフィームを DNaseI 処理すると、マトリクス中の DNA 分解はおこるがバイオフィーム崩壊は見られなかった。RNaseA 処理ではバイオフィーム崩壊がみられ、また RNase はバイオフィーム形成も阻害したことからマトリクス中の eRNA がバイオフィーム構造に重要であると考えられた。黄色ブドウ球菌は耐熱性の nuclease (NucA; 16.8KDa, NucB; 18.8KDa) を産生することが知られている。崩壊したバイオフィーム上清中には、バイオフィーム破壊作用がみられ、50-10KDa 画分をイオン交換カラムで分画し DNA zymography、バイオフィームアッセイで解析したところ、DNA 分解活性のある画分にバイオフィーム破壊作用がみられた。以上より黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成において eRNA が重要な役割をもち、自身が産生する酵素で RNA 分解することによってバイオフィーム崩壊が起こることが示唆された。現在その機構についてさらに解析を進めている。

### Ⅳ. ベースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* によるバイオフィーム形成

体内に長期間留置される医療用デバイスの 1 つであるベースメーカーをモデルとして、培養法によるバイオフィーム形成細菌の検出と分子系統解析、およびバイオフィームの性状解析を行った。感染の兆候がない患者から摘出されたベースメーカー 31 検体（ジェネレーター部分）をウサギ血液寒天培地にスタンプし、培養したところ、8 検体が培養陽性となった（陽性率：25.8%）。分離した株の 16S rDNA シーケンス解析を行い、*Propionibacterium acnes*（7 株）と *Staphylococcus hominis*（1 株）を同定した。*P. acnes* について Multilocus sequence typing (MLST) を行ったところ、ST2（2 株）、ST4（1 株）、ST53（1 株）、ST69（2 株）、新規 ST（1 株）と帰属された。いずれの株においても、バイオフィーム形成はグルコースによって促進された。ST2

に帰属された 2 株のバイオフィーム形成能は大きく異なっており、バイオフィーム形成能は MLST の結果と必ずしも相関しないことが示唆された。また、バイオフィームの各種酵素に対する感受性試験を行った結果、すべての株において細胞外 DNA はバイオフィーム形成に強く関与しており、タンパク質と多糖の関与は株によって差があることが示唆された。本研究は、平成 24 年度私立大学戦略的研究基盤形成事業「バイオフィーム感染症制圧研究拠点の形成」の支援を受け行われている。

### Ⅴ. バイオフィーム阻害剤の大規模スクリーニング

バイオフィーム感染症に対する新たな予防法および治療法の開発を目指し、バイオフィーム形成阻害活性を有する化合物のスクリーニングを行ってきた。これまでに、黄色ブドウ球菌をターゲットとして 59,600 化合物（119,200 アッセイ）のスクリーニングを行い、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含むブドウ球菌属のバイオフィーム形成を強く阻害する 2 つの化合物、ABC-JK1 および ABC-JK2 の取得に成功した。作用機序解析の結果、2 つの化合物はともにブドウ球菌属の細胞外多糖の合成と細胞壁の形成に影響を与えることが明らかになった。現在、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析を統合させたマルチオミクス解析により分子レベルでの作用機序の解析が進行中である。本研究は、平成 24 年度私立大学戦略的研究基盤形成事業「バイオフィーム感染症制圧研究拠点の形成」の支援を受け行われている。

### Ⅵ. 哺乳類腸内における窒素固定

窒素固定を行う細菌の中には、腸内細菌科に属し、哺乳類や昆虫の腸内に生息するものが存在する。近年の研究により、昆虫の腸内におけるこれらの細菌による窒素固定は確認されたが、哺乳類の腸内における窒素固定は未だその詳細が明らかではない。

本研究において、窒素固定細菌のみを有するマウスモデルを構築し、マウスの腸内で窒素固定が行われるかどうか、また固定された窒素がマウスの体組織に取り込まれるかどうかを検討した。

窒素固定細菌を有するマウスの腸内容物において、窒素固定のパラメータである窒素固定遺伝子 *nifH* の発現が確認された。また腸内容物に重窒素ガス ( $^{15}\text{N}_2$ ) を暴露し、元素分析/同位体比質量分析計を用いて窒素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) を分析してみた結果、窒素固定細菌を有するマウスの腸内容物においてのみ、 $\delta^{15}\text{N}$  が有意に上昇することが確認された。 $^{15}\text{N}_2$

存在下でマウスを飼育するため、 $^{15}\text{N}_2$  暴露用の閉鎖型循環式特型インキュベータをメーカーとともに設計・開発を行った。本機を用いて窒素固定細菌を定着させたマウスを  $^{15}\text{N}_2$  存在下で飼育し、組織(体毛、肝臓、腸管、腸内容物)を回収し、 $\delta^{15}\text{N}$  について分析を行った。その結果、腸内容物、そして腸管と肝臓において  $\delta^{15}\text{N}$  の有意な上昇が認められた。腸内容物の  $\delta^{15}\text{N}$  が最も高く、次いで腸管、肝臓の順であった。体毛では有意な差は見られなかった。今後より詳細な検討を行う予定である。

## Ⅶ. 新規感染症治療法の開発

近年、多剤耐性菌による難治性感染症が問題となっている。消化器・肝臓内科の光永眞人講師等によって開発された新規がん治療法－光線免疫療法－の難治性細菌感染症への応用について同講師等とともに共同で研究を行っている。本法は極めて効果的に多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を死滅させる。今後、マウス感染症モデルを用いてその効果を検討する予定である。

### 「点検・評価」

#### 1. 教育について

教育に関しては、臨床基礎医学(細菌・真菌と感染、感染症総論)の講義を担当した。細菌学実習は、123名を数班に分け、学生に密着して指導を行い、カリキュラムをよく理解させることができた。また、演習として感染・免疫テュートリアルを担当した。

3年次医学生の実験室配属では7名を、6年次医学生の実験実習では6名を受け入れ、多岐にわたる研究指導を行った。学生にとっても好評であった。

看護学科(国領校)2年次学生に微生物学、看護専門学校(西新橋校)1年次学生に感染と免疫、柏看護専門学校1年次学生に微生物学の講義を行った。

#### 2. 研究について

本年度は、従来から取り組んでいる黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成機構の解明およびバイオフィーム形成阻害因子のスクリーニングが大きく前進した。また、臨床との共同研究も着実に成果を上げている。具体的な研究内容として、1) 分子シャペロンを標的にした新しいバイオフィーム阻害法の開発、2) 蛍光プローブチオフラビン T による RNA 代謝の高感度モニター法の開発、3) バイオフィームライフサイクル(形成と崩壊)の解析、4) ペースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* によるバイオフィーム形成能の解析、5) バ

イオフィーム阻害剤の大規模スクリーニング、6) 哺乳類腸内における窒素固定、7) 新規感染症治療法の開発などがあげられる。さらに、入院患者より回収された中心静脈カテーテルに付着しているバイオフィームの解析を開始した。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Kinoshita T<sup>1)</sup>, Mori Y (National Institute of Infectious Diseases), Hirano K<sup>1)</sup>, Sugimoto S, Okuda K, Matsumoto S<sup>2)</sup>, Namiki T<sup>3)</sup>, Ebihara T<sup>4)</sup>, Kawata M<sup>4)</sup>, Nishiyama H<sup>5)</sup>, Sato M<sup>4)</sup>, Suga M<sup>5)</sup> (<sup>5</sup>JEOL), Higashiyama K<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>Suntory Global Innovation Center), Sonomoto K<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Kyushu Univ), Mizunoe Y, Nishihara S<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Soka Univ), Sato C<sup>4)</sup> (<sup>4</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology). Immuno-electron microscopy of primary cell cultures from genetically modified animals in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Microsc Microanal* 2014; 20(2): 470-84.
- 2) Arita-Morioka K<sup>1)</sup>, Yamanaka K<sup>1)</sup>, Mizunoe Y, Ogura T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Kumamoto Univ), Sugimoto S. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(1): 633-41.
- 3) 水之江義充. バイオフィーム 私たちをとりまく環境と健康との関わり－バイオフィーム感染症制圧の新たな試み. *BACTERIAL ADHEREN & BIOFILM* 2014; 27: 25-6.

### II. 総説

- 1) 水之江義充, 杉本真也, 岩瀬忠行. 常在細菌による黄色ブドウ球菌排除メカニズム. *呼吸器内科* 2014; 26(1): 49-52.
- 2) 杉本真也. バイオミディア やられたらやりかえす 6型分泌装置を介した細菌同士の死闘. *生物工会誌* 2014; 92(9): 513.

### III. 学会発表

- 1) 杉本真也, 有田健一<sup>1)</sup>, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋光<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>熊本大), 水之江義充. DnaK/Hsp70 シャペロンシステムは8型分泌装置の発現と品質を制御する. 第88回日本細菌学会総会. 岐阜, 3月.
- 2) 千葉明生, 杉本真也, 水之江義充. Extracellular small RNA はバイオフィームの構造維持に重要である. 第88回日本細菌学会総会. 岐阜, 3月.
- 3) 水之江義充. バイオフィームを標的にした感染症治療薬の探索. 第88回日本細菌学会総会. 岐阜, 3月.

- 4) 千葉明生, 杉本真也, 佐藤文哉, 堀 誠治, 水之江義充. 迅速な非侵襲的バイオフィルムマトリクス抽出法の開発. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 11月.
- 5) Okuda K, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, Mizunoe Y. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Oct.
- 6) 杉本真也, 有田(森岡)健一<sup>1)</sup>, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋光<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>熊本大), 水之江義充. 分子シャペロン DnaK はタンパク質のフォールディングと局在化を介してバイオフィルム形成を制御する. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 7) Sugimoto S, Okuda K, Sato M<sup>1)</sup>, Sato C<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), Mizunoe Y. Fine structures of biofilms in solution visualized by atmospheric scanning electron microscopy. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Oct.
- 8) 水之江義充. (シンポジウム2: 感染症治療の問題点とその克服 ~基礎ならびに臨床から~) バイオフィルム形成による治療抵抗性を示す感染症 (Device-related infection) とその克服. 医療薬学フォーラム 2014/第22回クリニカルファーマシーシンポジウム. 東京, 6月.
- 9) 有田(森岡)健一<sup>1)</sup>, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 水之江義充, 小椋光<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>熊本大), 杉本真也. 分子シャペロン DnaK を標的とする低分子化合物を用いた新たなバイオフィルム阻害法の開発. 第37回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 10) 岩瀬忠行. 哺乳類腸内における窒素固定. 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI 医学応用研究基盤拠点) の形成」第5回研究報告会. 東京, 3月.
- 11) 岩瀬忠行. 細菌学研究の流れ. 細菌学次世代構想研究会. 岐阜, 3月.

#### IV. 著 書

- 1) 水之江義充. 3. 細菌学各論 3.1. グラム陰性細菌 3.1.4. グラム陰性球菌および球菌 a. ナイセリア属, b. モラクセラ属, c. アシネトバクテラ属. 荒川宜親 (名古屋大), 神谷 茂 (杏林大), 柳 雄介 (九州大) 編. 病原微生物学: 基礎と臨床. 東京: 東京化学同人, 2014. p.96-7.

## 熱帯医学講座

教授: 嘉糠 洋陸 寄生虫感染と衛生動物学  
准教授: 石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫

### 教育・研究概要

#### I. 消化管寄生線虫2種の混合感染による相互作用

ヒトの消化管寄生線虫は長期に渡って感染し, しばしば混合感染をしている。この寄生に対して宿主免疫は Th2 応答を発現し, 腸管内環境をダイナミックに変化させるが, 結果的には排虫に至らない。マウスの実験では, 腸管からの排虫は IL-13/Stat6 を介したシグナルに大きく依存していることが明らかとなっている。 *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) は経皮感染後3日で小腸に到達し, 10日には IL-13/Stat6 依存性に排除される。一方, *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) は経口感染後, 一旦小腸の筋層内で発育して8日に管腔に戻り, Th2 応答を誘導するものの, 2ヶ月は感染し続ける。今回, ヒトの感染モデルと考えられる Hp 感染に対して, 急性に感染が終息する Nb を感染させた際の, 両種の寄生動態について検討した。 Hp 感染後10日に Nb を感染させて, Nb が Hp の感染に乗じて長期間定着するかどうか, 逆に, Nb が排除される時期 (感染後10日) に Hp が筋層から管腔に戻るように Hp を後追い感染させて, Hp が Nb と共に排除されるかどうかなどを検討した。その結果, 1) 先行感染した寄生虫は他種の後続感染によって寄生期間を延ばし, 一方, 2) 後続感染寄生虫は, 先行感染寄生虫によって誘導された宿主免疫応答の影響を受けること, さらに, 3) 虫卵形成は排除とは別に宿主免疫の影響を受けやすいことが示唆された。単独感染による排虫機構解析から「寄生虫種によって排除機序が異なる」という概念が提唱されてきているが, 自然界での事象をより反映させた本実験系は「宿主免疫応答を介した寄生虫間相互作用」において新しい概念を提唱すると考える。

#### II. フィラリアの生活環における環境応答性トランジション

寄生性線虫であるフィラリアの生活環は, 媒介昆虫 (蚊) と哺乳動物宿主の2つの動物ステージを経て完結する。この際, 蚊-宿主間の移行に伴う温度変化の乗り越え (適応) システムを解明するため, 犬フィラリア (*Dirofilaria immitis*) の第3期幼虫 (L3) における脱皮機構をモデルとして解析した。