

## 細菌学講座

教授：水之江義充	細菌学, 分子生物学
講師：田畠亜紀子	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. 哺乳類腸内における窒素固定 (NF)

NF 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ある。近年の研究により、昆虫の腸内における NF は実験的に確認されたが、哺乳類の腸内における NF の詳細はまだまだ明らかではない。

本検討において、窒素固定細菌 (NFB) のみを有するマウスを開発し、その腸内において、NF 遺伝子が発現していることを RT-PCR により確認した。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 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) を分析したところ、NFB を有するマウスにおいてのみ、 $\delta^{15}\text{N}$  が有意に上昇することを確認した。また、機器メーカーとともに開発を行った  $^{15}\text{N}_2$  暴露用の閉鎖型循環式インキュベータを用いて NFB を有するマウスを飼育し、その体組織の  $\delta^{15}\text{N}$  について分析したところ、体毛では有意な差は見られなかったが、腸内容物、腸管、そして肝臓において  $\delta^{15}\text{N}$  の有意な上昇が認められた。

#### II. シグマ因子変異臨床分離株の解析

腸管出血性大腸菌のストレス応答を検討する中で、ストレス応答を制御するシグマ因子に、新規の single point mutation が生じた株を見出した。本変異の解析により、当該部位の疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸へと置換することで、シグマ因子に機能不全を引き起こすことが確認された。さらに、レポーターアッセイによって、本変異を持ったシグマ因子は、その支配下にあるストレス耐性に寄与する遺伝子群の発現誘導を行えないことが明らかになった。本研究はシグマ因子の機能部位の特定に寄与するものと考えられる。

#### III. シグマ因子活性測定法の開発

ストレス応答を制御するシグマ因子の活性は、病原細菌のストレス抵抗性を検討するうえで極めて重要な指標となる。しかしながら、その活性を直接的

に測定することは難しい。そこで本検討において、シグマ因子によって正に制御される細菌のグリコーゲン合成に着目し、細菌のグリコーゲン量を簡便かつ鋭敏に定量することでシグマ因子の活性を間接的に測定する方法を開発した。本法は 3 mg/ml までグリコーゲンを直線的に検出可能であり ( $R^2 = 0.994$ )、シグマ因子の活性の測定に応用することができた。

#### IV. 分子シャペロンによるバイオフィーム形成の制御メカニズム

細胞質分子シャペロン DnaK は curli と呼ばれる菌体外アミロイド線維の産生を正に制御することで、バイオフィーム形成に重要な役割を果たす。本研究では、curli の産生における DnaK の役割を生化学的・細胞生物学的に解析した。その結果、DnaK が curli の主要な構成成分である CsgA の菌体外への輸送に関わることを見出した。DnaK は CsgA の N 末端に存在するシグナル配列に直接結合し、細胞質での CsgA の凝集を抑制することがわかった。

#### V. Curli の産生における補因子 (コシャペロン) の機能解析

分子シャペロン DnaK はコシャペロンである DnaJ および GrpE と協調的に機能することで、様々なタンパク質の品質管理を担う。本研究では、curli の産生におけるコシャペロンの必須性を解析した。遺伝子欠損株や変異体タンパク質を用いた分子遺伝学的解析の結果、DnaJ および GrpE のいずれかがなくても curli は産生されることがわかった。一方、DnaJ および GrpE のいずれかを欠損した大腸菌は、高温での生育が著しく低下した。また、活性の低い変異型 DnaK を発現する大腸菌では、DnaJ と GrpE の両方が curli の産生において必須であった。一部の原始的な細胞内共生細菌は、*dnaJ* あるいは *grpE* 遺伝子を欠損しており、本研究での観察結果は、原始的な DnaK の作用機構を示唆しているのかもしれない。

#### VI. ヌクレアーゼによるバイオフィーム dispersal

黄色ブドウ球菌のバイオフィームにおいて、形成後にバイオフィームの崩壊がみられたことから菌が dispersal (分散) を引き起こしていると考えられた。細胞外マトリックス、培養上清の解析からヌクレアーゼの関与が示唆され、変異株を用いた解析から菌自身の産生するヌクレアーゼによって dispersal が起きていることが明らかとなった。またヌクレ

アーゼによる dispersal は、上清中の pH に依存して起こることから、環境中の pH が重要であることが判明した。

#### Ⅶ. 生きているが培養できない (VBNC: Viable but nonculturable) 細菌の解析

大腸菌を含め多くの細菌が、VBNC 状態になることが知られている。主に、食中毒において、感染源を特定する上で大きな問題となっている。今回、腸管出血性大腸菌の臨床分離株から、低温・低栄養ストレスによって VBNC になるサブセットを見出した。その表現型は一遺伝子の変異に起因しており、ストレス暴露によって外膜の透過性が亢進し、ペリプラズム領域の抗酸化物質が減少し、その結果、酸素呼吸によって生じたヒドロキシラジカルが内膜およびゲノム DNA の損傷 (細胞死) を惹起することが明らかになった。抗酸化物質含有培地で VBNC 腸管出血性大腸菌を培養することによって、分離培養することが可能になった。また最近、本遺伝子の発現を抑制するバクテリオファージにコードされる遺伝子モジュールを見出した。腸管出血性大腸菌は、バクテリオファージによって病原性を獲得し、大きな進化を遂げたことが近年の研究で示されている。本遺伝子モジュールの解析は、本病原細菌の生態と進化に新たな洞察をもたらすものと期待される。

#### Ⅷ. 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・肝臓内科の光永真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。現在、マウス感染症モデルを用いてその効果を検証している。

#### Ⅸ. 薬剤耐性菌の迅速検出方法の開発

感染症起炎菌の薬剤感受性を速やかに確認することは、治療方針を決定する上で極めて重要である。即日の同定/確認を目指し、現在、基盤研究部門ならびに国内メーカーとともに新規薬剤耐性菌の迅速検出方法の開発を行っている。

#### 〔点検・評価〕

##### 1. 教育について

教育に関しては、コース臨床基礎医学 (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、110 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 5 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。MD-PhD コースの学生を 2 名受け入れ研究指導を行っている。

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細菌のバイオフィーム形成機構の解明および細菌のストレス応答に関する研究が大きく前進した。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) 哺乳類腸内における NF, 2) シグマ因子変異臨床分離株の解析, 3) シグマ因子活性測定法の開発, 4) 分子シャペロンによるバイオフィーム形成の制御メカニズム, 5) Curli の産生におけるコシャペロンの機能解析, 6) スクレアーゼによるバイオフィーム dispersal, 7) VBNC 細菌の解析, 8) 新規感染症治療法の開発, 9) 薬剤耐性菌の迅速検出方法の開発などがあげられる。

#### 研究業績

##### I. 原著論文

- 1) Sugimoto S, Okuda K, Miyakawa R, Sato M<sup>1)</sup>, Arita-Morioka K<sup>2)</sup>, Chiba A, Yamanaka K<sup>2)</sup>, Ogura T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Kumamoto Univ), Mizunoe Y, Sato C<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>AIST). Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Sci Rep* 2016; 6: 25889.
- 2) Iwase T, Ogura Y<sup>1)</sup>, Hayashi T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Kyushu Univ), Mizunoe Y. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* YH43. *Genome Announc* 2016; 4(2): e00242-16.
- 3) 水之江義充, 杉本真也, 奥田賢一. バイオフィーム感染症制圧に向けての展望. *家畜感染症学会誌* 2016; 5(4): 113-20.
- 4) Iwase T, Ogura Y<sup>1)</sup>, Hayashi T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Kyushu Univ), Mizunoe Y. Complete genome sequence of *Klebsiella oxytoca* strain JKo3. *Genome Announc* 2016; 4(6): e01221-16.

## II. 総 説

- 1) Sugimoto S. High sensitive method for monitoring RNA metabolism. Journal of Environmental Biotechnology 2016; 16(1) : 45-50.

## III. 学会発表

- 1) 杉本真也. (招待講演) バイオフィルムの基礎研究. 第5回感染症治療戦略会議. 東京, 5月.
- 2) 杉本真也, 有田-森岡健一 (福岡歯科大学), 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup> (熊本大), 水之江義充. (口頭) 分子シャペロン DnaK によるバイオフィルムの形成制御メカニズム. 第13回21世紀大腸菌研究会. 阿蘇, 6月.
- 3) 杉本真也. (招待講演) 蛍光プローブチオフラビン T による分子レベル・細胞レベルの RNA 代謝の高感度モニター. 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会/年会シンポジウム. 広島, 6月.
- 4) Chiba A, Yonemoto K, Sugimoto S, Mizunoe Y. (Symposium 222: Microbial communication via surface structures) Extracellular rna serves as a building material in bacterial habitats. ASM Microbe 2016. Boston, June.
- 5) Yoshii Y, Okuda K, Yamada S, Nagakura M, Sugimoto S, Nagano T<sup>1)</sup>, Okabe T<sup>1)</sup>, Kojima H<sup>1)</sup> (Univ Tokyo), Mizunoe Y. (Poster) Identification of ABC-JK2, a small molecule inhibitor of staphylococcal biofilm formation. ASM Microbe 2016. Boston, June.
- 6) Okuda K, Yamada S, Sugimoto S, Iwase T, Sato M<sup>1)</sup>, Sato C<sup>1)</sup> (AIST), Mizunoe Y. (Poster) Genotypic and biofilm profiles of *Propionibacterium acnes* isolated from pacemakers without clinical signs of infection. ASM Microbe 2016. Boston, June.
- 7) Sugimoto S, Okuda K, Miyakawa R, Sato M<sup>1)</sup>, Chiba A, Sato C<sup>1)</sup> (AIST), Mizunoe Y. (Symposium 222: Microbial communication via surface structures) High resolution imaging of aqueous biofilms by atmospheric scanning electron microscopy. ASM Microbe 2016. Boston, June.
- 8) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 斎藤充, 丸毛啓史, 水之江義充. (口頭) 黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成における分泌タンパク質と細胞壁アンカータンパク質の相補的な機能の解明. 第30回日本バイオフィルム学会. 東京, 7月.
- 9) 杉本真也. (招待講演) バイオフィルム形成の分子基盤の解明と難治性感染症の克服に向けた研究. ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト夏合宿. つくば, 9月.
- 10) 杉本真也, 宮川玲奈, 寺尾明莉, 有田健一 (福岡歯科大), 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup> (熊本大), 水之江義充. (ポスター) 細胞外アミロイド線維形成タンパク質の細胞内品質管理機構. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 11) 水之江義充, 杉本真也, 奥田賢一. (教育講演) バイオフィルム感染症制圧に向けての展望. 第6回家畜感染症学会学術集会. 福岡, 12月.
- 12) 奥田賢一. (シンポジウム: 第1部-2 制御拠点より5年間の成果について) 抗バイオフィルム感染症薬の開発に向けた化合物スクリーニングと作用機序研究. 第4回創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム (平成28年度). 東京, 12月.
- 13) Chiba A, Sugimoto S, Yonemoto K, Mizunoe Y. Characterization of extracellular nucleic acids in bacterial biofilms. Advanced Genome Science International Symposium: The Start New Genomic. Tokyo, Jan.
- 14) 杉本真也, 千葉明生, 宮川玲奈, 寺尾明莉, 米本圭吾, 水之江義充. (シンポジウム 20: 細菌の集団形成とその制御機構の新展開) バイオフィルムマトリクス成分の新機能. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.
- 15) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 斎藤 充, 丸毛啓史, 水之江義充. (選抜ワークショップ 5: 病原因子の病態) 黄色ブドウ球菌における Eap と細胞壁アンカータンパク質の相補的な機能. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.
- 16) 田嶋亜紀子, 水之江義充. (ポスター) スクレアーゼによる黄色ブドウ球菌バイオフィルム dispersal. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.
- 17) 千葉明生, 宮川玲奈, 杉本真也, 米本圭吾, 水之江義充. (ポスター) MRSA 臨床分離株のバイオフィルム形成能とマトリクス成分の解析. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.
- 18) 奥田賢一, 山田聡美, 梶山茉莉, 吉井 悠, 長野哲雄<sup>1)</sup>, 岡部隆義<sup>1)</sup>, 小島宏建<sup>1)</sup> (東京大), 水之江義充. (ポスター) 黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成阻害物質のスクリーニングと活性評価. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.
- 19) 吉井 悠, 奥田賢一, 山田聡美, 永倉茉莉, 杉本真也, 長野哲雄<sup>1)</sup>, 岡部隆義<sup>1)</sup>, 小島宏建<sup>1)</sup> (東京大), 岩本武夫, 水之江義充. (ポスター) 低分子化合物 ABC-JK2 は黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を阻害し,  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する感受性を上昇させる. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.
- 20) 岩瀬忠行, 岡井智瑛, 田嶋亜紀子, 水之江義充. (ポスター) 腸管出血性大腸菌 Sakai 株のゲノムに存在する機能未知遺伝子の酸化ストレス耐性に与える影響の解析. 第90回日本細菌学会総会. 仙台, 3月.