

## バイオフィーム研究センター

- 教授：水之江義充 細菌学，分子生物学  
(細菌学講座より出向中)
- 教授：堀 誠治 感染症，感染化学療法，薬物の安全性  
(感染制御科より出向中)
- 教授：橋本 和弘 後天性心疾患の外科・虚血心疾患，弁膜症の研究  
(心臓外科学講座より出向中)
- 教授：矢永 勝彦 消化器外科  
(外科学講座(消化器外科)より出向中)
- 教授：丸毛 啓史 膝関節外科，骨・靭帯の生化学  
(整形外科学講座より出向中)
- 教授：上園 晶一 小児麻酔，心臓血管外科麻酔，肺高血圧の診断と治療  
(麻酔科学講座より出向中)
- 教授：穎川 晋 前立腺癌，泌尿器悪性腫瘍，腹腔鏡手術  
(泌尿器科学講座より出向中)
- 教授：岩本 武夫 生化学・分子生物物理  
(基盤研究施設(分子細胞生物学)より出向中)
- 教授：高田 耕司 分子細胞生物学，病態生化学  
(自然科学教室(生物学研究室)より出向中)
- 教授：海渡 健 臨床血液学  
(臨床検査医学講座/中央検査部より出向中)
- 准教授：堀野 哲也 細菌感染症，HIV 感染症，抗菌化学療法  
(感染制御科より出向中)
- 准教授：荒屋 潤 呼吸器病学  
(内科学講座(呼吸器内科)より出向中)
- 講師：長堀 隆一 後天性心疾患の外科・心疾患の基礎的研究  
(心臓外科学講座より出向中)
- 講師：村井 法之 生化学，分子生物学  
(分子生物学講座より出向中)
- 講師：河野 緑 臨床微生物学  
(臨床検査医学講座より出向中)
- 講師：田嶋亜紀子 細菌学，分子生物学  
(細菌学講座より出向中)
- 講師：岩瀬 忠行 細菌学，分子生物学  
(細菌学講座より出向中)
- 講師：杉本 真也 細菌学，分子生物学  
(細菌学講座より出向中)
- 講師：奥田 賢一 細菌学，分子生物学  
(細菌学講座より出向中)

### 教育・研究概要

バイオフィーム研究センターは2015年4月に発

足した。本センターは、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「バイオフィーム感染症制圧研究拠点の形成」(2012～2016年度)の支援を受けた研究を推進するため、本学の先端医学推進拠点群の1拠点として設立されたものである。

バイオフィームとは、細菌が菌体外に分泌する多糖類などのマトリクスと菌の集合体から成る構造物である。細菌が付着・増殖すると、細菌はマトリクスに覆われた状態、すなわちバイオフィームを形成して薬剤に抵抗性を示し、また生体の防御機構からも逃れやすくなるために治療が困難になる。現在、バイオフィーム感染症は外科系診療科をはじめとしたすべての診療科において極めて重要な課題となっており、根本的な予防法・治療法の開発は急務である。本センターは基礎と臨床が共同し、臨床検体から分離したバイオフィームの細菌叢を網羅的に解析し、バイオフィーム形成における各細菌の役割と疾患との関連性を解明することにより、バイオフィーム感染症に対する診断法・予防法の実現を行う。また、バイオフィーム形成メカニズムの解明とバイオフィーム形成を阻害する物質の探索を行い、バイオフィーム感染症治療薬の開発を目指した研究を推進する。

### I. 黄色ブドウ球菌のバイオフィームの形成を阻害する低分子化合物の作用機序解析

臨床上大きな問題となっている黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を選択的に阻害する化合物の探索と得られた化合物の作用機序の解析を行った。東京大学創薬機構が保有する5万化合物に対してハイスループットシステムを用いた網羅的スクリーニングを行い、複数の黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌臨床分離株に対し高いバイオフィーム形成阻害活性を示す低分子化合物 ABC-JK2 (Anti Biofilm Compound-JK2) を見出した。メタボローム解析により、ABC-JK2 存在下で解糖系代謝産物の量が低下することが確認された。また、マイクロアレイ解析を用いて遺伝子発現プロファイルを検討した結果、ABC-JK2 存在下で細胞壁合成関連遺伝子の発現量の上昇が確認された。透過型電子顕微鏡による形態観察では、ABC-JK2 存在下で黄色ブドウ球菌の細胞壁の肥厚化や異常な隔壁構造の形成が観察された。以上より、ABC-JK2 は解糖系や細胞壁合成に影響を及ぼし、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害している可能性が示唆された。

## II. ミリセチン類縁体の抗バイオフィーム活性の解析

食品に含まれる機能性成分の潜在的能力の開拓は食品の付加価値を高めるとともに、食による疾病予防への応用展開が期待される。本研究では、食品成分を用いて慢性的な細菌感染症との関連が強いバイオフィームの形成を阻害できるかを検討した。その結果、植物由来ポリフェノールであるミリセチンが、大腸菌の増殖を阻害せず、濃度依存的にバイオフィーム形成を抑制できることを明らかにした。さらに、ミリセチン類縁体の中から、約 10 倍活性の高い化合物を見出した。現在、その作用機序の解析を進めている。

## III. 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) によるバイオフィームの液中高分解能観察

ASEM は、解放環境の水溶液中で細胞を直接観察できる電子顕微鏡である。本研究では、ASEM を用いて種々の細菌の形態やバイオフィームを観察した。重金属染色、正・負荷電ナノゴールドラベル、抗体ラベルなどにより、ブドウ球菌や大腸菌のバイオフィームとそれらのマトリクス成分（アミロイド線維 curli, 鞭毛, 菌体外 DNA, 分泌小胞）を観察することができた。今後、様々な研究分野に本手法が応用されることが期待される。

## IV. バイオフィーム形成における細胞外 RNA の重要性

黄色ブドウ球菌を含む病原細菌のバイオフィーム形成メカニズムの解明を目指し、我々がバイオフィームマトリクス中に見出した extracellular RNA (eRNA) の特性と機能を解析した。eRNA のサイズ分布を変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析したところ、20 から 100 塩基であった。また、共焦点レーザー顕微鏡観察によって、eRNA がバイオフィームの三次元構造中に含まれていることが視覚的にも確認された。また、黄色ブドウ球菌のバイオフィームマトリクスの主要構成成分の一つである細胞外多糖を分解すると、eRNA がバイオフィームから消失した。さらに、表面プラズモン共鳴により、RNA と精製した多糖が直接的に結合することを確認した。これらの結果は、eRNA がバイオフィームの構造維持に重要であること、細胞外多糖が eRNA の局在・安定化に重要であることを示している。今後、eRNA を標的としたバイオフィーム阻害法の開発が期待される。

## V. ペースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* の分子系統解析とバイオフィーム形成

ペ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を行った。感染兆候のない患者から摘出された使用済みペースメーカー 31 検体の培養試験を行ったところ、8 検体が培養陽性となり、*Propionibacterium acnes* (7 株), *Staphylococcus hominis* (1 株) と同定された。*P. acnes* について Multilocus sequence typing による分子系統解析を行ったところ、ST2 (2 株), ST4 (1 株), ST53 (1 株), ST69 (2 株), 新規 ST (1 株) に帰属した。In vitro におけるバイオフィーム形成を評価した結果、ST2 の 1 株を除く 6 株はグルコース依存的なバイオフィーム形成を示した。酵素感受性試験の結果、DNase I はすべての株のバイオフィーム形成を強く阻害したのに対し、proteinase K と dispersin B に対する感受性は株によって異なっていた。細胞外マトリクスに含まれる dsDNA, RNA, タンパク質、多糖の量は株によって違いが認められ、また同一 ST 間では各構成成分の存在比に類似性があった。さらに、透過型電子顕微鏡と大気圧走査型電子顕微鏡を使用してバイオフィームの微細構造を高分解能で観察した結果、溶菌に伴って細胞質成分が漏出する様子や、細胞間を繋ぐ線維状構造が観察され、これらの成分がバイオフィーム形成に関与していることが示唆された。本研究は、心臓外科学講座との共同研究によって行われたものである。

## VI. 分子の複雑さと冗長性によって支えられるバイオフィームの形成基盤

黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成能とマトリクスの解析を行い、強固なタンパク質性のバイオフィームを形成するユニークな臨床分離株を見出した。そのバイオフィームには、黄色ブドウ球菌に特異的な分泌タンパク質である Eap が多量に含まれていた。そのため Eap がバイオフィーム形成に重要な機能を有すると想定したが、本株において eap 遺伝子を欠損させてもバイオフィーム形成量は低下しなかった。そこで、バイオフィーム形成への関与が報告されている *srtA* 遺伝子との二重遺伝子欠損株を作製したところバイオフィーム形成量が著しく低下した。*srtA* によってコードされる Sortase A は 20 数種類の LPXTG モチーフを持つタンパク質を細胞壁へ共有結合させることから、これらの細胞壁タンパク質のいずれかがバイオフィーム形成におい

て Eap と重複した機能を有することが予想された。*eap* 遺伝子欠損株から LPXTG モチーフを持つ SasG 欠損させるとバイオフィーム形成量が低下することを見出した。このことは、バイオフィーム形成において分泌タンパク質である Eap と細胞壁タンパク質である SasG が重複した機能を有することを示しており、複雑なバイオフィーム形成の分子基盤が解明される糸口になると考えられる。

### 〔点検・評価〕

#### 1. 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) 黄色ブドウ球菌のバイオフィームの形成を阻害する低分子化合物の作用機序解析、2) ミリセチン類縁体の抗バイオフィーム活性の解析、3) 大気圧走査電子顕微鏡によるバイオフィームの液中高分解能観察、4) バイオフィーム形成における細胞外 RNA の重要性、5) ベースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* の分子系統解析とバイオフィーム形成、6) 分子の複雑さと冗長性によって支えられるバイオフィームの形成基盤などがあげられる。

### 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) バイオフィームの基礎研究. 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> (<sup>1</sup>熊本大), 水之江義充. (口頭) 分子シャペロン DnaK によるバイオフィー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> (<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> (<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> (<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ー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回日本バイオフィーム学会. 東京, 7月.
- 9) 杉本真也. (招待講演) バイオフィー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> (<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) バイオフィー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) 抗バイオフィー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) バイオフィー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) スクレアーズによる黄色ブドウ球菌バイオフィーム 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ー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> (<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ー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> (<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ーム形成を阻害し,  $\beta$ -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.