

細菌学講座

教授：水之江義充 細菌学，分子生物学
講師：進士ひとみ 細菌学，細菌感染学

教育・研究概要

I. 黄色ブドウ球菌接着因子 FnBPA, FnBPB の感染における役割

Fibronectin-Binding Protein (FnBP) は黄色ブドウ球菌の重要な接着因子であり，菌はこの因子を介して細胞外マトリクスに結合し組織に接着する他，種々の細胞に侵入する。FnBP には *fnbA*, *fnbB* にコードされた2つのホモログがあるが，各々の感染における役割は明らかになっていない。野生型株 SH1000 を親株として *fnbA*, *fnbB*, *fnbA/fnbB* 変異株を作成し，*in vivo* および *in vitro* 感染における病原性，細胞侵入性の相違等について検討した。マウスの尾静脈内感染において，親株投与群では著しい体重減少が認められ全頭が死亡した。変異株投与群では，ほぼ全頭が生存したが，*fnbB* 変異株では中程度の，*fnbA* 変異株では軽度の体重減少が見られ，親株と比べ，腎臓への菌の接着と接着後の増殖は著しく低下していた。脾臓での IL-6 濃度，NF- κ B 活性は親株と比べ *fnbA*, *fnbA/fnbB* 変異株で著しく減少していたが *fnbB* 変異株では有意な減少は見られなかった。*in vitro* での，上皮細胞，血管内皮細胞，繊維芽細胞への侵入性，炎症性マクロファージによる食菌性はいずれも親株 \geq *fnbB* 変異株 \gg *fnbA* 変異株 \geq *fnbA/fnbB* 変異株の順に高かった。以上より，*in vivo*, *in vitro* いずれにおいても，感染には FnBPA がより重要であることが明らかになったが，感染の重症化においては FnBPA, FnBPB の両者の協調作用が必要であると考えられる。

II. 黄色ブドウ球菌由来のバイオフィルム破壊因子の解析

バイオフィルムは，細菌が作る集合体であり，医療素材上に形成されると細菌が薬剤に抵抗性をもつとともに，感染源となって新たな部位に広がり治療を困難にしている。そのため，バイオフィルムを破壊する物質の探索・開発が求められている。我々は，バイオフィルム感染症を引き起こす黄色ブドウ球菌が，自身のバイオフィルムを破壊する因子を分泌することを見出し，その因子の同定や性質の解析を試みた。黄色ブドウ球菌の培養上清では，表皮ブドウ

球菌や MRSA に対しても有効であった。バイオフィルムの構成成分として多糖，菌体外 DNA，タンパク質が知られているが，様々な構成成分のバイオフィルムを破壊したことから，構成成分非依存の機構で破壊していると考えられた。緑膿菌や大腸菌のバイオフィルムも破壊したことから，バイオフィルム感染症で問題となる複数の菌に対して有効なことが示唆された。菌の培養上清を限外フィルターと透析膜 (MWCO500) で分画したところ，破壊因子は 500Da 以下である可能性が示唆された。現在は，様々なカラムを用いた因子の分離と TOF/MS による解析での因子の同定を検討している。

III. 黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリックスタンパク質の同定と時空間的動態解析

黄色ブドウ球菌のバイオフィルムは抗菌薬の殺菌作用に高い耐性を示すことで抗菌治療の効果を減少させるため，治療が難渋することが多い。バイオフィルム中で細胞を包み込む細胞外マトリックスは，多糖性ポリマー，菌体外 DNA，タンパク質によって構成されている。特に，バイオフィルムマトリックスタンパク質はワクチン開発の標的分子になると考えられるが，どのようなタンパク質がどのように黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成に関与しているのかは良くわかっていない。そこで本研究では，プロテオーム解析と生化学・細胞生物学手法により黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリックスを構成するタンパク質を単離・同定し，バイオフィルム形成過程における局在や構造の変化を調べた。まず，メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株の中から，タンパク質性のバイオフィルムを形成する株を選抜した。1M NaCl 処理により，バイオフィルムマトリックスを抽出し，そこに含まれるタンパク質をアミノ酸シーケンス解析，質量分析により同定した。その結果，133 個のタンパク質が同定され，宿主細胞接着因子，バイオフィルム関連タンパク質，細胞壁アンカータンパク質，細胞質タンパク質，機能未知タンパク質が含まれていた。この中で最も存在量の多かったのは，MHC class II analog protein (Map) であったが，その細胞局在に関する知見は皆無であったため，GFP 融合タンパク質 (Map-GFP) を用いてリアルタイムに局在性を調べた。その結果，培養 1 日目に細胞表層に観察された Map-GFP が培養 2 日目には細胞外マトリックス構造を形成することが明らかになった。さらに，精製した Map をバイオフィルム形成能の低い黄色ブドウ球菌の培養液に添加することにより，バイオ

フィルム形成が大幅に促進することを見出した。このことは Map が黄色ブドウ球菌の細胞外においてマトリックス構造を形成することにより、バイオフィーム形成に重要な役割を果たしていることを示している。現在、その他のタンパク質についてもバイオフィーム形成における役割を解析中である。

IV. 表皮ブドウ球菌に関する解析

我々は昨年、Esp を分泌する表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌のバイオフィームを破壊し、鼻腔内の黄色ブドウ球菌を排除することを報告した。現在、健康人および臨床から分離された表皮ブドウ球菌についてその性状解析 (Esp 遺伝子の発現等) を行なっている。また表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌の保菌率について疫学研究を行なうための準備を行っている。これらの研究は、京都府立医科大学、海外の研究者とともに進める予定である。

V. ATP を分泌する細菌の解析

昨年、我々はヒトには ATP を分泌する細菌が存在することを報告した。生命活動に極めて重要な ATP がどのような機作で分泌されているのか、またその生物学的意義を明らかにするため、分子生物学的、生理・生化学的アプローチを用いて検討している。これまでに、ATP 分泌に必須の栄養成分を同定し、ATP の分泌能が低下した変異体を得ることに成功した。更なる研究を行ない、ATP 分泌機構を明らかにしたい。本研究は日本学術振興会科学研究費補助金の支援を受け、当講座の大学院生を中心に行なわれている。

VI. 低タンパク食適応に対する腸内細菌の役割

我々は、腸内細菌の低タンパク食適応への役割を解明するため、細菌学・ゲノム科学・フィールド研究・疫学・栄養学・人類学の観点から検討を行っている。本年、高度に低タンパク食適応した人々 (パプアニューギニアの人々) の fecal サンプルから、極めて興味深い性質を有する細菌を分離することに成功した。現在更なる解析を行っている。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金、最先端・次世代研究開発支援プログラム (東京大学との共同研究)、文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」の支援を受け、行なわれている。

VII. 本学における共同研究

・近年、ATP 分泌細菌が潰瘍性大腸炎に関与している可能性が動物実験で示唆された。そこで、ヒ

トにおけるその関連を消化器内科とともに研究している。

・医療用デバイスに形成されるバイオフィームについて、心臓外科とともに研究している。

「点検・評価」

1. 教育について

教育に関しては、臨床基礎医学Ⅱ (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、107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年次医学生の実習室配属では14名、6年時選抜実習では1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感染機構の解明およびバイオフィーム形成および破壊機構の解明が前進した。また、新たなテーマとして潰瘍性大腸炎発症のメカニズムの解明に取り組んだ。*In vitro* で、黄色ブドウ球菌の定着を阻害する因子を分泌する常在性表皮ブドウ球菌 (阻害性 *S. epidermidis*) の同定および阻害因子の単離・同定に成功した。

黄色ブドウ球菌のファイブロネクチン結合タンパク FnBP には *fnbA*, *fnbB* にコードされた2つのホモログが存在し、菌はこの因子を介して細胞外マトリックスに結合し組織に接着する他、上皮細胞・繊維芽細胞・血管内皮細胞など種々の細胞に侵入することが報告されている。我々は、野生型株 SH1000 を親株として *fnbA*, *fnbB*, *fnbA/fnbB* 変異株を作成し、*in vivo* および *in vitro* 感染におけるそれぞれの病原性、細胞侵入性の相違等について検討した。その結果、*in vivo*, *in vitro* いずれにおいても感染には FnBPA がより重要であることが明らかになった。感染の重症化においては FnBPA, FnBPB の両者の協調作用が必要であることが判明した。

腸管内の ATP が Th17 細胞を分化し、大腸炎を起こす事が 2008 年に報告され、おそらく腸内の何らかの細菌が ATP を分泌していると示唆されたが、これまでその単離・同定はなされていなかった。今回、我々はヒトとマウスから ATP を分泌する株を単離した。同定の結果、腸球菌の一種であることが

判明した。

黄色ブドウ球菌が自身のバイオフィルムを破壊する因子を分泌することを見出した。菌の培養上清を用いてこの因子の生化学的特性を調べたところ、バイオフィルムに対して、数分で破壊効果を示すこと、100℃で5分処理しても失活しない耐熱性をもつものであること、500Da以下の水溶性の低分子であることが明らかになった。

バイオフィルム中で細菌を包み込む細胞外マトリックスは、多糖性ポリマー、菌体外DNA、タンパク質によって構成されている。特に、バイオフィルムマトリックスタンパク質はワクチン開発の標的分子になると考えられるが、どのようなタンパク質がどのように黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成に関与しているのかは良くわかっていない。そこで、プロテオーム解析と生化学・細胞生物学手法により黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリックスを構成するタンパク質を単離・同定し、バイオフィルム形成過程における局在や構造の変化を調べた。その結果、133個のタンパク質が同定され、宿主細胞接着因子、バイオフィルム関連タンパク質、細胞壁アンカータンパク質、細胞質タンパク質、機能未知タンパク質が含まれていた。この中で最も存在量の多かったのは、MHC class II analog protein (Map)であった。精製したMapをバイオフィルム形成能の低い黄色ブドウ球菌の培養液に添加すると、バイオフィルム形成が大幅に促進することを見出した。このことよりMapが黄色ブドウ球菌の細胞外においてマトリックス構造を形成し、バイオフィルム形成に重要な役割を果たしていることを示した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Abdullah-Al-Mahin¹⁾, Sugimoto S, Higashi C¹⁾, Matsumoto S¹⁾, Sonomoto K¹⁾ (¹Kyushu University). Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* dnaK. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(13): 4277-85.
- 2) Piao H¹⁾, Minohara M¹⁾, Kawamura N¹⁾, Li W¹⁾, Matsushita T¹⁾, Yamasaki R¹⁾, Mizunoe Y, Kira J¹⁾ (¹Kyushu University). Tissue binding patterns and *in vitro* effects of *Campylobacter jejuni* DNA-binding protein from starved cells. *Neurochem Res* 2011; 36(1): 58-66.
- 3) Kitagawa R¹⁾, Takaya A¹⁾, Ohya M¹⁾, Mizunoe Y, Takade A²⁾, Yoshida SI²⁾ (²Kyushu University), Iso-gai E¹⁾, Yamamoto T¹⁾ (¹Chiba University). Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *J Bacteriol* 2010; 192(21): 5645-56.
- 4) Piao H¹⁾, Minohara M¹⁾, Kawamura N¹⁾, Li W¹⁾, Mizunoe Y, Umehara F¹⁾, Goto Y¹⁾, Kusunoki S¹⁾, Matsusita T¹⁾, Ikenaka K¹⁾, Maejima T¹⁾, Nabekura J¹⁾, Yamazaki R¹⁾, Kira J¹⁾ (¹ Kyushu University). Induction of paranodal myelin detachment and sodium channel loss *in vivo* by *Campylobacter jejuni* DNA-binding protein from starved cells (C-Dps) in myelinated nerve fibers. *J Neurol Sci* 2010; 288(1-2): 54-62.
- 5) Iwase T, Shinji H, Tajima A, Sato F, Tamura T, Iwamoto T, Yoneda M (University of Tokyo), Mizunoe Y. Isolation and identification of ATP-secreting bacteria from mice and humans. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1949-51.
- 6) Iwase T, Uehara Y¹⁾, Shinji H, Tajima A, Seo H¹⁾ (¹Kochi Medical School), Takada K, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010; 465(7296): 346-9.
- 7) 佐藤文哉, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 進士ひとみ, 水之江義充. 耐性菌, 難治性感染症とバイオフィルム臨床分離ブドウ球菌のバイオフィルム形成について. *BACTERIAL ADHEREN & BIOFILM* 2010; 23: 23-8.

II. 総 説

- 1) 岩瀬忠行, 水之江義充. MEDICAL TOPICS (第37回) 常在菌由来プロテアーゼによる病原性黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成阻害. *LUNG* 2010; 18(4): 400-4.
- 2) 岩瀬忠行, 水之江義充. 病原細菌の定着を阻害する常在細菌の阻害因子の同定とその阻害メカニズムの解明. *実験医* 2010; 28(16): 2635-8.

III. 学会発表

- 1) Sugimoto S, Araki N¹⁾, Mogk A²⁾, Bukau B²⁾ (²Heiderberg University), Ogura T¹⁾ (¹Kumamoto University). Nucleotide-dependent formation of amyloid-like aggregates of *Escherichia coli* cytoplasmic proteins. The 3rd International Symposium on Protein Community. Nara, Sept.
- 2) 水之江義充. 細菌のバイオフィルムについて. 第2回食品バイオテクノロジー研究会. 熊本, 1月.
- 3) Shinji H, Yoshizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimo-

to S, Hironaka I, Mizunoe Y. Role of FnBPs in infection of *S. aureus*. The 14th International Symposium on Staphylococci and Staphyrococcal Infections. Bath, Sept.

- 4) 岩瀬忠行, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 杉本真也, 高田耕司, 縣 俊彦, 水之江義充. 表皮ブドウ球菌による黄色ブドウ球菌の定着阻害. 第127回成医会総会. 東京, 10月.
- 5) 岩瀬忠行, 上原良雄¹⁾, 進士ひとみ, 田嶋亜紀子, 瀬尾宏美¹⁾(¹高知大学), 高田耕司, 縣 俊彦, 水之江義充. 表皮ブドウ球菌による黄色ブドウ球菌の定着阻害. 第55回日本ブドウ球菌研究会. 東京, 7月.

IV. 著 書

- 1) 杉本真也, 園元謙二 (九州大学). 第2章: 乳酸菌・ビフィズス菌の構造・代謝 7. ストレス応答 温度. 日本乳酸菌学会編. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス. 京都: 京都大学学術出版会, 2010. p.240-6.
- 2) 杉本真也, 園元謙二 (九州大学). 第2章: 乳酸菌・ビフィズス菌の構造・代謝 7. ストレス応答 塩/浸透圧/乾燥. 日本乳酸菌学会編. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス. 京都: 京都大学学術出版会, 2010. p.238-40.

環境保健医学講座

- 教授: 柳澤 裕之 生体における必須微量元素の役割, 産業および環境化学物質の毒性 (特に中毒性腎症/変異原性/発癌性), 磁場の生体影響, 職場のメンタルヘルス
- 准教授: 鈴木 勇司 環境化学物質の変異原性, 磁場の生体影響
- 准教授: 縣 俊彦 疫学方法論, 医療情報処理, 地域保健, EBM
- 准教授: 須賀 万智 疫学, 予防医学
- 講師: 宮越 雄一 電磁場と化学物質の複合曝露による変異原性, 必須微量元素の生態影響
- 講師: 小林 浩 高気圧障害の予防, 酸化ストレスの生体影響

教育・研究概要

I. 実験医学

1. 酸化インジウム錫曝露作業由来末梢血リンパ球の小核誘発について

酸化インジウム錫曝露作業員から末梢血リンパ球画分を得て, phytohemagglutinin を加えた RPMI1640 培地に播種し, 48 時間培養した。Cytochalasin B を添加し, さらに 48 時間培養した。その結果, 14 名の酸化インジウム錫研磨作業員の末梢血リンパ球に誘発される小核の頻度は, 0.7~1.7% の間にあった。

2. 酸化インジウム錫曝露作業員由来の末梢血リンパ球の染色体異常試験について

酸化インジウム錫曝露作業員から末梢血リンパ球画分を得て, phytohemagglutinin-M (最終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$) を加えた RPMI1640 培地に播種し, 48 時間培養した。その結果, 酸化インジウム錫曝露作業員の 12 名の末梢血リンパ球には染色体異常は認められなかった。

3. ラットの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験法の検討について

mitogen の種類や濃度など, 試験を行う為の培養条件を検討中である。

4. 亜鉛欠乏ラットによる味覚異常と酸化ストレス

亜鉛欠乏により, SOD 活性が低下し, 酸化ストレスによる影響が増加すると考えられている。亜鉛