

ル伝達経路の研究による疲労病態の把握。第7回日本疲労学会総会・学術集会。名古屋。5月。

2) 小林伸行。身体表現性障害と慢性疲労症候群。第40回日本女性心身医学会学術集会。東京。7月。

3) 近藤一博。慢性疲労症候群。第40回日本女性心身医学会学術集会。東京。7月。

4) Shimizu A, Kobayashi N, Kondo K. Application of human herpesvirus-6 (HHV-6) for the gene therapy vector. 15th International Congress of Virology. Sapporo, Sept.

5) Kobayashi N, Shimada K, Shimizu A, Kondo K. Identification of SITH-1 as novel latent protein of human herpesvirus 6 (HHV-6) associated with chronic fatigue syndrome (CFS) and mood disorders. 15th International Congress of Virology. Sapporo, Sept.

6) 小林伸行。精神科領域から見た疼痛－身体表現性障害と慢性疲労症候群－。第40回日本女性心身医学会学術集会。東京。7月。

7) Shimada K, Kondo K. Roles of human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein and splicing factor SART3 in cellular tropism. 15th International Congress of Virology. Sapporo, Sept.

8) 嶋田和也, 清水昭宏, 近藤一博。組み換えHHV-6Bを用いたU79/80エンハンサー/プロモーター解析。第26回ヘルペスウイルス研究会。大阪。6月。

細菌学講座

教授：水之江義充 細菌学, 分子生物学

講師：田嶋亜紀子 細菌学

講師：岩瀬 忠行 細菌学

教育・研究概要

I. 表皮ブドウ球菌によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の定着阻害

我々はこれまでに、Espを分泌する表皮ブドウ球菌（阻害性表皮ブドウ球菌）が黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを破壊し、鼻腔内の黄色ブドウ球菌を排除することを報告した。しかしながら、阻害性表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌の定着を防ぐことができるかどうかについては不明であった。そこでマウスを用いて検討したところ、表皮ブドウ球菌を塗布し定着させたマウスでは、黄色ブドウ球菌の定着が阻害されることが判明した。本研究は米国の研究者との共同研究によって行われた。

II. バイオフィルム破壊因子の解析

バイオフィルムが、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。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。破壊因子は耐熱性で121度20分処理しても失活せず、また500Da以下の低分子であった。また培養上清は、表皮ブドウ球菌やMRSA、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可能性が示唆された。黄色ブドウ球菌の培養上清をHPLCにてゲルろ過カラムで分画後、逆相カラムの非吸着画分を回収し、親水性相互作用カラムで分画した。バイオフィルム破壊作用をもつ活性画分をMS解析し、現在因子の同定を進めている。

III. 表皮ブドウ球菌 Esp による黄色ブドウ球菌バイオフィルムの破壊メカニズム

表皮ブドウ球菌により産生されるバイオフィルム破壊酵素Espの大量発現・精製系を確立した。次に、Espにより分解される黄色ブドウ球菌の細胞表層タンパク質を探索し、その結果、Espは既知のバイオフィルム関連タンパク質 (Atl, Emp, FnBPA, Eap, Spa) や宿主への定着・病原性に重要なタン

パク質 (Efb, IsdA, Sbi, SceD, SdrD) を分解することが分かった。さらに Esp は、細菌-宿主間相互作用に重要な宿主タンパク質 (フィブリノーゲン, フィブロネクチン, ビトロネクチン) を分解することも明らかにした。

IV. 細胞外分子シャペロンによるバイオフィーム形成促進メカニズム

これまでに黄色ブドウ球菌のバイオフィームマトリクス中に多数の細胞質タンパク質が含まれることを見出している。この中で生存に重要な分子シャペロン (DnaK, ClpB) と細胞骨格タンパク質 (FtsZ) に着目し、バイオフィーム形成との関連性を調べた。その結果、いずれも黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を有意に促進することを見出した。現在、様々な変異体タンパク質を用いて、バイオフィーム形成促進のメカニズムを解析している。

V. バイオフィーム性細菌感染によるアミロイドーシスの発症メカニズム

アミロイド線維と総称される規則的な線維状凝集タンパク質は、アルツハイマー病やプリオン病などのアミロイドーシスに関与するだけでなく、病原細菌のバイオフィーム形成にも深く関わっている。本研究では、バイオフィーム性病原細菌の表層に存在するアミロイド線維が宿主のアミロイドーシス発症に関与するという新たな仮説を検証する研究の一環として、線虫アミロイドーシスモデルを用い、解析を行った。その結果、アミロイド β ペプチドを発現する線虫に Curli を発現する大腸菌を投与すると、麻痺症状が亢進するという知見を得た。現在、試験管内で調製した Curli アミロイド線維を線虫へ経口投与し、運動性や寿命の変化を詳細に調べている。

VI. バクテリオシンを利用したバイオフィーム制御法の開発

人体に負荷の少ないバイオフィーム感染症の治療法・予防法を開発する観点から、細菌が産生するペプチド性抗菌物質、バクテリオシンによるバイオフィームの殺菌メカニズムについて解析を行った。本研究では乳酸菌の一種 *Lactococcus lactis* が産生するバクテリオシン、ナイシンとラクチシン Q、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 *Staphylococcus warneri* が産生するヌカシン ISK-1 を使用した。精製したバクテリオシンを臨床から分離した MRSA のバイオフィームに添加し、その殺菌効果を評価した。比較対象で用いたバンコマイシンは、栄養培地で液体

培養した MRSA に対しては殺菌活性を示したが、バイオフィームを形成した MRSA に対しては活性を示さなかった。一方でナイシンとラクチシン Q は液体培養、バイオフィーム形成した MRSA の両方に対して高い殺菌活性を示した。ヌカシン ISK-1 は液体培養した MRSA に静菌的な活性を示したが、バイオフィームに対する活性は示さなかった。ナイシンとラクチシン Q は細菌の細胞膜に孔を形成して殺菌活性を示し、バイオフィーム感染症の予防・治療においては孔形成を行うバクテリオシンの有効性が示唆された。本研究は、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。

VII. 腸内細菌の低タンパク食適応に対する役割

腸内細菌が宿主の適応進化にどのような役割を担っているのかを解明するため、様々な分離株を対象に研究を行っている。本年、高度に低タンパク食に適応した人々から、宿主の窒素代謝に影響すると考えられる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。本知見は、常在細菌と宿主の間に新たな相互作用があることを示唆するものと考えられる。またこれらの知見は、飢餓に対する新しい方策の開発に繋がるものと期待される。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金の支援の下、進められている。

VIII. Viable but Nonculturable (VNC) 状態への移行メカニズム

生きていますが培養できない、VNC 状態への移行は、腸管出血性大腸菌 O157 においてシグマ S 因子の不活性化が関与すること、カタラーゼ添加培地で培養すると蘇生可能であることがこれまでの研究で分かっている。実際このような VNC 状態の大腸菌が、感染後、宿主内で蘇生し食中毒を起こすかどうか明らかになっていない。そこで動物実験を行うため、腸管出血性大腸菌 O157 Sakai 株の *rpoS* 遺伝子ノックアウト株を作成した。*rpoS* 遺伝子ノックアウト株は VNC 状態に誘導されたが、親株は VNC 状態に移行しなかった。今後、動物実験で VNC 細菌の病原性について検討する。

IX. 表皮ブドウ球菌 Esp の結晶構造解析

表皮ブドウ球菌の分泌する Esp タンパク質の特性を明らかにすることを目的に、Esp の結晶構造解析を行っている。種々の条件を検討することにより、X 線回折に耐えうる結晶を得ることができた。今後

この結晶を用いて、より詳細な解析が進むと期待される。本研究は米国の研究者との共同研究によって行われている。

〔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、100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年次医学生の研究室配属では10名、6年時選択実習では2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、1) バイオフィーム性細菌感染によるアミロイドーシス発症のメカニズムの解明、2) 腸内細菌の低タンパク食適応に対する役割の解明に取り組んだ。生きているが培養できない（VNC: viable but nonculturable）細菌およびATP分泌細菌についての研究も継続している。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Nishikori S, Esaki M, Yamanaka K, Sugimoto S, Ogura T. Positive cooperativity of the p97 AAA ATPase is critical for essential functions. *J Biol Chem* 2011; 286(18): 15815-20.
- 2) Puramattathu TV¹⁾, Islam MR¹⁾, Nishie M¹⁾, Yanagihara S¹⁾, Nagao J¹⁾, Okuda K¹⁾, Zendo T¹⁾, Nakayama J¹⁾, Sonomoto K¹⁾ (¹Kyushu University). Enhanced production of nukacin D13E in *Lactococcus lactis* NZ9000 by the additional expression of immunity genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93(2): 671-8.
- 3) Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, Seki K, Mizunoe Y. Role of FnBPA and FnBPB on *in vitro* cellular and *in vivo* septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2011; 79(6): 2215-23.
- 4) Kawamura N¹⁾, Piao H¹⁾, Minohara M¹⁾, Matsushita T¹⁾, Kusunoki S (Kinki University School of Medicine), Matsumoto H (Matsumoto Pediatric Clinic), Ikenaka K (National Institute for Physiological Sciences), Mizunoe Y, Kira J¹⁾ (¹Kyushu University). Campylobacter jejuni DNA-binding protein from starved cells in Guillain-Barré syndrome patients. *J Neuroimmunol* 2011; 240-1: 74-8.
- 5) Sugimoto S, Iwase T, Sato F, Tajima A, Shinji H, Mizunoe Y. Cloning, expression and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Microbiol* 2011; 111(6): 1406-15.
- 6) Park B¹⁾, Iwase T, Liu GY¹⁾ (¹Cedars-Sinai Medical Center). Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS ONE* 2011; 6(10): e25880.

II. 総説

- 1) Okuda K, Sonomoto K (Kyushu University). Structural and functional diversity of lantibiotic immunity proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12(8): 1231-9.
- 2) 水之江義充, 岩瀬忠行. 常在表皮ブドウ球菌と病原黄色ブドウ球菌の攻防. *感染・炎症・免疫* 2011; 41(1): 58-61.

III. 学会発表

- 1) Okuda K, Sugimoto S, Iwase T, Sato F, Tajima A, Shinji H, Mizunoe Y. Cloning, expression and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology. Tübingen, Mar.
- 2) 杉本真也, Seyffer F, 有田健一, 荒木令江, 山中邦俊, 小椋光. バクテリア細胞内タンパク質のアミロイド様凝集体形成. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 3) 杉本真也, 岩本武夫, 佐藤文哉, 田島亜希子, 岩瀬忠行, 進士ひとみ, 水之江義充. 細胞外分子シャペロンによる黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成機構. 第94回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10月.
- 4) Sugimoto S, Iwase T, Sato F, Tajima A, Shinji H, Yosizawa Y, Mizunoe Y. Efficient and economic extracellular production and purification of *Staphylococcus epidermidis* Esp using a Brevibacillus choshinensis secretion system. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Sept.
- 5) Mizunoe Y, Iwase T, Tajima A, Sugimoto S, Sato F,

Shinji H. Commensal bacterium *Staphylococcus epidermidis* serine protease esp eliminates *Staphylococcus aureus* nasal colonization via biofilm destruction. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Sept.

- 6) Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Sato F, Iwase T, Tajima A, Hironaka I, Okuda K, Shinji H, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades novel biofilm matrix proteins in *Staphylococcus aureus* biofilms. 第85回日本細菌学会総会. 長崎, 3月.
- 7) Sugimoto S, Iwamoto T, Sato F, Tajima A, Iwase T, Shinji H, Mizunoe Y. Proteomic survey for *Staphylococcus aureus* biofilm matrix proteins: extracellular AAA + chaperone ClpB contributes to the biofilm formation. 9th International Conference on AAA Proteins. Kumamoto, Nov.
- 8) 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 杉本真也, 弘中一平, 進士ひとみ, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌ファイブロネクチン結合タンパク質 FnBPA, FnBPB の *in vitro*, *in vivo* 感染における役割. 第56回日本ブドウ球菌研究会. 高知, 9月.
- 9) 水之江義充. 細菌の形成するバイオフィルム. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 東京, 4月.
- 10) 岩瀬忠行. 宿主-常在細菌-病原細菌との間に見られる相互作用. 第94回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10月.
- 11) 田嶋亜紀子, 弘中一平, 杉本真也, 岩瀬忠行, 進士ひとみ (国際学院埼玉短期大学), 水之江義充. 黄色ブドウ球菌 FnBPA, FnBPB の *in vitro*, *in vivo* 感染における役割. 第128回成医会総会. 東京, 10月.

IV. 著 書

- 1) Sugimoto S, Sonomoto K. Chapter 8. Quality control of protein structure in lactic acid bacteria. In: Sonomoto K, Yokota A, editors. Lactic acid bacteria and bifidobacteria: Current progress in advanced research. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. p.143-56.
- 2) 水之江義充. 第IV編: 細菌学各論 第13章: グラム陰性通性嫌気性桿菌 ビブリオ科, その他のグラム陰性通性嫌気性桿菌. 平松啓一 (順天堂大学) 監修, 中込 治 (長崎大学), 神谷 茂 (杏林大学) 編. 標準微生物学. 第11版. 東京: 医学書院, 2012. p.189-99.

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, 職場のメンタルヘルス
- 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, 必須微量元素の生体影響

教育・研究概要

I. 実験医学

1. 酸化的 DNA 損傷 (8-OHdG) の分析

電気化学検出器・紫外分光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD/UV) にて, 酸化的 DNA 損傷である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) および dG (deoxyguanosine) を分析した。亜鉛過剰モデルラットの骨髄細胞の 8-OHdG/dG は対照群と比較して増加を認めた。酸化インジウムまたは水酸化インジウムをラットに気管内投与したところ, 対照群と比較して有意差は見られなかった。

2. 糖尿病における遺伝子変異誘導要因の解析

糖尿病による酸化ストレス負荷に起因する発がんリスクに関する基礎的な検討として, STZ 投与により糖尿病を誘導したモデルラットにおける染色体異常を, 末梢血を用いる小核試験により経時的に検討した。その結果, 成熟赤血球においては, 投与後4週の間, 核頻度がわずかに増加する傾向が認められた。これらのことから, 高血糖負荷により, 小核の形成頻度が上昇する可能性が示唆された。これらは, 同一個体を経時的に観察することによって得られた結果であり, 末梢血を用いる小核試験の有用性が示された。今後, 再現性も含め, より詳細に検討を進めていきたい。

3. MALDI 分析による 8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンの測定

生体に酸化ストレスが加わると, 生体成分が酸化損傷を受ける。このとき遺伝子 DNA 中のグアニン塩基は, 8位の炭素が酸化されることにより, 8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-OHdG) が生成される。この 8-OHdG は, DNA の酸化損傷を示す最もよい指標と考えられており, これまでに GC/