

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 信也 細菌学, 分子生物学

教育・研究概要

I. 表皮ブドウ球菌 Esp の結晶構造解析

表皮ブドウ球菌 Esp は、黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを破壊する因子として、表皮ブドウ球菌の培養上清から分離された。今回、本因子の特性を明らかにするため、Esp の結晶構造解析を行った。Esp を大腸菌にて高発現させ精製し、X 線回折に耐えうる単結晶を得ることができた。また、本結晶に X 線ビームを照射することにより、本結晶の回折データ (1.8Å 分解能) を得ることができた。本研究は、University of Alabama at Birmingham (USA) の Narayana 教授との共同研究によって行われ、その成果は Acta Crystallographica に報告された。本研究により、表皮ブドウ球菌 Esp の特性ならびに作用機序についての理解が深まるものと期待される。

II. 細胞外分子シャペロンによるバイオフィルム形成制御メカニズム

これまでに黄色ブドウ球菌のバイオフィル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報告している。この中で生存に重要な分子シャペロン ClpB と DnaK は黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を促進することを見出した。変異体解析の結果、ClpB は分子シャペロン活性に依存せずバイオフィルム形成を促進し、少なくとも N 末端ドメインから Middle ドメインまでの領域が重要であること、Western blotting, 免疫光顕法, 免疫電顕法により、ClpB と DnaK がバイオフィルム形成の初期段階から細胞表層に局在することを明らかにした。

III. 多機能性バイオフィルムマトリクスタンパク質 Eap の機能解析と時空間的動態

MRSA 臨床分離株のうち、高度バイオフィルム形成株 (MR23) のバイオフィルムマトリクス画分に、様々な疾患に関与する Eap (extracellular adherence protein) が多量に存在すること、精製した Eap がバイオフィルム形成を促進することを見出し

た。さらに、MR23 eap 欠損株や遺伝子相補株を作製し、バイオフィルム形成における Eap の詳細な機能、バイオフィルム内部における動態を解析中である。

IV. 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM によるバイオフィル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顕微鏡である。電子線を透過する薄膜窓を底に備えた 3.5cm 径のサンプル dish を特徴とし、この容器中で様々な細胞を通常の実験環境で培養し、電顕ステージにのせることにより観察できる。ASEM を用いて黄色ブドウ球菌を含む病原細菌のバイオフィルム内部の微細構造と、バイオフィルムマトリクスを解析し、分泌小胞や細胞同士を連結するナノチューブ様構造の時空間的動態を明らかにした。また、抗体ラベル法やレクチンラベル法により、バイオフィルムマトリクスを可視化することに成功した。

V. バクテリオシンを利用したバイオフィルム制御法の開発

細菌によって生産されるペプチド性抗菌物質であるバクテリオシンのバイオフィルムに対する殺菌効果を解析した。構造と作用機作が異なる 3 種のバクテリオシン (ナイシン A, ラクティシン Q, ヌカシン ISK-1) の効果を比較したところ、ナイシンとラクティシン Q がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株のバイオフィルムに対して殺菌活性を示したが、ヌカシン ISK-1 はバイオフィルムに対する殺菌活性を示さなかった。ナイシンとラクティシン Q は濃度依存的にバイオフィルム内の細胞から ATP を漏出させ、殺菌活性と ATP 漏出量には相関性が見られたことから、胞膜上に安定的な孔を形成することがバイオフィルムの殺菌において重要であることが示唆された。

VI. バイオフィルム阻害剤の大規模スクリーニング

バイオフィル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て、東京大学創薬オープンイノベーションセンターと連携により、バイオフィルム形成を阻害する化合物のスクリーニングを行っている。多穴プレートを使用して高精度スクリーニングが可能なアッセイ系を確立し、プレートへの分注操作、培養操作、阻害活性評価を自動化するロボットシステムを構築して数万におよぶ化合物からハイスループットスクリーニングを行う体制を整えた。

これまでに、黄色ブドウ球菌のバイオフィルムをターゲットとして10,000化合物のスクリーニングを完了し、活性を示す化合物の取得に成功している。今後はさらに大規模なスクリーニングを行い、より活性の高い化合物の取得を目指す。

Ⅶ. Viable but Nonculturable (VNC) 細菌の病原性

生きているが培養できない、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をこれまでの研究で明らかにしてきた。無菌マウスを用い、VNC状態の腸管出血性大腸菌 O157 が病原性を有することを示した。

Ⅷ. 細菌の ATP 分泌機構の解析

近年、腸内細菌の分泌する ATP が腸管粘膜固有層における Th17 細胞の分化を誘導し、炎症性腸疾患を悪化させることを示唆する報告がなされた。どの菌種が ATP を分泌するかについては不明であったが、最近、我々は、マウス、ヒトの腸内細菌である *Enterococcus gallinarum* が ATP を分泌することを見出した。そこで、腸球菌属 22 菌種について ATP 分泌の有無を検討したところ、*E. gallinarum* 以外に 7 菌種が ATP を分泌することを新たに見出した。最も大量に ATP を分泌する *Enterococcus mundtii* を用い、ATP 分泌に影響を与える培地成分を検討した結果、グルコースが ATP 分泌に必須の成分であることを発見した。嫌氣的培養でも好氣的培養とほぼ同量の ATP を分泌することから、解糖系が ATP の分泌に重要な役割を果たしていることが示唆された。ジニトロフェノールで処理し、菌体内 ATP が枯渇した静止菌体にグルコースを添加すると、対数増殖期の菌体は定常期の菌体よりも多くの ATP を分泌することが判明した。そこで、現在まで ATP を分泌しないとされていた大腸菌や黄色ブドウ球菌などを含む 6 菌種の各増殖相における ATP 分泌について検討したところ、6 菌種全てが対数増殖期に ATP を分泌していることを見出した。以上より、様々な常在菌や黄色ブドウ球菌などの病原菌がグルコース存在下で増殖期依存的に ATP を分泌し、それが細菌間または細菌-宿主間の相互作用を担っていることが示唆された。

「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、103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 7 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ルム形成機構の解明および細菌の ATP 分泌機構の解析が大きく前進した。また新たな試みとして、1) 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM によるバイオフィルムの液中高分解能観察、2) バイオフィルム阻害剤の大規模スクリーニングを開始した。生きているが培養できない（VNC: viable but nonculturable）細菌の病原性に関する研究も進展している。

研究業績

I. 原著論文

1) Vengadesan K (UNESCO Regional Centre for Biotechnology (RCB)), Macon K¹⁾, Sugimoto S, Mizunoe Y, Iwase T, Narayana SV¹⁾ (University of Alabama at Birmingham). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the *Staphylococcus epidermidis* extracellular serine protease Esp. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2013; 69(Pt 1): 49-52.

II. 総説

1) 水之江義充. 【クローズアップ感染症】バイオフィルムってなに? 小児内科 2012; 44(7): 1198-202.

III. 学会発表

1) 水之江義充. 黄色ブドウ球菌の定着とバイオフィルム形成. 第3回 MRSA フォーラム. 東京, 7月.
2) Sugimoto S, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. Quality control of staphylococcal biofilms by excreted molecular chaperones DnaK and ClpB. EMBO/EMBL Symposia 2012. Heidelberg, Sept.

- 3) 水之江義充. バイオフィーム研究の最新のアプローチ. 第23回尿路感染症研究会. 東京, 10月.
- 4) 奥田賢一, 善藤威史¹⁾, 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 杉本真也, 弘中一平, 千葉明生, 園元謙二¹⁾(¹九州大), 水之江義充. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌バイオフィームに対するバクテリオシンの殺菌効果. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 5) 弘中一平, 岩瀬忠行, 杉本真也, 奥田賢一, 田嶋亜紀子, 水之江義充. 細菌によるATP分泌機構の解析. 第86回日本細菌学会総会. 千葉, 3月.
- 6) 水之江義充, 岩瀬忠行. 細菌間干渉・細菌宿主相互作用: 常在菌による黄色ブドウ球菌の排除. 第86回日本細菌学会総会. 千葉, 3月.
- 7) Hironaka I, Iwase T, Sugimoto S, Okuda K, Tajima A, Yanaga K, Mizunoe Y. Bacterial ATP secretion. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) 2013. Bremen, Mar.
- 8) 杉本真也, 奥田賢一, 田嶋亜紀子, 岩瀬忠行, 水之江義充. 細胞外に排出された細胞質分子シャペロンによるバイオフィーム形成制御メカニズム. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 9) 杉本真也, 奥田賢一, 佐藤主税(産総研), 水之江義充. MRSAのバイオフィームマトリクスタンパク質の網羅的解析と時空間的動態. 第95回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10月.
- 10) 水之江義充. 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成メカニズムの解析. 第79回日本細菌学会北海道支部学術総会. 帯広, 8月.

IV. 著 書

- 1) 水之江義充訳. Part III. 臨床細菌学 Chapter14. おもな病原体の概要および嫌気性細菌の序論, Chapter15. グラム陽性球菌, Chapter16. グラム陰性球菌. 吉開泰信(九州大), 西山幸廣(名古屋大) 監訳. レビンソン微生物学・免疫学. 原書11版. 東京: 丸善出版, 2012. p.97-119.

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. ナノ物質のCHL/IU細胞を用いた *in vitro* 小核試験による検討

ナノ物質は, 新たな物質・材料としての活用が期待されている一方, ヒトの健康や環境に重大な有害リスクをもたらす可能性がある。本研究では, 単層カーボンナノチューブ(SWCNT)および酸化亜鉛ナノ粒子の安全性を評価する為に, チャイニーズハムスター雌肺繊維芽細胞(CHL/IU細胞)を用いて *in vitro* 小核試験を行った。その結果, SWCNTでは連続処理法および短時間処理法のいずれの方法においても溶媒対照と比較して小核の誘発は見られなかった。酸化亜鉛では連続処理法の48, 72時間の125 μ Mにおいて, また, 代謝活性化法では6-18(処理-回復)時間の125 μ Mと, 6-18, 6-42, 6-66間の140, 156 μ Mにおいて, 溶媒対照と比較して小核誘発頻度が有意に上昇した。以上のことから, SWCNTは変異原性を持たない可能性があるが, 酸化亜鉛ナノ粒子には変異原性があると考えられる。

2. 亜鉛過剰摂取の血液凝固への影響

現在の日本人は亜鉛の摂取不足が問題となっており, それを補うためのサプリメント等も販売されている。一方で, 亜鉛サプリメントの適正な用量を守らずに摂取することが危惧される。しかし, 亜鉛を過剰に摂取した際の毒性についての研究報告は少ないが, 我々の先行研究でラットに亜鉛過剰食を摂取させた時に, 出血傾向を見出している。そこで本研究では, 血液凝固に焦点を当て亜鉛過剰モデルラットの血液凝固系の検討をした。

3. 環境汚染物質-フッ素における間質性腎症の進展機序とその解明