

## 細菌学講座

教授：水之江義充	細菌学，分子生物学
講師：田畠重紀子	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. 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したところ、分離培養することが可能であった。

#### 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。本研究は AMED 研究班の支援を一部受けて行われている。

#### 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。本研究は AMED 研究班の支援を一部受けて行われている。

#### IV. 哺乳類腸内における窒素固定

窒素固定 (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 の詳細はは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。現在、より詳細な検討を行っている。

#### V. 8 型分泌装置の作動機構の解明

8 型分泌装置はタンパク質の分泌と curli 線毛と呼ばれる菌体外アミロイド線維の形成が共役したユニークなタンパク質分泌装置である。Curli は、主要成分 CsgA と補助成分 CsgB によって構成され、外膜にアンカーした CsgF を介して菌の表面に結合する。これらは、リボソームで合成されたあと、内膜に存在する Sec トランスロコンを通してペリプラズムへ輸送され、最終的に外膜に埋め込まれた CsgG のチャネルを通して菌体外へ分泌される。本研究では、分子シャペロン DnaK が curli の産生に依存したバイオフィルムの形成に必須であることを見出し、curli 産生を正に制御する複数のタンパク質のフォールディングに重要であることを明らかにした。

#### VI. 植物由来ポリフェノールの新規生理機能の開拓

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ル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 Myricetin が、大腸菌の増殖を阻害せず、濃度依存的にバイオフィルム形成を抑制できることを明らかにした。さらに Myricetin は、メチシリン耐性株を含む黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成も抑制した。現在、Myricetin 類縁体の中で約 10 倍活性の高い化合物の作用機序の解明を進めている。

## Ⅶ. バイオフィルム崩壊メカニズムの解析

黄色ブドウ球菌のバイオフィルムは 8 時間で形成されるが 24 時間後には崩壊した。細胞外マトリックス解析から、この崩壊はマトリックス中の核酸の分解との関連が示唆された。バイオフィルム上清中に、バイオフィルム破壊作用がみられ、イオン交換カラムで分画した活性画分には DNA zymography 解析においてヌクレアーゼ (nuc) 活性がみられた。黄色ブドウ球菌は nuc の産生が知られており、nuc 変異株ではバイオフィルムの崩壊が抑制されたことから、nuc 分泌によりバイオフィルム崩壊が起こることが示唆された。

## 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、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、114 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 5 名を、6 年次医学生の実習室配属では 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。

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ル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) VBNC 細菌の解析、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) 哺乳類腸内における NF、5) 8 型分泌装置の作動機構の解明、6) 植物由来ポリフェノールの新規生理機能の開拓、7) バイオフィルム崩壊メカニズムの解析、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) Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb Biotechnol* 2015; 8(3): 392-403.
- 2) Koyama R<sup>1)</sup>, Okuda K, Matsushita K (Kawasaki Municipal Tama Hosp), Beppu M<sup>1)</sup> (St. Marianna Univ), Mizunoe Y. Antimicrobial and antibiofilm effects of ozonated water for prevention and treatment of bone and joint infections. *J St Marianna Univ* 2015; 6(1): 1-7.
- 3) Sugimoto S, Arita-Morioka K<sup>1)</sup>, Mizunoe Y, Yamanaka K<sup>1)</sup>, Ogura T<sup>1)</sup> (Kumamoto Univ). Thioflavin T as a fluorescence probe for monitoring RNA metabolism at molecular and cellular levels. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(14): e92.

### II. 総説

- 1) 水之江義充, 千葉明生, 岩瀬忠行, 杉本真也. 【バイオフィルム研究の最前線】医歯薬学 バイオフィルム細胞外マトリックスの分離解析. *化療の領域* 2015; 31(11): 2158-65.

### III. 学会発表

- 1) 有田健一<sup>1)</sup>, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 水之江義充, 小椋 光<sup>1)</sup>

- (<sup>1</sup>熊本大), 杉本真也. 分子シャペロン DnaK をターゲットにした小分子化合物を用いた新規バイオフィルム阻害法の開発. 第12回21世紀大腸菌研究会. 大津, 6月.
- 2) 杉本真也, 有田健一<sup>1)</sup>, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>熊本大), 水之江義充. DnaK/Hsp70 シャペロンシステムはVIII型分泌装置の発現と品質を制御する. 第12回21世紀大腸菌研究会. 大津, 6月.
- 3) 千葉明生, 杉本真也, 水之江義充. (一般演題IV) Extracellular RNA はバイオフィルムの構造維持に重要である. 第29回日本バイオフィルム学会学術集会. 蒲郡, 7月.
- 4) 杉本真也, 有田(森岡)健一<sup>1)</sup>, 水之江義充, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>熊本大). (一般演題IV) 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. 第29回日本バイオフィルム学会学術集会. 蒲郡, 7月.
- 5) 奥田賢一, 杉本真也, 岩瀬忠行, 山田聡美, 水之江義充. (一般演題I) ベースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* によるバイオフィルム形成. 第29回日本バイオフィルム学会学術集会. 蒲郡, 7月.
- 6) 杉本真也, 千葉明生, 米本圭吾, 水之江義充. バイオフィルムマトリクスに含まれる細胞外核酸の実態解明. 文部科学省研究費新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議. 京都, 8月.
- 7) 水之江義充, 千葉明生, 岩瀬忠行, 杉本真也. (エレクトロニクスソサイエティ 依頼シンポジウムセッションCI-3: 界面ナノバイオテクノロジー) 細菌のバイオフィルムマトリクスの解析. 電子情報通信学会2015年ソサイエティ大会. 仙台, 9月.
- 8) 千葉明生, 杉本真也, 佐藤文哉, 堀 誠治, 水之江義充. (セッション7: バイオフィルム) 迅速な非侵襲的バイオフィルムECM抽出法の開発. 第98回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10月.
- 9) 杉本真也. (シンポジウム: 若手中心による先端研究 運動・分泌マシナリーから見えるバクテリアの新しい世界) 8型分泌装置の発動における細胞質分子シャペロンの機能. 第98回日本細菌学会関東支部総会. 東京, 10月.
- 10) 千葉明生, 杉本真也, 水之江義充. RNAの新機能の発見: Extracellular RNA はバイオフィルムの構造維持に重要である. 第132回成医会総会. 東京, 10月.
- 11) Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y. (Microbial stress networks and cross talk with higher organisms) A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. Microbial Stress: from Molecules to Systems. Sitges, Nov.
- 12) Arita-Morioka K<sup>1)</sup>, Yamanaka K<sup>1)</sup>, Mizunoe Y, Ogura T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Kumamoto Univ), Sugimoto S. (Microbial stress in industrial production processes) Inhibition of bacterial biofilms by small compounds targeting molecular chaperone DnaK. Microbial Stress: from Molecules to Systems. Sitges, Nov.
- 13) 千葉明生, 杉本真也, 水之江義充. Extracellular RNA はバイオフィルムの構造維持に重要である. 第9回日本細菌学会若手コロッセウム. 鹿児島, 11月.
- 14) 杉本真也, 有田(森岡)健一<sup>1)</sup>, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>熊本大), 水之江義充. (ポスター発表: タンパク質-2) フォールディングと品質管理) 細胞外アミロイド産生におけるコシャペロン非依存的な分子シャペロン DnaK の機能. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.
- 15) 水之江義充. バイオフィルム感染症の予防・治療法の開発. バイオテクノロジー&エレクトロニクス研究討論会. 東京, 12月.
- 16) 杉本真也, 奥田賢一, 宮川玲奈, 佐藤真理<sup>1)</sup>, 千葉明生, 水之江義充, 佐藤主税<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>産業技術総合研究所). (招待講演) 大気圧走査電子顕微鏡によるバイオフィルムの液中高分解能観察. 第49回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会. 仙台, 1月.
- 17) 杉本真也, 奥田賢一, 宮川玲奈, 佐藤真理<sup>1)</sup>, 千葉明生, 佐藤主税<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>産業技術総合研究所), 水之江義充. (ワークショップ12: 細菌由来メンブランヴェシクル研究, 基礎と応用) 高分解能液中電顕観察から見えてきたバイオフィルム内部におけるメンブランベシクルの産生と多彩な機能. 第89回日本細菌学会総会. 大阪, 3月.
- 18) 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), 水之江義充. (一般演題) 黄色ブドウ球菌のバイオフィルムの形成を阻害する低分子化合物の作用機序解析. 第89回日本細菌学会総会. 大阪, 3月.
- 19) 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 水之江義充. 腸管出血性大腸菌 O157 の臨床分離株で見出された一塩基変異による RpoS の機能不全. 第89回日本細菌学会総会. 大阪, 3月.
- 20) 奥田賢一, 山田聡美, 杉本真也, 岩瀬忠行, 佐藤真理<sup>1)</sup>, 佐藤主税<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>産業技術総合研究所), 水之江義充. (一般演題) 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ルム形成. 第89回日本細菌学会総会. 大阪, 3月.