

会・学術集会. 仙台, 1月.

- 2) 安藤 隆, 小林寛伊, 遠藤博久, 菅原えりさ, 梶浦工, 三澤慶樹, 龍野桂太, 森屋恭爾, 坂本和美, 阿部正樹, 河野 緑, 岩本武夫, 松浦知和, 杉本健一. (一般演題 23 (口演): MALDI MALDI-TOF MS マススペクトルパターン解析による *Staphylococcus epidermidis* のバイオフィルム形性能の評価. 第 27 回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 仙台, 1月.
- 3) 田島彩紗, 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. (ポスター発表: 疾患生物学-1) がん) がん細胞におけるアンチザイムと ATP クエン酸リアーゼの相互作用の解析. BMB2015 (第 38 回分子生物学会年会, 第 88 回生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.
- 4) 藤本義隆, 浦島 崇, 糸久美紀, 伊藤怜司, 河内貞貴<sup>1)</sup>, 梶村いちげ, 赤池 徹, 草刈洋一郎, 藤原優子, 小川 潔<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup>埼玉小児医療センター), 井田博之, 南沢 享. (Poster presentation 4: Heart failure/hypertrophy) Low cardiac output induces hepatic fibrosis in right failure model rat. 第 32 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2015). 神戸, 12月.
- 5) 大平宇志, 須藤正道, 草刈洋一郎, 南沢 享. 長期宇宙滞在に伴う宇宙飛行士の骨格筋機能低下に対する予防策として温熱刺激の有効性の検討. 筋生理の集い. 東京, 12月.
- 6) 進藤大典, 朴ジョンヒョク, 前橋はるか, 松浦知和. (一般演題口演: セッション 85 NAFLD・基礎 3) 空腹時 <sup>13</sup>C-glucose 呼吸試験による肝臓エネルギー代謝の検討—ラットの雌雄差について—. 第 51 回日本肝臓学会総会. 熊本, 5月.

#### IV. 著 書

- 1) 中田浩二, 羽生信義, 松浦知和, 矢永勝彦. 第 4 章: 新規呼吸検査法の開発動向 8. 呼吸による消化管機能評価. 槻木恵一 (神奈川歯科大) 監修. 非侵襲的検体検査の最前線: 唾液検査・呼吸検査を中心に. 東京: シーエムシー出版, 2015. p.246-52.
- 2) 中田浩二. 3. 消化器疾患 14. 便秘. 富野康日己 (順天堂大) 編. 内科外来処方 navi. 東京: 中外医学社, 2015. p.56-7.
- 3) 中田浩二. Ⅲ. FD のガイドラインと治療の実際 食事・生活習慣の指導をどう行うか. 三輪洋人 (兵庫医科大) 編. FD 診療のすべて: その理論から実践まで. 東京: ヴァンメディカル, 2015. p.58-64.

### バイオフィルム研究センター

- |            |   |
|------------|---|
| 教 授: 水之江義充 | 細菌学, 分子生物学<br>(細菌学講座より出向中)                          |
| 教 授: 堀 誠治  | 感染症, 感染化学療法,<br>薬物の安全性<br>(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<br>血心疾患, 弁膜症の研究<br>(心臓外科学講座より出向中)       |
| 教 授: 矢永 勝彦 | 消化器外科<br>(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・靱帯の<br>生化学<br>(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<br>麻酔, 肺高血圧の診断と<br>治療<br>(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<br>瘍, 腹腔鏡手術<br>(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<br>(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<br>化学<br>(国領校・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<br>(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,<br>抗菌化学療法<br>(柏病院・感染制御部より出向中)       |
| 准教授: 荒屋 潤  | 呼吸器病学<br>(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<br>疾患の基礎的研究<br>(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<br>(分子生物学講座より出向中)                        |
| 講 師: 河野 緑  | 臨床微生物学<br>(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<br>(細菌学講座より出向中)                          |
| 講 師: 岩瀬 忠行 | 細菌学, 分子生物学<br>(細菌学講座より出向中)                          |
| 講 師: 杉本 真也 | 細菌学, 分子生物学<br>(細菌学講座より出向中)                          |
| 講 師: 奥田 賢一 | 細菌学, 分子生物学<br>(細菌学講座より出向中)                          |

#### 教育・研究概要

バイオフィルム研究センターは平成 27 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「バイオフィルム感染症制圧研究拠点の形成」(平成 24~28 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。

バイオフィルムとは、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ル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、バイオフィル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ルムの細菌叢を網羅的に解析し、バイオフィル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、バイオフィルム感染症に対する診断法・予防法の開発を行う。また、バイオフィルム形成メカニズムの解明とバイオフィルム形成を阻害する物質の探索を行い、バイオフィルム感染症治療薬の開発を目指した研究を推進する。

## I. Extracellular RNA (eRNA) はバイオフィルムの構造維持に重要である

黄色ブドウ球菌を含む病原細菌のバイオフィルム形成メカニズムの解明を目指し、近年我々がバイオフィルムマトリクス中に見出した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200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がバイオフィル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。次に、バイオフィルム形成におけるeRNAの機能を調べるために、バイオフィルムのRNase A感受性を検討した。RNase Aをバイオフィルム形成の開始時から添加するとバイオフィルムの形成が阻害され、成熟したバイオフィルムは短時間のRNase A処理で破壊された。さらに、緑膿菌などの細菌から抽出したバイオフィルムマトリクス中にもeRNAが存在することが確認された。以上の結果は、バイオフィルム内部におけるeRNAの存在とその生理的機能を示す新しい知見である。今後、eRNAを標的としたバイオフィルム阻害法の開発が期待される。

## II. 分子の複雑さとあいまいさによって支えられるバイオフィルムの形成基盤

黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成能とマトリ

クスの解析を行い、強固なタンパク質性のバイオフィルムを形成するユニークな臨床分離株を見出した。そのバイオフィルムは、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がバイオフィル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ルム形成量は低下しなかった。そこで、バイオフィルム形成への関与が報告されているいくつかの遺伝子と*eap*遺伝子との多重欠損株を作製したところ、バイオフィルム形成量が著しく低下する複数の遺伝子を見出した。その一つが*srtA*遺伝子であった。*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（アンカリング）させることから、これらの細胞壁アンカータンパク質のいずれかがバイオフィルム形成においてEapと重複した機能を有することが予想された。それらの機能をより詳細に解析することで、バイオフィルム形成の分子基盤が解明され、院内感染症の原因菌である黄色ブドウ球菌に対する特異的な予防・治療法の開発に繋がることが期待される。

## III. 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

臨床で大きな問題となっている黄色ブドウ球菌のバイオフィル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ルム形成阻害活性を示す低分子化合物Anti Biofilm Compound-JK2 (ABC-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ルム形成を阻害している可能性が示唆された。

## 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ルムを観察した。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が固体表面に形成したバイオフィルムと細胞外マトリクス(Curli線毛、鞭毛、DNA、分泌小胞)を可視化することができた。今後、バイオフィルムの形成メカニズムの理解がさらに深まり、新しい感染症治療薬の開発にも繋がると期待される。

## V. 菌体外分子シャペロンによるバイオフィルム形成制御

細胞質分子シャペロンDnaKは菌体外にも存在し、バイオフィルム形成を促進する。本研究では、DnaKの生理活性とバイオフィルム促進効果との相関性を明らかにするため、ドメイン欠損変異体および部位特異的変異体を作製し、黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成に対する促進効果を調べた。その結果、N末端のヌクレオチド結合ドメインのみでバイオフィルム形成促進活性を示した。また、DnaKはATPase活性と基質結合活性に依存せず、黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を促進した。以上より、DnaKは従来の分子シャペロンとしての機能とは全く異なる様式でバイオフィルム形成に関与すると考えられる。

## VI. 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ルム形成

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ル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ル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ルム形成を示した。酵素感受性試験の結果、DNase Iはすべての株のバイオフィル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ル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ル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。

## 「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ルム形成機構の解明およびバイオフィル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) Extracellular RNAはバイオフィルムの構造維持に重要である、2) 分子の複雑さとあいまいさによって支えられるバイオフィルムの形成基盤、3) 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、4) 大気圧走査電子顕微鏡によるバイオフィルムの液中観察、5) 菌体外分子シャペロンによるバイオフィルム形成制御、6) 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ルム形成などがあげられる。さらに、入院患者より回収された中心静脈カテーテルに付着しているバイオフィルムの解析を開始した。

## 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> (<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> (<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. 【バイオフィーム研究の最前線】医歯薬学 バイオフィーム細胞外マトリクスの分離解析. 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> (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ーム阻害法の開発. 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> (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 はバイオフィームの構造維持に重要である. 第 29 回日本バイオフィーム学会学術集会. 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> (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 回日本バイオフィーム学会学術集会. 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* によるバイオフィーム形成. 第 29 回日本バイオフィーム学会学術集会. 蒲郡, 7 月.
- 6) 杉本真也, 千葉明生, 米本圭吾, 水之江義充. バイオフィー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) 細菌のバイオフィー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: バイオフィーム) 迅速な非侵襲的バイオフィーム 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 はバイオフィー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> (熊本大), 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 はバイオフィー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> (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. バイオフィーム感染症の予防・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> (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ー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リジー学会総会. 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> (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ー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> (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ー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, 田馬亜紀子, 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> (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 *Propioni-*

*bacterium 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.