

細菌学講座

教授：水之江義充	細菌学, 分子生物学
准教授：岩瀬 忠行	細菌学, 分子生物学
准教授：杉本 真也	細菌学, 分子生物学
講師：田嶋亜紀子	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. 生きていますが培養できない (VBC: Viable but nonculturable) 細菌の解析

腸管出血性大腸菌 O157 を含めた多くの細菌が、ストレス暴露により VBC 状態になることが知られており、感染源を特定する上で大きな問題となっている。これまでの検討により、その表現型は一遺伝子の変異に起因しており、酸素呼吸によってペリプラズム内に生じたヒドロキシラジカルが細胞死を惹起することが明らかになった。このメカニズムを基に開発した抗酸化物質含有細菌検出用培地を用いることで、VBC 状態の腸管出血性大腸菌 O157 を分離培養することが可能になった。現在、大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課とともに本知見の有用性を検討している。

II. 腸管出血性大腸菌 O157 の病原性を増強させるバクテリオファージの遺伝子モジュールの解析

これまでの検討により、腸管出血性大腸菌 O157 のプロファージに由来する遺伝子モジュールが、宿主細菌のシグマ因子の発現を制御することで、本細菌の病原性を増強させることを見出した。この遺伝子モジュールは O157 の祖先種である O55 では検出されないことから、O157 に分かれる際に獲得したものであることが示唆される。本知見は、細菌の病原性を含む生態・進化に加え、細菌-ファージ間相互作用についても新たな洞察をもたらすものと考えられる。

III. 哺乳類腸内における窒素固定

窒素固定とは、生物利用不可能な大気中の窒素分子をアミノ酸に変換する事象をさす。一般には、マメ科植物の根に寄生する窒素固定細菌が有名であるが、これまでの検討により、ヒトを含む多くの哺乳動物、特に草食動物の腸内から窒素固定細菌を分離することができたことから、哺乳類の腸内においても窒素固定が行われる可能性が考えられる。

そこで、窒素固定細菌／窒素固定遺伝子欠損株の

みを有する実験動物（マウス）を用い、その腸内において窒素固定遺伝子が発現していることを確認した。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、 $\delta^{15}\text{N}$ 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窒素固定細菌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。現在その詳細について検討を進めている。

IV. 新規感染症治療法の開発

消化器・肝臓内科の光永真人講師等によって開発された光エネルギーを熱エネルギーに変換するプローブを結合させた多剤耐性の MRSA を標的する抗体を用い、本抗体に結合した MRSA に光を照射したところ、瞬時に殺菌することが明らかになった。

また、黄色ブドウ球菌を感染させたラットに光(近赤外光)を照射し、本法の効果をコロニーカウント法によって細菌学的に検討したところ、ほぼ根絶に近い形で MRSA を殺滅することが判明した。次年度以降において、本格的に in vivo での有用性を検証する予定である。

V. 間質性膀胱炎の病因解明と治療法の開発

間質性膀胱炎は激しい疼痛と頻尿を主訴とする難病であり、その病因は解明されておらず、効果的な治療法についても標準化されていない。泌尿器科の古田 昭准教授の臨床的経験によって本疾患に何らかの細菌の関与が疑われ、これを明らかにするため、共同研究を行っている。今回、細菌培養法を工夫することで、これまでほとんど分離されることのなかった細菌種を分離同定することができた。現在、本疾患の病因解明と治療法を開発すべく、これらの臨床分離株を用いて動物実験を行っている。

VI. 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。研究成果を 2 報の特許として申請した。

Ⅶ. 8型分泌装置の品質管理機構の解明

細菌は多様なタンパク質分泌装置を保有し、これまでに9つの分泌装置が報告されている。それらの機能は菌体外酵素の分泌、毒素の産生と宿主細胞への注入、DNAの取り込み、薬剤耐性プラスミドの伝播など多岐に渡る。なかでも、8型分泌装置はタンパク質の分泌とCurli線毛(菌体外アミロイド線維)の形成が共役したユニークな分泌装置である。これまでに我々は、8型分泌装置の発現に必須な転写因子RpoSおよびCsgD、Curli線毛構成タンパク質CsgAおよびCsgBの細胞内での品質管理において、細菌から哺乳類まで高度に保存されたHsp70ホモログである分子シャペロンDnaKが極めて重要であることを明らかにした。本研究ではさらに、CsgAのペリプラズムにける品質管理において重要な分子シャペロンとプロテアーゼを同定した。また、それらのタンパク質品質管理機構の破綻によってCsgA凝集体が分泌小胞によって菌体外へ排出されることを見出した。以上の知見は、8型分泌装置の発動メカニズムの解明に加え、様々なアミロイドーシス発症の理解や予防に資するものであると考えられる。

Ⅷ. 黄色ブドウ球菌バイオフィーム dispersal と病原性

黄色ブドウ球菌バイオフィームにおいて、菌自身が産生するヌクレアーゼによって dispersal が引き起こされることをこれまでに明らかにしている。バイオフィームから遊離した細菌(dispersed細菌)は、生体内において新たな部位に拡散し、感染を悪化させる可能性が考えられるためその病原性について planktonic 細菌と比較解析した。

in vitro において dispersed 細菌は好中球による貪食に抵抗性を示した。貪食抵抗性への寄与が報告されている菌体表面多糖, PNAG (poly-N-acetylglucosamine) が dispersed 細菌では多く検出された。またマウス感染モデルにおいて, dispersed 細菌はマウスの生存率を著しく低下させた。以上よりバイオフィームから遊離した菌は, planktonic 細菌とは異なる性状を持ち, 高い病原性を示すと考えられる。

「点検・評価」

1. 教育について

教育に関しては、コース臨床基礎医学のユニット「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、本プログラム内容の理解促進のため、110名を数班に分け、7名のスタッフが学

生に密着した指導を行った。また、演習としてユニット「感染・免疫テュートリアル」を担当した。

3年次医学科生のコース研究室配属では5名を受け入れ、多岐にわたる研究指導を行った。またMD-PhDコースの学生を2名受け入れ研究指導を行っている。

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、これまでの基礎細菌学的研究に加え、臨床部門との共同研究による臨床細菌学的研究も大きく前進した。基礎細菌学的研究の具体例として、1) VBC細菌の解析、2) 高病原性に寄与するプロフェージの新規遺伝子モジュールの解析、3) 8型分泌装置の品質管理機構の解明、4) 黄色ブドウ球菌バイオフィーム dispersal と病原性、5) 哺乳類腸内における窒素固定などがあげられる。また臨床細菌学的研究の具体例としては、1) 新規感染症治療法の開発、2) 間質性膀胱炎の病因解明と治療法の開発、3) 薬剤耐性菌の迅速検出方法の開発などがあげられる。加えて、University of Virginia等の海外との共同研究も活発に行われている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Iwase T, Matsuo T (NAIST), Nishioka S, Tajima A, Mizunoe Y. Hydrophobicity of residue 128 of the stress-inducible sigma factor RpoS is critical for its activity. *Front Microbiol* 2017; 8: 656.
- 2) Yoshii Y, Okuda K, Yamada S, Nagakura M, Sugimoto S, Nagano T¹⁾, Okabe T¹⁾, Kojima H¹⁾ (¹ Univ Tokyo), Iwamoto T, Kuwano K, Mizunoe Y. Norgestimate inhibits staphylococcal biofilm formation and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017; 3: 18.
- 3) Iwase T, Okai C, Kamata Y, Tajima A, Mizunoe Y. A straightforward assay for measuring glycogen levels and RpoS. *J Microbiol Methods* 2018; 145: 93-7.
- 4) Okuda K, Nagahori R, Yamada S, Sugimoto S, Sato C¹⁾, Sato M¹⁾ (¹ AIST), Iwase T, Hashimoto K, Mizunoe Y. The composition and structure of biofilms developed by *Propionibacterium acnes* isolated from cardiac pacemaker devices. *Front Microbiol* 2018; 9: 182.
- 5) Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onode-

ra S, Hori S, Mizunoe Y. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 2018; 8(1): 2254.

II. 総 説

- 1) 杉本真也. 遺伝子発現の揺らぎを瞬時に可視化する新手法の開発 チオフラビン T の新たな機能の発見とその応用. *化と生* 2017; 55(8): 573-9.
- 2) Kanematsu H (Suzuka Coll), Barry DM (Clarkson Univ), Ikegai H (Univ Human Arts Sci), Yoshitake M (Natl Inst Materials Sci), Mizunoe Y. Biofilm evaluation methods outside body to inside -problem presentations for the future-. *Med Res Arch* 2017; 5(8): 1-17.
- 3) 水之江義充, 杉本真也, 奥田賢一, 千葉明生, 吉井悠, 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 米本圭吾. 【生体および環境におけるバイオフィーム】生体・環境におけるバイオフィームの意義 医学領域におけるバイオフィーム. *臨と微生物* 2018; 45(1): 3-11.

III. 学会発表

- 1) Tajima A. Analysis of staphylococcal biofilm dispersal. Pasteur-Jikei Joint Symposium. Paris, Apr.
- 2) Sugimoto S. Imaging of bacterial biofilms in solution by atmospheric scanning electron microscopy. Pasteur-Jikei Joint Symposium. Paris, Apr.
- 3) Iwase T. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Pasteur-Jikei Joint Symposium. Paris, Apr.
- 4) 杉本真也, 寺尾明莉, 山中邦俊¹⁾, 小椋 光¹⁾ (¹ 熊本大), 水之江義充. Hsp70 シャペロンをハブとした AAA⁺プロテアーゼ分解基質のトリアージ. 第14回21世紀大腸菌研究会. 熱海, 6月.
- 5) 水之江義充, 岩瀬忠行. 細菌のシグマ因子活性測定法の開発. 有機エレクトロニクス研究会. 壱岐, 7月.
- 6) 水之江義充. (特別講演) 細菌の形成するバイオフィーム. 第134回成医会総会. 東京, 10月.
- 7) 花輪 和, 岡井智瑛, 田嶋亜紀子, 水之江義充, 岩瀬忠行. 腸管出血性大腸菌 O157 の病原性とストレス感受性に影響を与える新規ファージ媒介性遺伝子 pmoAB の解析. 第134回成医会総会. 東京, 10月.
- 8) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 齋藤 充, 丸毛啓史, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌における eap と細胞壁アンカータンパク質の相補的な機能の解明. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会. 宜野湾, 10月.
- 9) 杉本真也, 寺尾明莉, 山中邦俊¹⁾, 小椋 光¹⁾ (¹ 熊本大), 水之江義充. Hsp70 シャペロンによる

- AAA⁺プロテアーゼ分解基質のトリアージ. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会). 神戸, 12月.
- 10) 杉本真也. 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) を用いた複合微生物集団の構造と機能の統合的理解. JST ERATO 野村集団微生物プロジェクト会議. 三浦, 2月.
 - 11) Chiba A. RNA serves as a building material in bacterial habitats. Umeå-Jikei Joint Meeting. Umeå, Feb.
 - 12) Yoshii Y. Identification and characterization of a small compound inhibitor of *Staphylococcus aureus* biofilm. Umeå-Jikei Joint Meeting. Umeå, Feb.
 - 13) Yonemoto K. Redundant roles of secretory proteins and cell wall-anchored proteins in biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. Umeå-Jikei Joint Meeting. Umeå, Feb.
 - 14) 岩瀬忠行, 田嶋亜紀子, 山崎 和, 岡井智瑛, 水之江義充. 大腸菌 O157 の検出と分離. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 3月.
 - 15) 藤岡宏樹, 岩瀬忠行, 岩田祐士¹⁾, 青木 豊¹⁾ (¹ 鳥津製作所), 水之江義充, 馬目佳信. 菌種同定を目的とした血液培養液の揮発性成分の探索. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 3月.
 - 16) 田嶋亜紀子, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌バイオフィーム dispersal と病原性の解析. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 3月.
 - 17) 杉本真也, 有田-森岡健一 (福岡歯科大), 山中邦俊¹⁾, 小椋 光¹⁾ (¹ 熊本大), 水之江義充. ミリセチン類縁体による菌体外アミロイド線維依存的バイオフィームの制御. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 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¹⁾, 岡部隆義¹⁾, 小島宏建¹⁾ (¹ 東京大), 岩本武夫, 水之江義充. Norgestimate は黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害しβ-ラクタム薬感受性を誘導する. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 3月.
 - 19) 奥田賢一, 山田聡美, 吉井 悠, 水之江義充. Mechanism of action of the small molecule inhibitor against *Staphylococcus aureus* biofilm formation. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 3月.
 - 20) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 齋藤 充, 丸毛啓史, 水之江義充. Redundancy of a secretory protein and cell wall-anchored proteins on biofilm formation in *S. aureus*. 第91回日本細菌学会総会. 福岡, 3月.

IV. 著 書

- 1) 米本圭吾, 杉本真也. 第4章: 食とヒト常在微生物 27. 傷口の微生物. 北本勝ひこ¹⁾, 春田 伸 (首都大学東京), 丸山潤一¹⁾ (¹ 東京大), 後藤慶一 (東海大),

尾花 望 (筑波大), 齋藤勝晴 (信州大) 編. 食と微生物の事典. 東京: 朝倉書店, 2017. p.370-1.

- 2) 吉井 悠, 奥田賢一, 杉本真也. 第4章: 食とヒト常在微生物 28. 鼻咽腔と咽頭の微生物. 北本勝ひこ¹⁾, 春田 伸 (首都大学東京), 丸山潤一¹⁾ (¹⁾ 東京大), 後藤慶一 (東海大), 尾花 望 (筑波大), 齋藤勝晴 (信州大) 編. 食と微生物の事典. 東京: 朝倉書店, 2017. p.372-3.
- 3) 千葉明生, 杉本真也. 第4章: 食とヒト常在微生物 36. 手洗いと表皮常在微生物. 北本勝ひこ¹⁾, 春田 伸 (首都大学東京), 丸山潤一¹⁾ (¹⁾ 東京大), 後藤慶一 (東海大), 尾花 望 (筑波大), 齋藤勝晴 (信州大) 編. 食と微生物の事典. 東京: 朝倉書店, 2017. p.388-9.

熱帯医学講座

教授: 嘉糠 洋陸 衛生動物学, 寄生虫学
准教授: 石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫

教育・研究概要

I. ダニの再吸血に対する抵抗性を担う吸血部位への好塩基球の集簇における皮膚内在性の記憶 T 細胞由来インターロイキン 3 (IL-3) の重要性

吸血昆虫によって伝播される感染症は医学的にも重要であり, ダニはライム病などを引き起こすことが知られている。数種類の動物において, ダニの初回吸血によって後の再吸血に対する抵抗性が誘導されることが示されている。我々はこれまでマウスモデルを用いて, 初回吸血では認めないダニ吸血部位への好塩基球の集簇が再吸血の際に認められること, さらにこの集簇がダニの再吸血に対する抵抗性に重要な役割を演じていることを示してきた。今回, 我々はこの好塩基球の集簇に関与する細胞とその産物について検討を加えた。T 細胞を欠失したマウスでは好塩基球の集簇はほとんど認められなかったが, CD4 陽性 T 細胞の移入によって認めるようになった。再吸血の際にダニの吸血部位に IL-3 遺伝子の発現亢進を認めたために, IL-3 産生可能な CD4 陽性 T 細胞を T 細胞欠失マウスへ移入すると抵抗性を獲得させることができた。一方, IL-3 を遺伝的に欠失させたマウスの CD4 陽性 T 細胞の移入では獲得されなかった。これは再吸血部位への好塩基球の集簇に CD4 陽性 T 細胞由来の IL-3 が極めて重要であることを示している。興味深いことに, 再吸血前の初回吸血部位から距離をおいた“吸血を受けたことのない皮膚”に存在する CD4 陽性記憶 T 細胞も IL-3 を保有することを認めた。これらの結果は, 皮膚に内在する CD4 陽性 T 細胞由来の IL-3 が, ダニによる再吸血部位への好塩基球の集簇に不可欠であることを示している。このような吸血に対する抵抗性発現のメカニズム解明は, 吸血昆虫による感染症の伝播に対する新たなワクチン戦略に資すると考えられる。

II. 改良マゴットセラピー (Maggot Debridement Therapy: MDT) に向けた高機能マゴットの樹立

MDT とは, ヒロズキンバエ幼虫が患者の壊死組織だけを摂食する性質を利用し, 人体の難治性創傷