

バイオフィーム研究センター

教 授：水之江義充 (細菌学講座)	細菌学, 分子生物学
教 授：堀 誠治 (感染制御科)	感染症, 感染化学療法, 薬物の安全性
教 授：橋本 和弘 (心臓外科学講座)	後天性心疾患の外科・虚血心疾患, 弁膜症の研究
教 授：矢永 勝彦 (外科学講座(消化器外科))	消化器外科
教 授：丸毛 啓史 (整形外科学講座)	膝関節外科, 骨・靱帯の生化学
教 授：上園 晶一 (麻酔科学講座)	小児麻酔, 心臓血管外科麻酔, 肺高血圧の診断と治療
教 授：穎川 晋 (泌尿器科学講座)	前立腺癌, 泌尿器悪性腫瘍, 腹腔鏡手術
教 授：岩本 武夫 (基盤研究施設(分子細胞生物学))	生化学, 分子生物物理
教 授：高田 耕司 (国領校(生物学研究室))	分子細胞生物学, 病態生化学
教 授：海渡 健 (臨床検査医学講座/中央検査部)	臨床血液学
准教授：堀野 哲也 (感染制御科)	細菌感染症, HIV 感染症, 抗菌化学療法
准教授：荒屋 潤 (内科学講座(呼吸器内科))	呼吸器病学
准教授：岩瀬 忠行 (細菌学講座)	細菌学, 分子生物学
准教授：杉本 真也 (細菌学講座)	細菌学, 分子生物学
講 師：長堀 隆一 (心臓外科学講座)	後天性心疾患の外科, 心疾患の基礎的研究
講 師：村井 法之 (分子生物学講座)	生化学, 分子生物学
講 師：河野 緑 (臨床検査医学講座)	臨床微生物学
講 師：田畠亜紀子 (細菌学講座)	細菌学, 分子生物学
講 師：奥田 賢一 (細菌学講座)	細菌学, 分子生物学

教育・研究概要

I. Norgestimate (NGM) は黄色ブドウ球菌のバイオフィーム (BF) 形成を阻害し β -ラクタム薬感受性化を誘導する

BF 形成阻害剤の化合物スクリーニングを行い、プロゲステンの一種である NGM がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のバイオフィーム形成を阻害することを見出した。バイオフィームの構成成分である細胞外マトリクス (ECM) を解析した結果、NGM は ECM 内の多糖とタンパク質の量を減少さ

せることが明らかになった。また、NGM 存在下においてバイオフィーム形成への関与が知られる surface protein G や enolase の発現が低下することが示された。続いて、細胞壁合成への影響を透過電子顕微鏡観察により調べたところ、NGM 存在下では細胞壁の肥厚化や隔壁合成異常が認められた。細胞壁の合成と分解に関与する複数の遺伝子の発現が NGM 存在下で上昇することが示され、蛍光ペニシリンを用いた解析により PBP2 の発現がタンパク質レベルで上昇することが明らかになった。また、NGM は β -ラクタム薬に対する MRSA の感受性を上昇させた。以上より、NGM は黄色ブドウ球菌の BF 形成に重要な ECM 成分の産生を抑制するのみならず、細胞壁の恒常性に影響を及ぼすことで β -ラクタム薬に対する黄色ブドウ球菌の感受性化を誘導することが示唆された。

II. ペースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* が形成する BF の性状と構造に関する研究

ペースメーカーを検体として培養法による BF 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を血液寒天培地にスタンプし、嫌気条件下で培養を行った結果、31 検体のうち 7 検体から *Propionibacterium acnes* が分離された。分離された株のうち 6 株は Multilocus sequence typing により 5 つのシーケンスタイプ (ST4, ST53, ST69, ST124, ST125) のいずれかに分類されたが、1 株は分類不能であった。in vitro における BF 形成を評価したところ、ST125 の 1 株を除く 6 株はグルコース依存的な BF 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 BF 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。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 BF 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 DNA の線維状構造が観察され、これらの成分が BF 形成に関与していることが示唆された。

III. 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) を用いた BF 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 BF 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のBFとそれらのマトリクス成分（アミロイド線維 curli、鞭毛、菌体外DNA、細胞外分子シャペロン、分泌タンパク質 Eap、分泌小胞など）を高い分解能かつ自然に近い状態で観察することができた。さらに、BFを阻害する低分子化合物や酵素の作用を可視化する上でも有用であった。今後、様々な研究分野に本手法が応用されることが期待される。

IV. ミリセチン類縁体のBF阻害メカニズムの解明

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BF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ミリセチンが、大腸菌の増殖を阻害せず、濃度依存的にBF形成を抑制できることを明らかにした。さらに、ミリセチン類縁体の中から、約10倍活性の高い化合物を見出した。透過電顕で菌体外構造体を観察したところ、本化合物は低濃度でcurliの産生を抑制することが示された。また、curliの産生に関わる遺伝子及びタンパク質の発現を確認したところ、*csgA* (curliの構造遺伝子) および *csgD* (転写制御因子) のmRNA量が減少し、それに伴ってCsgAとCsgDのタンパク質量も減少することが分かった。また、本化合物の添加でcurliの産生に必須な *rpoS* (定常期特異的シグマ因子) の転写は影響を受けないが、RpoSのタンパク質量が減少することが分かった。さらに、スペクチノマイシン・チェイス実験の結果より、化合物の添加時にはRpoSの分解が亢進することが分かった。

V. BF形成における細胞外RNAの重要性

黄色ブドウ球菌を含む病原細菌のBF形成メカニズムの解明を目指し、我々がBF中に見出したextracellular RNA (eRNA) の特性と機能を解析した。これまでにeRNAは黄色ブドウ球菌の多糖に直接的に結合することで、BF内に局在していることを明らかにした。また、eRNAは細胞周囲にも局在していたことから、多糖以外にもeRNAの保持に重要な成分の存在が示唆された。そこでグラム陽性菌に普遍的に存在するタイコ酸の欠損株を作製したところ、eRNAがBF内から消失した。この結果はタイコ酸も多糖と同様にeRNAとBF形成を関連付ける因子であることを示している。さらに、eRNAの次世代シーケンサーを用いた解析より、BF形成

を促進する塩基配列の条件は、少なくともウラシルを含む2次構造を取ることが出来る配列ということが明らかとなった。このことはBF形成を促進するeRNAは多様であることを示し、実際にヒト血液から抽出したRNAもBF形成を促進させた。これらの結果は、黄色ブドウ球菌は感染宿主のRNAも利用しBF感染症の発症に寄与している可能性を示している。

VI. 分子の複雑さと冗長性によって支えられるBFの形成基盤

我々はこれまでにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の臨床分離株の中から分泌タンパク質 Eap を多量に含むBFを形成する株を見出した。EapはBF形成促進能を有するため、本株でもBF形成に重要であると予想された。しかし、*eap* 遺伝子を欠損させてもBF形成量は低下しなかったため、Eap以外のBF形成に重要なタンパク質の存在が示唆された。そこで、種々の遺伝子欠損株を作製した結果、Cell wall-anchored protein (CWAP) を細胞壁のペプチドグリカン層へ結合させるSortase A 遺伝子 (*srtA*) の欠損はBF形成量に影響しなかったが、 $\Delta eap\Delta srtA$ 株では顕著に低下することを見出した。この結果は、CWAPがBF形成においてEapと相補的に機能することを示唆している。そこで、複数のCWAP欠損株を作製したところ、 $\Delta eap\Delta sasG$ 株でBF形成量が低下することがわかった。また、共焦点レーザー顕微鏡でBFを観察すると、野生株では分厚く凹凸の大きいBFが観察されたのに対し、 $\Delta eap\Delta sasG$ 株では薄く平坦なBFが観察された。さらに、 $\Delta eap\Delta sasG$ 株においてカイコに対する病原性の低下が認められた。以上より、EapとSasGはBFの形成量、立体構造および病原性において相補的に機能することが明らかとなった。

「点検・評価」

本センターは、微生物によって形成される高次機能的構造体“バイオフィーム”とそれに関連した感染症を研究の対象とした本邦初の研究機関である。文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「バイオフィーム感染症制圧研究拠点の形成」(2012~2016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2015年4月に設立された。本センターはバイオフィーム基礎研究コア（リーダー：水之江義充）とバイオフィーム感染症研究コア（リーダー：堀 誠治・橋本和弘・矢永勝彦）の2つのコアから構成され、

臨床と基礎が連携してバイオフィーム感染症の制圧に向けた学内横断的な研究を展開している。また、学外の研究機関（東京大学、九州大学、熊本大学、筑波大学、産業技術総合研究所等）とも積極的に共同研究を実施し、密に情報交換や技術移転を行っている。留学生の受け入れや各国の研究機関（フランス・パスツール研究所、ポルトガル・ミンホ大学、スウェーデン・ウメオ大学、フィンランド・ヘルシンキ地域開発機構）との研究交流を行い、ジョイント・カンファレンスをパスツール研究所とウメオ大学で合計2回実施した。5月には、上記事業の研究成果を取りまとめ、文部科学省に成果報告書を提出した（http://www.mext.go.jp/a_menu/koutou/shinkou/07021403/002/002/1402924.htm）。

特筆すべき研究成果としては、従来から取り組んでいる黄色ブドウ球菌や大腸菌のバイオフィーム形成機構およびバイオフィーム形成阻害因子の作用機序の解明が上げられる。これらの成果は、本センターが主体となって2報の英文原著論文として報告した。また、臨床講座との共同研究も着実に成果を上げ、英文原著論文2報が掲載された。現在、投稿中もしくは投稿準備中の成果もあるが、それらはすでに国内外の学会において口頭もしくはポスター発表で報告しており、複数の学術賞（第134回成医会優秀発表賞、第7回家畜感染症学術集会優秀発表賞、第91回日本細菌学会優秀ポスター賞）を受賞するなど高く評価された。また、競争的資金の獲得に向けた取り組みを積極的に行い、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究B、若手研究A、日本学術振興会特別研究員奨励費など）や財団助成金の獲得、および科学技術振興機構・ERATOへの参画に繋がっている。以上のように、本センターの活動は国内外から評価され、本邦におけるバイオフィーム研究の重要拠点として認知度も高まってきている。今後も、学内外の研究機関との共同研究をさらに活性化させ、原著論文および国内外の学会で最新の研究成果を継続的に発表していくとともに、若手研究者の育成にも尽力していくことが望まれる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) 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.

- 2) 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.
- 3) S Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera 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), Michiko Y (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, 田嶋重紀子, 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) Okuda K. High-throughput screening of biofilm inhibitors. Pasteur-Jikei Joint Symposium. Paris, Apr.
- 2) Yoshii Y. Identification and characterization of a small compound inhibitor of *Staphylococcus aureus* biofilm. Pasteur-Jikei Joint Symposium. Paris, Apr.
- 3) 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14回21世紀大腸菌研究会. 熱海, 6月.
- 4) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 齊藤 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31回日本バイオフィーム学会学術集会. つくば, 7月.
- 5) 千葉明生, 杉本真也, 水之江義充. MRSA 臨床分離株のバイオフィーム形成能とマトリクス成分の解析. 第31回日本バイオフィーム学会学術集会. つくば, 7月.
- 6) 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

球菌のバイオフィルム形成を阻害し、 β ラクタム系抗菌薬に対する黄色ブドウ球菌の感受性を上昇させる。第31回日本バイオフィルム学会学術集会、つくば、7月。

- 7) 千葉明生, 杉本真也, 水之江義充. バイオフィルム形成における細胞外RNAの重要性. 第31回日本バイオフィルム学会学術集会. つくば, 7月.
- 8) 杉本真也, 水之江義充. 菌体外アミロイド線維curliの細胞内品質管理機構の解明. 第31回日本バイオフィルム学会学術集会. つくば, 7月.
- 9) 水之江義充. (招待講演) 細菌のバイオフィルム形成メカニズム. 第681回化学・物質工学セミナー. 長崎, 9月.
- 10) 水之江義充. (特別講演) 細菌の形成するバイオフィルム. 第134回成医会総会. 東京, 10月.
- 11) 奥田賢一, 吉井 悠, 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, 桑野和義, 水之江義充. プロゲスチンの新たな効果の発見—黄色ブドウ球菌に対するバイオフィルム形成阻害と β -lactam系抗菌薬への感受性向上効果. 第134回成医会総会. 東京, 10月.
- 12) 水之江義充. バイオフィルム研究の最新動向. 第6回バイオフィルムセミナー. 福岡, 11月.
- 13) 水之江義充, 千葉明生, 杉本真也. (招待講演) 迅速な非侵襲的バイオフィルムマトリクス抽出法の開発. 有機エレクトロニクス研究会. 鳥栖, 12月.
- 14) 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ルム形成を阻害し、 β ラクタム系抗菌薬に対する感受性を上昇させる. 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.
- 15) 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. プロゲスチンによる黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成メカニズム. 第7回家畜感染症学会学術集会. 札幌, 12月.
- 16) Iwase T. Staphylococcal biofilm component. MRC (Medical Research Council)–KHIDI (Korea Health Industry Development Institute) Workshop: Workshop to Understand *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. Busan, Jan.
- 17) Iwase T. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Umeå-Jikei Joint Meeting. Umeå, Feb.
- 18) Tajima A. Analysis of staphylococcal biofilm dispersal. Umeå-Jikei Joint Meeting. Umeå, Feb.
- 19) Sugimoto S. Imaging of bacterial biofilms in solu-

tion by atmospheric scanning electron microscopy. Umeå-Jikei Joint Meeting. Umeå, Feb.

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.