

バイオフィーム研究センター

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

教育・研究概要

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

I. 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM: Atmospheric Scanning Electron Microscopy) を用いたバイオフィー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電子顕微鏡である。本研究では、附属病院で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌臨床分離株のバイオフィーム形成に関わる分泌タンパク質 Eap および細胞壁アンカータンパク質 SasG の遺伝子欠損株を作製し、それらのバイオフィームの構造を、ASEM を用いて比較した。その結果、Eap のみが菌の凝集体形成において重要な役割を担うことを明らかにした (Yonemoto K, et al. Infect Immun 2019)。また、JST ERATO プロジェクト内の共同研究として、筑波大学 久能 樹准教授らと鉄酸化細菌 *Leptothrix* 属の分泌ナノ繊維や細胞フィラメントの生理的意義について解析した。その結果、分泌ナノ繊維の分布を自然に近い状態で観察することに世界で初めて成功し、分泌ナノ繊維が固体表面への接着と、細胞フィラメントの伸長開始および伸長方向の決定に重要であることを明らかにした (Kunoh T, et al. ACS Nano 2019)。今後、様々な研究分野にも本手法が応用されることが期待される。

II. 細菌の細胞外アミロイド前駆体タンパク質を分解するペリプラズム局在プロテアーゼの機能解明

アミロイド線維 Curli は大腸菌などの腸内細菌科細菌によって産生され、バイオフィームの形成や宿主への感染において重要な役割を担う。Curli は、CsgA と呼ばれるタンパク質が細胞質で合成され、菌体外に運び出されたあと、菌の表層でアミロイド線維を形成することで作られる。しかし、水に溶けにくい Curli が誤って菌体内に作られることで、細菌自身の生育が抑制されないように調節する仕組みは長らく謎であった。昨年度、我々は大腸菌の細胞質における CsgA の凝集体形成の抑制と菌体外への分泌において、分子シャペロン DnaK が重要な役割を果たすことを世界に先駆けて報告した (Sugimoto S, et al. Commun Biol 2018)。一方、ペリプラズム (グラム陰性菌に特徴的な内膜と外膜に挟まれた領域) において CsgA の量と質を制御する機構は不明である。本研究では、ペリプラズムに局在する 22 種類のプロテアーゼに着目し、CsgA の分解に関与する複数のプロテアーゼを発見した (第 136 回成医会総会ポスター発表賞を受賞)。現在、これらの機能を分子レベルで解析している。

Ⅲ. 閉塞性胆管ステントに形成されたバイオフィルムの顕微鏡学的・細菌学的解析

閉塞性黄疸は、胆汁の消化管への排出が滞り、胆汁中のビリルビンが体内に蓄積して、皮膚・尿・眼結膜の黄染を生じた状態であり、この治療の第一選択は、内視鏡を用いた胆管ステントの挿入による胆道ドレナージである。胆管ステントは、開存期間が短く、数カ月で閉塞をきたすため、定期的なステント交換を必要とするが、これが医療費増加につながるという問題点がある。胆管ステントは、その内腔に細菌が付着しバイオフィルムを形成することで、閉塞に至ると推定されているが、どのような細菌が原因になっているかは良く分かっていない。本研究では、内視鏡科 炭山和毅教授および古橋広人大学院生らとの共同研究（萌芽的共同研究推進費 2019 年度採択課題）として、ステント閉塞物のバイオフィルムについての解析を行った。ステント閉塞物を大気圧走査電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、特定の細菌の存在が確認された。血液寒天培地を用いて分離培養を行ったところ、多数のコロニーが得られ、16S rDNA の塩基配列解析により、これらの細菌の一部の菌種を同定した。分離された細菌のバイオフィルム形成を試験管内で評価したところ、二次胆汁酸の添加により、バイオフィルム形成が増加することが確認された。これらの知見は、胆管ステントの閉塞メカニズムを理解する上で重要な手掛かりであり、胆管ステント閉塞の予防法の確立に資するものである。

Ⅳ. 黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成阻害剤の探索と作用機序の解析

黄色ブドウ球菌は各種医療用デバイスの表面にバイオフィルムを形成することで難治性のバイオフィルム感染症の原因となる。我々は、バイオフィルム感染症に対する有効な治療薬・予防薬の開発を目指し、独自のスクリーニングシステムを構築して黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を阻害する低分子化合物の大規模スクリーニングを行ってきた。ヒット化合物の一つである ABC-JK1 は黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成に重要な細胞外多糖の産生を抑制し、細胞壁の肥厚化を誘導することが明らかになった。次に、リンカー構造を持つ磁性ビーズの表面に ABC-JK1 の誘導体を共有結合で固定化し、ブルダウン法による標的分子の同定を試みた。その結果、黄色ブドウ球菌の細胞壁関連タンパク質と特異的に結合することが明らかになった。活性を持たない前駆体および変異体タンパク質との結合性は大き

く低下したことから、本タンパク質の活性中心に ABC-JK1 が結合することが示唆された。また、マイクロ流路デバイスを用いたバイオフィルム阻害活性の評価を行い、ABC-JK1 が還流条件下でも効果を示すことを明らかにした。加えて、ABC-JK1 には黄色ブドウ球菌の酸素呼吸を亢進させることで、アミノグリコシド系抗菌薬に対する感受性を向上させる効果があることを見出した。ABC-JK1 を用いた難治性のバイオフィルム感染症の予防及び治療法の開発が今後期待される。

Ⅴ. 細胞外 RNA は黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を促進する

黄色ブドウ球菌は、健康者の約 3 割に常在する細菌である。その一方で、高いバイオフィルム形成能を有し、血管内留置カテーテルや心臓の人工弁などの生体内に挿入された人工物にバイオフィルムを形成するため、難治性感染症を引き起こす。この感染症に対する新規の予防・治療法の開発には、バイオフィルム形成の分子基盤の理解が重要である。黄色ブドウ球菌が形成するバイオフィルムの構成成分として、多糖、タンパク質、DNA については、これまでに多くの解析がなされている。我々は、附属病院の臨床検体から分離された MRSA の MR10 株を用いて、RNA がバイオフィルムの構成成分であることを見出した。本研究では、MR10 株の多糖産生量が多いことに着目し、多糖と RNA の関係について、共焦点レーザー顕微鏡による局在観察と表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を行った。その結果、RNA は細胞外多糖と結合することでバイオフィルム内に局在していることが分かった。また、血管内カテーテルを模した *in vitro* のモデルで、ヒト血液から抽出した RNA によりバイオフィルムの形成量が促進することを見出した。以上の結果は、黄色ブドウ球菌が血管内カテーテルなどの感染において、ヒト由来の RNA を利用しバイオフィルムをより強固にしている可能性が示唆された。

「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“バイオフィルム”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センターである。文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「バイオフィル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

ルム基礎研究コア（リーダー：金城雄樹）とバイオフィルム感染症研究コア（リーダー：堀 誠治・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ル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、静岡大学、宇都宮大学、産業技術総合研究所、国立感染症研究所等）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。さらに、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実施してきた。

2019年度の特筆すべき研究成果としては、従来から取り組んできたASEMを用いた微生物の観察と黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成機構が上げられる。これらの成果は3報の英文原著論文として報告し、そのなかの一報は米国微生物学会が発行する学術雑誌の表紙を飾った。また、臨床講座との共同研究も着実に成果を上げ、本学の萌芽の共同研究推進費の研究課題に採択され、順調に成果を上げている。現在、投稿中もしくは投稿準備中のものもあり、今後も継続的な研究成果の発信が期待できる。さらに、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、AMED、JST ERATO、および各種財団助成金の獲得にも繋がっている。主要な構成メンバーは、日本バイオフィルム学会評議員および広報委員としての活動を通して、本邦のバイオフィルム研究の活性化に尽力している。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ルム研究の重要拠点として責務を果たしている。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、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期待される。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, Marumo K, Mizunoe Y. Redundant and distinct roles of secreted protein Eap and cell wall-anchored protein SasG in biofilm formation and pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 2019; 87(4): e00894-18.
- 2) Abe M, Nakamura S, Kinjo Y, Masuyama Y, Mitsuyama J, Kaku M, Miyazaki Y. Efficacy of T-2307, a novel arylamidine, against ocular complications of disseminated candidiasis in mice. J Antimicrob Chemother 2019; 74(5): 1327-32.
- 3) Okai C, Itani Y, Furuta A, Mizunoe Y, Iwase T. Rapid identification and quantification of *Lactobacillus rhamnosus* by real-time PCR using a TaqMan probe. Jpn J Infect Dis 2019; 72(5): 323-5.
- 4) Lopes AA, Yoshii Y, Yamada S, Nagakura M, Kinjo Y, Mizunoe Y, Okuda K. Roles of lytic transglycosylases in biofilm formation and β -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2019; 63(12): e01277-19.
- 5) Ueno K, Yanagihara N, Otani Y, Shimizu K, Kinjo Y, Miyazaki Y. Neutrophil-mediated antifungal activity against highly virulent *Cryptococcus gattii* strain R265. Med Mycol 2019; 57(8): 1046-54.
- 6) Kunoh T, Morinaga K, Sugimoto S, Miyazaki S, Toyofuku M, Iwasaki K, Nomura N, Utada AS. Polyfunctional nanofibril appendages mediate attachment, filamentation, and filament adaptability in *Leptothrix cholodnii*. ACS Nano 2020; 14(5): 5288-97. Epub 2019 Dec 5.

II. 総説

- 1) 佐藤主税, Memtily N, 佐藤真理, 杉本真也. 親水環境での電子顕微鏡：クライオ電顕とASEM組織観察. 表面と真空 2019; 62(4): 198-204.

III. 学会発表

- 1) 田嶋亜紀子, 金城雄樹. (ポスター) バイオフィルム dispersed 細菌の病原性. 第92回日本細菌学会総会. 札幌, 4月.
- 2) 奥田賢一, Lopes AA, 吉井 悠, 山田聡美, 永倉茉莉, 水之江義充, 金城雄樹. (ポスター) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成と薬剤耐性におけるトランスグリコシラーゼの関与. 第92回日本細菌学会総会. 札幌, 4月.
- 3) 大石和徳, 常 彬, 大西 真, 金城雄樹. (ポスター) わが国における12F血清型による成人侵襲性肺炎球菌感染症の臨床像. 第92回日本細菌学会総会. 札幌, 4月.
- 4) 杉本真也. (シンポジウム2：菌の休眠と覚醒のメカニズムと意義) 休眠と覚醒を繰り返す菌の温床“バイオフィルム”～その形成メカニズムと制御～. 第92回日本細菌学会総会. 札幌, 4月.
- 5) 奥田賢一, 金城雄樹. (口頭) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のトランスグリコシラーゼはバイオフィルム形成と薬剤耐性に関与する. 第67回日本化学療法

学会総会、東京、5月。

- 6) 杉本真也, 山中邦俊, 小椋 光, 金城雄樹. (ポスター) 菌体外アミロイド線維 Curli のペリプラズムにおける品質管理機構の解明. 第16回21世紀大腸菌研究会. 大津, 5月.
- 7) 千葉明生, 杉本真也, 金城雄樹. (口頭) ブドウ球菌のバイオフィーム内における細胞外RNAの保持機構. 第33回日本バイオフィーム学会学術集会. 久留米, 7月.
- 8) 奥田賢一, Lopes AA, 吉井 悠, 山田聡美, 永倉茉莉, 水之江義充, 金城雄樹. (口頭) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成と薬剤耐性におけるトランスグリコシラーゼの関与. 第33回日本バイオフィーム学会学術集会. 久留米, 7月.
- 9) 米本圭吾, 千葉明生, 水之江義充, 金城雄樹, 杉本真也. (口頭) 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成における分泌タンパク質 Eap と細胞壁アンカータンパク質 SasG の機能的類似と相違. 第33回日本バイオフィーム学会学術集会. 久留米, 7月.
- 10) 久能 樹, 森永花菜, 杉本真也, 豊福雅典, 野村暢彦, Utada AS. (口頭) *Leptothrix* 属細菌の分泌ナノ繊維は連鎖状菌体に環境適応性を付与する. 第71回日本生物工学会大会. 岡山, 9月.
- 11) 佐藤主税, 杉本真也, 簗野悠里, 佐藤真理, 坂井詠子. (シンポジウム 2SHP: 可視化デバイス開発と数値モデル化を用いた細胞内アーキテクチャの解読) 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM による骨組織再構築の水中免疫電顕法と cryo-TEM 観察. 第57回日本生物物理学会. 宮崎, 9月.
- 12) 千葉明生, 金城雄樹. (口頭) 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成における細胞外RNAの重要性. 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第66回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 仙台, 10月.
- 13) 寺澤友梨香, 杉本真也, 金城雄樹. (ポスター) 細菌のアミロイド線維形成を制御するペリプラズム局在プロテアーゼの発見. 第136回成医会総会. 東京, 10月.
- 14) 杉本真也, 山中邦俊, 小椋 光, 金城雄樹. (ポスター) ペリプラズム局在プロテアーゼによる細菌のアミロイド線維形成の制御機構. 第42回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 15) Sugimoto S, Yamanaka K, Ogura T, Kinjo Y. (Poster) The DnaK/Hsp 70 system modulates the activity of AAA+ protease ClpXP. Keystone Symposia: AAA+ Proteins: From Atomic Structures to Organisms (A5). Tahoe City, Jan.
- 16) 奥田賢一, Lopes AA, 吉井 悠, 山田聡美, 永倉茉莉, 水之江義充, 金城雄樹. (ポスター) MRSA におけるトランスグリコシラーゼ遺伝子の欠損は mecA 発現レベルに関わらず β -ラクタム感受性化を誘導す

る. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.

- 17) 田嶋亜紀子, 金城雄樹. (ポスター) バイオフィーム遊離細菌における好中球貪食回避. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 18) 千葉明生, 金城雄樹. (ポスター) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する納豆菌の抗菌活性. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 19) 杉本真也. (ワークショップ WS08: Membrane vesicle 研究におけるパラダイムシフトとその応用) 細胞外小胞を介したプロテオスタシスの制御. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 20) 水島明日香, 奈須野恵理, 杉本真也, 加藤紀弘. (ポスター) Quorum sensing の自己誘導ペプチド前駆体をコードする遺伝子破壊によるレポーター株作製. 第14回日本ゲノム微生物学会年会. 名古屋, 3月.

V. その他

- 1) 奥田賢一. 最新の技術やニュースの紹介: バイオフィーム形成阻害試験自動化システム. 日本バイオフィーム学会会報 2019; 4: 7.
- 2) 杉本真也. イベント参加報告: 第92回日本細菌学会総会. 日本バイオフィーム学会会報 2019; 5: 5.