

管機能検査 update】機能性ディスペプシアの診断.  
消化器・肝臓内科 2019;5(2):147-55.

### III. 学会発表

- 1) 江崎裕敬, 綾部誠人, 政木隆博, 越智小枝, 目崎喜弘, 中山律子, 池脇克則, 松浦知和. 循環器病専門クリニックの受診者を対象とした空腹時<sup>13</sup>C グルコース呼気試験を用いた肝臓インスリン抵抗性の検討. 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会. 米子, 7月.
- 2) 政木隆博, 松浦知和, 江崎裕敬, 目崎喜弘, 越智小枝, 中村まり子, 中山律子. 非アルコール性脂肪性肝炎症例における空腹時<sup>13</sup>C-glucose呼気試験による肝臓インスリン抵抗性の評価. 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会. 米子, 7月.
- 3) 中村まり子, 政木隆博, 目崎喜弘, 横山 寛, 松浦知和, 肥満・II型糖尿病発症モデルラットを用いた空腹時<sup>13</sup>C-glucose呼気試験による肝臓インスリン抵抗性の検討. 第10回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会. 横浜, 9月.

### 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, 真菌学
(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・靭帯の生化学
(整形外科科学講座)	
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(分子細胞生物学))	
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：岩瀬 忠行	細菌学, 分子生物学
(細菌学講座)	
准教授：杉本 真也	細菌学, 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：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：田嶋亜紀子	細菌学, 分子生物学
(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：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

オフィウム形成を阻害する物質の探索を行い、バイオフィウ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. 次世代シーケンサーを用いた中心静脈カテーテルに付着した細菌 DNA の網羅的解析

細菌の 16S rDNA を標的とした次世代シーケンシング (NGS) によりカテーテル関連感染症 (CRI) の原因菌の同定を行い、従来の培養法との比較を行った。対象とした 156 例中 125 例は症状のないルーチン除去であり、31 例は CRI の疑いで CVC が除去された。CVC から抽出した DNA から細菌 16S rDNA の PCR による増幅を行い、NGS による解析を行った結果、156 例中 14 例 (9.0%) が NGS 陽性であった。14 例中 9 例は CRI が疑われたグループであり、5 例はルーチン除去グループであった。CRI が疑われたグループにおいて NGS と培養法の結果はよく一致し、感度と特異度はそれぞれ 80.0% と 76.9% であった。培養法と NGS がともに陽性であった 4 例において、培養法によって検出された細菌はすべて NGS でも検出された。そのうち 1 例では、培養法では *Klebsiella pneumoniae* のみが同定されたが、NGS では *Klebsiella* に加え *Staphylococcus* と *Enterobacteriaceae* が検出された。一方、ルーチン除去グループにおける NGS の偽陽性率は、4.0% と低かった。結論として、細菌の 16S rDNA を標的とした NGS による CVC 検体の細菌組成解析により CRI の原因となる病原体を検出することができ、CRI の診断に応用できる可能性が示唆された。

## II. バイオフィウムの立体構造における分泌タンパク質 Eap の重要性

附属病院で患者から分離された MRSA 臨床分離株 MR23 は、分泌タンパク質 Eap を多量に含むタンパク質性のバイオフィウムを形成する。これまでの研究で、1. Eap と細胞壁アンカータンパク質 SasG がバイオフィウム形成量を規定する上で Redundant に機能すること、2. SasG は細胞壁に共有結合した状態でバイオフィウム形成に寄与すること、3. SasG は DNA に結合し、その分解を抑制すること、4. *eap* と *sasG* の二重遺伝子欠損株はカイコに対する病原性が低下することを見出した。次に、RNA に結合する蛍光プローブであるチオフラビン T を用いてバイオフィウムを染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、野生株や  $\Delta sasG$  株では分厚く凹凸の大きいバイオフィ

ウムが観察されたのに対し、 $\Delta eap$  株では厚く平坦なバイオフィウムが観察され、 $\Delta eap \Delta sasG$  株では薄く平坦なバイオフィウムが観察された。この結果は、Eap が複雑なバイオフィウムの構造形成に寄与することを示唆している。以上より、Eap と SasG はバイオフィウムの形成量の点では相補的に機能するが、バイオフィウムの立体構造構築の点では異なる機能を有することがわかった。従来の研究では、バイオフィウム形成に関わる単一の分子に着目したものが主であったが、今後、単一の分子だけでなく複数の分子を同時に解析することで、バイオフィウム形成の分子機構の理解が一層深まると考えられる。

## III. バイオフィウム内での RNA の安定化のメカニズム

黄色ブドウ球菌は、健康者の 3 割に常在する細菌である。しかし、高いバイオフィウム形成能を有するため、血管内留置カテーテルや人工関節などの生体内に挿入された人工物にバイオフィウムを形成し、難治性感染症を引き起こす。このような感染症に対する新しい予防・治療法の開発には、バイオフィウ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ウ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 がバイオフィウムの構成成分であることを見出した。しかし、環境中では容易に分解されやすい RNA がバイオフィウム内で安定的に存在できる機序は明らかでなかった。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ウム内に局在していることが分かった。また、MR10 株のゲノム DNA を次世代シーケンサーで解析し、既知の黄色ブドウ球菌のゲノム DNA と比較したところ、黄色ブドウ球菌の DNase/RNase 活性を規定する遺伝子 *nucA* が完全に欠損していることが分かった。そこで、黄色ブドウ球菌 Newman 株の intact な *nucA* をプラスミドに連結し、MR10 株で発現させたところ、バイオフィウム形成が顕著に阻害された。以上より、バイオフィウム内での RNA の安定的な保持には、多糖の産生だけでなく *nucA* の欠損も重要であることがわかった。

#### IV. バイオフィーム形成に重要なアミロイド線維 Curli の形成を制御するメカニズムの解明

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（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。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のフォールディングと、Curliの構成タンパク質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が極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。また、茶カテキンEGCGを用いたCurli形成の阻害法を考案し、その作用機序の一端を明らかにした。さらに、CsgAのペリプラズムにお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、現在それらの詳細な機能を解析中である。これらの知見は、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。

#### V. 大気圧走査電子顕微鏡（Atmospheric Scanning Electron Microscopy: ASEM）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、ASEMを用いて種々の細菌の形態やバイオフィームを観察した。重金属染色、正荷電ナノゴールドラベルなどにより、ブドウ球菌や大腸菌のバイオフィーム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、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。また、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MR23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。さらに、JST ERATOプロジェクトの一環として、*Paracoccus* 属細菌や *Leptothrix* 属細菌のDish表面への付着過程をASEMを用いて観察することが出来た。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。

#### 「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：金城雄樹）とバイオフィーム感染症研究コア（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、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。

2018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患者から抜去された中心静脈カテーテルに付着した細菌叢の網羅的解析が上げられる。これらの成果は、本センターが主体となって4報の英文原著論文として報告した。そのなかには、編集者が選ぶEditor's Picksに選出されたものや雑誌の表紙を飾ったものも含まれる。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。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、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) Sugimoto S, Arita-Morioka K<sup>1)2)</sup>(<sup>1</sup> Fukuoka Dent Coll), Terao A, Yamanaka K<sup>2)</sup>, Ogura T<sup>2)</sup>(<sup>2</sup> Kumamoto Univ), Mizunoe Y. Multitasking of Hsp70 chaperone in the biogenesis of bacterial functional amyloids. *Commun Biol* 2018; 1: 52.
- 2) Arita-Morioka K<sup>1)2)</sup>, Yamanaka K<sup>2)</sup>, Mizunoe Y, Tanaka Y<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> Fukuoka Dent Coll), Ogura T<sup>2)</sup>(<sup>2</sup> Kumamoto Univ), Sugimoto S. Inhibitory effects of Myricetin derivatives on curli-dependent biofilm formation in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 2018; 8(1): 8452.
- 3) Abe M<sup>1)2)3)</sup>, Kinjo Y, Ueno K<sup>1)</sup>, Takatsuka S<sup>1)</sup>, Nakamura S<sup>1)</sup>, Ogura S<sup>3)</sup>, Kimura M<sup>3)</sup>, Araoka H<sup>3)4)</sup>, Sadamoto S<sup>5)</sup>, Shinozaki M<sup>5)</sup>, Shibuya K<sup>5)</sup>(<sup>5</sup> Toho Univ), Yoneyama A<sup>3)4)</sup>(<sup>3</sup> Toranomon Hosp, <sup>4</sup> Okinaka Memorial Inst Med Res), Kaku M<sup>2)</sup>(<sup>2</sup> Tohoku Univ), Miyazaki Y<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> NIID). Differences in ocular complications between *Candida albicans* and non-albicans *Candida* infection analyzed by epidemiology and a mouse ocular candidiasis model. *Front Microbiol* 2018; 9: 2477.
- 4) Okuda K, Yoshii Y, Yamada S, Chiba A, Hironaka I, Hori S, Yanaga K, Mizunoe Y. Detection of bacterial DNA from central venous catheter removed from patients by next generation sequencing: a preliminary clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2018; 17(1): 44.
- 5) Takatsuka S<sup>1)</sup>, Inukai T<sup>1)</sup>, Kawakubo S<sup>1)2)</sup>(<sup>2</sup> Waseda Univ), Umeyama T<sup>1)</sup>, Abe M<sup>1)</sup>, Ueno K<sup>1)</sup>, Hoshino Y<sup>1)</sup>, Kinjo Y, Miyazaki Y<sup>1)</sup>, Yamagoe S<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> NIID). Identification of a novel variant form of *Aspergillus fumigatus* CalC and generation of anti-CalC monoclonal antibodies. *Med Mycol J* 2019; 60(1): 11-6.
- 6) Ueno K<sup>1)</sup>, Urai M<sup>1)2)</sup>(<sup>2</sup> Tokyo Univ Agriculture), Sadamoto S<sup>3)</sup>, Shinozaki M<sup>3)</sup>, Takatsuka S<sup>1)</sup>, Abe M<sup>1)</sup>, Otani Y<sup>1)4)</sup>, Yanagihara N<sup>1)4)</sup>, Shimizu K<sup>4)</sup>, Iwakura Y<sup>4)</sup>(<sup>4</sup> Tokyo Univ Sci), Shibuya K<sup>3)</sup>(<sup>3</sup> Toho Univ), Miyazaki Y<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> NIID), Kinjo Y. A dendritic cell-based systemic vaccine induces long-lived lung-resident memory Th17 cells and ameliorates pulmonary mycosis. *Mucosal Immunol* 2019; 12(1): 265-76.

## II. 総説

- 1) 杉本真也. News & Hot Paper Digest 細菌から発見されたセルロースの新規な修飾. *実験医* 2018; 36(11): 1880-1.
- 2) 杉本真也. Opinion こんなところにも!? バイオ

フィルム研究の魅力. *実験医* 2018; 36(16): 2823.

## III. 学会発表

- 1) 杉本真也, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> 熊本大), 水之江義充. 8型分泌装置に依存する Curli 形成の制御機構の解明. 第15回21世紀大腸菌研究会. 南陽, 5月.
- 2) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 斎藤 充, 金城雄樹, 丸毛啓史, 水之江義充. Redundant and distinct roles of secreted Eap and cell wall-anchored SasG in biofilm formation and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. 第32回日本バイオフィーム学会学術集会. 宇都宮, 7月.
- 3) 奥田賢一, 長堀隆一, 山田聡美, 杉本真也, 佐藤主税<sup>1)</sup>, 佐藤真理<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> 産業技術総合研究所), 岩瀬忠行, 橋本和弘, 金城雄樹, 水之江義充. ペースメーカーより分離された *Propionibacterium acnes* が形成するバイオフィームの生化学的性質と構造. 第32回日本バイオフィーム学会学術集会. 宇都宮, 7月.
- 4) Sugimoto S, Arita-Morioka K (Fukuoka Dent Coll), Terao A, Yamanaka K<sup>1)</sup>, Ogura T<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> Kumamoto Univ), Mizunoe Y, Kinjo Y. Regulation of bacterial amyloid biogenesis by molecular chaperones and proteases. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave". Otsu, Aug.
- 5) 金城雄樹. (大会企画シンポジウム: アゲラスフィンから始まったNKT細胞研究と, その最前線) iNKT細胞を介する生体防御. 第62回日本薬学会関東支部大会. 東京, 9月.
- 6) 金城雄樹, 上野圭吾<sup>1)</sup>, 定本聡太<sup>2)</sup>, 篠崎 稔<sup>2)</sup>, 大谷淑子<sup>1)3)</sup>, 柳原 尚<sup>1)3)</sup>, 清水公德<sup>3)</sup>(<sup>3</sup> 東京理科大), 澁谷和俊<sup>2)</sup>(<sup>2</sup> 東邦大), 宮崎義継<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> 国立感染症研究所). (シンポジウム3: 真菌と宿主攻防の最前線) クリプトコックス・ガッティの莢膜多糖による免疫回避機構及び樹状細胞ワクチンを用いた感染防御機構の解析. 第62回日本医真菌学会総会・学術集会. 東京, 9月.
- 7) 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 野村ERATO 集団微生物制御プロジェクト会議. つくば, 9月.
- 8) Chiba A, Mizunoe Y, Kinjo Y, Sugimoto S. Extracellular RNA contributes to robust biofilm organization. 8th ASM (American Society for Microbiology) Conference on Biofilms. Washington, D.C., Oct.
- 9) Sugimoto S, Arita-Morioka K<sup>1)</sup>, Terao A, Yamanaka K<sup>2)</sup>, Ogura T<sup>2)</sup>(<sup>2</sup> Kumamoto Univ), Tanaka Y<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> Fukuoka Dent Coll), Kinjo Y, Mizunoe Y. Regulation of bacterial amyloid biogenesis by multitasking molecular chaperon DnaK. 8th ASM (American Soci-

- ety for Microbiology) Conference on Biofilms. Washington, D.C., Oct.
- 10) 岩瀬忠行, 金城雄樹. バクテリオファージ由来遺伝子 pmoAB による宿主細菌の遺伝子発現と病原性のコントロール. 第 135 回成医学会総会. 東京, 10 月.
  - 11) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 斎藤 充, 金城雄樹, 丸毛啓史, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成と病原性における Eap と細胞壁にアンカーした SasG の多様な機能の解明. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会. 奈良, 10 月.
  - 12) 林崎浩史, 金城雄樹, 大石和徳 (国立感染症研究所). 抗 PspA 抗体による肺炎球菌排除機構の解析. AMED ACT-M 班会議. 大阪, 10 月.
  - 13) 金城雄樹. (教育講演 8) 肺炎球菌感染症: ワクチンの研究. 第 67 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 65 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 東京, 10 月.
  - 14) 杉本真也, 山中邦俊<sup>1)</sup>, 小椋 光<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> 熊本大), 水之江義充, 金城雄樹. バイオフィルム形成に重要なバクテリア細胞外アミロイド形成の制御機構. 第 41 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月.
  - 15) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 斎藤 充, 金城雄樹, 丸毛啓史, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌のバイオフィルム・病原性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 の多様な機能の解明. 第 41 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月.
  - 16) 金城雄樹. NKT 細胞の $\alpha$ ガラクトシルセラミド類似細菌糖脂質の認識および感染免疫における役割. 第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会. 横浜, 12 月.
  - 17) Takatsuka S<sup>1)</sup>, Hayashizaki K, Ueno K<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> NIID), Kubo M (Tokyo Univ Sci), Kinjo Y. The critical role of IL-21<sup>+</sup> NKT cells in the formation of germinal center B cells by a protein-based pneumococcal vaccine. 第 47 回日本免疫学会学術集会. 福岡, 12 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), 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 8 回家畜感染症学会学術集会. 福岡, 12 月.
  - 19) 金城雄樹. (特別講演 1) 高病原クリプトコックスに対する感染防御機構. 第 2 回東北医真菌研究会. 仙台, 12 月.
  - 20) 金城雄樹, 高塚翔吾<sup>1)</sup>, 川久保俊<sup>1)</sup>, 林崎浩史, 宮崎義継<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> 国立感染症研究所). 糖脂質に着目した肺炎球菌感染防御. 第 5 回糖鎖免疫研究会. 東京, 2 月.