

第26回

Bacterial Adherence & Biofilm

学術集会

会期◆2012年7月13日金

会場◆大阪ガーデンパレス

大阪市淀川区西宮原1-3-35

会長◆天野 富美夫

大阪薬科大学 生体防御学研究室



第26回

Bacterial Adherence & Biofilm

学術集会

会期 ◆ 2012年 7月13日(金)

会場 ◆ 大阪ガーデンパレス
大阪市淀川区西宮原1-3-35

会長 ◆ 天野 富美夫
大阪薬科大学 生体防御学研究室

共催 ◆ 日本薬学会近畿支部
大阪薬科大学

第26回 Bacterial Adherence & Biofilm
学術集会実行委員会

大阪薬科大学 生体防御学研究室

〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原4-20-1

TEL&FAX: 072-690-1054

E-mail: amano@gly.oups.ac.jp

会長挨拶

第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会

会長 天野 富美夫

(大阪薬科大学 生体防御学研究室 教授)

この度、平成24年7月13日に大阪ガーデンパレスで開催されます第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会の会長を仰せつかりました。開会に際し、ひと言、ご挨拶申し上げます。

本会は細菌学のみならず、薬理学、病理学、感染症学、内科学、外科学、泌尿器科学、歯学、獣医学、薬学、環境科学など、幅広い専門領域の多彩な研究者により構成される学際的な会です。1987年の第1回 Bacterial Adherence 研究会に始まり、毎年1回、開催され、途中、Bacterial Adherence & Biofilm と名称を変えて今年度で26回を迎えます。

第26回の本学術集会では、一般演題は、「細菌付着の制御と Biofilm 形成」、「Biofilm 形成の制御機構」、「薬剤耐性」、ならびに「病原性と測定法」の4つの分野のそれぞれ4演題ずつ、計16演題において最新の研究成果が発表されます。さらに、シンポジウムでは、「再考！バイオフィーム！」をメインテーマに掲げ、バイオフィーム形成に関与する遺伝子および細菌間の情報伝達機構、薬剤耐性・病原性とバイオフィームの関連、歯科領域におけるバイオフィーム形成と誤嚥性肺炎のリスクなど、それぞれの研究の最先端を担う5人の演者の先生方から、研究のご紹介と討論をして戴きます。また、特別講演(教育講演)として、大阪大学産業科学研究所の山口明人先生に、「細菌のバイオフィーム形成と薬剤耐性機構」のご講演をして戴きます。なお、本研究会の活性化を図るため、新たに、学生・大学院生等の若手研究者を対象とする「優秀賞」を設け、一般演題の中から選考します。この取り組みを通じ、わが国のバイオフィーム研究の振興と、若手研究者の活躍の機会が増加することを期待しています。

以上、限られた時間ではありますが、本学術集会を通じて、ご参加の先生方に Bacterial Adherence、そして Biofilm に関する新たな研究への道が拓かれますことを祈念しまして、会長のご挨拶に代えさせて戴きます。

学術集会の案内

日 程

平成 24 年 (2012 年) 7 月 13 日 (金曜日)

会 場

大阪ガーデンパレス

大阪市淀川区西宮原 1-3-35 TEL : 06-6396-6211

<http://www.hotelgp-osaka.com>

実行委員長

天野 富美夫 (大阪薬科大学 生体防御学研究室)

連絡先

第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会実行委員会

大阪薬科大学生体防御学研究室

〒 569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1

TEL : 072-690-1054 Fax : 072-690-1054

E-mail : amano@gly.oups.ac.jp

参加費 (当日受付のみ)

会 員 : 5,000 円

一般 (会員外) : 6,000 円

学生・大学院生 : 1,000 円

懇 親 会 費 : 3,000 円 (学生・大学院生 : 2,000 円)

参加者の皆様へのご案内

会 場

すべての講演を大阪ガーデンパレス 2F の桜の間で行います。

受 付

7月13日(金曜)午前8時30分より、会場前に設置したデスクで受付を行います。受付で参加費をお支払い戴きましたら、参加証と要旨集をお渡しいたします。また、懇親会の受け付けも同時に行います。

講演時間

【一般演題】

発表は口演時間が9分間、質疑応答が3分間の計12分間です。講演時間厳守をお願いいたします。

【シンポジウム】

発表は口演時間が30分間、質疑応答が5分間の計35分間です。

発表方法

1. 会場のスクリーンは1面です。
2. 口演はすべて PC によるプレゼンテーションです。PC をご持参下さい。
 - ① モニター出力端子に Mini D-sub15 ピン3列コネクター(通常モニター端子)が装備されているものに限り、薄型 PC などでは出力の規格が異なる場合がありますので、その場合は接続用の端子をご持参下さい。
 - ② 発表データは Microsoft Power Point (Power Point 97-2003、またはそれ以降)で作成してください。
 - ③ 当日、発表セッションの30分前迄に、会場入り口付近にある「PC 受付」にご自身の PC をお持ちいただき、試写をして動作確認を行って下さい。受付には発表用ファイルを開いた状態にして、電源アダプターと一緒に預けてください。
 - ④ 研究会が準備したプロジェクターとの接続ができない場合に備え、バックアップデータを USB メモリまたは CD-R に保存し、必ずご持参下さい。
 - ⑤ パソコンが外部ディスプレイに出力可能であるか、特に動画が多用された大容量データの場合、必ず事前に確認してください。
 - ⑥ スクリーンセーバー、ウイルスチェック、ならびに省電力機能はあらかじめ解除しておいてください。解除されておらずと発表中にスクリーンセーバーなどが動作してしまうことがあります。
 - ⑦ プロジェクターへの接続は会場内の PC 席にて係が行います。
 - ⑧ 講演終了後は速やかに PC 席からご自分の PC をお受け取りください。
3. 演者の先生は10分前までに「次演者席」にご着席をお願いします。
4. 一般講演の座長の先生方は、「次座長席」にご着席をお願いします。

昼 食

お弁当等の販売は行いません。会場の大阪ガーデンパレスまたは周辺の飲食店をご利用ください。

プログラム

平成24年7月13日(金) 開場 8:30

開会の挨拶 9:00 天野 富美夫(大阪薬科大学 生体防御学研究室 教授)

一般演題1 9:05~9:53 座長:水之江 義充(東京慈恵会医科大学・細菌学)

[細菌付着の制御と Biofilm 形成]

0-01 Role of extracellular DNA and DNA-binding protein in biofilm formation of *Streptococcus intermedius*

○Asikin Nur¹⁾、弘田 克彦¹⁾、湯本 浩通²⁾、平尾 功治²⁾、高橋 加奈子²⁾、村上 圭史¹⁾、松尾 敬志²⁾、三宅 洋一郎¹⁾

1)徳島大学 HBS 研究部 口腔微生物学分野、2)徳島大学 HBS 研究部 歯科保存学分野

0-02 殺菌処理後のバイオフィルム構造への *Streptococcus mutans* の二次付着について—一殺菌から分散、剥離へと口腔バイオフィルムの制御戦略転換の必要性の提言—

○大墨 竜也、竹中 彰治、興地 隆史

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 う蝕学分野

0-03 高機能キメラ酵素の創出による歯面バイオフィルムの分解の試み

○角田 衣理加¹⁾、大塚 良子²⁾、野村 義明¹⁾、村田 貴俊¹⁾、今井 奨¹⁾、津守 秀明³⁾、桃井 保子²⁾、花田 信弘¹⁾

1)鶴見大学歯学部 探索歯学講座、2)鶴見大学歯学部 保存修復学講座、3)防衛医科大学校 化学教室

0-04 非結核性抗酸菌が形成するバイオフィルムの生態学的特徴

○西内 由紀子¹⁾、戸谷 孝洋²⁾、立石 善隆^{2,3)}、前倉 亮治³⁾、松本 壮吉²⁾

1)大阪市立大学医学部刀根山結核研究所、2)大阪市立大学大学院医学研究科細菌学講座、3)国立病院機構刀根山病院

一般演題2 9:56~10:44 座長:恵比須 繁之(大阪大学大学院・歯・口腔分子感染制御学)

[Biofilm 形成の制御機構]

0-05 嫌気環境下における緑膿菌 Biofilm の形成メカニズムの解析

○清川 達則、八幡 穰、豊福 雅典、内山 裕夫、野村 暢彦

筑波大学大学院 生命環境科学研究科 微生物機能利用学

0-06 ウェルシュ菌の温度依存的なバイオフィルム形態変化の制御機構の解析

○尾花 望、中村 幸治、野村 暢彦

筑波大学 生命環境系

0-07 緊縮応答による百日咳菌 Biofilm 形成の制御

○杉崎 健太郎¹⁾、花輪 智子¹⁾、澤井 真優子²⁾、米澤 英雄¹⁾、大崎 敬子¹⁾、蔵田 訓¹⁾、神谷 茂¹⁾

1) 杏林大学 医学部感染症学教室、2) 杏林大学医学部感染症学教室 (医学科6年生)

0-08 *Streptococcus* 属細菌の ComA ペプチダーゼドメインの簡易活性測定を目的とした人工基質の検討

○石井 誠志¹⁾、矢野 貴人^{1,3)}、海老原 章郎^{4,6)}、岡本 明弘⁵⁾、満足 美穂⁴⁾、林 秀行^{1,2)}

1) 大阪医科大学 医学部 生化学、2) 大阪医科大学 医学部 化学、3) 大阪医科大学 看護学部 生化学、4) 理研播磨研 放射光科学総合研究センター、5) 東海大学 開発工学部、6) 岐阜大学 応用生物科学部

一般演題3 10:47～11:35

座長：公文 裕巳(岡山大学大学院・医歯薬学総合・泌尿器病態学)

[薬剤耐性]

0-09 付着及びバイオフィルム形成緑膿菌の抗菌薬抵抗性関連遺伝子の探索

○村上 圭史¹⁾、小野 恒子²⁾、弘田 克彦¹⁾、三宅 洋一郎¹⁾

1) 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野、
2) 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 微生物、遺伝子解析学分野

0-10 広宿主域接合プラスミド *pJRD215* を基盤にした新規プラスミドの作製と口腔 *Actinomyces* 属細菌への応用

○真下 千穂、南部 隆之、円山 由郷、山根 一芳、山中 武志、福島 久典

大阪歯科大学 細菌学講座

0-11 *Porphyromonas gingivalis* の PGN_0088 遺伝子の役割解析

— バイオフィルム形成とマクロライド系抗生物質の抗バイオフィルム作用について —

○山本 れいこ、野村 由一郎、山口 幹代、朝日 陽子、前園 葉月、呉本 勝隆、
恵比須 繁之

大阪大学 大学院 歯学研究科 口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)

0-12 *Helicobacter pylori* バイオフィルムにおける Efflux pump の発現上昇とクラリスロマイシン抵抗性

○米澤 英雄、大崎 敬子、花輪 智子、蔵田 訓、神谷 茂

杏林大学医学部感染症学教室

[病原性と測定法]

0-13 黄色ブドウ球菌(SA)のバイオフィーム(BF)形成能と生体内における病原性の検討

○真鍋 ひとみ¹⁾、自見 至郎²⁾、大山 拓人³⁾、倉田 久嗣¹⁾、原 周司¹⁾、高田 徹⁴⁾、大慈弥 裕之³⁾

1)福岡大学 薬学部、2)福岡大学 医学部 病態構造学、3)福岡大学 医学部 形成外科学、
4)福岡大学 医学部 腫瘍血液感染症内科学

0-14 本邦で分離された多剤耐性アシネトバクター(*Acinetobacter baumannii*)のバイオフィーム形成能に関する検討

○狩山 玲子¹⁾、光畑 律子¹⁾、高田 徹²⁾、松永 彰³⁾、吉村 尚江³⁾、公文 裕巳¹⁾

1)岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学、2)福岡大学病院感染制御部、
3)福岡大学病院臨床検査部

0-15 *Streptococcus anginosus* 選択培地開発における抗菌剤の検討

○野村 義明¹⁾、福田 雄¹⁾、角田 衣理加¹⁾、村田 貴俊¹⁾、大塚 良子¹⁾²⁾、今井 奨¹⁾、花田 信弘¹⁾

1)鶴見大学歯学部探索歯学講座、2)鶴見大学歯学部保存修復学講座

0-16 低電圧パルス印加による大腸菌検査における前処理方法の開発

○松田 直樹、岡部 浩隆、中島 達郎

産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター

— 昼休み (12:30～13:30) —

[細菌のバイオフィーム形成と薬剤耐性機構]

山口 明人(大阪大学産業科学研究所・生体情報制御学研究分野)

[再考！バイオフィルム！]

S-1 バイオフィルム形成に関わる遺伝子群の転写制御

○石浜 明

法政大学・生命科学部・マイクロナノテクノロジー研究センター

S-2 口腔細菌のトランスロケーションによる感染症とその予防
— 誤嚥性肺炎を中心に —

○三宅 洋一郎

徳島大・院 HBS 研究部・口腔微生物

— 休 憩 (15分間) —

S-3 口腔バイオフィルム形成に関与するセンサー分子の役割

○泉福 英信

国立感染症研究所細菌第一部

S-4 黄色ブドウ球菌の新規グローバルレギュレーター SptA とバイオフィルム産生

○加藤 文紀、菅井 基行

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 細菌学研究室

S-5 結核菌の増殖、長期生存、および静止期以降の薬剤抵抗性獲得の分子メカニズム

○松本 壮吉

大阪市大・院・医・細菌学分野

閉会の挨拶 18:00 天野 富美夫(大阪薬科大学 生体防御学研究室 教授)

懇 親 会 18:15～20:15

運営委員会が12:30から別室で行われます。運営委員の先生方はお集まりください。
(運営委員会には昼食の用意を致しております。)

抄 録

細菌のバイオフィルム形成と薬剤耐性機構

山口 明人

大阪大学産業科学研究所・生体情報制御学研究分野

【はじめに】このような表題で講演を仰せつかったのですが、私の専門は細菌の異物(多剤)排出タンパクで、本講演はバイオフィルム形成が薬剤耐性にどう係わるかという問題について触れるものではないので、その点をまずお断りしておきたいと思います。バイオフィルムと異物排出タンパクがどう関係するかというと、キーワードはクオラムセンシング(QS)です。バイオフィルム形成にクオラムセンシングが関係している事は多くの研究がありますが、そのクオラムセンシングを起こす情報伝達分子であるホモセリンラクトン(HSL)の分泌・排出と多剤排出タンパク、中でも緑膿菌の MexAB-OprM 系及びそのホモログとの関連について注目されています。私もこの文脈から QS ならびにバイオフィルム形成と異物排出タンパクの関連について研究したことがございますが、確定的なことを申し上げるような結果は得ておりません。しかしながら、MexB をはじめとする異物排出タンパクが HSL を排出していることそのものは間違いありません。そこで、本講演では、私どもの細菌異物排出タンパクの構造解析を中心に、異物排出タンパクの異物認識機構とその本来の生理的役割について解説させていただきたいと思います。

【異物排出タンパクとは】多剤耐性菌感染症が化学療法の大きな脅威になってきています。多剤耐性は様々な耐性因子の集積によって起こりますが、中でも、多剤排出タンパクと呼ばれる内在性の膜タンパク質(私どもはこれを異物排出タンパクと呼んでいます)の高発現がその背景にあることが注目されてきました。例えば、院内感染で問題になる多剤耐性緑膿菌(MDRP)のほとんどが MexAB-OprM, MexXY-OprM といった RND 型多剤排出タンパクを高発現しており、排出タンパク阻害剤を併用することにより、抗生物質の抗菌力を回復させることができます。これらは細胞膜輸送体、外膜チャネル、膜融合蛋白の3者複合体からなる排出輸送体ですがその著しい特徴は、共通の化学構造を持たない非常に幅広い薬物・毒物を排出するという点にあります。私どもは、この多剤認識機構を理解するために異物排出タンパクの結晶構造解析を行ってきました。

【異物の識別は場の認識】私どもは、2002年に世界で初めて大腸菌の異物排出タンパク AcrB の結晶構造決定に成功しました¹⁾。ホモ3量体で、細胞質膜貫通部とペリプラズムに突出した頭部を持つマッシュルーム様の構造をしており、頭頂部には外膜チャネル TolC と接続するロート状の開口部がありました。著しい特徴は、分子の側面、ちょうど細胞質膜脂質二重層外層表面に向かって基質取入口が開いていたことです。これにより、それまで生化学的実験で推定されていた、異物排出タンパクは細胞膜の掃除機(membrane vacuum cleaner)であるということが、構造的にも証明されました。異物は、特定のトランスポーターを介することなく、脂質二重層に溶け込んで単純拡散により菌体内に侵入することが多いので、この機構により効率的に異物を識別できると考えられます。

【多剤認識の基礎はマルチサイト結合】2006年に基質結合型構造を決定しました²⁾。その結果、多剤認識は蛋白質の induced-fit ではなく、基質の部分構造を認識する複数のサイトの組み合わせによるマルチサイト結合が基本となっていることがわかりました。また、3つのモノマーは非対称で、待機

→結合→排出という3状態を順番に採る事により排出が行われる機能的回転輸送機構が明らかになりました。

【ペリスタポンプ機構】 昨年、大分子量薬物の結合構造を決定したところ、マルチサイト結合ポケットがもう一つあることが判明しました³⁾。これまでの遠位ポケットに対して近位ポケットと名付けましたが、2つのポケットは輸送経路に沿って縦に配列しており、スイッチンググループによって仕切られています。待機状態ではまず近位ポケットに薬物が入り、ついでスイッチンググループの構造変化などにより次の結合段階で遠位ポケットに送り込まれ、最終的に排出段階で頭頂開口部から排出されるというタンパク質の蠕動運動によるペリスタポンプ機構が明らかになりました。

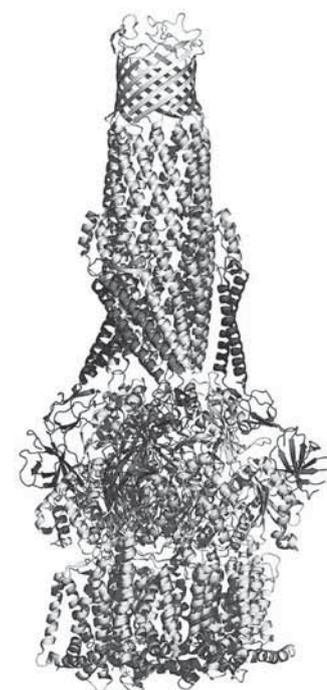
【阻害剤の結合部位】 多剤排出タンパクによる多剤耐性の克服には排出タンパク阻害剤が有効であると証明されています。ところが、現在までのところ臨床的に有効な阻害剤はまだ開発されていません。緑膿菌の MexB, MexY 双方を阻害でき、かつ膜障害作用のない阻害剤が得られていないためです。両方を阻害できるユニバーサル阻害剤分子設計に役立てるため、私どもは最近、阻害剤結合型構造を決定しました。それによると、薬物結合ポケットの中に、基質輸送経路から分岐した阻害剤結合ピットの存在が明らかになりました。これを元に現在ユニバーサル阻害剤の分子設計をしています。

【ファジー結合】 非常に幅広い基質認識が2つのポケットのマルチサイト結合だけで説明できるのかどうか。まだ結合構造が解かれている薬物が少ないので断定できません。その中で、面白い事実がわかってきました。まずは、一つの薬物が2つのポケットに渡って複数のサイトに同時に結合するという例があること。もう一つは、阻害剤結合ピットは疎水性トラップになっていて、この部位に変異が起こると、基質がトラップの中に引き込まれ、強く結合して輸送されなくなるということです。結晶構造解析による結合位置決定が大変に難しいという事実と合わせて、異物排出タンパクによる基質結合には「ファジー結合」の要素があるのではないかと考えられます。つまり、必ずしも特定の一カ所に結合するのではなく、様々な箇所へ緩く結合するという様式です。このことについてはまだ今後の解明が必要です。

【本来の生理的役割】 異物排出タンパクは薬物や毒物を排出するだけでなく、様々な生理的役割を担っていることもわかってきました。例えば、病原性の発現、宿主細胞への侵入、毒素の分泌、重金属イオンキレート体の分泌、老廃物の排泄などです。この文脈の中で HSL の分泌があるわけです。異物排出タンパク阻害剤は、例えばサルモネラ菌の宿主細胞侵入を阻害することにより、その病原性を無くすることができます。同様に、異物排出タンパク阻害剤にはバイオフィーム形成を阻害する効果も期待できるのではないかと考えています。

【参考文献】

- 1) Murakami, S. *et al. Nature* **419**, 587-593 (2002)
- 2) Murakami, S. *et al. Nature* **443**, 173-179 (2006)
- 3) Nakashima, R. *et al. Nature* **480**, 565-569 (2011)



大腸菌異物排出複合体
AcrAB-TolC 構造

バイオフィーム形成に関わる遺伝子群の転写制御

Regulation of the genes for biofilm formation in *Escherichia coli*

石浜 明 法政大学・生命科学部・マイクロナノテクノロジー研究センター

Akira Ishihama Hosei University, Department of Frontier Bioscience and Micro-Nano Technology
Research Center, Koganei, Tokyo, Japan

【目的】細菌の遺伝子発現制御の研究は、実験室培養の単細胞の遊泳状態の細胞を利用して解析されてきた。しかし、自然界の過酷な環境での細菌は、一般にバイオフィームとして生存している。バイオフィームは、様々の環境要因で誘導され、多段階多様な形成経路で形成され、その様態も多様である。従って、バイオフィーム形成には、多数遺伝子が関わっていることが予想されていたが、ゲノム全構造が決定されたことで、漸くその分子機構の解明が可能となって来た。個別遺伝子の機能と発現制御が、最も良く解析されているモデル生物・大腸菌を利用して、ゲノム全体が関わりと予想されたバイオフィーム形成機構の解明に新たな突破口を切り開くことを目指した。

【方法】大腸菌のゲノムの発現は、凡そ2,000分子のRNAポリメラーゼのゲノム4,500遺伝子への分配で制御される¹⁾。この制御には、7種類のシグマ因子と約300種類の転写因子との2段階の相互作用による、転写装置の遺伝子選択特性制御によっている²⁾。プロモーター認識を担当するシグマ因子については、支配下遺伝子群の概要が明らかにされている。本研究では、転写因子の制御標的遺伝子群の同定と、バイオフィーム形成に関わる遺伝子群プロモーターを制御する転写因子の同定を目指し、以下の方法を開発した。

- 1) Genomic SELEX 法：純化転写因子を大腸菌ゲノム DNA 断片と混合し、転写因子が認識し結合した DNA 断片を複合体として単離し、断片の塩基配列を、DNA tilling array を利用して決定した。転写因子結合部位から、制御標的遺伝子群を同定した。
- 2) NIP-chip 法：生菌内での、ゲノム上の転写因子結合部位同定のために、予めフォルムアルデヒド処理で、蛋白-DNA 共有結合させた後、転写因子結合ゲノム DNA 断片を、転写因子特異抗体で回収し、DNA tilling array で解析した。
- 3) PS (promoter-specific)-TF screening 法：特定プロモーターに結合する転写因子を探索する目的で、試験プロモーター断片混合物に、純化転写因子を添加し、mixed gel shift assay で、目的プロモーターに結合した転写因子を同定した。

【結果・考察】

- 1) 大腸菌転写因子約300種の全てを過剰発現精製した。純化転写因子を利用して Genomic SELEX 法で、Cra³⁾、CRP⁴⁾、Dan⁵⁾、LeuO⁶⁾ など、凡そ200種転写因子に関して、認識結合するゲノム上の DNA 配列を決定した。その結果から、制御支配下遺伝子を予測

-
- し、promoter assay 法および Northern blot 法によって、転写因子の制御を確認した。
- 2) バイオフィーム形成の master regulator CsgD 遺伝子のプロモーターに作用する10種以上の転写因子を同定した。また、CsgD 支配下遺伝子セットを同定し、従来知られていた curli 絨毛遺伝子以外にも多数の新規支配下遺伝子群を発見した。支配下遺伝子に、遊泳細菌のべん毛遺伝子群の master regulator である *flhDC* が含まれて、それらの転写を抑制していた⁸⁾。一方、FlhDC は、*csgD* プロモーターを抑制していたので、細菌のふたつの生存様式が master regulator が相互に抑制することで決定されることが判明した。
 - 3) *csgD* 遺伝子プロモーターに結合する転写因子を網羅する目的で、PS-TF screening 法を開発し、更に10数種の転写因子が関わることを予測した。併せて、20種以上の転写因子のそれぞれは、環境の異なる要因を感知し、バイオフィーム形成に影響していた。これらの転写因子は、*csgD* プロモーターの狭い領域に結合して制御に関わっていた。この結果、従来予想も出来なかった原核生物の新規の複雑な転写制御様式を発見した。
 - 4) 大腸菌転写因子の支配下遺伝子群には、多くの場合、別の転写因子が含まれていることから、転写因子の巨大な制御ネットワークが形成されていることが明らかとなり、ゲノムの転写制御の全体像が見えて来た。

【参考文献】

- 1) Ishihama, A.: Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Ann. Rev. Microbiol.* **54**, 499-518 (2000)
- 2) Ishihama, A.: Prokaryotic genome regulation: Multi-factor promoters, multi-target regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbial Reviews*, **34**, 628-645 (2010)
- 3) Shimada, T., Fujita, N., Maeda, M. and Ishihama, A.: Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX. *Genes Cells*, **10**(9), 907-918 (2005).
- 4) Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS ONE* **6**(6): e20081 (2011)
- 5) Teramoto, J., Yoshimura, S.H., Takeyasu, K. and Ishihama, A.: A novel nucleoid protein of *Escherichia coli* induced under anaerobic growth conditions. *Nucleic Acids Res.* **38**(11), 3605-3618 (2010)
- 6) Shimada, T., Bridier, A., Briandet, R. and Ishihama, A.: Novel roles of LeuO in transcription regulation in *E.coli*: Antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Mol. Microbiol.* **82**(2), 376-397 (2011)
- 7) Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: The *E. coli csgD* promoter: Interplay between eight transcription factors. *Microbiology* **156**(8), 2470-2483 (2010)
- 8) Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Cross-regulation between biofilm formation and flagella synthesis: Role of biofilm master regulator CsgD. *J. Bacteriol.* **193**(10), 2587-2597 (2011)

口腔細菌のトランスロケーションによる感染症と その予防 — 誤嚥性肺炎を中心に —

Infection of oral bacteria by bacterial translocation and its prevention. -Focusing on aspiration pneumonia-

三宅洋一郎 徳島大・院 HBS 研究部・口腔微生物

Yoichiro Miyake Department of Oral Microbiology, Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School

口腔内には700種を超える細菌が生息しており、その数はデンタルプラーク1gあたり 10^{10} 個以上、唾液1mlあたり 10^8 個以上にのぼる。それらの細菌は歯の表面や、歯と歯肉の間等でバイオフィルムを形成して生息している。歯の表面に形成されたバイオフィルムにより齲蝕が、歯と歯肉の間のバイオフィルムにより歯周病が発症することはよく知られている。しかし、口腔細菌はトランスロケートすることにより、口腔から離れた部位での感染症を引き起こすことがある。口腔細菌が口腔から咽頭を経て下気道へ達することで起こる誤嚥性肺炎、口腔細菌が歯肉より侵入し血行性に心臓に達することで起こる感染性心内膜炎などがよく知られているが、それ以外にも肝膿瘍、脳膿瘍、腎炎などが起こると言われている。

バイオフィルムを形成している細菌がトランスロケートするためには、バイオフィルムから離脱することが必要である。しかし、バイオフィルムの形成の機序についての研究は種々の菌種で精力的に進められてきたが、バイオフィルムからの菌の離脱の機序についてはまだ十分な知見は得られていない。菌のトランスロケーションによる感染症の予防のためには、今後はこの離脱の機序についての検討が必要となるであろう。

口腔細菌のトランスロケーションによる感染症の予防のためには「細菌のリザーバー」である口腔への対策を施し、口腔細菌のコントロールを行うことが必要である。それら感染症の中で最も多いのが誤嚥性肺炎であるが、誤嚥性肺炎の予防には口腔ケアが有効であることが示されている。そのメカニズムとしては、口腔ケアにより咽頭細菌数が減少し、下気道に達する細菌数が減少によることがわかっている。その他の感染症に関しても、口腔細菌のリザーバーである口腔のケア、およびそのトランスロケーション経路のコントロールが予防のためには必要であると考えられる。

我々はこれまで細菌付着の阻害によるバイオフィルム形成抑制の可能性を探ってきており、消毒薬などを用いずに口腔細菌の定着を抑制する試み、さらに細菌付着の極めて少ない高分子素材の開発の試みについても併せて報告する予定である。

【参考文献】

- 1) A. Ishikawa, T. Yoneyama, K. Hirota, Y. Miyake, K. Miyatake: Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria. *J. Dent. Res.* **87** (2008) 594-598.
- 2) K. Hirota, H. Yumoto, K. Miyamoto, N. Yamamoto, K. Murakami, Y. Hoshino, T. Matsuo, Y. Miyake: MPC-polymer reduces adherence and biofilm formation by oral bacteria. *J. Dent. Res.* **90** (2011) 900-905.
- 3) Katsuhiko Hirota, Keiji Murakami, Ken Nemoto, Yoichiro Miyake: Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **248** (2005) 37-45.

口腔バイオフィーム形成に關与するセンサー分子の役割

Roles of sensor molecules associated with oral biofilm formation

泉福 英信 国立感染症研究所細菌第一部

Hidenobu Senpuku National Institute of Infectious Diseases, Department of Bacteriology 1

【目的】口腔バイオフィームの病原性発現メカニズムは、近年新たな展開を見せている。従来は、スクロースを介して *Streptococcus mutans* が産生したグルコシルトランスフェラーゼによる非水溶性グルカンの合成が重要なメカニズムとして説明されていた。しかし、実際はスクロースを摂取しなくても口腔バイオフィームは形成される。口腔バイオフィームは、*S. mutans* のみならず他の *Streptococci*, *Actinomyces* や *Lactobacillus* などの複数の菌とともに形成される。よって本来のバイオフィーム形成メカニズムを明らかにしていくためには、スクロースに依存しない、複数の菌によるバイオフィーム形成メカニズムを研究する必要がある。近年、菌が歯表面で凝集、密集し、それを菌のセンサーが感知して様々な遺伝子や分子が動きだし病原性を発揮するクオラムセンシング (QS) システムが注目されるようになった。この QS システムを突破口にすれば、新たな口腔バイオフィーム形成メカニズムの解明が可能になってくると考える。そこで我々は、実験室株よりも厳しい環境で生き残る臨床分離株を利用して、バイオフィーム形成と QS システムに関わる遺伝子や分子を明らかにし、複合微生物による口腔バイオフィームの病原性発現メカニズムを明らかにすることを目的とし検討を行った。

【方法】3才児およびその母親から遺伝子タイプの異なる 17 種類の *S. mutans* 臨床分離株、実験室株 *S. mutans* UA159, GS5、様々な変異株：*S. mutans* UA159. *gtfB*, *gtfC*, *gtfBC*, *mbrC*, *mbrD*, *comC*, *comD*, *comE*, *comX*, *comR*, *sunL*, *Streptococcus salivarius* HT9R, JCM5707, ATCC 9759 などを用いた。バイオフィーム形成実験に、ヒト唾液をコートした 96 穴マイクロタイタープレートやフローセルシステムを用い、0.25% スクロースか 0.25% グルコースを含む TSB 培地で培養、PBS にて 2 回洗浄、サフラニン染色や LIVE/DEAD 染色を行った。96 穴プレート法のバイオフィームは DW 洗浄、乾燥後、70% アルコールにて溶解、492nm の吸収値にて評価を行った。フローセル法は、共焦点レーザー顕微鏡にて評価を行った。遺伝子発現の差の検討は、マイクロアレイ、リアルタイム PCR, RT-PCR により検討した。

【結果および考察】スクロースを含まない培地における臨床分離株のバイオフィーム形成能を調べると、バイオフィーム形成能の高い、中程度、低い株に分類することができた。高い株と低い株を利用して、バイオフィーム形成時遺伝子発現の違いをマイクロアレイにて解析

すると、高い株において発現量が4倍以上増加した遺伝子74個が明らかになった。それらの遺伝子を利用して、浮遊細胞とバイオフィーム細胞における遺伝子発現の差を検討すると、QSシステムに依存した遺伝子である *sunL* がバイオフィーム形成を制御する遺伝子であることが明らかとなった。また、*gtfB*, *gtfC*, *com* 遺伝子群および *sunL*, バシトラシン感受性の高まった *mbrC*, *mbrD* は、グルコース含有培地において、pH 低下や抗生物質存在下による死菌形成、菌体外 DNA の放出に深く関わり、それらがバイオフィーム形成に物理的に作用することが明らかとなった。それらの死菌形成、DNA の菌体外放出は、QSシステムによる耐酸性やバクテリオシン産生などに影響を受けていることが考えられた。

様々な複合菌を用いたバイオフィーム形成実験から、*S. salivarius* は *S. mutans* と共培養するとスクロース含有培地においてバイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった。*S. salivarius* ATCC 9759の培養上清を用いて、抑制物質を精製し、TOFF MAS解析にて物質の特定を行った。その結果 exo-beta-D-fructosidase (FruA) が、バイオフィーム形成を抑制する物質であることが明らかとなった。FruA は、*S. mutans* が産生する Glucosyl-transferase によるスクロースを基質としたグルカン合成が行われる前にスクロースを分解することでバイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった。この FruA は培地中のスクロースを感知してより分泌されることも明らかになった。真菌である *Aspergillus niger* の産生する市販の FruA (相同性31.6%、類似性59.6%) も *S. mutans* のバイオフィーム形成を抑制する。よって、多くの菌に広く保存された FruA は、口腔バイオフィーム形成阻害物質として大きな役割があることを示唆した。

黄色ブドウ球菌の新規グローバルレギュレーター SptA とバイオフィーム産生

A novel global regulator, SptA, of *Staphylococcus aureus* and its relevance to biofilm formation

加藤 文紀、菅井 基行 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 細菌学研究室

Fuminori Kato, and Motoyuki Sugai Laboratory of Bacteriology, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

私どもは伝染性膿痂疹を起こす黄色ブドウ球菌に注目し、膿痂疹の特徴である表皮水疱形成に関与する毒素、表皮剥脱毒素 Exfoliative Toxin : ETA および ETB の遺伝子発現調節について研究を行ってきた^{1, 2)}。さらに表皮剥脱毒素の新規発現調節因子を探索する過程で、遺伝子破壊株の解析から ETA の新たな発現抑制因子を見出し、SptA : Staphylococcal pathogenicity-related transcriptional regulator A と名付けた。SptA の遺伝子欠損株および遺伝子相補株の解析から、SptA が黄色ブドウ球菌の病原性因子発現調節の重要なグローバル制御機構である Agr システムに関係することが明らかになった。

Agr system は *agrB*, *D*, *C*, *A* からなり、AgrD が AgrB によりプロセッシングされ、クオラムセンシング物質である AIP が作られる。菌量が増加、AIP 量が増加し、ある一定量に達すると二成分制御系の AgrC が感知しリン酸化、つづいてレギュレーターである AgrA がリン酸化され、活性化し、*agr* 遺伝子および RNA III の転写が促進される。この RNA III が *agr* による病原性因子の産生制御、表層タンパク質の発現抑制および分泌タンパク質の発現促進に重要な key factor して機能している。

私どもは黄色ブドウ球菌において SptA が RNA III の発現を強力に制御していることを見出した。すなわち SptA は *agr* システムの更に上位で制御するグローバルレギュレーターと考えられる。

一方、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム産生は *agr* を含め様々な因子がその制御に関わっていることが報告されている。本研究会では SptA について紹介し、バイオフィーム産生に関わる SptA の役割について議論したい。

【参考文献】

- 1) 加藤文紀 菅井基行：特集・ブドウ球菌感染症の基礎と応用，黄色ブドウ球菌の病原性発現機構。化学療法の領域，Vol.25 No.8, 35-45, (2009)。
- 2) Kato, F. et al.: The regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun (2011) 79: 4 1660-1670.

結核菌の増殖、長期生存、および静止期以降の薬剤抵抗性獲得の分子メカニズム

Molecular mechanisms underlying growth coordination, longevity, and phenotypic tolerance to the anti-tuberculosis drug of *Mycobacterium tuberculosis*

松本 壮吉 大阪市大・院・医・細菌学分野

Sohkichi Matsumoto Dept. Bacteriol. Grad. Sch. Med., Osaka City Univ.

結核菌は、飛沫核感染によって、肺を侵入門戸としてヒトに感染する。感染者の約5%が速やかに結核を発症するが、多くの場合(感染者の約95%)、無症候感染が成立する。ヒト型結核菌は、ヒトに特化した寄生病原体であり、感染成立後、免疫系は菌を生体から駆逐することができない。現在、無症候感染者は人類の1/3にのぼると推定されている。結核菌をはじめ、ヒトに寄生する病原性抗酸菌は遅発育性である。さらに潜伏感染菌の多くは、増殖を停止しているが死滅しない静止期や休眠期に移行する。遅発育性や休眠現象は、疾患の慢性化や宿主-菌双方の長期生存につながる病原性抗酸菌に特徴的な形質である。一方、無症候結核菌感染者の5-10%で感染菌の再増殖、すなわち内因性再燃が生じる。成人肺結核の多くがこの機序で発症し、現在、年間約100万人以上の命が失われている。このように結核の無症候化と発症は、結核菌自身の増殖と密接にリンクする。

結核菌は液体培地表面で、コード状発育をすることが知られており、病原性との関連が1950年代から指摘されていた¹⁾。コードは目視することが可能で、気液界面にせり上がって増殖することから、バイオフィームの一形態ともいえる。結核菌の細胞壁には、長鎖脂肪酸であるミコール酸が含まれているが、ミコール酸を含んだ糖脂質がコード形成の1要因である。また、非病原性抗酸菌を利用した解析から、抗酸菌バイオフィーム形成に遊離ミコール酸が関わっていること²⁾、結核菌のバイオフィーム形成にポリケチド合成酵素が関わること³⁾も昨今、報告されている。

一方、結核菌が、生体内で増殖を停止した後に、菌自身が産生する糖や核酸でバイオフィームを形成するという証拠は明瞭でない。しかしながら結核の臨床において、増殖期の薬剤感受性菌とは異なった細菌集団が生体内で生じ、予防投薬や治療の短期化を阻んでいることは明らかだ。特に最主力薬剤であるイソニアジドに対しては、静止期や休眠期の菌が完全に抵抗性となる。理論的には、増殖菌のみが対象であればイソニアジドにより2週間で予防投薬や治療を完結できる。しかし現実には、無症候感染者や発症者に対して少なくとも6ヶ月間の投薬が必要である。

肉芽腫形成は、結核に特徴的な病変であり、それはヒトの寄生菌である結核菌の生活の場である。肉芽腫の形成により、低酸素環境が生じ結核菌の増殖は抑制される。一方、結核菌の生存や増殖をサポートする宿主分子も含まれており、結核菌は肉芽腫内で長きにわたって生存する。一般のバイオフィームと異なり結核肉芽腫は宿主由来成分によって構成されるが、

菌の生存や薬剤抵抗性を促す点で“バイオフィルム様”の機能構造体といえる。

このような長期の潜伏感染後の発病や肉芽腫形成など、結核に特徴的な病態進行を背景として、本会では、結核菌の増殖制御や薬剤抵抗性を含む長期生存のメカニズム⁴⁻⁶⁾についての我々の研究成果を紹介したい。

【参考文献】

- 1) Bloch, H. 1950. Studies on the virulence of tubercle bacilli: isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J Exp Med* 91: 197-218, pl.
- 2) Ojha, A., M. Anand, A. Bhatt, L. Kremer, W. R. Jacobs, Jr., and G. F. Hatfull. 2005. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 123:861-873.
- 3) Pang, J. M., E. Layre, L. Sweet, A. Sherrid, D. B. Moody, A. Ojha, and D. R. Sherman. 2012. The polyketide Pks1 contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 194:715-721.
- 4) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Mycobacteria Exploit Host Hyaluronan for Efficient Extracellular Replication. *PLoS Pathog* 5:e1000643.
- 5) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A Histone-Like Protein of Mycobacteria Possesses Ferritin Superfamily Protein-Like Activity and Protects against DNA Damage by Fenton Reaction. *PLoS One* 6:e20985.
- 6) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. L. Dahl, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J Biol Chem* In press.

協 賛 一 覧

第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会の開催に際しまして、下記の企業・団体の皆様より多大なご支援・ご協賛を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

会 長 天野 富美夫

(大阪薬科大学 生体防御学研究室 教授)

【共 催】

日本薬学会近畿支部

大阪薬科大学

【協 賛】(50音順)

アスピオファーマ株式会社

株式会社 大塚製薬工場

花王株式会社

カゴメ株式会社

クラシエホームプロダクツ株式会社

互応化学工業株式会社

サントリーウエルネス株式会社

塩野香料株式会社

第一三共株式会社

丸石製薬株式会社

Meiji Seika ファルマ株式会社

第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会

会 長：天野 富美夫(大阪薬科大学 生体防御学研究室)

第26回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会実行委員会：

大阪薬科大学生体防御学研究室

〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原4-20-1

TEL：072-690-1054 Fax：072-690-1054

E-mail：amano@gly.oups.ac.jp

出 版： (株)セカンド 学術集会専門出版社
株式会社セカンド

〒862-0950 熊本市中央区水前寺4-39-11 ヤマウチビル1F

TEL：096-382-7793 FAX：096-386-2025