



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	私の研究史
Author(s)	柴田, 健一郎
Citation	北海道歯学雑誌, 37(2), 107-115
Issue Date	2017-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65462
Type	journal article
File Information	37-02_01_shibata.pdf



特 集

私の研究史

My research career

柴田健一郎

はじめに

私は京都大学4回生の時に行った卒業論文で、研究の面白さ・楽しさを知りました。その後、京都大学大学院修士課程、民間企業の研究所、国立予防衛生研究所歯科衛生部、長崎大学歯学部、米国アルバートアインスタイン医科大学微生物学・免疫学教室そして北海道大学歯学部と渡り歩いて、いろいろな研究に携わってきました。特集の執筆を依頼された時に、「2017年3月に停年を迎えるので私の研究史を特集として書いていいでしょうか？」と編集委員長にお伺いしたところ、快諾していただきました。歯学分野の出身でない私がどのような経緯で歯学分野に携わるようになったのか、また、私がどのような研究を行ってきたのかについて、代表的な研究成果を基にまとめてみました。近年、歯学の分野において他分野出身の研究者が増加していることから、そのような人達にも何かの参考になるかも知れないという期待も込めて「私の研究史」というタイトルで特集を書いてみました。

1. 研究生生活の始まり（1975年10月～1978年3月）

私は、1975年10月の京都大学4回生の時に、半年間、酵素化学研究室（廣海啓太郎主任教授）で「 α -アミラーゼ活性の連続的活性測定法の開発」というテーマで卒業論文のための研究を行いました。グルコースが α 1-4結合で結合したアミロースは水溶液の状態では α -ヘリックス構造をとっている。そのアミロース水溶液に蛍光色素TNS（2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate）を加えると、TNSは α -ヘリックス構造に取り込まれ、蛍光を発する。そこに α -アミラーゼを加えると時間とともに蛍光の消光が起こる。その消光の時間変化を蛍光光度計でモニターして連続的に酵素活性を追跡できるという測定法を確立し、Wiley社のBiopolymers誌にセカンドオーサーとして発表しました¹⁾。特に、この研究で感動したのは、熱力学で勉強したアミロースとTNSとの相互作用の自由エネルギー、エントロピーやエンタルピー変化を実験的に決定したことであり、これらはアミロースとTNSの相互作用の解離定数の温度変化を調べることにより算出され、熱力学の講義では良く理解できなかったことが実際に実験を行うことで決定できるという驚きと喜びが、今考えてみると、私のリサーチマインドを覚醒させたような気がします。この研究は酵素化学教室の廣海啓太郎教授ならびに中谷博助手の指導によるものであり、この研究を契機に大学院でも酵素化学を専攻し、研究を継続しました。その当時、朝9時から夜中の1あるいは2時ぐらいまで実験したり、また、同じフロアにある他の研究室の友達とお酒を飲んだりしたこ

とが懐かしく思い出されます。大学院では動物あるいは昆虫由来の α -アミラーゼ活性を阻害するタンパク質をインゲン豆から精製し、その阻害機構について研究し、Thesisの形で修士論文を英語でまとめました²⁾。

京都大学では、その当時から博士号は取得したが、就職が見つからないというオーバードクターが大きな問題になっていたために博士課程に進学するのを諦め、修士課程修了後は就職することにしました。廣海啓太郎教授の紹介で、1978年4月に岡山の林原株式会社（現在は倒産し、他の会社に吸収されている）に入社し、技術部の所属になりました。

2. カップリングシュガーの抗う蝕性に関する研究
（1978年4月～1978年8月）

林原株式会社技術部では、1回の酵素反応でデンプンから純度90%以上のマルトース（2分子のグルコースが α 1-4結合した二糖類）を作る方法を確立するというのが最初の研究テーマでした。2ヶ月ほどで、ジャガイモ中に存在するいくつかの酵素を同時に作用させることにより、マルトースの純度が90%以上なることを発見し、特許を取得しました。その当時、林原株式会社はマルトースの製造で特許を取得しており、点滴用マルトースとして大塚製薬から販売し、大きな収益をあげていました。通常はグルコース（ブドウ糖）が点滴用に使用されますが、マルトースは代謝されるのに1段階の分解反応が必要なためにグルコースより点滴に適していると言われていました。

入社して4ヶ月後に国立予防衛生研究所（以後、予研）の歯科衛生部（当時の部長は荒谷真平先生）に出向を命ぜられました。その当時、歯科衛生部では、林原株式会社が大阪市立工業研究所の岡田茂孝先生のグループと共同開発したカップリングシュガー（図1）の抗う蝕性に関する研究を行っていました。

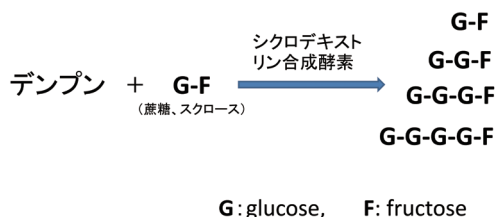


図1 カップリングシュガーの合成

3. 予研での研究（1978年8月～1981年3月）

荒谷真平部長が中心になって、広島大学、大阪大学、東北大学、日本大学、日本歯科大学の歯学部の方で構成されるカップリングシュガー研究会が設立され、年1回の研究報告会が開催されていました。私は予研の歯科衛生部の研究生として、主に西沢俊樹先生や今井奨先生からカップリングシュガーの抗う蝕性に関する研究指導を受けました。う蝕誘発の重要な因子である歯垢形成に係わる *Streptococcus mutans* の不溶性グルカンの合成をカップリングシュガーが阻害することなどがそれまでに明らかにされていました。私が実際に係わった研究は、牛の埋伏歯からエナメル切片を図2に示すような装置に固定し、カップリングシュガーを滴下した後に実際に人の口に入れてエナメル切片の脱灰の程度ならびに切片上の細菌叢を解析することでした。これらの研究内容は私が予研を去った数年後に二つの論文に発表されています^{3, 4)}。

荒谷真平部長が1980年に停年退職され、その年の秋に大阪大学歯学部の講師をされていた浜田茂幸先生が部長として赴任され、林原株式会社から出向してきている研究生は全員、会社に戻るになりました。そこで、私はそのまま基礎研究を続けたいということで、妻の両親の知り合いである長崎大学医学部第二内科の教授である原耕平先生に相談しました。その結果、長崎大学歯学部口腔細菌学教室に知り合いの先生が教授として赴任されるのでその先生に会ってみなさいということでした。そういう経緯で紹介されたのが、その当時鶴見大学歯学部口腔細菌学教室助教授の渡邊継男先生でした。渡邊先生は1981年4月から長崎大学歯学部口腔細菌学教室の教授として赴任されることになっており、私の研究業績を審査していただいた上で助手として採用してくださいました。このようにして、林原株式会社を円満退社して、1981年4月から長崎大学歯学部口腔細菌学教室の助手として教育・研究に従事することになりました。

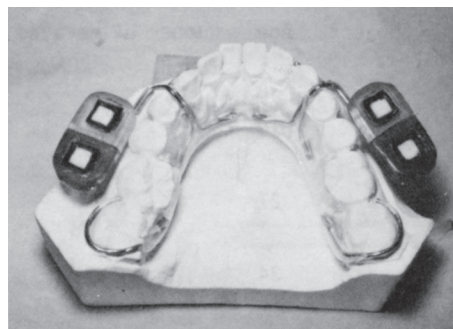


図2 牛エナメル切片を埋め込んだ装置

4. 長崎大学歯学部での研究（1981年4月～1989年5月）

1981年4月に長崎大学歯学部口腔細菌学教室の助手として、渡邊継男教授のもとでマイコプラズマの研究を開始し、特に *M. salivarium* のタンパク分解酵素に関する研究を行いました。 *M. salivarium* の細胞膜に存在する2種類のアルギニン特異的なプロテアーゼを精製し、性状を明らかにしました⁵⁻⁷⁾。 *M. salivarium* は非発酵性マイコプラズマで、arginine dihydrolase pathwayでATPを産生していることから、これらのプロテアーゼは環境に存在するタンパク質あるいはペプチドからエネルギー源としてのアルギニンを供給するために細胞膜に存在しているものと推測されました（図3）。これらの研究成果は世界的に評価され、1992年にAmerican Society for Microbiology (ASM) が出版したJ. Maniloff編の *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathology* の単行本 (p100-101) に紹介され、また、1995年にAcademic Press社から出版された *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (Razin S & Tully JG編) のproteolytic activities (p315-323) の章の執筆を依頼され、渡邊継男教授と共に分担執筆しております。

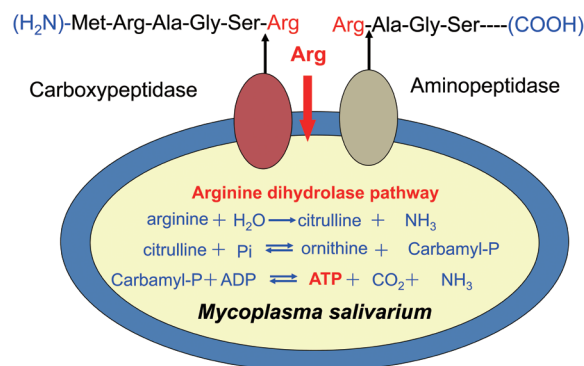


図3 細胞膜結合性アルギニン特異的なプロテアーゼの存在意義

5. 米国留学時の研究（1989年6月～1991年7月）

1988年に渡邊継男教授が北海道大学歯学部教授として転出されました。そこで、以前から免疫学に興味を持っていた私は米国留学を決意し、予研時代の恩師である西沢俊樹

先生から米国ニューヨーク市のアルバートアインスタイン医科大学微生物学・免疫学教室のStanley G. Nathenson教授を紹介していただきました。そして、渡邊継男先生の後任として、1989年4月に長崎大学歯学部教授として大阪大学微生物研究所から赴任された山田毅先生から米国留学の許可をいただき、同年6月に米国に渡り、Stanley G. Nathenson教授のもとで免疫学の研究に従事しました。その当時、抗原提示細胞のMHC（主要組織適合遺伝子複合体）分子がどのようなメカニズムで微生物抗原をT細胞に抗原提示をするのかについて多くの研究がなされていましたが、不明な点が多く残されていました。MHC分子にはクラスIとクラスII分子があり、1986年にハーバード大のグループによりMHCクラスI分子のX線結晶解析が行われ、その立体構造が明らかにされました。MHCクラスI分子は二つの α -ヘリックス構造と β -シート構造で囲まれた溝があり、そこに微生物由来抗原が結合していると考えられていましたが、その抗原がどのような物質であるかについては不明のままでした。同じ研究室のオランダからの留学生であるGrada M. Van BleekがマウスのMHCクラスI分子であるH-2K^b分子の溝に結合しているvesicular stomatitis virus (VSV) 由来のペプチドがRGYVYQGL (VSV8) であることを世界で初めて同定し、1990年にNature (vol. 348: 213-215) に発表しました。そこで、私はVSV8のどのアミノ酸残基がMHC分子あるいはT細胞受容体 (TCR) と相互作用するのかを明らかにしようと考えました。VSV8のアミノ酸残基を1個ずつアラニン (A) に変換したペプチドを合成してCytolytic T lymphocyte (CTL) のキラー活性を測定し、図4に示すようにN末端から3, 5番目のチロシン (Y) とC末端のロイシン (L) がMHC分子と相互作用し、それ以外のアミノ酸残基はTCRと相互作用することを明らかにしました⁸⁾。この研究成果は、現在でも免疫学の教科書として汎用されているJaneway's Immunobiology (Garland Science出版) の一つの図に掲載されています。

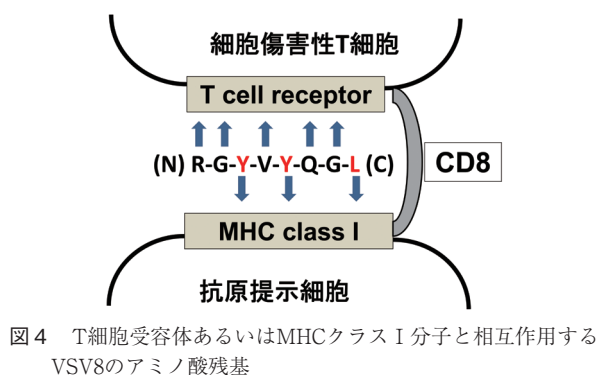


図4 T細胞受容体あるいはMHCクラスI分子と相互作用するVSV8のアミノ酸残基

6. 北海道大学歯学部助手・助教授時代の研究（1991年9月～2001年7月）

7月米国から帰国し、長崎大学歯学部口腔細菌学教室で2ヶ月間働いた後、9月に北海道大学歯学部助手として転任し、再び渡邊継男のもとで研究することになりました。その理由としては、私が米国で研究をしている時に北大に移られた渡邊教授から「米国から帰国したら北大に来なさい。君が好きな研究をしていいから」というラブコールが何度かあり、また、私が帰国した際には、渡邊先生と山田先生との間で既に北大転任が決定していたからであります。

北大に転任した直後は、米国での研究が評価され、日本免疫学会のワークショップで講演を依頼されたり、また、北大内で開催された第3回分子生物学交流会（ウイルス研究の現在）で「ウイルス抗原ペプチド、MHCクラスI分子ならびにT細胞レセプターの三分子間相互作用について」という演題で講演を依頼されたりしました。そこで、赴任した当時は米国での研究を続けるつもりでしたが、設備等の関係で直ぐには開始できませんでした。渡邊教授から「まずは以前やり残したマイコプラズマの研究をやってください」と言われ、再度マイコプラズマの研究を開始することになりました。まず、以前*M. salivarium*から精製したプロテアーゼの遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにしました⁹⁾。また、その当時注目を浴びていたエイズ関連マイコプラズマのホスホリパーゼに関する研究なども行いました¹⁰⁾。1996年4月に、1981年から15年間続けてきた助手という身分とは別れをつけ、やっと助教授に昇進させていただきました。さらに、この時期に現在の研究につながる*M. salivarium*のリポタンパク質 (LP) がリンパ球、マクロファージ、歯肉線維芽細胞等を活性化することを明らかにしました^{11, 12)}。さらに、分子量44kDaのLP (LP44) を精製し、その構造ならびに活性部位がN末端のリポペプチド領域であることを明らかにし、そのN末端のリポペプチド領域の構造を基にリポペプチドを化学合成し、fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1) (図5) と名付けました¹³⁾。翌年の2001年3月に渡邊教授が停年退職され、4月からはすべての講義と実習をやることになり、講義の準備と研究とで目がくらむような忙しさでした。細菌学実習の関係で、1学期を二つにわ

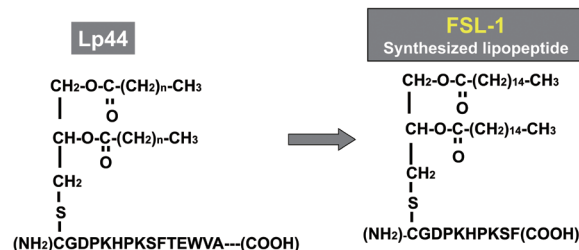


図5 Lp44のN末端構造とリポペプチドFSL-1の合成

け、前半を生理学教室が、後半を細菌学教室が講義と実習を担当することになっていたために、1週間に7コマの講義をしたこともあり、8月には渡邊先生の後任教授に昇進させていただき、やっと自分のやりたい研究ができるような立場になりました。

7. 北海道大学歯学部教授時代の研究 (2001年8月～現在)

教授昇進後は、2000年に発表したマイコプラズマ由来のLPの生物活性とToll-like receptor (TLR) による認識機構について研究しようと考えました。微生物由来LPの発見、生合成経路ならびに生物活性については日本細菌学会から依頼され、総説を書いています¹⁴⁾。また、驚いたことに、この総説は2016年11月の時点で、HUSCUPで3200回以上ダウンロードされています。TLRは1997年に発見され、2011年にはノーベル医学・生理学賞を受賞した免疫学分野での大発見でした。私がリポペプチドFSL-1を発見した1年前にLPのレセプターはTLR2であることが既に報告されていました(図6)。そこで、私はLPならびにリポペプチドを用いて以下の研究を行いました。

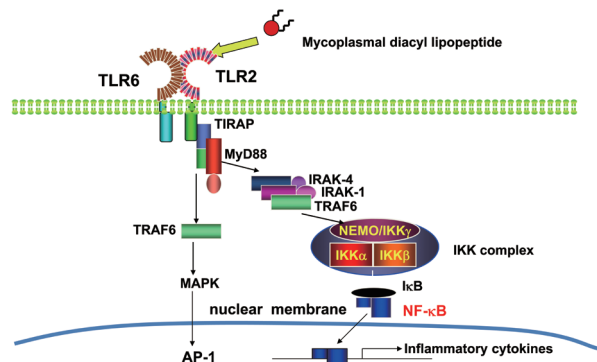


図6 TLR2によるジアシルリポペプチドの認識

A. TLR2によるLPの認識機構の解明

まず、TLR2によるLPの認識機構を分子レベルで明らかにしようと考えました。先ず、LPの認識に係わるTLR1、TLR2、TLR6ならびにCD14の遺伝子をヒト由来単球系細胞であるTHP-1細胞からクローニングし、これらの遺伝子とNF-κBリポペプチドレポーター遺伝子をHEK293細胞に導入し、NF-κBレポーター測定系を確立しました(図7)。FSL-1の脂肪酸であるパルミチン酸をステアリン酸に変換したり、また、ペプチドのC末端のFをRに変換したりリポペプチドを合成しました(図8)。さらに、TLR2に種々の点変異あるいは欠失変異を導入し、NF-κBリポペプチドレポーター法により認識機構を調べて、以下の分子メカニズムを明らかにしました。1) TLR2のロイシンリッチリピートのLeu107、Leu112ならびにLeu115が認識に必要な(図9)¹⁵⁾。2) TLR2はリポペプチドのペプチド部分と脂肪酸部分

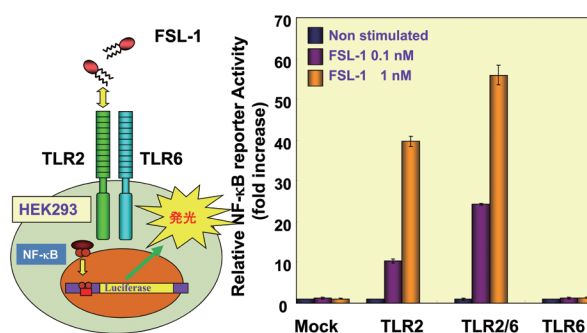


図7 NF-κBレポーター法によるLPのTLRによる認識

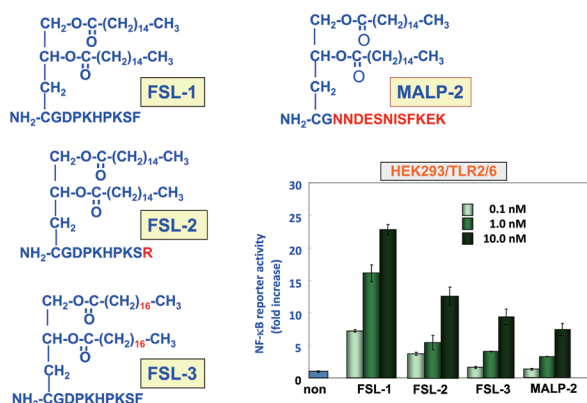


図8 FSL-1とその変異体のTLR2/6による認識

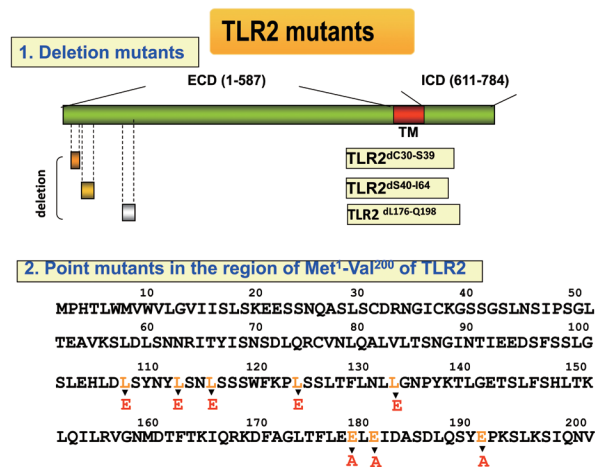


図9 ヒトTLR2の変異体

の両方を認識し、その認識は疎水的である¹⁶⁾。3) CD14はトリアシルリポペプチドと結合し、TLR1とTLR2の2分子複合体のトリアシルリポペプチドを受け渡すだけで、CD14、トリアシルリポペプチド、TLR1ならびにTLR2からなる4分子複合体は形成しない(図10)¹⁷⁾。4) TLR2のアスパラギン結合糖鎖がリポペプチドの認識には必要である¹⁸⁾。5) FSL-1はTLR2で認識された後、CD14やCD36を介してクラスリン依存性の経路で細胞内に取り込まれる(図11)¹⁹⁾。

私達が開発したFSL-1は現在、欧米の試薬メーカーからTLR2のリガンドとして市販されており、平成28年10月現在で、PubMedで検索すると111報の論文で使用されています（図12）。

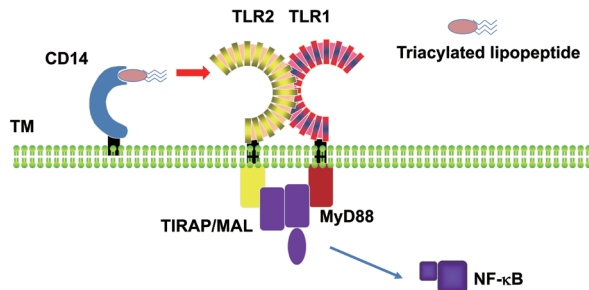


図10 CD14はトリアシルリポペプチドをTLR2/1複合体に渡す

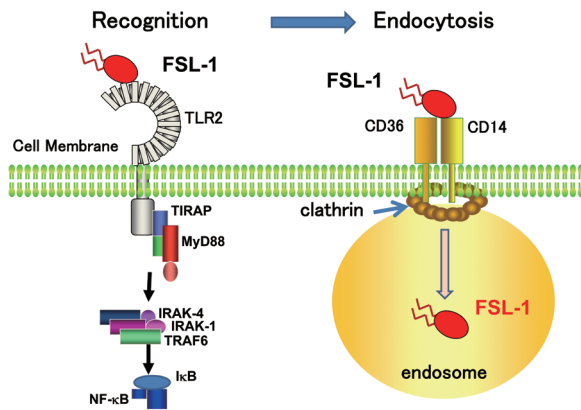


図11 FSL-1のクラスリン依存的な細胞内へ取り込み

B. LPならびにリポペプチドのTLR2を介したアポトーシス

私達は、マイコプラズマ由来LP (MLP) がリンパ球や単球に対して、TLR2依存的にcaspase-3の活性化を伴うアポトーシスを誘導することを明らかにしました²⁰⁾。LPのアポトーシス誘導活性はTLR2を介して誘導され、補助レセプターであるTLR6を共導入することにより増強された。さらに、TLR2とTLR6を介するMLPのアポトーシス誘導活性は、ドミナントネガティブ型myeloid differentiation factor-88 (MyD88) ならびにFas-associated death domain protein (FADD) によって抑制され、さらに、MAP キナーゼ JNKならびにp38の選択的阻害剤SB203580によって著明に抑制された（図13）²¹⁾。以上の結果は、MLPはTLR2ならびにTLR1あるいはTLR6により認識され、そのシグナルはMyD88ならびにFADDを介してアポトーシスを誘導する活性を有していることを示唆している。

このように、微生物由来LPが、重要な免疫担当細胞であるリンパ球や単球を活性化するだけでなく、アポトーシスを誘導することは感染防御免疫機構を考える上で非常に興味深いものと推測しています。

C. TLR2とC型レクチン

自然免疫系では、マクロファージ、好中球そして樹状細胞（DC）が微生物の侵入を感知した後、貪食によって排除している。これらの貪食細胞はTLRのようなパターン認識レセプターで微生物を認識した後、微生物を

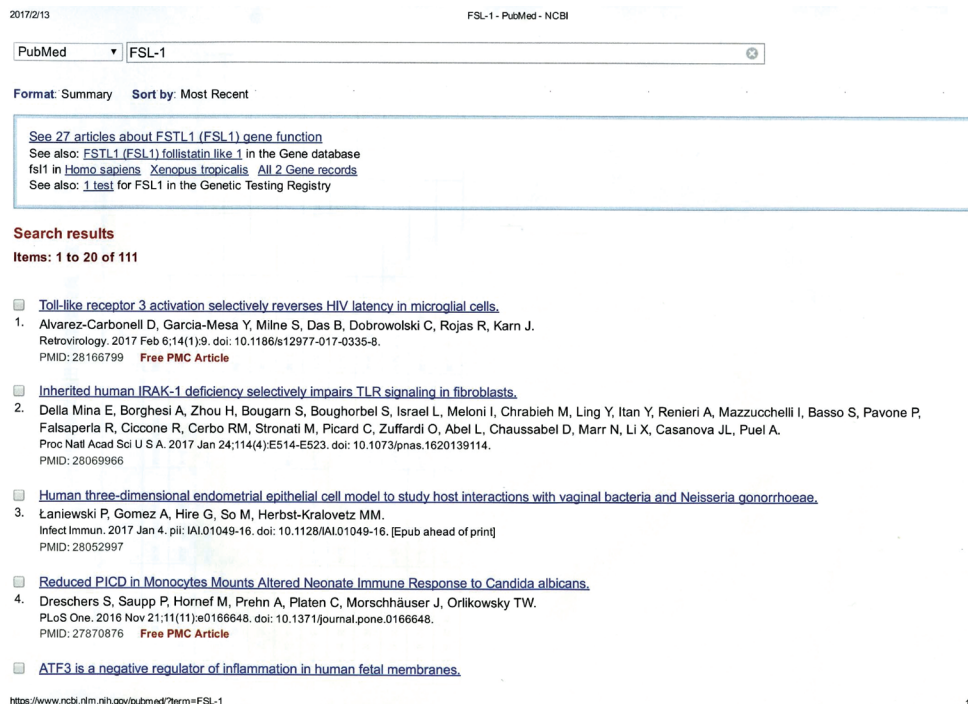


図12 FSL-1使用論文数（2/13/2017時点でのPubMed検索）

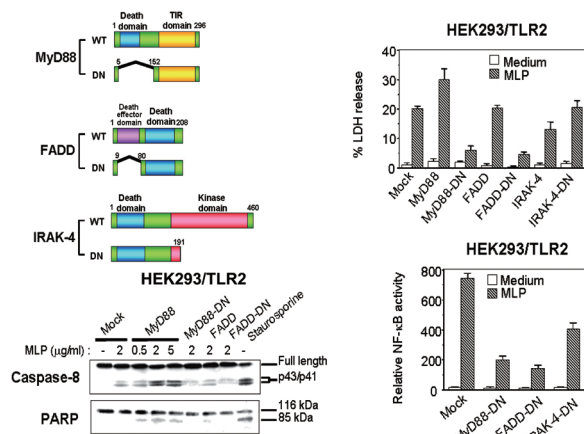


図13 マイコプラズマ由来LP (MLP) によるアポトーシス

貪食し、分解している。我々は、TLR2それ自身は貪食受容体として働かないが、TLR2リガンドであるFSL-1刺激によるTLR2シグナルがスカベンジャー受容体であるMSR1 (macrophage scavenger receptor) やCD36、さらにはDC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin) やdectin-1といったC型レクチンの発現を増強することにより貪食能を活性化することを明らかにしました^{22, 23}。機能的なTLR2ならびにSIGNR1 (DC-SIGNのマウスホモログ) を発現していたマウス樹状細胞を用いて、TLR2のリガンドであるFSL-1で刺激したところ、TNF- α 、IL-6、IFN- γ ならびにIL-10は濃度依存的に増加したが、SIGNR1のリガンドであるリポアラビノマンナンとの共刺激ではFSL-1によるTNF- α 、IL-6ならびにIFN- γ 誘導活性は有意に抑制され、その抑制にはsuppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) によるアダプター分子Mal (MyD88-adaptor-like protein) のユビキチン化が関与していることを明らかにしました (図14)²⁴。さらに、DC-SIGNはリガンドを認識する際にオリゴマーを形成しTLR2と会合していることも明らかにしました。

このように、私達は微生物を認識するレセプターからのシグナルは貪食が始まると抑制されるという認識と貪食の相互作用に関する一つの興味深い現象を見いだしました。

D. リポペプチドFSL-1の抗腫瘍活性

腫瘍細胞は自己リンパ球によって認識される腫瘍抗原を有していることから、生体は微生物などと同様に腫瘍細胞に対しても免疫応答を示します。この抗腫瘍免疫応答においては、Th1応答が優位に誘導されると強い細胞傷害活性をもつT細胞 (CTL) が誘導され、腫瘍細胞を傷害して排除するが、Th2応答が優位な場合には、腫瘍抗原特異的な抗体産生は誘導されるものの、CTLが誘導されないために腫瘍細胞が排除されに

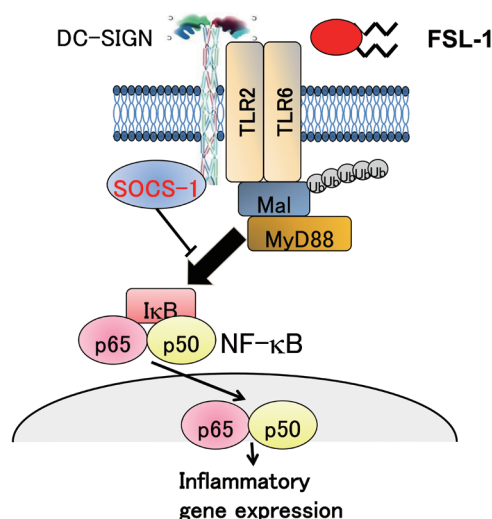


図14 認識レセプターと貪食レセプター相互作用

くことが明らかにされています。私達は、マイコプラズマ由来リポペプチドFSL-1はTLR2を介してTh2応答優位のアジュバント活性を有することを報告しました²⁵。さらに、腫瘍の増殖に及ぼすFSL-1の影響を調べ、以下のような興味深い結果を得ています。FSL-1を単独、あるいはFSL-1とUV照射したC57BL/6由来線維肉腫 (QRsP) の混合物をマウスの皮下に1週おきに4回免疫した後、QRsPを接種し、生存率ならびに腫瘍体積を経日的に測定しました。その結果、FSL-1+QRsP (UV) を免疫したマウスでは腫瘍の増殖が著しく抑制され、生存率も著しく伸びました (図15)。また、弱いながらも腫瘍抗原特異的なCTLが誘導されていたが、NK活性の増強はみられませんでした。しかしながら、FSL-1を単独で免疫した場合は、腫瘍の増殖が著しく増強され、生存率も著しく低下しました。そこで、FSL-1単独免疫により制御性T細胞 (Treg) が活性化され、免疫応答を抑制したために腫瘍の増殖が促進されたのではないかと推測しました。実際、FSL-1を単独で免疫した後、腫瘍を接種し7日後に所属リンパ節に、CD4⁺Foxp3⁺のTreg細胞の割合が有意に高いことがわかりました²⁶。

このように、FSL-1は腫瘍抗原と一緒に免疫すると抗腫瘍作用を有するが、単独免疫では腫瘍促進作用を示すという興味深い結果を報告しています²⁶。これまで述べてきたように、FSL-1はTLR2を介して炎症性サイトカインを誘導する強い活性を有しています。このようなFSL-1が単独免疫で腫瘍促進作用を示すという現象は、持続的に炎症を誘導する物質ががんの発症に導かれるという一つのメカニズムを示しているのではないかと考えています。

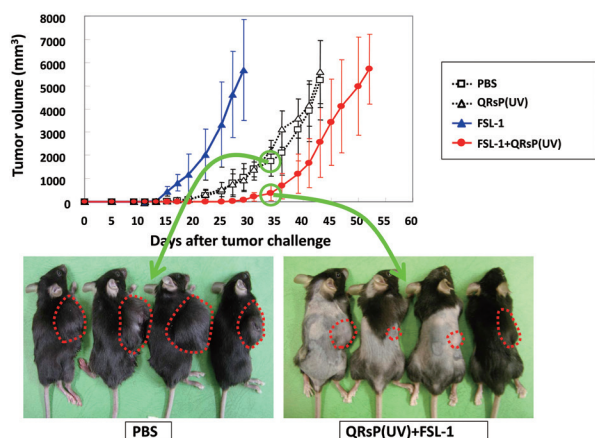


図15 FSL-1免疫の腫瘍への影響

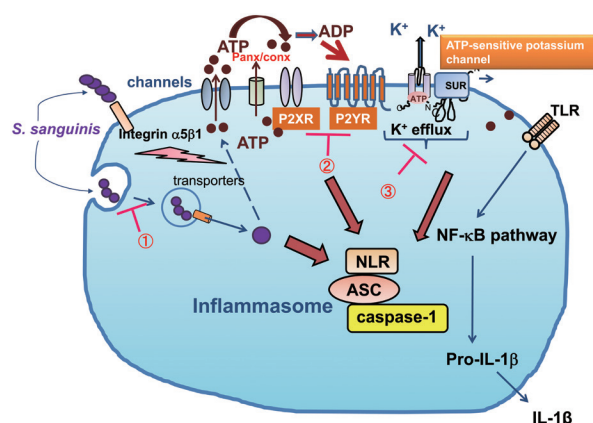
E. 口腔レンサ細菌による樹状細胞やマクロファージの細胞内センサーであるインフラマソームの活性化

口腔レンサ球菌である *Streptococcus sanguinis* は感染性心内膜炎の代表的起因菌として注目され、多くの研究がなされています。近年、炎症性サイトカインの一つであるIL-1がその病態の形成に関与しているという報告がなされています。これまで、*S. sanguinis* がIL-1を誘導し、感染性心内膜炎の発症・増悪において重要な役割を果たしていることは明らかにされていますが、*S. sanguinis* がどのようなメカニズムでIL-1の産生を誘導するのかについては不明のままでありました。IL-1はIL-1 α とIL-1 β からなり、IL-1 β はインフラマゾームの活性化で誘導されることが明らかにされています。インフラマゾームとは細胞内センサーでNOD-like receptor (NLR)、アダプター分子apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain (ASC)そしてprocaspase-1からなる3分子複合体で、細菌毒素、ATP、尿酸結晶などで活性化され、IL-1 β の産生に導かれることが明らかにされています。NLRはいくつか報告されており、最もよく研究されているのが、nucleotide-binding domain-like receptor containing protein 3 (NLRP3)であります。そこで、先ず、私達は *S. sanguinis* がNLRP3インフラマゾームを活性化してIL-1 β を誘導するかどうかを検証しました。標的細胞としてはA/Jマウス由来樹状細胞(XS-106細胞)、さらに、C57BL/6 (B6) マウスあるいはcaspase-1, NLRP3ならびにASCノックアウトマウス(caspase-1KO, NLRP3KO, ASCKO)から調製した骨髓細胞を、L929細胞培養上清存在下で分化誘導したマクロファージ(BMM)を用いました。NLRP3特異的なsiRNAを安定発現するXS-106細胞を樹立し、*S. sanguinis*で刺激したところ、IL-1 β 産生量は野生型のXS-106細胞に比べて有意に低下しました。さらに、*S. sanguinis*はB6由来のBMMに対して強いIL-1 β 産生誘導活性を示しましたが、

caspase-1KO, NLRP3KOならびにASCKO由来のBMMに対しては殆ど活性を示しませんでした。さらに、これらの細胞はネクロシス様の細胞死を起こしていました。現在、IL-1 β 産生を伴うネクロシス様の細胞死はピロプトシスと呼ばれ、新たな細胞死の形態として注目されています。

これらの結果から、*S. sanguinis*はマウス樹状細胞ならびにマウスマクロファージにおいてNLRP3インフラマゾームを活性化して、IL-1 β の産生を誘導することが示唆されました。さらに、そのメカニズムについて検証したところ、食事に伴って細胞外への放出されたATPとそのレセプターであるP2X7のシグナルが重要な役割を果たしていることが判明しました(図16)²⁷⁾。

このように、本研究は口腔レンサ球菌の一つである *S. sanguinis* の感染性心内膜炎の発症・増悪機構の一つを解明したということで本論文²⁷⁾は高く評価されています。

図16 *S. sanguinis*によるインフラマソームの活性化

終わりに

以上が卒業論文から現在までの約40年間で発表した代表的な論文を基にまとめた私の研究史の概略であります。なお、本稿で引用した論文以外にも数十報の論文を国際誌に発表しておりますが、あまり長くなると「読みでみよう」という意欲を削いでしまうのではないかと考え、それらの研究内容は本稿では割愛しております。昨年(2015年)12月に調べた現時点で、私がこれまで国際誌に発表した79報の論文(共同研究も含めて)の全インパクトファクター(IF)は約250で、全引用回数(CI)は約2300でした。歯学部出身ではない私がこのような研究業績を残せたのは、私を歯学分野に導き、指導してくださった恩師の先生方である廣海啓太郎先生(故)、中谷博先生、西沢俊樹先生(故)、荒谷真平先生(故)、原耕平先生(故)、渡邊継男先生、山田毅先生ならびにStanley G Nathenson先生(故)と、私と一緒に研究に携わってくれた素晴らしい弟子達の御陰であると心から感謝しております。

参 考 文 献

- 1) Nakatani H, Shibata K, Kondo H, Hiromi K : Interaction of amylose and other α -glucans with hydrophobic fluorescent probe (2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate) Biopolymers. 6 : 2363-2370, 1977.
- 2) Shibata K. Purification, chemical properties and inhibition mechanism of α -amylase inhibitor from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). Kyoto : Kyoto University ; p1-61, 1978.
- 3) Nishizawa T, Imai S, Furuta T, Shibata K, Takeuchi K, Yoshida S, Ishii T, Araya S, Hinoide M : Intraoral cariogenicity of isomaltose, maltosylfructoside, and Coupling sugar. 歯科基礎医学雑誌. 28 : 109-119, 1986.
- 4) Imai S, Takeuchi K, Shibata K, Yoshikawa S, Kitahata S, Okada S, Araya S, Nisizawa T : Screening of sugars inhibitory against sucrose-dependent synthesis and adherence of insoluble glucan and acid production by *Streptococcus mutans*. J Dent Res. 63 : 1293-1297, 1984.
- 5) Shibata K, Watanabe T : Carboxypeptidase activity in human mycoplasmas. J Bacteriol. 168 : 1045-1047, 1986.
- 6) Shibata K, Watanabe T : Purification and characterization of an aminopeptidase from *Mycoplasma salivarium*. J Bacteriol. 169 : 3409-3413, 1987.
- 7) Shibata K, Watanabe T : Purification and characterization of an arginine-specific carboxypeptidase from *Mycoplasma salivarium*. J Bacteriol. 170 : 1795-1799, 1988.
- 8) Shibata K, Imarai M, van Bleek GM, Joyce S, Nathenson SG : Vesicular stomatitis virus antigenic octapeptide N52-59 is anchored into the groove of the H-2K^b molecule by the side chains of three amino acids and the main-chain atoms of the amino terminus. Proc Natl Acad Sci USA. 89 : 3135-3139, 1992.
- 9) Shibata K, Tsuchida N, Watanabe T : Cloning and sequence analysis of the aminopeptidase My gene from *Mycoplasma salivarium*. FEMS Microbiol Lett. 130 : 19-24, 1995.
- 10) Shibata K, Sasaki T, Watanabe T : AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. Infect Immun. 63 : 4174-4177, 1995.
- 11) Shibata K, Hasebe A, Sasaki T, Watanabe T : *Mycoplasma salivarium* induces interleukin-6 and interleukin-8 in human gingival fibroblasts. FEMS Immunol Med Microbiol. 19 : 275-283, 1997.
- 12) Dong L, Shibata K, Sawa Y, Hasebe A, Yamaoka Y, Yoshida S, Watanabe T : Transcriptional activation of mRNA of intercellular adhesion molecule 1 and induction of its cell surface expression in normal human gingival fibroblasts by *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans*. Infect Immun. 67 : 3061-3065, 1999.
- 13) Shibata K, Hasebe A, Into T, Yamada M, Watanabe T : The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. J Immunol. 165 : 6538-6544, 2000.
- 14) 柴田健一郎 : 微生物由来リポタンパク質・リポペプチドのメンエキ生物活性と自然免疫系による認識. 日本細菌学雑誌. 62 : 363-374, 2007.
- 15) Fujita M, Into T, Yasuda M, Okusawa T, Hamahira S, Kuroki Y, Eto A, Nisizawa T, Morita M, Shibata K : Involvement of leucine residues at positions 107, 112, and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and *Staphylococcus aureus* peptidoglycans. J Immunol. 171 : 3675-3683, 2003.
- 16) Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K : Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. Infect Immun. 72 : 1657-1665, 2004.
- 17) Nakata T, Yasuda M, Fujita M, Kataoka H, Kiura K, Sano H, Shibata K : CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. Cell Microbiol. 8 : 1899-1909, 2006.
- 18) Kataoka H, Yasuda M, Iyori M, Kiura K, Narita M, Nakata T, Shibata K : Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2. Cell Microbiol. 8 : 1199-1209, 2006.
- 19) Shamsul HM, Hasebe A, Iyori M, Ohtani M, Kiura K, Zhang D, Totsuka Y, Shibata K : The Toll-like receptor 2 (TLR2) ligand FSL-1 is internalized via the clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2. Immunology. 130 : 262-272, 2010.
- 20) Into T, Nodasaka Y, Hasebe A, Okuzawa T,

- Nakamura J, Ohata N, Shibata K : Mycoplasmal lipoproteins induce toll-like receptor 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes. *Microbiol Immunol.* 46 : 265-276, 2002.
- 21) Into T, Kiura K, Yasuda M, Kataoka H, Inoue N, Hasebe A, Takeda K, Akira S, Shibata K : Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation. *Cell Microbiol.* 6: 187-199, 2004.
- 22) Mae M, Iyori M, Yasuda M, Shamsul HM, Kataoka H, Kiura K, Hasebe A, Totsuka Y, Shibata K : The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis of bacteria by macrophages through a Toll-like receptor 2-mediated signalling pathway. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49 : 398-409, 2007.
- 23) Iyori M, Ohtani M, Hasebe A, Totsuka Y, Shibata K : A role of the Ca²⁺ binding site of DC-SIGN in the phagocytosis of *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 377 : 367-372, 2008.
- 24) Ohtani M, Iyori M, Saeki A, Tanizume N, Into T, Hasebe A, Totsuka Y, Shibata K : Involvement of suppressor of cytokine signalling-1-mediated degradation of MyD88-adaptor-like protein in the suppression of Toll-like receptor 2-mediated signalling by the murine C-type lectin SIGNR1-mediated signalling. *Cell Microbiol.* 14 : 40-57, 2012.
- 25) Kiura K, Kataoka H, Yasuda M, Inoue N, Shibata K : The diacylated lipopeptide FSL-1 induces TLR2-mediated Th2 responses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48 : 44-55, 2006.
- 26) Kiura K, Hasebe A, Saeki A, Segawa T, Okada F, Shamsul HM, Ohtani M, Into T, Inoue N, Wakita M, Shibata K : In vivo anti- and pro-tumour activities of the TLR2 ligand FSL-1. *Immunobiology.* 216 : 891-900, 2011.
- 27) Saeki A, Suzuki T, Hasebe A, Kamezaki R, Fujita M, Nakazawa F, Shibata KI : Activation of nucleotide-binding domain-like receptor containing protein 3 inflammasome in dendritic cells and macrophages by *Streptococcus sanguinis*. *Cell Microbiol.* 2016. Sep 7. doi : 10.1111/cmi.12663. [Epub ahead of print] PMID : 27601185