

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02350

研究課題名(和文)新規網羅的病原遺伝子同定法を用いたピブリオ・バルニフィカス好中球逃避機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of evasion mechanisms of neutrophil killing by *V. vulnificus*.

研究代表者

柏本 孝茂 (Kashimoto, Takashige)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50327459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、新規網羅的病原遺伝子同定法を開発し、*V. vulnificus*の好中球逃避機構に關与する40の遺伝子を同定した。中でも0055と0056は、菌体外膜へのタンパク質輸送に共同して關与すると推察された。0055は菌体内でアシルACPを合成するエノイルアシルキャリアプロテインレダクターゼ2と結合していた。この合成経路上には、0055と0056の周辺に位置する0058から0061の4タンパク質も存在していた。すなわち、これら0055から0061までの一連のタンパク質の作用によりアシル化修飾を受ける何らかの物質が、*V. vulnificus*の好中球からの逃避能を担っている本体と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*V. vulnificus*は、感染者を短時間内に死に至らしめるため、人食いバクテリアと呼ばれ恐れられている。しかし、どのような機構で短時間内における感染者体内での増殖を可能にしているかは明らかでない。本研究結果により、*V. vulnificus*が生体内で好中球から逃避し、増殖できる能力を証明できたと共に、それには菌体外膜に局在するタンパク質のアシル化が重要である可能性を示すことができた。本研究結果を発展させ、好中球逃避機構を担うアシル化修飾タンパク質を同定し、その働きを明らかにすることにより、人食いバクテリアの抗生物質に頼らない、新たな治療法が開発可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：We have developed the novel method named ISLAP that comprehensively identifies the *V. vulnificus* genes required to evade neutrophils. Among 40 identified genes, VV1_0055 and VV1_0056 were involved in a protein transport system from inner membrane to outer membrane in periplasm. 0055 binds Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 2, which is the enzyme for Acyl ACP synthesis. Interestingly, 0058, 0059, 0060 and 0061 were found on the same pathway for Acyl ACP. Thus, the acylated proteins modified by 0055 and 0056 are involved in ability of evading neutrophils.

研究分野：病原細菌学

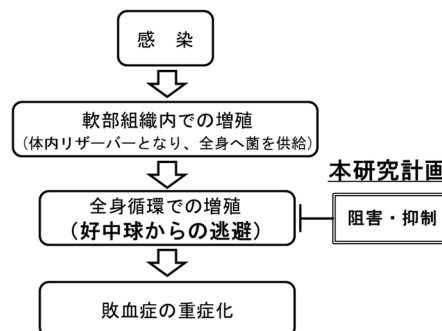
キーワード：ピブリオ バルニフィカス 敗血症 好中球 新規治療法

1. 研究開始当初の背景

Vibrio vulnificus は、ヒトに経口あるいは創傷感染し、組織の壊死や敗血症などの重篤な症状を引き起こす。*V. vulnificus* の経口感染は、肝硬変、糖尿病、免疫不全症など免疫機能の低下に付随して発生し、感染者の 95% が何らかの基礎疾患を持った患者である。一方で最近、創傷感染は感染者の 80% 以上が健康な人（基礎疾患の見当たらない人）であることが報告された。これらの事実は、*V. vulnificus* が健康な人の免疫システムにより容易に排除され、全身循環中では増殖できない日和見感染症起因菌であるが、創傷感染においては健康な人であっても感染局所で増殖し、極短時間内に水腫や壊死性筋膜炎などを引き起こし得ることを示している。

最大の問題は、本菌が感染者体内で極めて短時間内に増殖することである。本感染症の治療においては、早期の抗生物質投与が生存率を向上させるが、平均潜伏期間は 16 時間と短く、感染者が体調に異変を感じた時点で既に体内菌数は増加しており、*V. vulnificus* が抗生物質による治療効果を上回って増殖するため、治療が功を奏さない。本菌敗血症患者の救命には、抗生物質治療と併用可能な、あるいは依存しない、全身循環中における *V. vulnificus* の増殖制御が必要となる。

敗血症重症化過程における本研究計画の位置づけ



2. 研究の目的

本研究の目的は、*V. vulnificus* の好中球逃避機構を解明し、本菌敗血症の新規治療法の開発に繋げることである。本研究計画では、その第一段階として、我々がこれまでに同定した、*V. vulnificus* が好中球からの逃避に必須とする遺伝子の機能解析を行う。

我々の研究グループは、新規網羅的病原遺伝子同定法 (ISLAP 法) を開発し、生体内における *V. vulnificus* の好中球逃避機構に関与する 40 の遺伝子の同定に成功した。本研究計画では、これらの中から、ゲノム上に連続して存在していた VV1_0055 (以下、0055) と VV1_0056 (以下、0056) の 2 つの遺伝子の好中球逃避機構に関与する機能の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 0055 および 0056 の生体内における好中球逃避への関与の証明

トランスポゾンによるランダム変異株のアッセイから、0055::Tn および 0056::Tn のマウスに対する致死性が低下していることを明らかにした。しかしながら、0055 と 0056 の上流や下流の遺伝子領域は同方向に配置された遺伝子が間隔を空けずに並んでいたことから、オペロンを形成している可能性が考えられ、トランスポゾンが挿入されていた 0055 や 0056 がマウス致死性低下の責任遺伝子か否かは不明であった。そこで、0055 および 0056 のインフレーム欠失変異体 (0055 および 0056) およびそれらの相補株を作成し、好中球の存在する健常マウスと好中球を枯渇させたマウス (好中球枯渇マウス) の大腿部皮下に接種して、マウスに対する致死性、および、感染局所 (接種局所直下の筋肉) と全身循環中 (脾臓中) での増殖性を評価した。

2) 0055 と結合する菌体因子の同定

0055 には LolA のモチーフが広範囲に渡り保存されていた。LolA は *Escherichia coli* において、菌体内膜から外膜へのリポタンパク質輸送に関与している。LolA の研究において、ヒスチジンタグをつけた LolA-His を菌体のスフェロプラストに添加した後、抗ヒスチジンタグ抗体でプルダウンすることで、LolA により輸送されている菌体リポタンパク質が共沈降することが証明されている。0055 がリポタンパク質の輸送に関与するかは未知であるが、LolA と同様、0055-His を用いたプルダウンアッセイにより輸送タンパク質が共沈降する可能性は高く、0055-His を用いた共沈実験により、好中球逃避機構に直接関与するタンパク質を同定できる可能性がある。このことから、0055-His を作成し、*V. vulnificus* の菌体外膜およびペリプラズムを含む画分と混合し、ニッケルレジンによるプルダウン後、LC-ESI-MS に供して 0055 と結合するタンパク質を同定した。

4. 研究成果

研究方法 1) の結果

図 1 に示したように、0055 および 0056 共に、健常マウスへ接種した場合、野生株と比較し

てマウスの生存時間は延長した(図 1 A と B)。一方、この 0055 および 0056 による健常マウスの生存時間の延長は、好中球枯渇マウスでは認められなかった(図 1 A と B)。加えて、0055 および 0056 のそれぞれに 0055 あるいは 0056 遺伝子を相補した相補株 (p0055 および p0056) では、野生株と同等まで生存時間が戻ったことから、0055 と 0056 は、生体内において好中球からの逃避に関与していることが明らかとなったと共に、0055 および 0056 は、好中球逃避の責任遺伝子であることがわかった。

次に、健常マウスと好中球枯渇マウスにおける感染局所(接種局所直下の筋肉)および全身循環中(脾臓中)での増殖性を解析した。その結果、接種局所では好中球の存在の如何にかかわらず、また、0055 および 0056 遺伝子の有無にかかわらず、野生株と同程度の菌数が検出された(図 2 A と B)。一方、全身循環中での増殖は、好中球の存在する健常マウスにおいて菌数の低下が認められたが、この菌数の低下は好中球枯渇マウスでは認められなかった(図 2 A と B)。これらの結果は、0055 と 0056 が感染局所よりも全身循環中で好中球による排除から逃れるために必要であることを示唆している。

研究方法 2) の結果

0055-His と菌体外膜およびペリプラズムを含む画分と混合して、ニッケルレジンによるブルダウン後、LC-ESI-MS に供して 0055 と結合するタンパク質を同定した。その結果、0055-His を含まないコントロールと比較して、2.3 倍量のエノイルアシルキャリアプロテインレダクターゼ 2(VV2_0265)が検出された(データは示していない)。このタンパク質は、アセチル CoA からアシルキャリアプロテインを合成する最終段階の酵素であり、細胞膜のリン脂質合成に関与する(図 3)。興味深いことに、この、アセチル CoA からアシルキャリアプロテインを合成する経路には、0055 および 0056 と連続して存在する 0058, 0059, 0060 および 0061 が含まれていた(図 3)。これらのことから、0055 および 0056 は、アセチル CoA から 0058, 0059, 0060 および 0061 の働きにより合成されたアシルキャリアプロテインを菌体外膜へ運ぶ作用を担っていると考えられた。すなわち、*V. vulnificus* の好中球逃避には、アシル化を受け、菌体外膜を構成する何らかの物質が重要であることが示唆された。

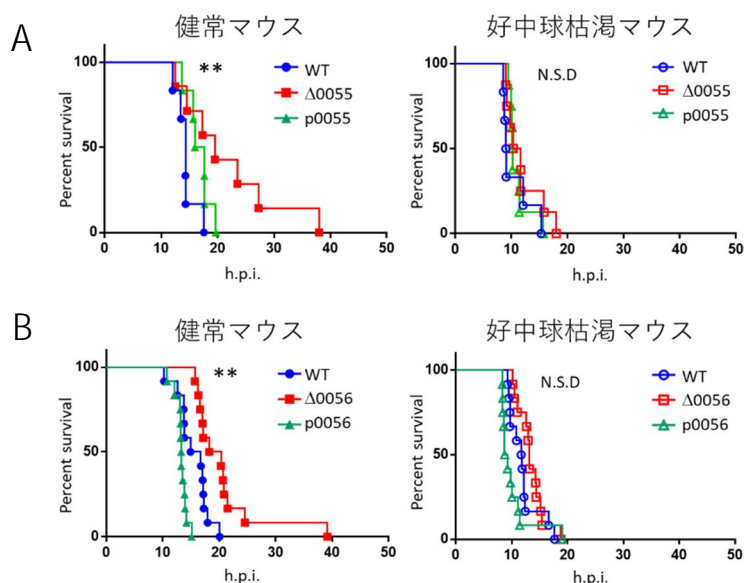


図 1. 健常マウスと好中球枯渇マウスにおける WT と変異株の致死性の評価

(A) WT (n=6)、Δ0055 (n=7)、および p0055 (n=6) または (B) WT (n=12)、Δ0056 (n=12)、および p0056 (n=12) を健常マウスと好中球枯渇マウスに皮下接種 (10⁶ CFU/マウス) し、Kaplan-Meier の生存曲線解析を行った。**P < 0.01; log-rank test

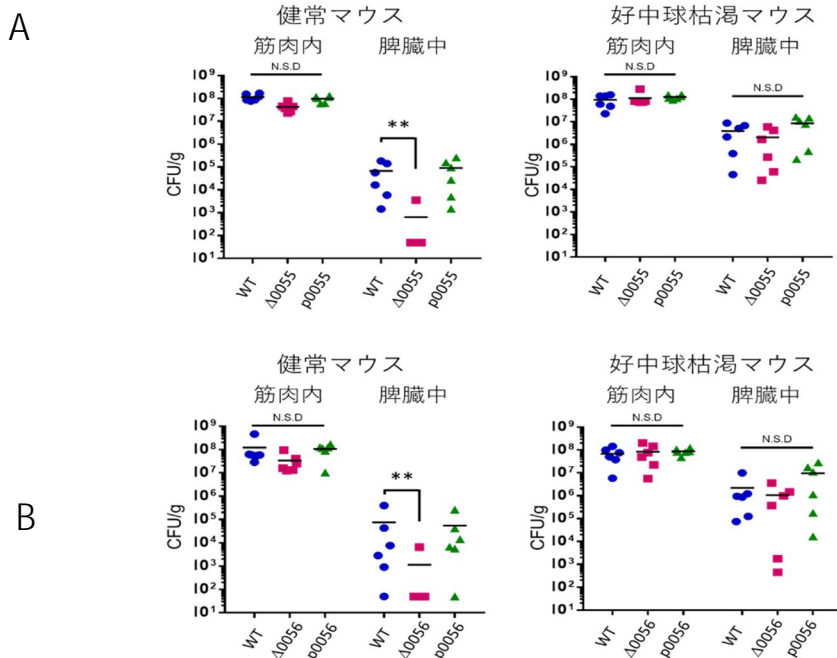


図2 WT と変異株を健常マウスと好中球枯渇マウスに皮下接種した後、9 時間での筋肉内と脾臓中の菌数

(A) WT、 $\Delta 0055$ 、および p0055、または (B) WT、 $\Delta 0056$ 、および p0056 を健常マウスと好中球枯渇マウスに皮下接種 (10^6 CFU/マウス) し、9 時間後に筋肉内と脾臓中の菌数を算出した。 ** $P < 0.01$; Dunn's multiple comparison test

リン脂質合成経路と 0055 周辺タンパク質

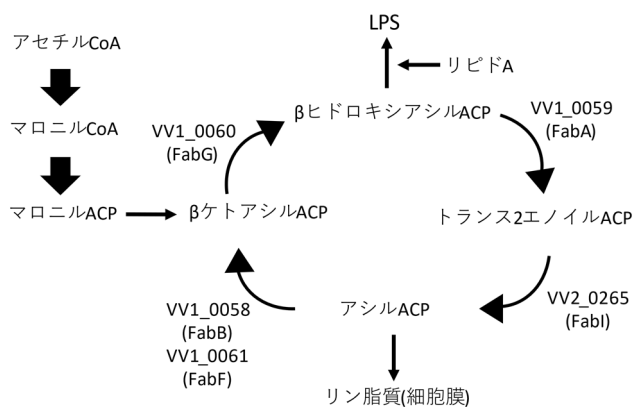


図3. リン脂質合成経路と 0055 周辺タンパク質

リン脂質合成経路を示す。0055 結合タンパク質として、エノイルアシルキャリアプロテインレダクターゼ 2 (Vv2_0265: FabII) が検出された。このタンパク質は、アセチル CoA からアシルキャリアープロテインを合成するリン脂質合成の最終段階の酵素である。また、この経路上には、0055 および 0056 と連続して存在する 0058, 0059, 0060 および 0061 が含まれていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamazaki Kohei, Kashimoto Takashige, Kado Takehiro, Akeda Yukihiro, Yoshioka Kazuki, Kodama Toshio, Yamamoto Mai, Okamura Masashi, Kakuda Tsutomu, Ueno Shunji	4. 巻 11
2. 論文標題 Chemotactic invasion in deep soft tissue by <i>Vibrio vulnificus</i> is essential for the progression of necrotic lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virulence	6. 最初と最後の頁 839 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21505594.2020.1782707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kashimoto T, Sugiyama H, Kawamidori K, Yamazaki K, Kado T, Matsuda K, Kodama T, Mukai T, Ueno S.	4. 巻 30
2. 論文標題 <i>Vibrio vulnificus</i> hemolysin associates with gangliosides.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-020-01755-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takehiro Kado, Takashige Kashimoto*, Kohei Yamazaki, Kaho Matsuda, and Shunji Ueno	4. 巻 127
2. 論文標題 Accurate prediction of anti phagocytic activity of <i>Vibrio vulnificus</i> by measurement of bacterial adherence to hydrocarbons. Prediction of Anti Phagocytic Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 APMIS.	6. 最初と最後の頁 80-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apm.12910.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kohei Yamazaki, Takashige Kashimoto*, Mio Morita, Takehiro Kado, Kaho Matsuda, Moeko Yamasaki, and Shunji Ueno	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of in vivo Essential Genes of <i>Vibrio vulnificus</i> for Establishment of Wound Infection by Signature-Tagged Mutagenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.00123. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashige KASHIMOTO, Kohei YAMAZAKI, Shunji UENO.
2. 発表標題 壊死性軟部組織感染症において壊死した軟部組織は感染菌の生体内リザーバーとして機能する
3. 学会等名 日本細菌学会第93回総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷 豪、柏本 孝茂、山崎 浩平、松田 果穂、上野 俊治
2. 発表標題 <i>Vibrio vulnificus</i> の生体内における増殖・拡散に必要な因子の探索
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏本 孝茂、山崎 浩平、門 武宏、松田 果穂、上野 俊治
2. 発表標題 軟部組織壊死感染症における壊死性筋膜炎発症の意義
3. 学会等名 第32回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏本 孝茂、山崎 浩平、上野 俊治
2. 発表標題 壊死筋肉組織はNSTI起因菌の生体内リザーバーとなる
3. 学会等名 令和元年度獣医学術東北地区学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiro Kado, Takashige Kashimoto, Kohei Yamazaki, Yukihiro Akeda, Toshio Kodama, and Shunji Ueno
2. 発表標題 Knock out of a putative transporter system in <i>Vibrio vulnificus</i> reduces lethality of mice.
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashige Kashimoto, Takehiro Kado, Kohei Yamazaki, and Shunji Ueno
2. 発表標題 Accurate prediction of anti phagocytic activity of <i>Vibrio vulnificus</i> by measurement of bacterial adherence to hydrocarbons.
3. 学会等名 8th Congress of European Microbiologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学獣医公衆衛生学研究室 http://www.vmas.kitasato-u.ac.jp/publichealth/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------