

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590436

研究課題名（和文）尿路病原性大腸菌が産生する USP の作用解析と粘膜ワクチンの開発

研究課題名（英文）Analysis of Uropathogenic-specific protein and development of the mucosal vaccine by using of USP

研究代表者

倉園 久生 (KURAZONO HISAO)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：90186487

研究成果の概要（和文）：尿路病原性大腸菌の産生する特異的な尿路病原因子である Uropathogenic-specific protein (USP) に対する高感度の検出系の構築を行なった。その結果、HRP-TMBZ を用いた Bead-ELISA 系の感度が最も高く、その検出感度は 100 pg/ml であった。現在、この系を用いて USP の産生量と UPEC が惹起する病型との関係を検討すると共に、native USP の精製を行なっている。

研究成果の概要（英文）：Uropathogenic-specific protein (USP) is one of the important virulence factors in UPEC. We established a highly-sensitive bead-ELISA system against USP. The minimum detection concentration of USP in the sample is 100 pg/ml. By using of this detection system, we try to clarify the relationship between the production of USP in UPEC and the symptoms of the patients suffered from UPEC infections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性、粘膜ワクチン

1. 研究開始当初の背景

尿路感染症は最も頻度の高い感染症の一つであり、加齢並びに抵抗力の低下に伴い頻回に感染を繰り返し、性差を問わず成人の多くに尿路感染症の既往があるとされている。尿路感染を引き起こす細菌のうちで、尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *E. coli*: UPEC) は原因細菌の80%以上を占めている。他の細菌感染症と同様に、UPECによる尿路感染症の治療においても薬剤耐性菌が問題になっている。

我々はUPEC に新しい病原遺伝子群 (PI) を発見した。このPI は、4 つのOpen Reading frame (*usp*, *orfU1*, *orfU2*, *orfU3*) からなる 4,167bp のPI で、*usp* 遺伝子を含むPI のUPEC における分布は、既報の尿路病原因子と比較して特異的かつ高頻度であった。

2. 研究の目的

我々が発見し着目しているUSP は、1) それ自体で尿路感染を惹起し、2) Immunity protein と推定される蛋白と共に発現されて

周囲の細菌を殺してその菌がdominant になり、3) トランスポゾン様に周囲の大腸菌 (あるいは他種の細菌にも) に伝搬され、4) 分子疫学的にもUPEC に局在し、5) 愛玩動物の尿路感染症由来株のUPEC もヒトと全く同様の性状および挙動を示す。これらの研究結果と他の細菌性疾患同様、尿路感染症で分離されるUPEC も薬剤耐性菌が増加の一途をたどっている事より、UPEC が特異的に分泌していると考えられるUSP に対する粘膜ワクチンを開発することで、UPEC が保持されている腸管並びに感染部位である尿路系でのUPEC の増殖を抑制してUPEC による尿路感染症を減少させる事を目的とする。

3. 研究の方法

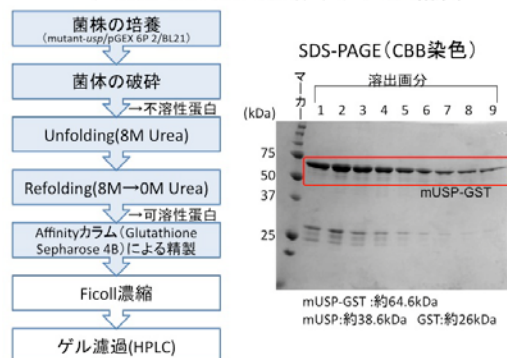
(1) 1アミノ酸置換無毒化USPの精製: *usp* 遺伝子は強発現させると宿主である大腸菌を殺してしまう。我々は、*usp* 遺伝子をpGEX-6P-1 (GSTとの融合蛋白を構築するvector) にクローニングした際に、1塩基置換体 (Frameはそのまま結果として1アミノ酸置換体) を得た。このクローンは大腸菌で強発現できるため、大腸菌あるいは細菌に対する毒性を失った無毒化USPを産生していると考えられる。このクローンを強発現させてInclusion bodyになったUSPをRe-foldしてGlutathione Sepharose 4Bで精製し、HPLCで最終的にゲル濾過を行い精製した。

(2) USPに対する特異的なELISA系の構築: 精製無毒化USPを用いて無毒化USPに対する家兎ポリクローナル抗体を作製し、無毒化USP (USP) に対する高感度ELISA系を構築した。

4. 研究成果

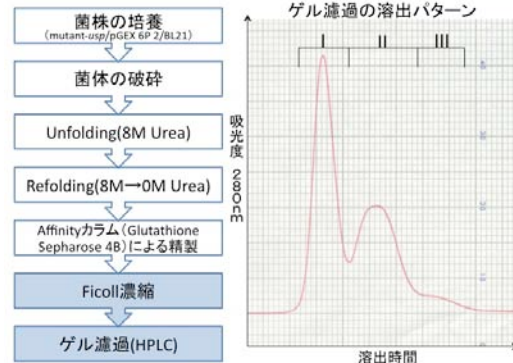
(1) 1アミノ酸置換無毒化USPの精製: mUSP/pGEX-6P-2/BL21培養して菌体を超音波破碎した。mUSP-GSTはInclusion bodyとなったので尿素に対する段階的な透析 (8M→0M) によりRe-foldし、Glutathione Sepharose 4Bカラムで粗精製した (図1)。

図1. mutant USP-GST融合蛋白の精製



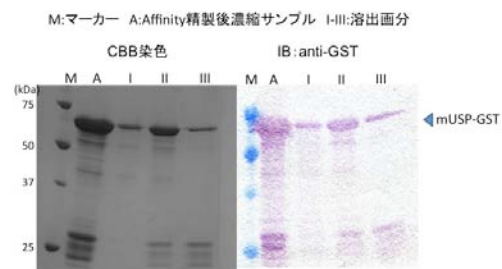
粗精製した mUSP-GST は Ficoll で濃縮した後、更に Superdex75 (10/300 GL) カラムでゲル濾過した (図2)。

図2. mutant USP-GST融合蛋白の精製
ゲル濾過の溶出パターン



ゲル濾過して得られたピーク I-III を SDS-PAGE 及び Western blotting 解析したところ、mUSP-GST の多量体であることが分かり、単一の蛋白として精製できた (図3)。

図3. ゲル濾過精製後サンプルの
CBC染色像(左)、Western blotting 解析像(右)

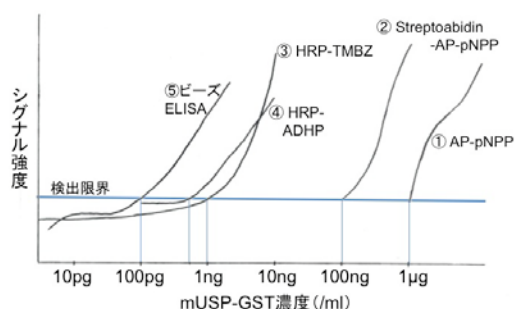


(2) 抗 mUSP-GST 家兎血清の作製: 1) で精製した mUSP-GST を常法により家兎に免疫して、抗 mUSP-GST 家兎血清を作製した。得られた抗血清の抗体価は ELISA 法で 2^{11} であった。

(3) 抗 mUSP-GST 特異 IgG の調整: 1) で精製した mUSP-GST を Sepharose 4B に結合させて Affinity カラムを作製した。このカラムを用いて抗 mUSP-GST 家兎血清に対して Affinity 精製を行い、5 ml の家兎血清から 563 μ g の抗 mUSP-GST 特異 IgG を調整した。

(4) USP 検出系 (ELISA 系) の構築: 1) と 3) で作製した精製 mUSP-GST と抗 mUSP-GST 特異 IgG を用いて種々の ELISA 系を構築してその検出感度を比較検討した結果、HRP-TMBZ を用いた Bead-ELISA の感度が最も高く、100 pg/ml の USP を検出できた (図4)。

図4. 各ELISA系のUSPの検出限界



現在、この系を用いて USP の産生量と UPEC が惹起する病型との関係を検討すると共に、native USP の精製を行なっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

(1) Hisatsune J, Kurazono H, Yamasaki E (11人中4、8番目) : Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF κ B activation. J. Immunol. 180 : 5017-5027, 2008.

(2) Tapchaisri P, Kurazono H, Chaicumpa W (11人中10番目) : Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. J. Health Popul. Nutr. 26: 79-87, 2008.

(3) Takahashi S, Yamamoto S (11人中2番目) : 21-hydroxylase deficiency presenting as an adrenal incidentaloma: Endocrinological evaluation and mutational analysis. Endocrinologist 18: 207-210, 2008.

(4) Yamamoto S (7人中1番目) : Diagnostic efficacy of free to total ratio of prostate-specific antigen and prostate-specific antigen velocity, singly and in combination, in detecting prostate cancer in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/ml. Int. Urol. Nephrol. 40: 85-89, 2008.

(5) Yamamoto S (6人中1番目) : Antibiotic prophylaxis for transrectal prostate biopsy: a prospective randomized study of tosufloxacin versus levofloxacin. Int J Urol 15: 604-606, 2008

(6) Kondoh N, Yamamoto S (6人中2番目) : Salvage therapy trial for erectile dysfunction using phosphodiesterase type 5 inhibitors and vitamin E: Preliminary report. Aging Male 11: 167-170, 2008.

(7) Nakayama M, Yamasaki E, Kurazono H, Hirayama T (11人中3、5番目) : *Helicobacter pylori* VacA- induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. J. Biol. Chem. 284: 1612-1619, 2009.

(8) Takahashi A, Kurazono H, Yamamoto S (12人中 11、12 番目) : Genetic profiles of fluoroquinolone- resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis: phylogeny, virulence factors, PAI_{usp}-subtypes, and mutation patterns. J. Clin. Microbiol. 47: 791-795, 2009.

(9) Kulkeaw K, Kurazono H, Chaicumpa W (11人中10番目) : Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. J. Proteomics 72: 270-282, 2009.

(10) Yamamoto S (10人中1番目) : Clinical efficacy of oral administration of 200 mg gatifloxacin once daily for 3 days for the treatment of patients with uncomplicated cystitis. J. Infect. Chemother. 15: 104-107, 2009.

(11) Yamamoto S (8人中1番目) : Diagnostic accuracy of volume- rendered computed tomography movie and other computed tomography-based imaging methods in assessment of renal vascular anatomy for laparoscopic donor nephrectomy. Int. Urol. Nephrol. 41: 785-790, 2009.

(12) Imamura M, Yamamoto S, Ogawa O (11人中4番目) : Basic fibroblast growth factor causes

urinary bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297: F46-F54, 2009.

(13) Thanongsaksrikul J, Kurazono H, Chaicumpa W (8人中7番目) : A V_HH that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. *J. Biol. Chem.* 285: 9657-9666, 2010.

(14) Akada KJ, Kurazono H, Nakamura K (13人中5番目) : *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells. *Disease Models & Mechanisms* 3: 605-617, 2010.

(15) Shima H, Yamamoto S (8人中2番目) : Far-infrared rays control prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cent. Eur. J. Biol.* 5: 178-189, 2010.

(16) Naito S, Yamamoto S, Tomita Y (21人中11番目) : Prognostic of Japanese metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients in the cytokine era -a cooperative group report of 1,463 mRCC patients. *Eur. Urol.* 57:317-315, 2010.

(17) Fukudo M, Yamamoto S, Inui K (8人中5番目) : A transient increase of calcineurin phosphatase activity in living-donor kidney transplant recipient with acute rejection. *Drug Metab. Pharmacokinet* 25: 411-417, 2010.

(18) Suzuki T, Terao S, Acharya B, Naoe M, Yamamoto S, Okamura H, Gotoh A (7人中5番目) : The antitumour effect of $\gamma\delta$ T Cells is enhanced by valproic acid-induced up-regulation of NKG2D ligands. *Anticancer Res.* 30: 4509-4514, 2010.

(19) Wada A, Yamasaki E, Senba M (12人中9番目) : Direct binding of gangliosides to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity. *Glycobiology*, 20, 668-678, 2010.

(20) Matsumoto A, Kurazono H, Kohno S (11人中8番目) : *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X_L, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. *Digestive Diseases and Science*, 56: 999-1006, 2011.

(21) Na-Ubol M, Kurazono H, Chaicumpa W (14人中10番目) : Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J. Med. Res.*, 133: 387-394, 2011.

(22) Maruyama T, Yamamoto S, Shima H (6人中5番目) : Double short-time exposure to pirarubicin produces higher cytotoxicity against T24 bladder cancer cells. *J. Infect. Chemother.* 17: 11-16, 2011.

(23) Higuchi Y, Takesue Y, Yamamoto S (10人中10番目) : A single-dose regimen for antimicrobial prophylaxis to prevent perioperative infection in urological clean and clean-contaminated surgery. *J. Infect. Chemother.* 17: 219-222, 2011.

[学会発表] (計 12 件)

1. Yamasaki E, Hoshi H, Seto Y, Chongsa-nguan M, Chaicumpa W, G B Nair, Makino S-I, Hirayama T, Kurazono H: Biological activities of *Salmonella* enterotoxin. The 43rd Joint Conference US – Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel, Fukuoka, Japan, Nov. 17-19, 2008
2. Yamamoto S: “AAUS Symposium: Catheter Associated UTI: CAUTI” European and Asian guidelines. Pre-congress meeting of the 5th Asian Association of UTI and STD. Taipei, Taiwan. 2008.11.29.
3. Yamasaki E, Nakano M, Hoshi H, Seto Y, Chongsa-nguan M, Chaicumpa W, Nair G B, Makino S-I, Hirayama T and Kurazono H: Diversity in the expression of *Salmonella* enterotoxin that has a cytotoxic effect on cultured cells by various *Salmonella* species. 3rd ASM Conference on *Salmonella*: Biology, Pathogenesis & Prevention. Aix-en-Provence, France, 2009. 10. 05-09.
4. Yamamoto S, Takahashi A, Muratani T,

- Yasuda M, Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, Kiyota H, Arakawa S, Matsumoto T, Shima H, Kurazono H: The phylogenetic and virulence profiles of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis are different from quinolone-susceptible counterparts. AUA Annual Meeting '09. Chicago, USA. 2009.4.26-30.
5. Toru Suzuki, Bishnu Acharya, Shuji Terao, Shingo Yamamoto, Hiroki Shima, Haruki Okamura, Akinobu Gotoh: The antitumor effect of $\gamma\delta$ T cells against bladder cancer cells is enhanced following upregulation of NKG2D ligands by valproic acid. AUA Annual Meeting '09. Chicago, USA. 2009.4.26-30.
6. Ueda Y, Nojima M, Hashimoto M, Higuchi Y, Kinoshita T, Hao H, Kyo M, Ichikawa Y, Hirota S, Yamamoto S, Shima H, Transient disappearance of donor-specific antibody on post-transplant day 1 may indicate high risk for antibody-mediated acute rejection following kidney transplantation in sensitized recipients. European Society for Organ Transplantation 2009. Paris, France. 2009.8.27-30
7. 山崎栄樹、高橋彰、山本新吾、星英之、牧野壮一、倉園久生: 尿路病原性大腸菌の産生する USP に対する特異的同定法の開発。第 83 回日本細菌学会総会 (パシフィコ横浜、横浜市) 2010. 3.27-29.
8. Kurazono H: Analysis of Pthogenicity island of Uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP. SPU Forum: Updates on Common Viral and Bacterial Infections. 25 October, 2010, Universiti Malaysia Sabah, School of Medicine.
9. Suzuki T, Tacharya B, Terao S, Nojima M, Yamamoto S, Gotoh A: Enhancement of $\gamma\delta$ T cell antitumor activity against prostate cancer cell through Toll-like receptor 2 and 3 ligand dependent activation. AUA Annual Meeting '10. San Francisco, USA. 2010.5.29-6.3.
10. Higuchi Y, Yamada Y, Ueda Y, Suzuki Y, Aihara K, Maruyama T, Nojima M, Yamamoto S: Assessment of a single-dose regimen for antimicrobial prophylaxis to prevent perioperative infection in urologic surgery. Society for Infection and Inflammation (SIIU) at AUA Annual Meeting '10. San Francisco, USA. 2010.5.30
11. Yamamoto S: Assessment of a single-dose regimen for antimicrobial prophylaxis to prevent perioperative infection in urologic surgery. German-Japanese Confederation of Urology 9th Scientific Meeting. Munster,

Germany. 2010.6.19-26

12. Takahashi S, Hamasuna R, Yasuda M, Arakawa S, Tanaka K, Ishikawa K, Kiyota H, Hayami H, Yamamoto S, Matsumoto T, on behalf of the Japanese UTI Research Group: A randomized clinical trial to evaluate the preventive effect of cranberry juice (UR65) for patients with recurrent urinary tract infection. ICC/ECCMID 2011. Milan, Italy. 2011.5.7-10

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉園 久生 (KURAZONO HISAO)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号：90186487

(2) 研究分担者

山本 新吾 (YAMAMOTO SHINGO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：80322741

(3) 研究分担者

山崎 栄樹 (YAMASAKI EIKI)
帯広畜産大学・畜産学部・助教
研究者番号：40514708