

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590400

研究課題名（和文）

新しい食品由来感染症の原因菌、バルニフィカス菌の病原遺伝子とワクチン開発の研究

研究課題名（英文）

Research on pathogenic genes and development of vaccine of *Vibrio vulnificus*, a novel causative agent of foodborne infection

研究代表者 山本 耕一郎 (yamamoto kouichirou)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：30158274

研究成果の概要（和文）：

バルニフィカス菌 (*Vibrio vulnificus*) は魚介類の生食などで、肝臓疾患などの基礎疾患をもつヒトに感染し、その死亡率は 50% を超える感染症である。この菌の感染メカニズムはほとんど解明されていない。今回トランスポゾン (Tn) 変異法を用い病原関連遺伝子を遺伝子の解明を試みた。

Tn 変異株プールからマウス感染性が 1/1000,000 以下に低下した株など多くの弱毒変異株が分離され、Tn が挿入破壊した遺伝子を調べた。今回毒性が低下した変異株では、以下の 6 種の遺伝子に Tn は挿入されていた。すなわち、1) プリン合成に関する IMP 脱水素酵素、2) シアル酸合成に必要な UDP-N-アセチルサミングルコサミン-2-エピメラーゼ、3) アミノ酸合成に関するアスパラギン酸リン酸化酵素、4) Insulinase family protease (HFP)、5) ヘモリジンなどの外毒素の分泌などに必要な II 型分泌機構 General Secretion Pathway (GSP)、その他、6) 未知の機能タンパク、をコードする遺伝子であった。

これらの変異株の内、最も毒性が低下した IMP 脱水素酵素遺伝子変異株をワクチンとして用いたところ感染攻撃に対し高い感染防御効果あることが見出されたので、この遺伝子の変異株が経口生菌ワクチンとしての可能性あると考えられる。現までに見出された病原遺伝子を完全に除去して逆変異を起こらない形にして、安全性の保証された株を作成を試み、最も感染入り口として重要な腸管での免疫の可能性について鋭意研究中である。

研究成果の概要（英文）：

Vibrio vulnificus is an important pathogens of foodborn diseases and wound infection. This pathogen causes fatal septicemia rapidly in immunocompromised hosts after they contact with contaminated seawater or seafood with this organism. The mortality rate is more than 50%. For the rapid progress and the high mortality, vaccination is considered an effective way to control infection with *V. vulnificus* in a high risk population.

We applied Signature-Tagged Mutagenesis (STM) to generate attenuated mutants from a clinically-isolated virulent *V. vulnificus* strain, OPU1 which was isolated from a patient. Twelve insertion mutants were selected and the virulence of these mutants were determined by the minimal lethal dose (MLD) to mice. Several mutant strains showed lower virulence compare to the parent virulent strain. The DNA sequences flanking to transposon insertion sites in these mutants were determined and searched for homologies at DNA Date Bank of Japan. The transposons inserted genes were those for IMP dehydrogenase, UDP-N-acetylgulcosamin-2-epimerase, aspartokinase, and a conserved hypothetical protein. This suggests that these genes may be involved in *V. vulnificus* virulence. One of the mutants was administrated for experimental vaccination to mice. The immunized mice were challenged with the virulent parent strain. All unimmunized mice were killed within 36 hr, but almost all immunized mice survived. In this experiment, we found that the attenuated have a potentiality as live vaccine candidate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ビブリオ、バルニフィカス菌、感染、毒素、トランスポゾン、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

Vibrio vulnificus は魚介類の生食や海水の接触などで、肝臓疾患などの基礎疾患をもつヒトに感染し、その死亡率は50%を超える。魚の生食という習慣があり、また、肝疾患患者が非常に多い東アジアの一員である日本にとって、この感染症は重要な疾患である。この菌の産生する毒素について様々な研究はあるが、感染メカニズムはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

肝硬変患者が生鮮魚介類から感染するビブリオ・バルニフィカス菌 (*Vibrio vulnificus*) の感染因子を決定し、この因子を欠失した弱毒株を最終的にワクチンとして使用出来る可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

A. **Signature-Tag** トランスポゾン法を用い、感染防御機構突破能を失った弱毒変異株を網羅的にスクリーニングする。

B. 弱毒変異株でのトランスポゾンが挿入遺伝子をゲノムデータベースから決定した。

C. 弱毒変異株そのもの、あるいは判明した感染因子遺伝子を相同組換えにより欠失させ、病原性を失った変異株を作成する。

D. マウスを用い弱毒化変異株を腹腔投与などでワクチンとして用い、毒性株に対する感染防御効果を確かめる。

4. 研究成果

Tn 変異株プールからマウス感染性が1/1000,000以下に低下した株を含む多くの弱毒変異株が分離され、Tnが挿入破壊した遺伝子を調べた。今回毒性が低下した変異株では、以下の6種の遺伝子にTnは挿入されていた。すなわち、

- 1) プリン合成に関するIMP脱水素酵素
- 2) シアル酸合成に必要なUDP-N-アセチルサミングルコサミン-2-エピメラーゼ

3) アミノ酸合成や莢膜合成に関係するアスパラギン酸リン酸化酵素

4) メタロプロテアーゼの1つであるInsulinase family protease (HFP)

5) II型分泌機構であるGeneral Secretion Pathway (GSP)

6) 未知の機能タンパクである。

これらの変異株の内、最も毒性が低下したIMP脱水素酵素遺伝子変異株を腹腔注射ワクチンとして用いたところ感染攻撃に対し高い感染防御効果あることが見出されたので、この遺伝子の変異株がワクチンとして使用できる可能性あると考えられた。現在、これらの遺伝子がどのようなメカニズムによって病原性に関連するかを追求するとともに、この回十分に出来なかった経口ワクチンの可能性について、現在鋭意研究中である。

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 4件)

①Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Yamamoto, K., Wei, X. Structure-affinity relationship of flavones on binding to serum albumins: Effect of hydroxyl groups on ring A. Mol. Nutr. Food Res. 54 S253-S260, 2010.

②Xiao, J., Mao, F., Yang, F., Zhao, F., Zhang, C., Yamamoto, K. Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. Mol. Nutr. Food Res. 55, 1-9, 2011.

③Xiao, J. Kai, G., Yang, F., Liu, C., Xu, X., Yamamoto, K. Molecular structure-affinity relationship of natural polyphenols for bovine γ -globulin. Mol. Nutr. Food Res. 55, 86-92, 2011.

④Cao, H., Chen, X., and Yamamoto, K. Bovine serum albumin significantly improves the DPPH free radicals scavenging potential of dietary polyphenols and gallic acids. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 12:940-948, 2012

[学会発表] (計 17 件)

①山本真衣, 北林奏, 肖建波, 瀬川理恵, 井上美幸, 細原浩平, 横田憲治, 小熊恵二, 山本耕一郎. *Vibrio vulnificus* トランスポゾン挿入弱毒化変異株と挿入部位遺伝子の特定, 日本細菌学雑誌, 65:150, 2010. (日本細菌学会第 83 回総会, 2010 年 3 月 27 日(横浜) [日本細菌学雑誌, 65, 2010])

②中田和江, 山本耕一郎, 吉岡典子, 杣源一郎, 腸管マクロファージにおける LPS 低応答性に関する研究. CD14 発現抑制機構の解析, 日本細菌学雑誌, 65:182, 2010. 日本細菌学会第 83 回総会, 2010 年 3 月 28 日(横浜) [日本細菌学雑誌, 65:182, 2010]

③中田和江, 田中友美, 山本耕一郎, 杣源一郎. 腸管病原細菌に対する腸管マクロファージの応答性. 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010 年 9 月 12 日(松山)

④Yamamoto, K., Yamamoto, M., Tong, P., Xiao, J., Nakata, K., Yokota, K., Oguma, K.

Transposon mutation of pathogenic genes of *Vibrio vulnificus*. 日米コレラ部会 (日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会) 日本側総会, 2012 年 8 月 6 日、京都.

⑤Nakata, K., Yamamoto, M., Yamamoto, Inagawa, H., Soma, G. Anti-stress effect by innate immunity activation. Bioactive Okayama 2010 - An international Conference for Biologically Active Substances. Soja, Aug. 12, 2010.

⑥Yamamoto, M., Xiao, J., Hosohara, K., Segawa, R., Inoue, M., Nakai, M., Yokota, K., Oguma, K., Yamamoto, K.

Vaccination with an attenuated *Vibrio vulnificus* strains protects mice against infection. Bioactive Okayama 2010 - An international Conference for Biologically Active Substances. Soja, Aug. 12, 2010.

⑦Nakata, K., Tanaka, T., Yamamoto, K., Soma, G. The 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. Kyoto, Dec. 6, 2010.

⑧Yamamoto, K. Vibrios as a causative agent of foodborne diseases. The First Guangzhou International Symposium on Nutrition and Health. Guangzhou, China, Dec. 10, 2010.

⑨Yamamoto, K., Yamamoto, M., Xiao, J., Nakata, K., K. Yokota, and K. Oguma. Pathogenic genes of *Vibrio vulnificus* and protection by vaccination with an attenuated strain against the infection in mice. 日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会・日本側総会. 2011 年 8 月 3 日 (京都)

⑩守上加奈子, 金島 健, 宮本 菜津美, 山本 耕一郎. トランスポゾン挿入変異株を用いた *Vibrio vulnificus* 溶血性遺伝子の研究. 第 64 回日本細菌学会中国四国支部総会. 2011 年 10 月 22 日 (岡山).

⑪守上加奈子, 金島 健, 宮本 菜津美, 中田和江, 山本 耕一郎. *Vibrio vulnificus* 溶血性に関する遺伝子. 第 85 回日本細菌学会総会. 2012 年 3 月 29 日 (長崎)

⑫Yamamoto, M., Xiao, J., Nakata, K., Yokota, K., Oguma, K., Yamamoto, K. Isolation of virulence-attenuated mutants of *Vibrio vulnificus* by transposon-mutagenesis. In Proceedings of Bioactive Okayama 2012, An International Symposium on Biologically-Active Substances. Okayama,

Japan, Sept. 14, 2012, pp.56.

⑬ Nakata, K., Yasuda, M., Yamamoto, K.
Response of intestinal macrophage to
non-pathogenic and pathogenic bacteria.
In Proceedings of Bioactive Okayama
2012, An International Symposium on
Biologically-Active Substances,
Okayama, Japan, Sept. 14, 2012.pp58.

⑭ Yamamoto, M., Tong, P., Xiao, J.,
Nakata, K., Yokota, K., Oguma, K.,
Yamamoto, K. Transposon mutation
pathogenic genes of *Vibrio vulnificus*.
The 47th US-Japan Cholera Panel
Conference, Dec. 2012, Chiba, Japan.

⑮ 中田和江、安田美穂、山本耕一郎、稲川
裕之、杣源一郎、病原性/非病原性細菌に対
する腸管マクロファージの応答性. バイオ
治療法研究会. 2012 年.

⑯ Yamamoto, M. et al. Identification of
genes required for *Vibrio vulnificus*
virulence by signature-tagged
transposon mutagenesis. 山本真衣、横田
憲治、小熊恵二、山本耕一郎. STM 法によ
る *Vibrio vulnificus* 病原性に必要な遺伝子
のスクリーニング. 第 86 回日本細菌学会
総会. 2013 年 3 月 (千葉)

⑰ Nakata K., Yasuda, M., Yamamoto, M.,
Yamamoto, K. Response of intestinal
macrophage to non-pathogenic and
pathogenic bacteria. 非病原性/病原性細菌
に対する腸管マクロファージの応答. 第
86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 (千
葉)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 耕一郎 (yamamoto kouichirou)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：30158274

(2) 研究分担者

中田 和江 (nakata kazue)
岡山県立大学・保健福祉学部・助教
研究者番号：60411740

(3) 連携研究者

該当なし