

*Vibrio vulnificus* の生体内増殖機構の解明  
～新規網羅的病原遺伝子同定法 (ISLAP) 法の開発～

門 武宏

A novel method for comprehensive identification of virulence genes  
involved in a pathogenic mechanism

Takehiro KADO

## 目次

序論	1
第1章 <i>V. vulnificus</i> は、腸管内増殖において Fumarate and nitrate reduction regulatory protein (FNR) を必要とする。.....	3
I. 緒言 .....	3
II. 材料および方法 .....	6
1. 本実験に用いたプラスミド .....	6
2. 使用菌株 .....	6
3. <i>fnr</i> と Em 耐性遺伝子置換株 ( <i>fnr::erm</i> ) の作製 .....	7
4. <i>fnr</i> 相補株の作製 .....	13
5. <i>V. vulnificus</i> の好気条件下における成長曲線の作成 .....	14
6. <i>V. vulnificus</i> の嫌気条件下における成長曲線の作成 .....	15
7. 嫌気培養下でのグルコース添加最小培地内における増殖曲線の作成 .....	16
8. マウス腸管内と肝臓における Competition assay .....	16
III. 実験成績 .....	19
1. WT と <i>fnr::erm</i> の好気培養および嫌気培養における増殖性の比較 .....	19
2. WT と <i>fnr::erm</i> のグルコース添加最小培地中での嫌気培養における増殖性の比較 .....	19
3. 腸管ループ内と肝臓における Competition assay .....	20
IV. 考察 .....	21
図表 .....	24

第 2 章	新規病原遺伝子網羅的同定法 ISLAP 法の開発 .....	27
I.	緒言 .....	27
II.	材料および方法 .....	28
1.	菌株 .....	28
2.	好中球枯渴マウスの作製 .....	29
3.	ISLAP 法の実施 .....	30
4.	Arbitrary primed (AP) -PCR 法によるトランスポゾン挿入遺 伝子の同定 .....	34
5.	<i>V. vulnificus</i> 変異株の作製 .....	35
6.	生存曲線解析 .....	38
7.	In vivo イメージング .....	39
8.	筋肉組織内および脾臓中菌数の算出 .....	40
9.	In vitro phagocytosis assay .....	40
III.	実験成績 .....	42
1.	好中球枯渴マウスの作製 .....	42
2.	ISLAP 法の実施 .....	43
3.	ISLAP 法により取得した遺伝子の解析 .....	43
4.	0055 遺伝子欠損株と 0056 遺伝子欠損株の健常マウスと好 中球枯渴マウスにおける致死性の比較 .....	45
5.	接種局所における Δ0055 と Δ0056 の増殖・拡散の観察 ...	46
6.	接種 9 時間後における筋肉内および脾臓中菌数の算出 ....	47
7.	Δ0055 と Δ0056 のヒト好中球に対する貪食抵抗性の調査	48
IV.	考察 .....	48
	図表 .....	51

第 3 章	<i>V. vulnificus</i> の好中球逃避機構における 0055 と 0056 の機能解析 .....	59
I.	緒言 .....	59
II.	材料および方法 .....	60
1.	菌株 .....	60
2.	外膜局在タンパク質の半定量解析 .....	60
3.	蛍光抗体法による GroEL の菌体内分布の観察 .....	62
4.	菌体成分の分画 .....	63
5.	免疫沈降アッセイによる 0055 と GroEL の相互作用の検出 .....	66
III.	実験成績 .....	67
1.	0055 と 0056 のモチーフ解析および膜貫通領域予測 .....	67
2.	0055 と 0056 周囲の遺伝子の解析 .....	68
3.	外膜に局在するタンパク質の半定量解析 .....	69
4.	GroEL の蛍光顕微鏡下での観察 .....	70
5.	超遠心分離による細胞分画における GroEL の局在解析 ...	70
6.	0055 の局在、および 0055 と GroEL の相互作用の解析 ....	71
IV.	考察 .....	72
	図表 .....	76
総括	85	
謝辞	87	
参考文献	88	

## 序論

近年、バイオインフォマティクスを利用した病原細菌の生体内発現遺伝子の同定技術は、目覚ましい発展を遂げている。生体内で増殖できないトランスポゾン変異株を選抜する STM 法[31]と Tn-Seq 法[61]、生体内で発現する遺伝子のプロモーター領域を同定可能な IVET 法[51]、生体内発現遺伝子を同定・定量可能な RNA-Seq 法 [19, 79]、および 1 菌体の発現遺伝子を同定・定量可能な LIANTI 法 [14]など様々な手法が開発されてきた。しかしながら、これらの手法のみでは、同定された遺伝子の生体内における機能を実証することは不可能である。そこで本研究ではバイオインフォマティクスと感染実験を融合することで、標的とした機能に関与する遺伝子を網羅的に同定可能な **I**dentification of **S**pecific genes using the **L**ibrary of **A**virulent **P**henotypes (ISLAP) 法の開発を試みた。

*Vibrio vulnificus* (以下 *V. vulnificus* とする) は一本の極鞭毛を持ち、活発な運動性を有するグラム陰性の小桿菌である。水温 20℃ 以上、NaCl 濃度 2.0%~3.0%の環境で旺盛に増殖することから、本菌による感染症は温暖な汽水域が存在する沿岸地域において発生率が高い[32, 35, 37, 43, 45, 55, 59, 72]。本菌は経口感染においては日和見感染症起因細菌であることが知られており、感染者の 95%以上が肝疾患、糖尿病、悪性疾患、あるいは腎疾患などの基礎疾患を有することが特徴である[35, 38, 59]。一方創傷感染においては、感染者の 80%以上が基礎疾患をもたない健常人であり、致死的ではないものの感染局所の壊死を発症し、この壊死組織が感

染巣を形成するため、多くの場合、手足の切断を含む外科的処置が必要とされる[1, 8, 16, 29, 65, 68, 73]。また、潜伏期間は平均 16 時間と極めて短い[59]。これらの事実は、*V. vulnificus* が創傷感染においてのみ健常人の感染局所において、自然免疫を凌駕して増殖可能であることを示唆していることから[56, 62–64]、ISLAP 法により選抜する遺伝子は、*V. vulnificus* のもつ好中球逃避機構関連遺伝子とし、それに必須の遺伝子の網羅的選抜・同定を試みた。

本研究では、*V. vulnificus* の新規好中球逃避機構の解明を目的とし、第 1 章では *V. vulnificus* における遺伝子ノックアウト技術と、生体内における標的遺伝子の解析手法を習得した。第 2 章においては、ISLAP 法を実施し、*V. vulnificus* における好中球からの逃避に必須の遺伝子を網羅的に選抜・同定した。第 3 章では ISLAP 法により取得した機能未知遺伝子の機能解析を行った。

第 1 章 *V. vulnificus* は、腸管内増殖において Fumarate and nitrate reduction regulatory protein (FNR) を必要とする。

## I. 緒言

第 1 章では ISLAP 法の開発と確立にあたり必要とされる、*V. vulnificus* における遺伝子ノックアウト技術、生体を用いた感染実験技術、およびその解析手法の習得のために、すでに筆者が体得していた経腸管内感染モデルを利用して、腸管内における *V. vulnificus* の低酸素環境への適応機構と腸管内増殖の関係性の解明を試みた。

*V. vulnificus* は海水、汽水中および生ガキなどの魚介類から高率に検出されるグラム陰性の小桿菌で、水温 17℃以上、NaCl 濃度 2.0～3.0%を至適発育環境としている[35, 55, 72]。2000 年から 2002 年までの米国での疫学調査において、海水温が 5℃以下となる 12 月では約 7 CFU/mL (CFU; コロニー形成単位)、20℃を超える 6～7 月では、約 700 CFU/mL の *V. vulnificus* が海水中に存在すると報告されている[60]。我が国の *V. vulnificus* 感染症の発生も、海水温が上昇する 7～9 月に約 90%が集中している[35]。

*V. vulnificus* は、肝疾患、腎不全、糖尿病、免疫機能不全などの基礎疾患を有するヒトに感染し[36]、感染者が発症する病型には、原発性敗血症型、創傷感染型および胃腸炎型が知られている[11, 43]。1988～1996 年にフロリダ州で報告された 422 例の *V. vulnificus* 感染症のうち、原発性敗血症型が 43%、創傷感染型が 45%および胃腸炎型が 5%であった[70]。原発性敗血症型は、ヒトが本菌に汚染された魚介類を生食することで感染し、感染者におい



て、血液あるいは組織から *V. vulnificus* が分離され、創傷を認めないものとされている。汚染魚介類の摂取から平均 24 時間で、皮膚に、紫斑や出血班、出血を伴った水泡の出現を認め、症状の悪化に伴い壊死性筋膜炎に陥る。そして多くの感染者は、発症後平均 40 時間という極短時間で敗血症性ショックにより死亡する[30]。

*V. vulnificus* がこのように極短時間で敗血症を引き起こすには、感染局所から全身への素早い拡散が必須であり、それに伴い変化する外環境に菌体が適応する必要がある。変化する菌体外環境の中でも酸素濃度の変化は著しく、大気中で 8.06 mM であった酸素濃度は、腸管内で 1.0~1.3 mM、動静脈内で 2.5~5 mM である[34]。*V. vulnificus* が経口感染した場合、腸管で低酸素環境に曝されることとなり、急激な酸素濃度の減少に適応しなければならない。低酸素環境への適応に重要なタンパク質として、細菌の代謝機構を嫌気呼吸に移行させる Fumarate and nitrate reduction regulatory protein (FNR) が、*Escherichia coli* (以下 *E.coli* とする) において知られている[13, 28, 42]。FNR は、好気環境下では不活化状態で存在し、嫌気環境では活性化される[13, 41, 42]。活性化した FNR は、Nitrate reductase などの嫌気呼吸に関連する遺伝子の発現を増強する[13, 28]。この FNR をコードする遺伝子 (以下 *fnr* とする) が *V. vulnificus* にも存在することが、ゲノム解析の結果明らかになった。これは、*V. vulnificus* が感染時に低酸素環境を通過するので、外環境への適応に必要なタンパク質として、*V. vulnificus* の遺伝子上に保存されていると考えられる。しかしながら、これまでに *V. vulnificus* の腸管内における低酸素環境への適応・増殖機構に関する報告はない。そこで本研究では、*V. vulnificus* の腸管内におけ

る酸素濃度への適応に着目し、低酸素環境への適応機構と腸管内増殖の関係性の解明を試みた。

## II. 材料および方法

### 1. 本実験に用いたプラスミド

#### (1) pGEM®-T Easy Vector (Promega)

PCR産物のクローニングのために用いられるベクターで、マルチクローニングサイトの領域には制限酵素認識部位が設けられ、導入後もインサートDNAを切り出すことが出来る。

#### (2) pUC18-Em

PCR産物のクローニングのために用いられるベクターで、マルチクローニングサイトの領域には制限酵素認識部位が設けられ、導入後もインサートDNAを切り出すことが出来るpUC18を基に作製した。pUC18をマルチクローニングサイト内の*Bam*HIで切断し、エリスロマイシン耐性遺伝子（以下*erm*）の両端に*Bam*HI切断配列を付加したものを挿入した。

#### (3) pYAK1

クロラムフェニコール耐性遺伝子を有し、*sacB*（レバンスクラゼをコードし、この遺伝子を持つグラム陰性菌はsucrose存在下で培養すると、異常な糖転移産物が菌体内に蓄積することで、死菌となることが知られている）およびR6Kの複製起点を持つ。*V. vulnificus* 内では自殺ベクターとなる。

### 2. 使用菌株

(1) *Vibrio vulnificus* MO6-24 rif 株

Chonnam National University Medical School Joon Haeng Rhee 教授より分与頂いた *V. vulnificus* MO6-24 株 (以下 MO6 とする) にリファンピシン耐性を付与した。

(2) *E.coli* DH5 $\alpha$

リコンビナーゼなどをコードする遺伝子がノックアウトされており、組み換え DNA 実験に広く使われている大腸菌である。

(3) *E.coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ pir

*E.coli* DH5 $\alpha$  に R6K の複製起点をもつプラスミドの維持に必要な *pir* 遺伝子を、 $\lambda$ phage によりゲノム上に組み込んだ大腸菌である。

(4) *E.coli* BW19094 (以下 BW とする)

R6K の複製起点をもつプラスミドの維持に必要な *pir* 遺伝子が  $\beta$  グルクロニダーゼ構造遺伝子中に組み込まれた大腸菌である。岡山県立大学山本耕一郎教授より分与頂いた。

### 3. *fnr* と Em 耐性遺伝子置換株 (*fnr::erm*) の作製

(1) *fnr* 欠損のための相同組み換え領域のクローニング

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて MO6 よりゲノム(以下精製ゲノムとする)を抽出した。MO6 における VVMO6\_01515 (以下 *fnr* とする) の上流約 1 kbp (以下 up とする) および下流約 1 kbp (以下 down とする) を PCR によって増幅した。up では、鋳型として精製ゲノム (54.8

ng/μL) 1 μL、プライマーとして 25 μM up Fw (5'-  
GGATCCCTCGAGAGTTGGCGTTAA-3'；下線部は *Bam*HI 認  
識部位)、25 μM up Rev (5'-  
GATATCAACAACCTTTCACTATTTGATATACGTC-3'；下線部  
は *Eco*RV 認識部位) を各 1 μL、Expand<sup>TM</sup> High Fidelity<sup>PLUS</sup>  
PCR System (Roche) 付属のポリメラーゼを 1 μL、  
10×polymerase buffer を 5 μL、25 mM dNTP を 2 μL を PCR  
チューブ中で混合し、超純水で全量を 50 μL にした。down  
ではプライマー down Fw (5'-  
GATATCATCTCTACTGCGACGTAGCTCAACC-3'；下線部は  
*Eco*RV 認識部位)、down Rev (5'-  
CTGCAGAGTTTGAGTTATGAAGCCGTCGTTG-3'；下線部は  
*Pst*I 認識部位) を用いて同様に作製した。これらの PCR チ  
ューブをサーマルサイクラーにセットし、94°C-2 分間、  
94°C-20 秒間、57°C-30 秒間および 72°C-1 分間を 1 サイ  
クルとして 25 サイクルに設定し、DNA フラグメントを増幅  
した。増幅した各 DNA フラグメントをそれぞれ pGEM<sup>®</sup>-T  
Easy Vector へクローニングし、*E.coli* DH5α に形質転換し  
た。これらの *E.coli* をアンピシリン (最終濃度 100 μg/mL)  
加 Luria-Bertani (LB) 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養  
した。発育したコロニーからいくつかの単一のコロニーを  
アンピシリン (最終濃度 100 μg/mL) 加 LB broth 3 mL に  
接種し、37°C で一晩培養した。それぞれの培養液からミニ  
プレップ (アルカリ法) によりプラスミド DNA を回収  
した。このプラスミドのうち up を制限酵素 *Bam*HI と

*EcoRV* で、down を *EcoRV* と *PstI* で切断することにより、それぞれ up と down が挿入されたと思われるクローンを選択した。両者の DNA 配列を、DNA シークエンサーにより決定し、up および down 共に変異がないことを確認した。これらのプラスミドを pGEM®-T Easy *dfnr* up および pGEM®-T Easy *dfnr* down とした。

両者を制限酵素 *ApaI* と *EcoRV* でそれぞれ切断し、1%アガロースを用いて電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド溶液 (1 µg/mL) に浸漬した。UV トランスイルミネーター上で pGEM®-T Easy *dfnr* up は約 1 kbp、pGEM®-T Easy *dfnr* down では約 4 kbp の位置に検出されたバンドをゲルごと切り出した。切り出したゲルから Mini Elute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。pGEM®-T Easy *dfnr* up の抽出液 4 µL、pGEM®-T Easy *dfnr* down の抽出液 1 µL と、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TAKARA) 5µL を混合して 16°C で一晩放置し、*E.coli* DH5α に形質転換した。この大腸菌を、0.1 M イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (以下 IPTG とする) (25 µL/plate) と 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド溶液 (以下 X-Gal とする) (20 mg/mL) (40 µL/plate) を添加したアンピシリン (最終濃度 100 µg/mL) 加 LB 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。発育したコロニーのうち、いくつかの白い単一のコロニーをそれぞれアンピシリン (最終濃度 100 µg/mL) 加 LB broth 2 mL に接種し、37°C で一晩振盪培養した。それぞれの培養菌液からミニプレップ

(アルカリ法) によりプラスミド DNA を回収し、制限酵素 *Bam*HI および *Pst*I で切断することで、pGEM®-T Easy *dfnr* up に *dfnr* down が挿入されたクローンを選択した。このプラスミドを pGEM®-T Easy *dfnr* up down とした。

## (2) *dfnr* up down の自殺ベクターへの挿入

pGEM®-T Easy *dfnr* up down と自殺ベクター pYAK1 をそれぞれ制限酵素 *Bam*HI および *Pst*I で切断し、1%アガロースを用いて電気泳動を行った。エチジウムブロマイド溶液 (1 µg/mL) に浸漬し、UV トランスイルミネーター上でそれぞれ pGEM®-T Easy *dfnr* up down では約 2.0 kbp、pYAK1 では約 6.5 kbp の位置に検出されたバンドをゲルごと切り出した。切り出したゲルから Mini Elute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。pGEM®-T Easy *dfnr* up down と pYAK1 の抽出液をそれぞれ 2.5 µL と、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TAKARA) 5 µL を混合して 16°C で一晩放置し、*E.coli* DH5α λpir に形質転換した。これらの *E.coli* をクロラムフェニコール (最終濃度 20 µg/mL) 加 LB 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。発育したコロニーからいくつかの単一のコロニーをクロラムフェニコール (最終濃度 20 µg/mL) 加 LB broth 2 mL に接種し、37°C で一晩培養した。それぞれの培養液からミニプレップ (アルカリ法) によりプラスミド DNA を回収し、制限酵素 *Bam*HI および *Pst*I で切断することで、*dfnr* up down が挿入されたと思われるクローンを選択した。

### (3) *fnr* と *erm* を置換するための自殺ベクターの作製

pUC18-Em を *Bam*HI で切断し、エタノール沈殿を行った。乾燥後に DW 7  $\mu$ L、T4 DNA polymerase buffer 1 $\mu$ L、BSA 1  $\mu$ L、2mM dNTP 0.32  $\mu$ L を加えた。70°C、5 分放置し、T4 DNA polymerase 1  $\mu$ L を加え 37°C、5 分放置した後、Vortex を用いて激しく振盪し、*erm* の両端を平滑化した。この平滑化した *erm* を、pYAK1 *dfnr* を *Eco*RV によって切断したものに挿入し、*E.coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ pir に形質転換した。これらの *E.coli* をクロラムフェニコール（最終濃度 20  $\mu$ g/mL）加 LB 寒天培地に播種し、37°Cで一晩培養した。発育したコロニーからいくつかの単一コロニーをクロラムフェニコール（最終濃度 20  $\mu$ g/mL）加 LB broth 2 mL に接種し、37°Cで一晩培養した。それぞれの培養液からミニプレップ（アルカリ法）によりプラスミド DNA を回収し、制限酵素 *Bam*HI および *Pst*I で切断することで *erm* が挿入されたと思われるクローンを選択した。このようにして得たプラスミド DNA を BW に形質転換した（以下、pYAK1 *dfnr-erm* / BW とする）。

### (4) MO6 と pYAK1 *dfnr-erm* / BW の接合伝達

pYAK1 *dfnr-erm* / BW をクロラムフェニコール（最終濃度 20  $\mu$ g/mL）加 LB broth 5 mL に接種し 37°Cで一晩振盪培養後、そのうちの 100  $\mu$ L をクロラムフェニコール（最終濃度 20  $\mu$ g/mL）加 LB broth 2 mL に接種し、37°Cで 2.5 時間振盪培養した。そのうちの 100  $\mu$ L を滅菌シャーレに入



れたクロラムフェニコール（最終濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）加 LB broth 5 mL に植え継ぎ、37°C、6 時間静置培養した。上記の操作により培養した pYAK1 *dfnr-erm* / BW 500  $\mu\text{L}$  を、1.5mL マイクロチューブ（以下、マイクロチューブとする）にとり、そこに LB broth を 1 mL 加え、7,000 rpm、4°C、3 分間遠心分離を行った。上清を捨て、LB broth を 1 mL 加えて沈渣を崩し、再び同様に遠心分離を行い、LB broth を 500  $\mu\text{L}$  加え、沈渣を崩した。MO6 は LB broth 5 mL に接種し、25°C で 16 時間静置培養した後、1 時間振盪培養した。そのうち 500  $\mu\text{L}$  をマイクロチューブに取り、7,000 rpm、4°C、3 分間遠心分離を行った。上清を捨て LB broth を 500  $\mu\text{L}$  加えて沈渣を崩した後、再び同様に遠心分離を行い、LB broth を 500  $\mu\text{L}$  加えて沈渣を崩した。上記の操作で得た pYAK1 *dfnr-erm* / BW 500  $\mu\text{L}$  と CMCP6 500  $\mu\text{L}$  を混合し、7,000 rpm、4°C、3 分間遠心分離を行った。上清を捨て、沈渣を 2% Sodium Chloride-Luria-Bertani 寒天培地（以下 SLB 寒天培地とする）寒天培地上に置いた 1×1 cm ニトロセルロース膜上に滴下し、25°C で 10 時間静置培養した。培養後のニトロセルロース膜を、LB broth を 800  $\mu\text{L}$  入れたマイクロチューブに移し、Vortex を用いて激しく振盪することで、ニトロセルロース膜上に発育した菌体をすべて洗い落とした。マイクロチューブからニトロセルロース膜を取り出し、7,000 rpm、4°C、3 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を捨て、沈渣を崩した結果残った 100  $\mu\text{L}$  を TCBS 寒天培地（日水製薬株式会社）に播種し、

37°Cで一晩培養した。TCBS 寒天培地上に発育したコロニーを 20% sucrose 加 2% NaCl Heart Infusion broth 5 mL で 24 時間培養した。その後培養菌液 100 µL を 20% sucrose 加 TCBS 寒天培地に播種し、37°Cで一晩培養した。培地上に発育したコロニーをクロラムフェニコール (最終濃度 10 µg/mL) 加 TCBS 寒天培地と抗生剤無添加 TCBS 寒天培地の両方に播種し、抗生剤無添加 TCBS 寒天培地にのみ発育するクローンを選択した。

(5) PCR法による *fnr* と *erm* が置換されたことの確認

鋳型として、5. (4) で選択した各コロニーを超純水 17.5 µL に溶解し、そこにプライマーとして 10 µM up Fw (5'-GGATCCCTCGAGAGTTGGCGTTAA-3'; 下線部は *Bam*HI 認識部位)、10 µM down Rev (5'-CTGCAGAGTTTGAGTTATGAAGCCGTCGTTG-3'; 下線部は *Pst*I 認識部位) を各 1 µL、KOD FX Neo (TOYOBO) を 0.5 µL、2×PCR Buffer for KOD FX Neo を 25 µL、2mM dNTP を 5 µL を加え、PCR (polymerase chain reaction) チューブ内で混合した。混合後の PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、97°C -5 分、97°C -15 秒間、71.7°C -30 秒間および 68°C -3 分間を 1 サイクルとして 30 サイクルに設定し、DNA フラグメントを増幅した。増幅した DNA フラグメントをそれぞれ電気泳動により確認し、約 3.0kbp のバンドが確認できたクローンを *fnr::erm* とした。

4. *fnr* 相補株の作製

精製ゲノムを鋳型として 1  $\mu$ L、25  $\mu$ M のプライマー *fnr* Fw (5'- AAAAAGGATCCATTTCTGAAAAACCTGCACAAAG -3') と *fnr* Rev (5'- CTCGAGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTCTTTTGATA CGCCAGC -3') を各 1  $\mu$ L、Expand<sup>TM</sup> High Fidelity<sup>PLUS</sup> System (Roche) 付属のポリメラーゼを 0.5  $\mu$ L、polymerase buffer を 5  $\mu$ L、2 mM dNTP を 2  $\mu$ L を PCR チューブ中で混合し、滅菌超純水で全量を 50  $\mu$ L にした。混合液をサーマルサイクラーで、97°C-30 秒間、53°C-30 秒間および 72°C-1 分 30 秒間を 1 サイクルとして 25 サイクル反応させた。増幅した DNA 断片を pGEM<sup>®</sup>-T Easy ベクター (Promega) にクローニングした。このプラスミドを *Bam*HI (Takara Bio) および *Xho*I (Takara Bio) により制限酵素処理後、pACYC184 にクローニングし、*fnr* 相補プラスミドを作出した。*fnr::erm* にこのプラスミドを導入し得られた株を *pfnr* とした。

#### 5. *V. vulnificus* の好気条件下における成長曲線の作成

WT および *fnr::erm* を LB broth 5 mL 中で 37°C、15~18 時間振盪培養した。この培養液を用いて、分光光度計 (HITACH Model 100-10 spectrophotometer) により培養菌液の吸光度を波長 600 nm で測定した値 (以下 OD<sub>600</sub> 値とする) が 0.001 になるように LB broth で調整した菌液を 110 mL 用意した。WT と *fnr::erm* の菌液をそれぞれ 5 mL ずつ 21 本の中試験管に分注し、37°C で振盪培養した。0 時間から 10 時間

にかけて 2 時間毎に、WT と *fnr::erm* の培養菌液の OD<sub>600</sub> 値を記録し、成長曲線を作成した。

## 6. *V. vulnificus* の嫌気条件下における成長曲線の作成

### (1) 嫌気 LB broth の作製

ガラス瓶 (33 m/m × 63m/m : 日電理化硝子 Lot.3-30309) に LB broth を 5 mL 加えて、ブチルゴム栓 (日電理化硝子) を外気が行き来する程度開けておいた。それを W チャックスタンディングパウチ (三菱ガス化学) にアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) と共に入れて、チャックをしっかりと閉めて 37°C、48 時間放置した。チャックを開けずに、袋の外側からブチルゴム栓を完全に閉めた後、チャックを開いてガラス瓶を取り出すことで、嫌気状態となった LB broth を作製した。なお、LB broth 中に含まれたレサブリン (最終濃度 10 mg/L) が無色となった時点で、LB broth が嫌気状態になったと判定した。

### (2) 嫌気条件下における成長曲線の作成

WT および *fnr::erm* を LB broth 5 mL 中で 37°C、15~18 時間振盪培養した。OD<sub>600</sub> 値が 1.0 になるように菌液を LB broth で調整した。WT と *fnr::erm* が入った菌液をそれぞれ 1 mL の注射器 (TERUMO) で吸い、(1) に示した方法で嫌気状態にした LB broth が入っている 15 本のガラス瓶に 50 µL ずつ注入し、37°C で静置培養した。0 時間から 10 時間にかけて、2 時間毎に WT と *fnr::erm* の培養菌液の OD<sub>600</sub> 値を記録し、成長曲線を作成した。

## 7. 嫌気培養下でのグルコース添加最小培地内における増殖曲線の作成

### (1) 嫌気最小培地の作製

M9最小培地を基礎として0.05%のyeast extractを添加したものを最小培地とした(0.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  , 0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 g  $\text{NaCl}$ , 0.1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.12mM D-グルコース, 0.001% チアミン, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05g yeast extract, 100mL 蒸留水)。ここに、最終濃度50mMのグルコースを加えたものをグルコース添加最小培地とした。最小培地とグルコース添加最小培地を6.(1)と同様に扱い、嫌気培地とした。

### (2) 成長曲線の作成

6.(2)と同様に行った。

## 8. マウス腸管内と肝臓における Competition assay

### (1) 使用動物および飼育条件

5週齢♀ C57BL/6 マウス（日本チャールス・リバー株式会社より購入）を使用した。マウスは室温  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度40～60%、照明点灯時間 8：00～20：00 に設定された飼育室で飼育した。飼育期間中、実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社) と水（水道水）は自由に摂取させた。

### (2) 菌液の調整

WT および *fnr::erm* を LB broth 5 mL 中で  $37^\circ\text{C}$ 、12 時間振盪培養した。培養後の菌液 100  $\mu\text{L}$  を新たな LB broth 5

mL に植え継ぎ、37°C、2 時間振盪培養を行った。OD<sub>600</sub> 値が 1.0 になるように LB broth を用いて調整した。それを 4 本のマイクロチューブに 1 mL ずつ取り、7,000 rpm、4°C、3 分間遠心分離を行い、上清を捨てた。沈渣を 1 mL の 0.1%ゼラチン含有 PBS で再懸濁（4 倍濃縮）した。WT 懸濁液と  $\Delta fnr$  懸濁液を 500  $\mu$ L ずつ混合したものを接種菌液とした。

### (3) 菌数の算出

10<sup>7</sup> 倍まで 10 倍階段希釈した接種菌液のうち、10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> 倍希釈液をリファンピシン（最終濃度 50  $\mu$ g/mL）加 LB 寒天培地（LB rif 寒天培地）と、リファンピシン（最終濃度 50  $\mu$ g/mL）およびエリスロマイシン（最終濃度 50  $\mu$ g/mL）含有 LB 寒天培地（LB rif-em 寒天培地）にそれぞれ播種し、37°C で 12 時間培養後、コロニー数を測定した。WT の菌数は LB rif 寒天培地に形成されたコロニー数から LB rif-em 寒天培地に形成されたコロニー数を引くことで算出した。 $fnr::erm$  の菌数は LB rif-em 寒天培地に形成されたコロニー数から算出した。

### (4) マウス腸管内への接種菌液の接種

塩酸キシラジン（20 mg/mL）を PBS で 10 倍希釈した溶液を 0.006 mL/g (63 mL/kg B.W.)、マウスの腹腔内に投与した後、ジエチルエーテル麻酔下で解剖台に固定した。剣状突起の約 1 cm 下部で皮膚を正中切開し、白線に沿って 0.5 cm 程度腹膜を切開して十二指腸を体外へ露出させた。その後、露出した腸管の近位側を絹製縫合糸（シラカワ）で

結紮し、その結紮部位から約5 cm遠位側を緩く結紮し腸管ループを作成した。緩く結紮した部位のさらに遠位側から26G針付き注射器を用いて腸管ループ内に接種菌液100 μLを接種し、針を抜くと同時にしっかりと結紮した。腸管ループを腹腔内に戻し、絹製縫合糸で腹腔、および皮膚を結紮して閉腹した。

(5) 肝臓と腸管ループからの菌分離

接種10時間後にマウスをセボフルラン深麻酔下で安楽死させ、肝臓を摘出、または腸管ループを両端の結紮部位で切除・回収し、重量を測定した。その後、重量の9倍量の0.1%ゼラチン含有PBSに浮遊させてホモジナイズした。ホモジナイズ後の浮遊液を0.1%ゼラチン含有PBSで $10^8$ 倍まで10倍階段希釈し、その内 $10^5$ 倍から $10^8$ 倍希釈液をLB rif寒天培地とLB rif-em寒天培地に播種した。37°Cで12時間培養後、コロニー数を計測して8. (3) 菌数の算出の項と同様にWTと*fnr::erm*の菌数を算出した。

(6) Competitive index の算出

接種時の*fnr::erm*の菌数 (*fnr::erm* input) を接種時のWTの菌数で割った値 (WT input) を、10時間後に回収された*fnr::erm* (*fnr::erm* output) の菌数をWTの菌数 (WT output) で割った値で割りCompetitive indexとした。
$$(\textit{fnr}::\textit{erm} \text{ input} / \textit{WT input}) / (\textit{fnr}::\textit{erm} \text{ output} / \textit{WT output})$$

### III. 実験成績

#### 1. WTと*fnr::erm*の好気培養および嫌気培養における増殖性の比較

*E. coli* において、代謝機構を嫌気呼吸へとスイッチさせる Fumarate and nitrate reduction regulatory protein (FNR) が、低酸素環境への適応に重要なタンパク質として知られている [78]。そこで FNR が、*V. vulnificus* においても嫌気条件への適応に関与するか調べるため、*fnr* 遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子(*erm*)に置換することで *fnr* を欠失させた *fnr::erm* を作製し、好気培養および嫌気培養下での増殖性を WT と比較した。その結果、好気培養下において WT と *fnr::erm* の OD<sub>600</sub> 値は 0 時間から 10 時間までほぼ一致した (図 1A)。一方、嫌気培養下では、*fnr::erm* の OD<sub>600</sub> 値が、培養開始 2 時間後と 4 時間後において WT のそれと比較して有意に減少した (図 1B)。これらの結果は、FNR が嫌気条件下の *V. vulnificus* の増殖に必要であることを示唆している。これは、*E. coli* において FNR が嫌気条件下で活性化することで増殖するという報告と一致する [13, 28, 42]。すなわち FNR は、*V. vulnificus* においても好気呼吸から嫌気呼吸へと代謝機構を移行させる機能を担っていると考えられた。

#### 2. WTと*fnr::erm*のグルコース添加最小培地中での嫌気培養における増殖性の比較



*V. vulnificus* は嫌気環境においてグルコースを炭素源として使用することが知られている[46]。そこで実際にグルコースの代謝に FNR が関与しているか調べるために、WT、*fnr::erm*、および *pfnr* のグルコース添加最小培地における増殖性を比較した。グルコース非添加の最小培地ではすべての菌株において増殖は見られなかった（図 2A）。一方グルコース添加最小培地においては、WT と *pfnr* の増殖がみられた（図 2B）。また、それらと比較して *fnr::erm* の増殖性は低下していた（図 2B）。すなわち、FNR は *V. vulnificus* において嫌気環境下におけるグルコースの代謝に関与していることが示唆された。

### 3. 腸管ループ内と肝臓における Competition assay

魚介類と共に経口的に摂取された *V. vulnificus* は、腸管腔内の低酸素環境にさらされる。すなわち、腸管内環境へと適応するために、FNR の働きにより代謝機構を嫌気呼吸へ転換していると考えられる。そこで *V. vulnificus* が、腸管内で FNR によって低酸素環境へ適応しているか否か調査するために、腸管ループ内に 1 : 1 の WT と *fnr::erm* を接種し、10 時間後の腸管ループ内の存在比と肝臓中の存在比を算出する Competition assay を行った。腸管ループ内での Competition assay の結果、Competitive index は  $0.378 \pm 0.034$  となった (mean  $\pm$  S.E.M; 図 3)。これは、接種前には 1 : 1 であった WT と *fnr::erm* の存在比が、接種 10 時間後には 2.6 : 1 となったことを示している。また、肝臓内におい

ては  $0.243 \pm 0.123$  であり、腸管内における Competitive index との間に有意な差はなかった。これらの結果は、腸管内において生じた差は肝臓内においても維持されていることを示しており、*V. vulnificus* は腸管内においてのみ FNR を利用して増殖していることを示唆していた。

#### IV. 考察

経口感染において発症する原発性敗血症型 *V. vulnificus* 感染症の理解、および *V. vulnificus* における遺伝子ノックアウト技術や、生体を用いた感染実験技術とその解析手法の習得のために、経口感染における感染初期の増殖部位である腸管内における *V. vulnificus* の適応機構の解明を試みた。*E. coli* において嫌気環境への適応に必要な遺伝子である *fnr* の遺伝子欠損株 (*fnr::erm*) を作製し、嫌気環境下での増殖性を調査したのち、腸管内における増殖性を WT と比較した。その結果腸管内における低酸素環境への適応に、*fnr* が必要であることが明らかとなった。

作製した *fnr::erm* の最小培地における増殖性は、グルコースの添加により回復しなかった (図 2)。これらの結果は、*V. vulnificus* が嫌気環境において FNR を活性化し、グルコースを利用し、ATP を産生することを示唆している。*Vibrio* 科細菌の嫌気環境における ATP 産生機構には Nitrate や Fumarate を電子受容体として使う嫌気呼吸や、グルコースを解糖する発酵が挙げられる [46]。通常、細菌の嫌気呼吸における ATP 産生量は、好気呼吸の 1/2 程度、発酵においては好気呼吸の 1/18 であ

ることが報告されている[71, 77, 78]。このため、嫌気呼吸が、より嫌気環境下における ATP 産生量を高く保てると予測した我々は、はじめに Nitrate 添加最小培地と Fumarate 添加最小培地を使用して増殖曲線を作成した。しかしながら、WT の増殖性は回復しなかった（データは示していない）。これらの成績は、嫌気環境において、*V. vulnificus* の ATP 産生機構の大部分はグルコースの発酵により賄われていることを示唆している。

Competition assay の結果において、腸管ループ内における Competitive index の値は、WT と比較して有意に減少した。また、腸管ループ内で生じた WT と *fnr::erm* の存在比の差は、肝臓においても変化しなかった。これらの結果から、腸管内において増殖性が低下した *fnr::erm* は、腸管から肝臓へと侵入する頻度も同様に低いことが示唆される。当研究室の以前の研究によって、*V. vulnificus* を経口投与されたマウスが死に至る場合、腸管内における *V. vulnificus* の著しい増殖が認められるが、生残する場合はそれらが認められないことが、明らかにされている[40]。すなわち本研究結果から、*V. vulnificus* 経口感染において、腸管内における *V. vulnificus* の増殖を抑制することで、腸管外への侵入を抑制し、感染の進行を抑えることができると考えられた。

本章で習得した *V. vulnificus* における遺伝子操作技術、生体を用いた感染実験技術、およびその解析手法を用いて、第 2 章では、新規網羅的遺伝子同定法 **I**dentification of **S**pecific genes

using a **L**ibrary of **A**virulent **P**henotypes (ISLAP) 法の開発と確立を試みた。

図表

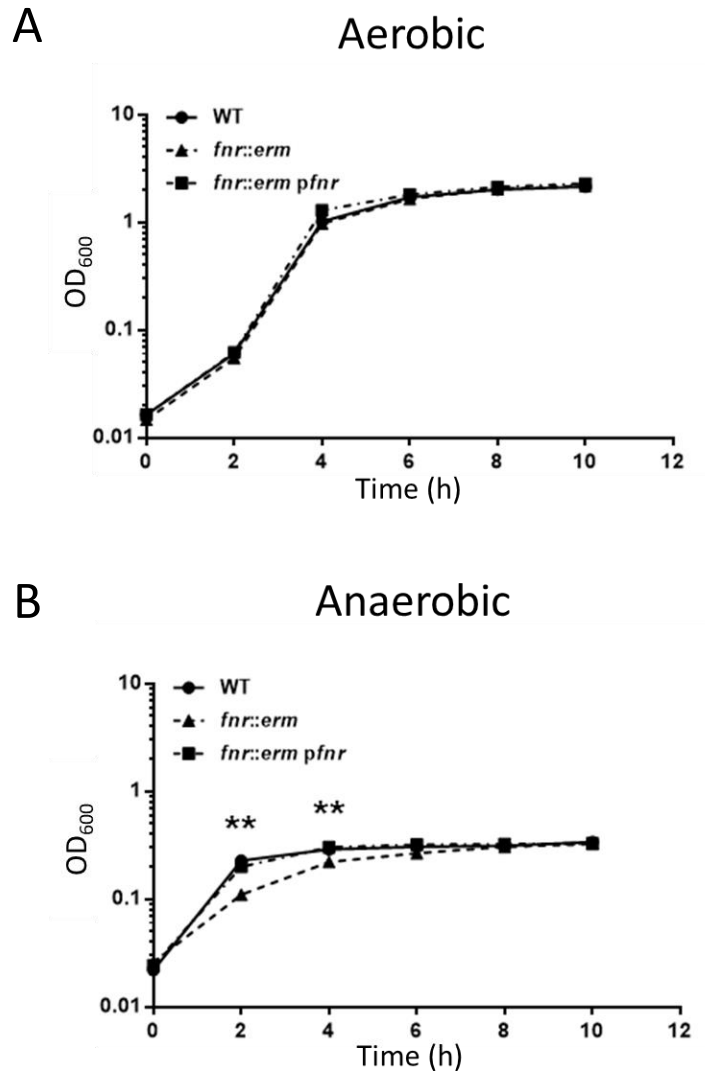


図 1 好気培養と嫌気培養における WT と *fnr::erm* の増殖性の比較

WT と  $\Delta fnr::erm$  をそれぞれ、Luria-Bertani (LB) broth 5ml 中で 37 °C、10 時間好気培養 (A)、または嫌気培養 (B) し、2 時間毎に OD<sub>600</sub> 値を測定した。エラーバーは S.E.M を示す。 \*\* $P < 0.01$ ; Dunn's multiple comparison test

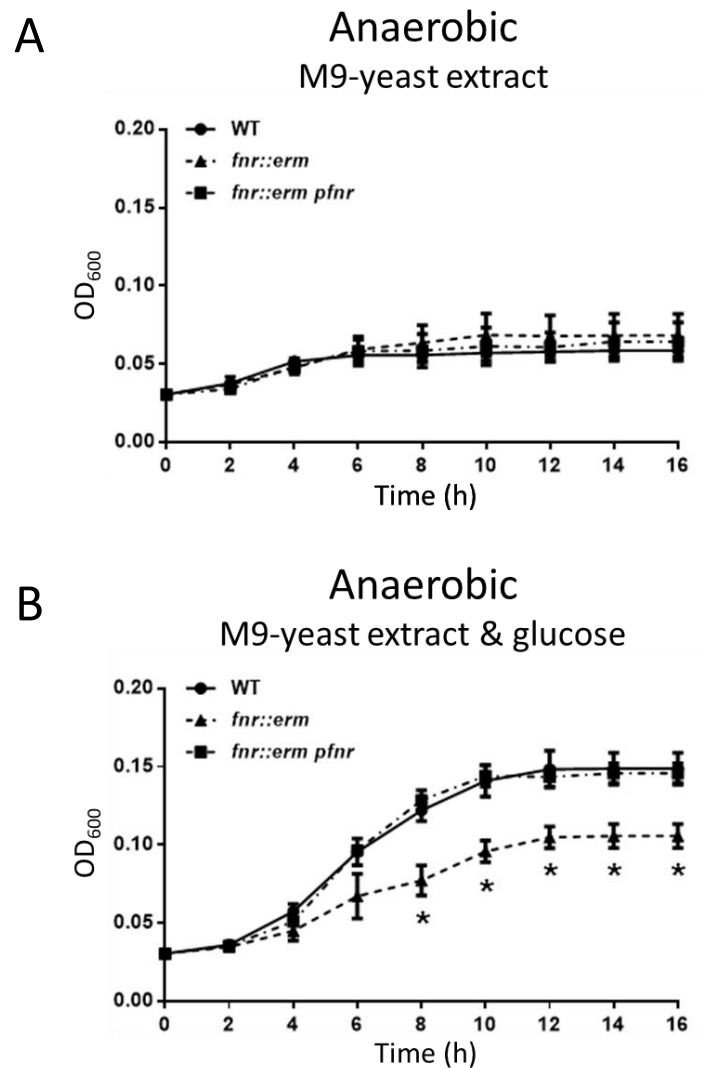


図 2 WT と *fnr::erm* のグルコース添加最小培地中での嫌気培養における増殖性の比較

WT と  $\Delta fnr::erm$  をそれぞれ、最小培地 (A) またはグルコース添加最小培地 (B) 5ml 中で 37 °C、16 時間嫌気培養し、2 時間毎に OD<sub>600</sub> 値を測定した。エラーバーは S.E.M を示す。 \* $P < 0.05$ ; Dunn's multiple comparison test

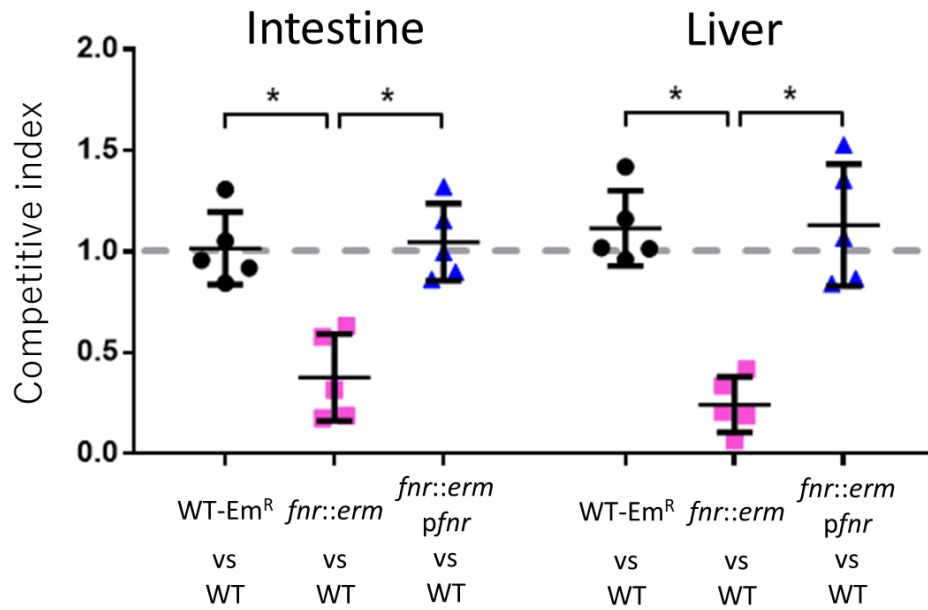


図 3 腸管ループ内と肝臓における WT と *fnr::erm* の Competition assay

WT と *fnr::erm* を LB broth で培養後、両者を 1:1 で混合し、腸管ループ内に接種し、10 時間後に腸管ループ内と肝臓に含まれる *V. vulnificus* 数を算出した。算出した CFU を基に WT と変異株の存在比 (Competitive index) を  $(fnr::erm \text{ input} / \text{WT input}) / (fnr::erm \text{ output} / \text{WT output})$  の計算式により算出した。エラーバーは S.E.M を示す。 \* $P < 0.05$ ; Dunn's multiple comparison test

## 第 2 章 新規病原遺伝子網羅的同定法 ISLAP 法の開発

### I. 緒言

近年、バイオインフォマティクスを利用した病原細菌の生体内発現遺伝子の同定技術は、目覚ましい発展を遂げている。生体内で増殖できないトランスポゾン変異株を選抜する STM 法[31]と Tn-Seq 法[61]、生体内で発現する遺伝子のプロモーター領域を同定可能な IVET 法[51]、生体内発現遺伝子を同定・定量可能な RNA-Seq 法[19]、および 1 菌体の発現遺伝子を同定・定量可能な LIANTI 法[14]など様々な手法が開発されてきた。我々の研究室ではこれまでに上記の中の一つの手法 STM 法を用いて *V. vulnificus* の生体内増殖機構の解明を目指してきた[81]。

*V. vulnificus* は 4,433 の遺伝子を持つことから、その 3 倍の 13,299 株の変異株を作製して STM 法に供し、生体内で生存不可能な変異株を 374 株取得した。それらのうち 70 株のトランスポゾン挿入遺伝子を同定し、予測される機能により分類した[81]。その結果、環境情報処理に関する遺伝子、栄養代謝に関与する遺伝子、および運動機能に関与する遺伝子に分類され、運動機能に関与する遺伝子が最も多かった。その後、運動機能が生体内における増殖・拡散に持つ役割を明らかにすることができたものの、他の遺伝子の生体内における役割はいまだ不明である。この例のように、生体内で発現する遺伝子の網羅的同定に成功しても、それらの生体内における機能を実証することは困難を極める。これは、冒頭に挙げた網羅的遺伝子同定法を含め、全ての方法に見出される問題点である。



そこで、第2章では、同定した生体内増殖に必須とされる多数の遺伝子の中から、増殖に必要な特定機能に関与する遺伝子のみを網羅的に選抜する、**I**dentification of **S**pecific genes using the **L**ibrary of **A**virulent **P**henotypes (ISLAP) 法の開発を試みた。

ISLAP 法では、病原細菌が逃避している宿主防御機構を破綻させた動物モデルを用意し、健常な動物では排除されるが、特定防御機構の破綻した動物のみで増殖可能な変異株を選択する。我々は、*V. vulnificus* が細菌感染における主要な防御機構である好中球による貪食を逃避する事実に着目し[30]、選抜対象とする遺伝子を、*V. vulnificus* の好中球逃避機構関連遺伝子とした。好中球を枯渇させたマウスを作製し、STM 法により取得した 374 株の弱毒変異株を用いて ISLAP 法を実施して、好中球からの逃避に必須の遺伝子を網羅的に選抜・同定した。得られた遺伝子のノックアウト株を作製し、そのノックアウト株の *in vitro* および *in vivo* における好中球逃避能を、好中球を枯渇させたマウスへの皮下接種およびヒト好中球細胞株を用いた phagocytosis assay により評価した。

## II. 材料および方法

### 1. 菌株

本研究に用いた *V. vulnificus* は韓国 Chonnam National University Hospital で感染患者より分離された CMCP6 株を Chonnam National University Medical School の Joon Haeng Rhee 教授より分与頂き、リファンピシン耐性を付与したものを使用した[15]。

pUTmini-Tn5 Km2 Tagおよび*E.coli* BW19795は岡山県立大学 山本耕一郎教授より分与頂いた。pUTmini-Tn5は複製起点としてR6Kを持つため、本プラスミドは*V.vulnificus*中で自殺ベクターとして働く。その他、本プラスミドは、Tn5トランスポゾン転移酵素遺伝子、I-O領域に挟まれたカナマイシン耐性遺伝子 (Km2)、および定常領域に挟まれたTag領域をコードしている。*E.coli* BW19795株にpUTmini-Tn5 Km2 Tagを形質転換し、カナマイシン (最終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加LB寒天培地でコロニーを選択し、これをpUTmini-Tn5 Km2 Tag/BWとした。

In vivo imaging systemにおける解析には、上記菌株に発光遺伝子クラスター (*luxCDABE*) を含むプラスミド pXen-13 (Xenogen, CA, USA) をWTまたは変異株に形質転換し、アンピシリン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加LB寒天培地上で選択後の菌株を使用した。

## 2. 好中球枯渇マウスの作製

### (1) 試薬

抗Ly6Gラットモノクローナル抗体およびアイソタイプコントロール抗体 (ラット IgG2a) はBioXCell (NH, USA)から購入した。

### (2) 好中球数の測定

アイソタイプコントロール抗体または抗Ly6G抗体を400  $\mu\text{g}$ 、マウスの腹腔内に投与した[49]。抗体投与前と投与24時

間後に尾静脈から血液を採取した。採取した血液 3  $\mu$ Lと57  $\mu$ Lのチュルク液 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) に加えた後、血球計算盤を用いて白血球の数を測定した。さらに、採取した血液をギムザ染色し、全白血球数と好中球数との比率を測定した。これらの数値から、末梢血中の好中球数を算出した。

### 3. ISLAP法の実施

#### (1)使用動物

5週齢♀のC57BL/6を日本チャールス・リバーより購入し、実験に使用した。全ての動物実験は北里大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された (承認番号 17-141)。

#### (2)Input poolの作製およびマウスへの皮下接種

96穴プレートにカナマイシン (最終濃度 50  $\mu$ g/mL) 加LB培地を各200  $\mu$ L 加えて、トランスポゾン挿入変異株を37°C、12時間静置培養した。培養後の菌液を全て試験管に収集し、半量をドットハイブリダイゼーションに用いるInput poolとして保存した。残った半量を、分光光度計を用いて濁度OD<sub>600</sub>を測定した。菌液をOD<sub>600</sub> = 1.0に調整し、7,000 rpm、3分間遠心分離した。上清を捨て、0.1%ゼラチン加PBSで再懸濁後、7,000 rpm、3分間遠心分離した。上清を捨て、LB培地で再懸濁した。懸濁液を10倍希釈し、接種菌液とした。接種菌数は10倍階段希釈した菌液をTCBS寒天培地に播種し37°C、12時間培養後にコロニー数を測定して算

出した。接種菌液を、アイソタイプコントロール抗体を腹腔内接種した健常マウスと抗Ly6G抗体を腹腔内接種した好中球枯渇マウスに接種し、設定したエンドポイントに達したマウスをセボフルラン吸引により、安楽殺した。

### (3) 生体通過後の Output pool の回収

トランスポゾン挿入変異株をマウスに皮下接種後、設定したエンドポイントに達したマウスを安楽殺したのち直ちに開腹し、脾臓を採取した。採取した脾臓の重量を測定し、9倍量の0.1%ゼラチン加PBSを加えた後、ラボミキサーIKA EUROSTAR デジタル (IKA) を用いて組織懸濁液を作製した。その組織懸濁液を800rpmで5分間遠心分離した。その上清100  $\mu$ Lをリファンピシン (最終濃度100  $\mu$ g/mL) 加LB寒天培地に播種し、37°Cで12時間培養後、集菌し Output pool とした。

### (4) Input pool と Output pool の比較

Input pool および Output pool は Tag 特異的 ドット ブロット ハイブリダイゼーション法により比較した。Input pool および Output pool に対するプローブは、以下のPCR条件において増幅することにより作製した。Tag pool を 7,500 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、超純水 1 mL を加えて再懸濁し、再び 7,500 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、超純水 1 mL を加えて再懸濁し、98°C で 5 分間熱変性させた後、冷却し 14,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離後、上清を粗精製ゲノムとした。希釈後の粗精製ゲノム 1  $\mu$ L、プライマーとして DIG206 (5'-DIG catggtacccattctaac-3') と DIG208

(5'-DIG tacctacaacctcaagct-3') をそれぞれ 1  $\mu$ L、KOD FX Neo polymerase kit (TOYOBO, Osaka, Japan) 付属のポリメラーゼを 0.5  $\mu$ L、polymerase buffer を 25  $\mu$ L、dNTP 5  $\mu$ L を PCR チューブ 中内で混合し、超純水で全量を 50  $\mu$ L とした。混合液をサーマルサイクラーにセットして、95°C -5分間を 1 サイクル、95°C -15秒間、59°C -45秒間および 68°C -10秒間を 1 サイクルとして 25 サイクルに設定し、pUTmini-Tn5 Km2 Tag の可変領域を増幅した。得られた PCR 産物をプローブとして用いた。

Tag 検出用メンブレンの作製は鋳型として各 Tag の可変領域の塩基配列から作製した 10  $\mu$ M のオリゴヌクレオチド 1  $\mu$ L、50 ng/ $\mu$ L のサケ ssDNA (和光純薬工業株式会社) 1  $\mu$ L、そして超純水 1  $\mu$ L の混合液を 98°C で 5 分間熱変性させた後冷却し、全量を Hybond™-N+ membrane (GE Healthcare) にスポットした。メンブレンを 37°C、12 時間乾燥させた後、CL-1000 Ultraviolet Crosslinkers (UVP, CA, USA) により 2 分間、紫外線架橋を行った。メンブレンを 0.4M NaOH に 5 分間浸漬後、2 $\times$ SSPE (20 $\times$ SSPE [NaCl<sub>2</sub> 最終濃度 3M、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 最終濃度 0.2M および EDTA 最終濃度 0.2M ; pH7.4] を 10 倍希釈) に 1 分間浸し、ローラーボトル内にメンブレンと 45°C に温めたハイブリダイゼーションバッファー 1 (20 $\times$ SSPE 2.5 mL、ブロッキング Reagent (Roche) 0.05 g、50 $\times$ Denhart's 試薬 (和光純薬工業株式会社) 0.6 mL および SDS 0.1 g を超純水で 10 mL にメスアップ) をいれ、ハイブリオーブン MHS-200e (eyelaco, Tokyo, Japan) を用いて 7 rpm、45°C の条件で 1 時

間、プレハイブリダイゼーションした。ローラーボトル内の溶液を捨て、ハイブリダイゼーションバッファー2 (20×SSPE 2.5 mL、ブロッキング Reagent 0.05 g、50×Denhart's試薬 0.6 mL、SDS 0.1 gおよびホルムアミド 5 mLを超純水で10 mLにメスアップ) と沸騰水中で5分、熱変性させたプローブを加えて、ハイブリオーブンをを用いて7 rpm、45°Cで2時間ハイブリダイゼーションした。40 mLのSSPE洗浄液 (20×SSPE 50 mLおよびSDS 5 gを超純水で500 mLにメスアップ) でハイブリオーブンをを用いて48 rpm、25°Cで5分間の洗浄操作を3回繰り返し、次いで、あらかじめ60°Cに温めておいた40 mLのSSPE洗浄液で48 rpm、10分間の洗浄操作を6回繰り返した。40 mLのバッファー1 (0.1Mマレイン酸、0.15 M 塩化ナトリウム；pH7.5) をローラーボトルにいれ48 rpm、15°Cで1分間洗浄し、次いで、30 mLのバッファー2 (最終濃度1%blocking stock solution、バッファー1で希釈) 中に15 rpm、15°Cで30分間振盪させた。AP標識抗DIG抗体Fabフラグメント (Roche, Tokyo, Japan) を2.5 mLのバッファー2で150 mU/mLに希釈した溶液を加えて7 rpm、37°Cで2時間反応させた。その後、40 mLのバッファー1で48 rpm、15°Cで15分間の洗浄操作を2回行った。メンブレンをバッファー3 (100 mmol/L Tris-HCl； 100 mmol/L NaCl； 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>； pH9.5) 中で2分間浸し、平衡化を行った。メンブレンの水分を拭い、CDPstar (Roche) により化学発光させ、Micro Chemi (DNR Bio Imaging System, Jerusalem, Israel)

を用いて撮影した。撮影後、Gel Capture (DNR Bio Imaging System) によって画像として出力した。

#### 4. Arbitrary primed (AP) -PCR法によるトランスポゾン挿入遺伝子の同定

Input pool でシグナルが検出され、Output pool においてシグナルが著しく減弱あるいは欠落した *V. vulnificus* のトランスポゾン挿入変異株から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) により、ゲノムを精製した。1st AP-PCR では、鋳型として約 200 ng の精製ゲノム、プライマーとして

P132 Arb1 (5'-ggccacgcgctcgactagtcannnnnnnnnnngatat-3')、  
P162 Arb3 (5'-ggccacgcgctcgactagtcannnnnnnnnnnttcaa-3')、  
P163 Arb4 (5'-ggccacgcgctcgactagtcannnnnnnnnnnccacg-3')、  
P164 Arb5 (5'-ggccacgcgctcgactagtcannnnnnnnnnnactga-3')、  
P133 Arb6 (5'-ggccacgcgctcgactagtcannnnnnnnnnnacgcg-3')、  
P165 Arb7 (5'-ggccacgcgctcgactagtcannnnnnnnnnntggca-3') をそれぞれ 1 μL と、pUTmini-Tn5 Km2 プラスミドへの tag の挿入方向が正方向の場合 p144 consensus1 I-out 1st (5'-ggtacctacaacctcaagct-3')、tag の挿入方向は逆方向の場合)p166 Rev consensus2 I-out 1st (5'-ccatgggtaagattggttcgaa-3' をそれぞれ 1 μL、Expand<sup>TM</sup> High Fidelity<sup>PLUS</sup> System (Roche) 付属のポリメラーゼを 0.5 μL、polymerase buffer (MgCl<sub>2</sub> 含有) を 5 μL、dNTP 2 μL を PCR チューブ中で混合し、超純水で全量を 50 μL にした。混合液をサーマルサイクラーにセ

ットし、95°C -5 分間を 1 サイクル、95°C -30 秒間、30°C -30 秒間および 72°C -4 分間を 1 サイクルとして 6 サイクル、95°C -30 秒間、45°C -30 秒間および 72°C -4 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル、72°C -4 分間を 1 サイクルに設定し増幅した。この増幅産物を鋳型として 1 μL、プライマーとして P134 Arb2nd (5'-ggccacgcgtcgactagtca-3') を 1 μL と、tag 挿入方向が正方向の場合 p145 consensus2 I-out 2nd (5'-gcttggttagaatgggtacc-3') あるいは tag 挿入方向が逆方向の場合 p167 Rev consensus1 I-out 2nd (5'-agcttggttagaatgggtacc-3') を 1 μL、Expand™ High Fidelity<sup>PLUS</sup> System (Roche) 付属のポリメラーゼを 0.5 μL、polymerase buffer (MgCl<sub>2</sub> 含有) を 5 μL、dNTP 2 μL を PCR チューブ中で混合し、超純水で全量を 50 μL にした。この混合液をサーマルサイクラーにセットし、95°C -1 分間を 1 サイクル、95°C -30 秒間、52°C -30 秒間および 72°C -4 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル、72°C -4 分間を 1 サイクルに設定し、増幅した。増幅産物の DNA シーケンス解析を FASMAC (Kanagawa, Japan) に外部委託することで解析した。

## 5. *V. vulnificus*変異株の作製

### (1) 0055 欠損株の作製

VV1\_0055 の上流の DNA 断片を増幅するために、精製ゲノムを鋳型として 1.5 μL、7.5 μM のプライマー 0055 Up Fw *Apa*LI (5'-CACTTAACGGCTGACATGGGGTGCACGGTGGTCACATTGCCATGG-3') と 0055 Up Rev (5'-



CCAGTTCCAGTTAGCATAGGTACGCTCCG -3') を各 1  $\mu$ L、CloneAmp<sup>TM</sup> HiFi PCR Premix (Takara Bio) を 12.5  $\mu$ L を PCR チューブ中で混合し、滅菌超純水で全量を 25  $\mu$ L にした。0055 の下流の DNA 断片を増幅するために、精製ゲノムを鋳型として 1.5  $\mu$ L、7.5  $\mu$ M のプライマー 0055 Down Fw (5'- CCTATGCTAACTGGAAGTGGTGGAAAAACGTGG -3') と 0055 Down Rev *Xho*I(5'- AAGGGGTGACGCCAAAGTATCTCGAGGCAATGGTGATGGTG AGTGCC -3') を各 1  $\mu$ L、CloneAmp<sup>TM</sup> HiFi PCR Premix (Takara Bio) を 12.5  $\mu$ L を PCR チューブ中で混合し、滅菌超純水で全量を 25  $\mu$ L にした。自殺ベクター pYAK1 を増幅するために、精製した pYAK1 プラスミドを鋳型として 1.5  $\mu$  L、7.5  $\mu$ M のプライマー pYAK1-5-out1 (5'- ATACTTTGGCGTCACCCC-3') と pYAK1-3-out1 (5'- CCCATGTCAGCCGTTAAG-3') を各 1  $\mu$ L、CloneAmp<sup>TM</sup> HiFi PCR Premix (Takara Bio) を 12.5  $\mu$ L を PCR チューブ中で混合し、滅菌超純水で全量を 25  $\mu$ L にした。全ての混合液をサーマルサイクラーで、98°C-10 秒間、55°C-15 秒間および 72°C-30 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させた。PCR により増幅された 0055 の上流を含む DNA 断片と下流を含む DNA 断片を In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて pYAK1 にクローニングし、ノックアウトベクター pYAK1-0055KO を作製した。pYAK1-0055KO を保持する *V. vulnificus* は 20%スクロース加 LB 培地中で培養し、相同組

換えを誘導した（第 1 章 材料と方法 3.(4)－(5)参照）。これにより得られた変異株を  $\Delta$  0055 とした。

(2) C 末端にヒスチジンを付加した 0055 を相補した株の作製

精製ゲノムを鋳型として 1  $\mu$ L、25  $\mu$ M のプライマー 0055 Fw (5'- AAAAGGATCCATGTCATGGCGACAACACAC -3') と 0055 6 $\times$ His Rev (5'- TTTTCTCGATTAGTGATGGTGATGGTGATGAAACGCAAACCTGCTTTTGCTC -3') を各 1  $\mu$ L、Expand<sup>TM</sup> High Fidelity<sup>PLUS</sup> System (Roche) 付属のポリメラーゼを 0.5  $\mu$ L、polymerase buffer を 5  $\mu$ L、2 mM dNTP を 2  $\mu$ L を PCR チューブ中で混合し、滅菌超純水で全量を 50  $\mu$ L にした。混合液をサーマルサイクラーで、97°C-30 秒間、53°C-30 秒間および 72°C-1 分 30 秒間を 1 サイクルとして 25 サイクル反応させた。増幅した DNA 断片を pGEM<sup>®</sup>-T Easy ベクター (Promega) にクローニングした。このプラスミドを *Bam*HI (Takara Bio) および *Xho*I (Takara Bio) により制限酵素処理後、pACYC184 にクローニングし、0055-His 相補プラスミドを作出した。(1)で作製した  $\Delta$  0055 にこのプラスミドを導入し得られた株を p0055 とした。

(3) 0056 欠損株の作製

(1)0055 欠損株の作製と同様に行った。使用したプライマーは、それぞれ、0056 Up Fw *Bgl*II (5'- GGGGTGACGCCAAAGTATAGATCTTTTTTTGAAGAAGCAAGACG -3')、0056 Up Rev (5'- GGTTTTTTCTCTTGATTAAAACGCAAACCTGCTTTTGCTC -3')

0056 Down Fw (5'-

TCAAGAGAAAAAACCATGATAAGACAGCTTGTCC -3')と

0056 Down Rev *Xho*I(5'-

CTTAACGGCTGACATGGGCTCGAGTTGTTTGCGGTAGTGAT

AATC -3')である。

#### (4) 0056相補株の作製

(2)と同様に行ったが、ヒスチジンは付加していない。使

用したプライマーは、それぞれ、0056 Fw (5'-

AAAAGGATCCTTGCGTTTTAAATCCCGACG -3') と 0056

Rev (5'- TTTTCTCGAGTCATGGTTTTTTCTCTTGATTGGG -

3') である。

## 6. 生存曲線解析

### (1)使用動物

5 週齢♀の C57BL/6 を日本チャールス・リバーより購入し、実験に使用した。全ての動物実験は北里大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された（承認番号 17-141）。

### (2)マウスへの *V. vulnificus* の接種および死亡時間の記録

*V. vulnificus* は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 100  $\mu$ L を新しい LB 培地に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整し、7,000rpm、3 分間遠心分離後、上清を捨て、0.1%ゼラチン加 PBS で再懸濁して、7,000rpm、3 分間遠心分離した。

上清を捨て、LB培地で再懸濁し、10倍希釈して、接種菌液とした。接種菌数は10倍階段希釈した菌液をTCBS寒天培地に播種し37℃、12時間培養後にコロニー数を測定して算出した。接種菌液を、マウスに皮下接種し、設定したエンドポイントに達したマウスをセボフルラン吸引により、安楽殺し、その時間を記録した。

### (3)統計分析

統計分析は、GraphPad Prism (MDF) を用いて行った。生存率および生存時間はKaplan-Meier生存曲線において、log-rank検定を用いて比較した。0.05未満のP値を有意差ありとした。

## 7. In vivoイメージング

### (1)使用動物

5週齢♀のBALB/cマウスを日本チャールス・リバーより購入し、実験に使用した。全ての動物実験は北里大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された(承認番号17-141)。

### (2)マウスへの *V. vulnificus* の接種および In vivo イメージング

pXen-13を保持する *V. vulnificus* をBALB/cマウスの大腿部皮下に接種した。3時間ごとにマウスを2.0%イソフルラン (Pfizer) の吸引により麻酔し、*V. vulnificus* から発せられる発光シグナルを、In vivo imaging systemにより検出した。

## 8. 筋肉組織内および脾臓中菌数の算出

### (1)使用動物

5 週齢♀の C57BL/6 を日本チャールス・リバーより購入し、実験に使用した。全ての動物実験は北里大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された（承認番号 17-141）。

### (2)筋肉組織内および脾臓中菌数の算出

*V. vulnificus* を皮下接種してから 9 時間後にマウスを安楽殺した。その後、*V. vulnificus* を接種した皮下組織の直下に存在する筋肉を鉗で切り取り、重量を測定した。採取した筋肉をホモジナイズ管に移し、筋肉重量の 9 倍量の 0.1%ゼラチン加 PBS を加えた後、ラボミキサー IKA EUROSTAR デジタル (IKA) を用いて組織懸濁液を作製した。その組織懸濁液を 800 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を採取した。上清および採血後の血液は 0.1%ゼラチン加 PBS で 10 倍階段希釈後、リファンピシン（最終濃度 100  $\mu\text{g/mL}$ ）加 LB 寒天に播種し、37°C、12 時間静置培養した。発育した *V. vulnificus* のコロニーを数え、組織 1 g 当たりの CFU 数を算出した。

## 9. In vitro phagocytosis assay

### (1)使用細胞株

ヒト白血病細胞株 HL-60 を、大阪大学 明田幸宏先生より分与頂いた。HL-60 は 10% FBS (F7524, Sigma-Aldrich) 含有 RPMI 1640 メジウム (R8758, Sigma-Aldrich) で、細胞密度が 1

$\times 10^6$  cells/ml を超えないように、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で継代・維持された。

## (2) HL-60 の好中球への分化

分化の方法は、以前の論文を参考とした[23, 66]。  $5 \times 10^5$  cells の HL-60 を 5mL の 10% FBS と 100mM Dimethylformamide (DMF) を含有した RPMI 1640 メジウムに懸濁し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で 5 日間培養することで好中球へと分化させた。分化した細胞の割合を、ギムザ染色した細胞の顕微鏡検査により計測した。

## (3) *V. vulnificus* のプレオプソニン化

*V. vulnificus* は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 100 $\mu$ L を新しい LB 培地に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整し、7,000rpm、3 分間遠心分離後、上清を捨て、Hank's バッファー (0.14 g CaCl<sub>2</sub>, 0.1 g MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 0.1 g MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.4 g KCl, 0.06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.35 g NaHCO<sub>3</sub>, 8 g NaCl, 0.048 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g D-グルコースを超純水で 1L にメスアップした。) で再懸濁して、7,000rpm、3 分間遠心分離した。上清を捨て、10% ヒト血清 (H4522, Sigma-Aldrich) 含有 Hank's バッファーで再懸濁し、15 分間 37°C で振盪培養した。培養後 50  $\mu$ L を 96 穴プレートに移した。

## (4) 分化好中球と *V. vulnificus* の共培養

*V. vulnificus* のプレオプソニン化の間に分化好中球の準備を行った。(2) で好中球に分化させた好中球  $1 \times 10^6$  cells を 160 $\times$

g、10 分間遠心分離し 10% ヒト血清含有 Hank's バッファーで再懸濁した。好中球懸濁液または好中球を含まない 10% ヒト血清含有 Hank's バッファー 50 $\mu$ L を (3) で菌液を加えた 96 穴プレートに加え (MOI=10)、45 分間 37°C で振盪培養した。

#### (5) 菌数測定と生存率の測定

好中球と *V.vulnificus* を共培養した後、培養液を 10 倍階段希釈し、100  $\mu$ L をリファンピシン (最終濃度 50  $\mu$ g/mL) 加 LB 寒天培地に播種し、37°C で 12 時間培養後、コロニー数を計測した。生存率は、(好中球含有ウェル中の CFU) / (好中球非含有ウェル中の CFU)  $\times$  100 により計算した。

#### (6) 統計分析

統計分析は、GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて行った。5 群間の統計学的有意差を、Kruskal-Wallis 検定を行った後、Dunn の多重比較検定により分析した。

### III. 実験成績

#### 1. 好中球枯渇マウスの作製

ISLAP 法を用いて好中球逃避機構に関与する遺伝子を網羅的に同定するためには、好中球を枯渇させたマウスを作製する必要がある。そこで、好中球特異的に発現する分子である Ly6G に対する抗体 (抗 Ly6G 抗体) を 400 $\mu$ g 腹腔内接種したマウスと、コントロールとなる Isotype 抗体を同量腹腔内接種したマウスをそれぞれ準備し、末梢血好中球数を 6 時間ごとに 24 時間まで計測した。その結果、抗 Ly6G 抗体接種 6 時

間後から末梢血好中球数は減少し、接種 24 時間後においてその減少率は 96% となった（図 4）。これらの結果から、抗 Ly6G 抗体接種 24 時間後のマウスを好中球枯渇マウスとし、ISLAP 法に用いた。

## 2. ISLAP 法の実施

前項において作製した好中球枯渇マウスと Isotype 抗体を接種した健常マウスに STM 法で取得した変異株[81]を皮下接種し、ISLAP 法を実施した（図 5）。ISLAP 法では、好中球が存在する健常マウスでは増殖できないが、好中球が存在しない好中球枯渇マウスでは増殖できる変異株を選抜する。STM 法で得られた変異株の中から、タグ番号が重複しない 39 株を用いて ISLAP 法を実施した。その結果、好中球枯渇マウスでのみ増殖できる変異株を 3 株取得することに成功した（図 5）。これらの変異株は好中球からの逃避に必要な遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異株であると考えられた。同様に ISLAP 法を繰り返し、最終的に 19 株の変異株を取得した。

## 3. ISLAP 法により取得した遺伝子の解析

前項で取得した 19 株の変異株におけるトランスポゾン挿入遺伝子を AP-PCR 法により同定した結果、既知の好中球逃避に関与する 9 遺伝子（表 1）と未知の好中球逃避に関与する 10 遺伝子が得られた（表 2）。既知の遺伝子を機能ごとに分類すると、鞭毛の構成タンパク質をコードする *fliF*、*fliH*、



および *fliK*、鞭毛の回転制御に関与する *pomA*、*motX*、*fliM*、および *cheY*、莢膜の形成に関与する *wza*、および鉄獲得に関与するシデロフォアのレセプター *iutA* であった（表 1）。*V. vulnificus* は鞭毛による運動性を利用して筋肉内に侵入し、好中球から逃避することが当研究室の山崎により明らかにされている[81]。また、莢膜により菌体表面の疎水度を減少させることで、好中球による貪食から逃れることも報告されている[9, 38, 80]。*V. vulnificus* は、Vulnibactin と呼ばれる鉄親和性の高いシデロフォアを放出する[58]。*V. vulnificus* は、鉄を結合した Vulnibactin を *iutA* にコードされるレセプターを介して菌体内に取り込むことで、鉄を利用し、生体内で増殖する[74]。一方、好中球は Lipocarin-2 と呼ばれるシデロフォアに親和性を持つ因子を放出することで、生体内に侵入した細菌から鉄を奪い、増殖を阻害する[10, 20]。このようにして好中球と *V. vulnificus* は鉄を奪い合う。以上、本研究により見出された既知の遺伝子の全ては、*V. vulnificus* の好中球逃避機構に関与していたことから、ISLAP 法により、病原細菌の好中球逃避機構に関与する遺伝子を網羅的に同定できることが証明された。

残りの未知の好中球逃避機構に関与する遺伝子には、菌体外環境の感知に関与する *barA* と Nitrogen regulation protein、菌体の分裂・増殖に関与する *mukB* と DNA helicase、および機能未知の 6 遺伝子が含まれていた（表 2）。*barA* は *uvrY* と two component regulatory system を形成し、様々な遺伝子の発現量を変化させることが知られているが[25, 47]、現在ま

で、好中球との関連性は報告されていない。*luxO* は、クォラムセンシング機構に關与する転写制御因子であり、*luxO* 欠損変異株では、好中球を傷害する毒素である Repeats in toxin (RTX)の発現量が低下すると報告されている[50, 69]。これらのことから ISLAP 法により得られた *luxO* 変異株の RTX 発現量は低下しており、そのため好中球逃避能が低下していたと考えられた。*mukB* と DNA helicase、および残りの 6 遺伝子は機能すら明らかにされておらず、当然ながら、好中球逃避機構への關与も不明である。これらのうち VV1\_0055 と VV1\_0056 (以下 0055 と 0056 とする)は連続してゲノム上に存在していた。近接して同方向に配置されていたことから、同時期に発現し、同じ機能に關与している可能性が高いと考え、これら 2 つの遺伝子が担う好中球逃避機構について解析することとした。

#### 4. 0055遺伝子欠損株と0056遺伝子欠損株の健常マウスと好中球枯渴マウスにおける致死性の比較

0055 と 0056 の好中球逃避機構における役割の解析にあたり、初めにそれぞれのノックアウト株 ( $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056) とその相補株 (p0055 と p0056) を作製した。作製した変異株の生体内における好中球逃避能を評価するために、それぞれの変異株、その相補株および WT を健常マウスと好中球枯渴マウスに皮下接種し、マウスの生存時間を比較した。その結果、 $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 を皮下接種した健常マウスの生存時間は、WT および相補株と比較して延長した (図 6 AB)。一方で

好中球枯渴マウスに皮下接種した場合、すべてのマウスにおいて生存時間に変化はなかった（図 6 AB）。これらの結果は好中球存在下でのみ  $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  のマウスに対する致死性が減弱していることを示しており、0055 と 0056 が *V. vulnificus* の好中球逃避機構に必要な遺伝子であることが明らかとなった。

## 5. 接種局所における $\Delta 0055$ と $\Delta 0056$ の増殖・拡散の観察

前項で、生体内における好中球からの逃避に 0055 と 0056 が必要であることが明らかとなったため、0055 と 0056 が創傷感染過程のどの段階で働くかを調査した。これまでの研究により、*V. vulnificus* の好中球による貪食は、皮下で効率的に行われることが明らかにされている [44, 81]。そこで、WT と変異株にルシフェラーゼをコードする発光プラスミドである pXEN-13 を導入し、*V. vulnificus* の創傷感染局所（大腿部）における変異株の増殖・拡散性を In vivo imaging system により観察した。その結果、WT においては接種後 6 時間まで感染局所における *V. vulnificus* の発光シグナルの増加・拡散が認められたが、感染 9 時間以降にそれらは減少した（図 7）。これは *V. vulnificus* が感染局所の皮下組織および筋肉組織の浅層部で増殖後、IVIS シグナルを検出することができない深部の筋肉組織内に達したことを示している [81]。一方  $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  の発光シグナルの増加・拡散は接種 9 時間後においても認められた（図 7）。これらの結果は、 $\Delta 0055$  と

Δ 0056 の筋肉組織深層部への侵入が好中球により妨げられていることを示唆している。

#### 6. 接種9時間後における筋肉内および脾臓中菌数の算出

生存曲線解析と In vivo イメージングの結果から Δ 0055 と Δ 0056 の筋肉組織深層部への侵入性が低下しており、このことがマウスの生存時間の延長を引き起こしていることが示唆された。マウスの死因は敗血症であり、死亡するマウスの全身循環からは多量の *V. vulnificus* が検出される[81]。そこで、Δ 0055 と Δ 0056 の接種において認められた筋肉組織深層部への侵入性の低下が、全身循環中の菌数に与える影響を調査するため、両変異株を健常マウスと好中球枯渇マウスに皮下接種し、9時間後における筋肉内菌数と脾臓中菌数を算出した。その結果、Δ 0055 と Δ 0056 の健常マウスにおける筋肉内菌数に有意差は認められなかったものの、WT および、それぞれの相補株の筋肉内菌数と比較し、減少傾向にあった（図 8 AB）。この傾向は、好中球枯渇マウスにおいては見られなかった（図 8 AB）。一方、Δ 0055 と Δ 0056 の脾臓中菌数は、健常マウスにおいて有意に減少しており（図 8 AB）、これは好中球枯渇マウスにおいて見られなかった（図 8 AB）。これらの結果から、Δ 0055 と Δ 0056 は、好中球の存在により筋肉内への侵入または筋肉内での増殖が抑制され、それに伴い全身循環への侵入が遅延し、マウスの生存時間が延長すると考えられた。

#### 7. Δ 0055 と Δ 0056 のヒト好中球に対する貪食抵抗性の調査

これまでの研究結果から、*V. vulnificus* は生体内で好中球から逃避すること、および、0055 と 0056 が感染局所における好中球からの逃避に必要であることが示唆された。そこで、好中球の主要機能である貪食に対する *V. vulnificus* の抵抗性に 0055 と 0056 が必要であるか否かを、ヒト白血病細胞株である HL-60 を用いた In vitro phagocytosis assay により調査した。HL-60 を 100 mM N,N-dimethylformamide (DMF) 含有 RPMI 内で 5 日間培養することで好中球に分化させた後、In vitro phagocytosis assay を実施した。その結果、Δ 0055 と Δ 0056 の Viability は、WT と比較して減少した (図 9)。すなわち、0055 と 0056 がヒト由来の好中球による貪食抵抗性にも必要であることが明らかとなった。

#### IV. 考察

バイオインフォマティクスと遺伝子解析法の発展により、生体内で発現する遺伝子を網羅的に同定する方法として、STM 法[31]、IVET 法[51]、RNA-Seq 法[19, 79]、Tn-Seq 法[61]、および LIANTI 法[14]など多数開発されている。しかし、これらのみでは、同定された遺伝子の生体内における機能を実証することは不可能である。そこで本研究では、バイオインフォマティクスと感染実験を融合することで、標的とした機能に関与する遺伝子を網羅的に同定可能な ISLAP 法を開発した。ISLAP 法は、特定の機構を欠損させたマウスにおいて STM 法を実施することにより、その機構に関与する遺伝子のみを網

羅的に同定できる手法である。本研究では、*V. vulnificus* の好中球逃避機構関連遺伝子群を標的とし、ISLAP 法を実施した。

ISLAP 法を実施した結果、好中球逃避に必要な 19 遺伝子を同定することに成功した。これらの遺伝子の中には、*V. vulnificus* において好中球逃避に関与することが既に知られている運動機能に関与する遺伝子、莢膜形成に関与する遺伝子、および鉄獲得に関与する遺伝子が含まれていた（表 1）。すなわち *V. vulnificus* が生体内において、1)運動性により好中球から逃避する、2)莢膜により貪食を逃れる、および、3) 感染局所において好中球よりも鉄を効率よく取り込むことで、効率的に増殖可能であることが明らかとなった。これらの成果は、ISLAP 法を使用することで、生体内における病原細菌の特定病原機構に関与する遺伝子を網羅的に同定でき、それらから病原機構を統合的に理解することが可能であることを証明している。

本研究で ISLAP 法を実施した結果、RTX は得られなかった。RTX は好中球の傷害に関与することが報告されているため、理論上、ISLAP 法により取得されるはずである[50]。これは ISLAP 法の基となる STM 法がネガティブセレクション法であることに起因すると考えられる。当研究室で確立した STM 法では、63 種類のトランスポゾン変異株を一度にマウスへ接種してアッセイ可能であるが、これら 63 株に RTX 非産生変異株が複数株含まれていたとしても、これら RTX 非産生株は、残りの変異株が産生・分泌する RTX の恩恵を受け、生体内で増殖することが可能であると考えられる。すなわち、STM 法では、分泌性

病原因子は取得できず、必然的に、STM 法を利用した ISLAP 法も同様である。これが、ISLAP 法の最大の欠点となる。

In vivo イメージングの結果において、 $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  の感染局所におけるシグナルは、接種 9 時間後においても残存していた（図 7）。これらの結果から  $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  の感染局所における増殖性は、遅延していることが予測されたため、接種 9 時間後の筋肉中の菌数を算出した。その結果、有意な差は得られなかったものの、 $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  の筋肉中菌数は、WT と比較し、微かであるが減少傾向にあった（図 8）。また、同時間における  $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  の脾臓中菌数は、WT と比較し、有意に減少していた。好中球による *V. vulnificus* の排除は皮下で効率的に行われることが明らかにされている[81]。そのため、*V. vulnificus* は活発な運動能により、好中球が感染局所へ遊走するよりも早く、栄養源豊富な筋肉中へと侵入し、増殖して、全身循環へと至ると考えられる[81]。 $\Delta 0055$  と  $\Delta 0056$  は皮下において好中球に貪食されやすくなっており、それに伴い筋肉へ侵入する菌数が WT と比較して減少傾向にあり、全身循環への侵入が遅延するため、健常マウスにおける生存時間が延長したと考えられた。

以上の結果から 0055 と 0056 が *V. vulnificus* の生体内における好中球逃避機構に関与することが明らかとなった。次章では、0055 と 0056 の機能解析を試みた。

図表

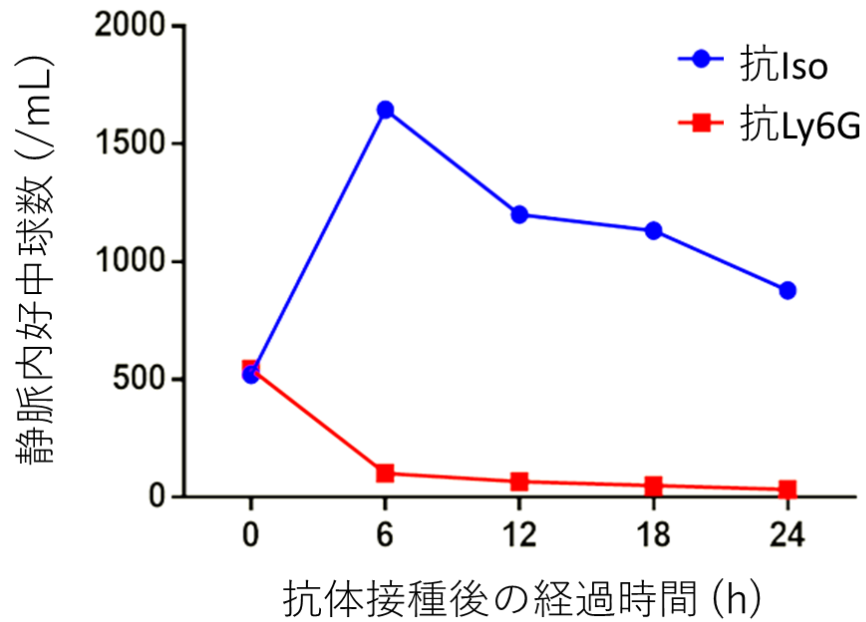


図 4  $\alpha$ -Ly6G 接種後の末梢血好中球数の推移

抗体を接種してから 6 時間ごとに尾静脈より末梢血を採取し、含まれる好中球をギムザ染色により計数した ( $n = 6/\text{group}$ )。



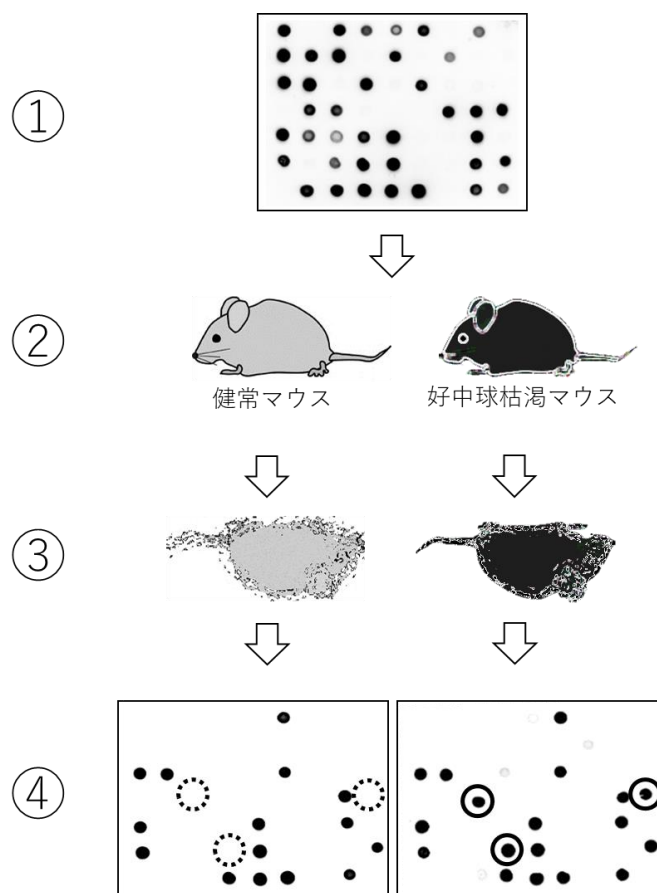


図 5 ISLAP 法の模式図（写真は実際のデータを使用した）

①弱毒株をまとめて Input pool とした。②Input pool を Isotype 抗体接種マウス（健康マウス）と Ly6G 抗体接種マウス（好中球枯渴マウス）に皮下接種した。③死亡したマウスの脾臓から菌を回収し、Output pool とした。④Input pool と Output pool に存在するトランスポゾン変異株をドットブロット法により比較し、健康マウスにて検出されないが好中球枯渴マウスにて検出される変異株を選抜した。

表 1 ISLAP 法により得られた好中球逃避に関与する既知の遺伝子

遺伝子番号	遺伝子名	予測機能
VV1_1935	flagellar M-ring protein <i>fliF</i>	鞭毛の構成 タンパク質
VV1_1937	flagellar assembly protein H <i>fliH</i>	
VV1_1940	flagellar hook-length control protein <i>fliK</i>	
VV1_0312	flagellar motor protein <i>pomA</i>	鞭毛の 回転制御
VV1_1300	sodium-type polar flagellar protein <i>motX</i>	
VV1_1942	flagellar motor switch protein <i>fliM</i>	
VV1_1953	chemotaxis protein <i>cheY</i>	
VV1_0786	polysaccharide export protein <i>wza</i>	莢膜形成
VV2_1016	aerobactin siderophore receptor <i>iutA</i>	鉄獲得因子

表 2 ISLAP 法により得られた好中球逃避に関与する機能未知の遺伝子

遺伝子番号	遺伝子名	予測機能
VV1_1573	hybrid sensory histidine kinase <i>barA</i>	Two component
VV1_3091	repressor protein <i>luxO</i>	regulatory system
VV1_2145	cell division protein <i>mukB</i>	細胞の分裂・増殖
VV2_0122	DNA helicase IV	
VV1_0055	putative transmembrane protein	機能未知
VV1_0056	membrane protein	
VV1_0065	transcriptional regulator	
VV1_0388	hypothetical protein	
VV1_1454	hypothetical protein	
VV1_2287	hypothetical protein	

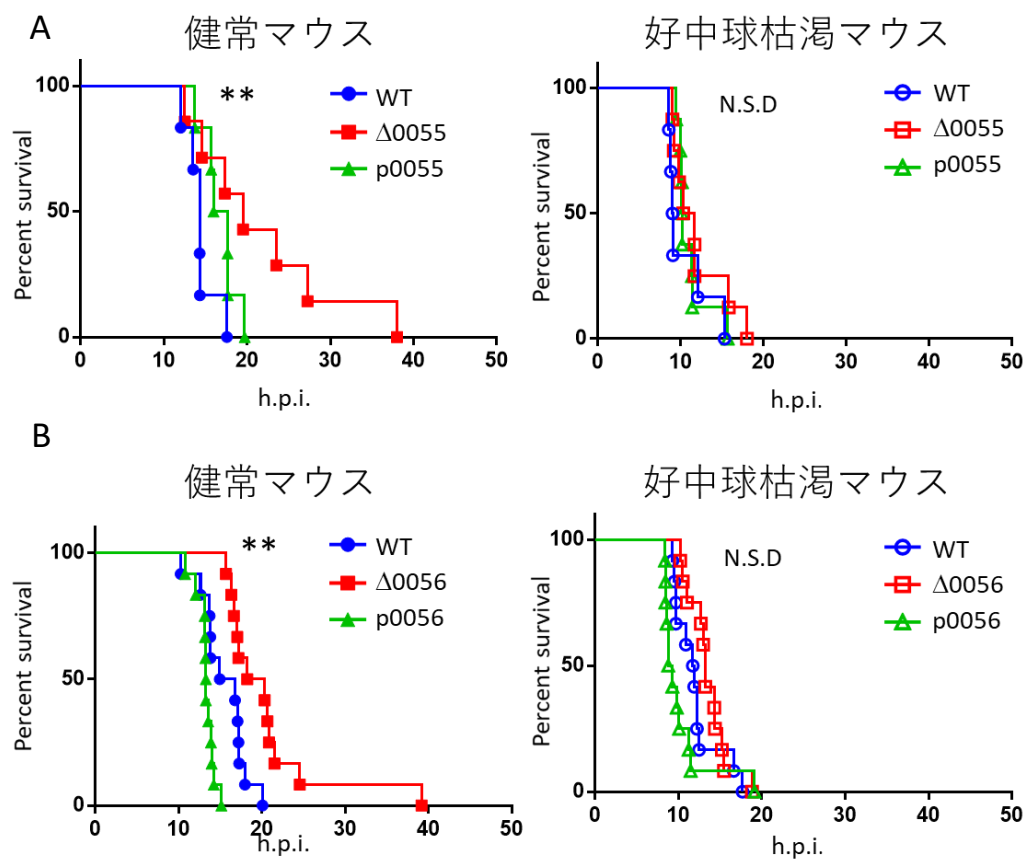


図 6 健常マウスと好中球枯渴マウスにおける WT と変異株の致死性の評価

(A) WT (n=6)、 $\Delta 0055$  (n=7)、および p0055 (n=6) または (B) WT (n=12)、 $\Delta 0056$  (n=12)、および p0056 (n=12) を健常マウスと好中球枯渴マウスに皮下接種 ( $10^6$  CFU/匹) し、Kaplan-Meier の生存曲線解析を行った。 \*\* $P < 0.01$ ; log-rank test

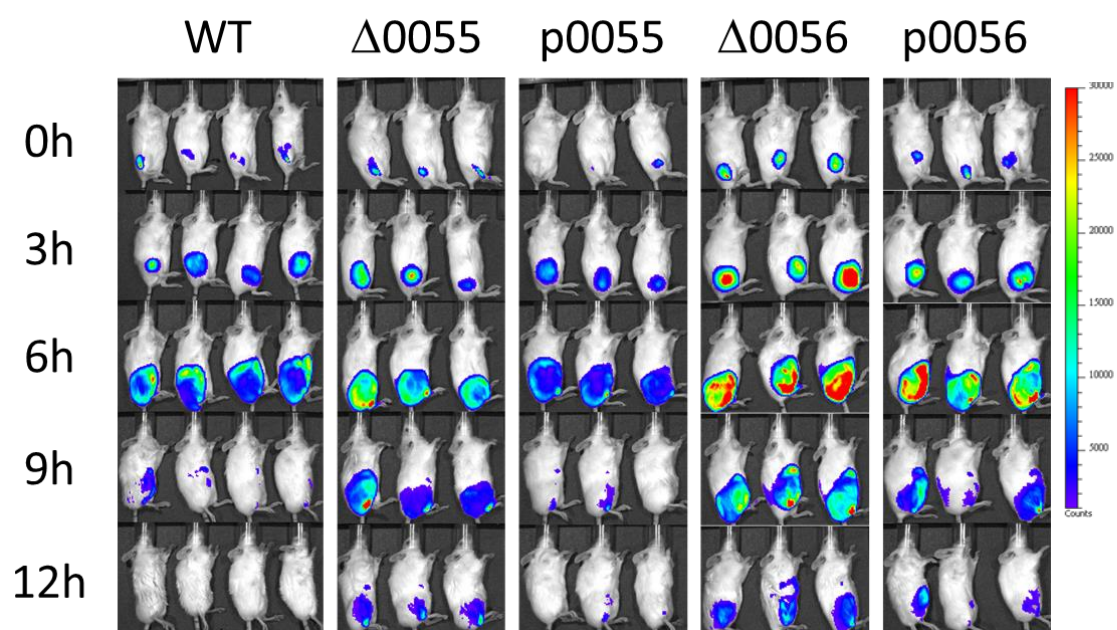


図 7 接種局所の大腿部皮下における *V. vulnificus* の拡散の観察

WT (n=4)、 $\Delta 0055$  (n=3)、p0055 (n=3)、 $\Delta 0056$  (n=3)、および p0056 (n=3) を皮下接種 ( $10^6$  CFU/匹) 後、3 時間毎に In vivo imaging system によって発光シグナルを検出した。

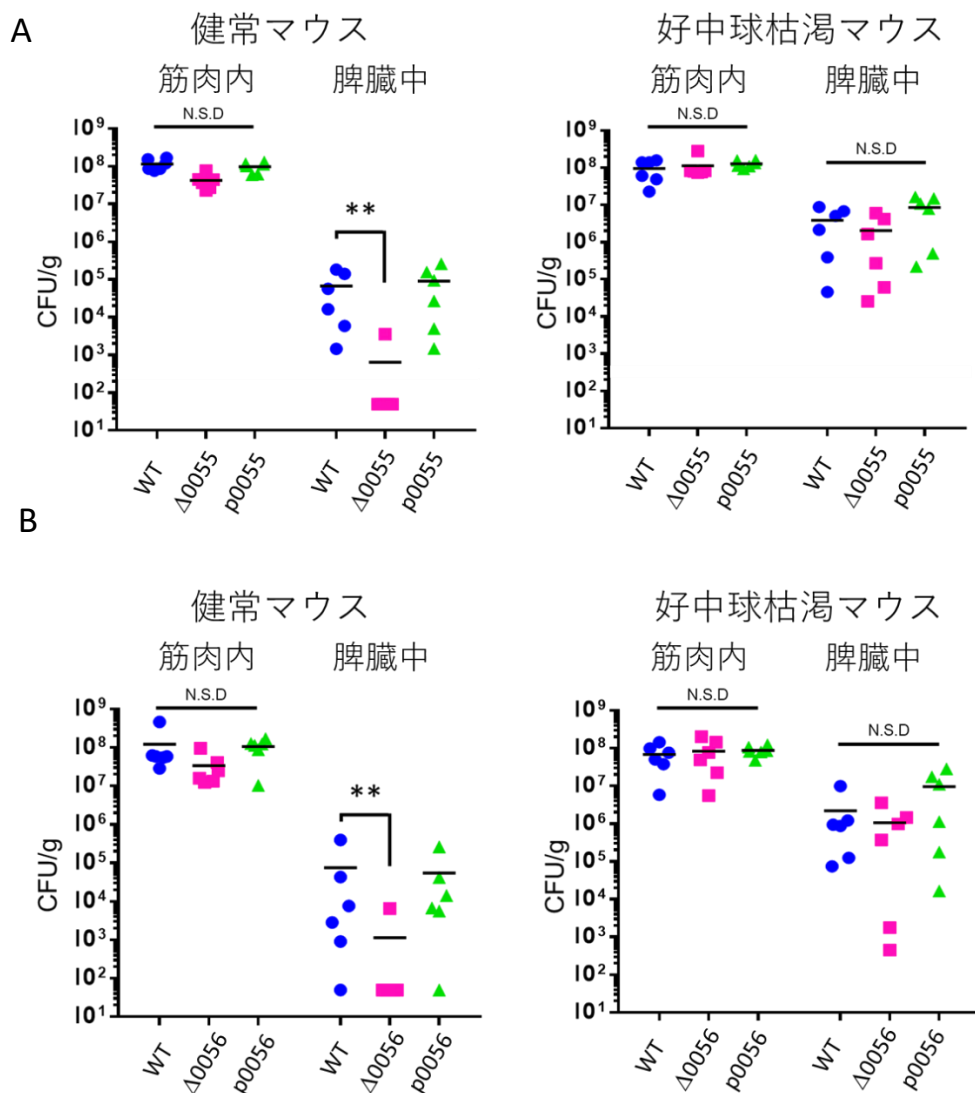


図 8 WT と変異株を健康マウスと好中球枯渇マウスに皮下接種し、9 時間後の筋肉内と脾臓中の菌数

(A) WT、Δ0055、および p0055、または (B) WT、Δ0056、および p0056 を健康マウスと好中球枯渇マウスに皮下接種 ( $10^6$  CFU/匹)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

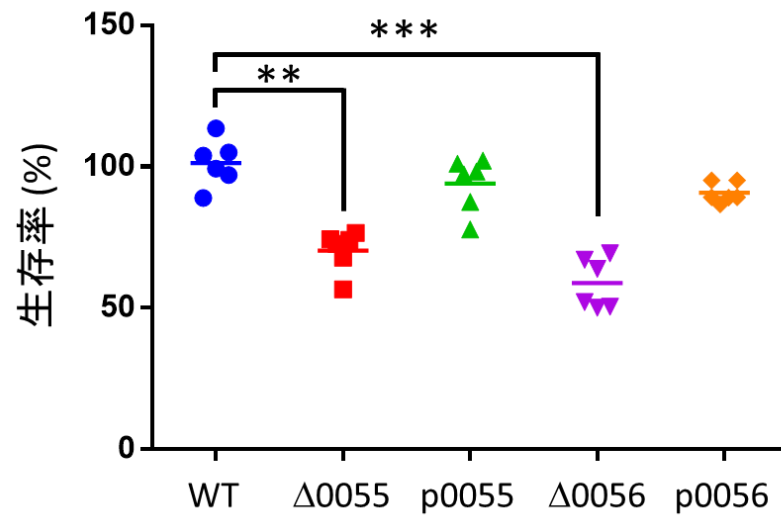


図 9 HL-60 を用いた In vitro phagocytosis assay

100mM DMF を含んだ培地中で 5 日間培養し、好中球に分化させた好中球を用いて In vitro phagocytosis assay (MOI=5) を行った。

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ ; Dunn's multiple comparison test

### 第 3 章 *V. vulnificus* の好中球逃避機構における 0055 と 0056 の機能解析

#### I. 緒言

*V. vulnificus* の創傷感染における潜伏期間は 16 時間と極めて短く [59]、その後、軟部組織の浮腫や壊死を中心とした急速な症状の進行が認められる [22, 38, 48, 73]。これらの事実は、*V. vulnificus* が健常人の感染局所における軟部組織において、自然免疫を凌駕して増殖可能であることを示している。そこで我々は、本研究において、免疫機構からの逃避に必要な遺伝子を網羅的に同定可能な ISLAP 法を開発し、特に、*V. vulnificus* の好中球逃避機構に焦点を絞り、その統合的理解を試みた。その結果、*V. vulnificus* は、生体内において、1) 運動性により好中球から逃避する、2) 莢膜により貪食を逃れる、および、3) 感染局所において好中球よりも鉄を効率よく取り込むことで、効率的に増殖することが明らかとなった (第二章)。またこれらに加えて、担っている好中球逃避機構が不明である 9 つの遺伝子を同定した。これら働きが不明である 9 つの遺伝子のうち、*V. vulnificus* のクロモソーム上に連続して位置していた 0055 と 0056 のそれぞれのノックアウト株を作製し、マウスに対する致死性と、感染局所における拡散・増殖性を解析した結果、0055 と 0056 は感染局所における好中球からの逃避に必要であることが明らかとなった。

第三章ではこの 0055 と 0056 が関与する好中球逃避機構を、データベースを用いたモチーフ解析、およびその予測に基づいた関連タ



ンパク質の同定により解析した。その結果 0055 と 0056 が、ストレスへの抵抗に必要な GroEL をペリプラズムに局在させる機能を持つことが明らかとなった。すなわち 0055 と 0056 は、*V. vulnificus* が好中球存在下で暴露されるストレスへの抵抗性に必要であることが示唆された。

## II. 材料および方法

### 1. 菌株

本研究に用いた *V. vulnificus* は韓国 Chonnam National University Hospital で感染患者より分離された CMCP6 株を Chonnam National University Medical School の Joon Haeng Rhee 教授より分与頂き、リファンピシン耐性を付与したものを使用した。CMCP6 を親株として作製した  $\Delta$  0055、 $\Delta$  0056、p0055 および p0056 の作製法は第二章に記した。

### 2. 外膜局在タンパク質の半定量解析

#### (1). 菌体外膜画分の精製

*V. vulnificus* は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 2.5mL を新しい LB 培地 50mL に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整し、14,000rpm、5 分間遠心分離後、上清を捨て、30mL の PBS で再懸濁して、再度 14,000rpm、5 分間遠心分離した。上清をきれいに取り除き、-20°C で 20 分静

置し、凍結させた。凍結サンプルを 1mL の Lysis Buffer (0.1mg/mL Lysozyme、10mM EDTA、cOmplete™ mini) に溶解し、1 時間氷上で静置した。静置後のサンプルをやさしく超音波破碎した (Amplitude を 5% 前後に設定し、5 秒 sonicate, 5 秒 stop を 8 サイクル)。PBS でサンプルを 1.4mL にメスアップし、13,000rpm、10 分間遠心分離後、上清を別のチューブに移し、再度 13,000rpm、10 分間遠心分離した。上清を 0.22 $\mu$ m フィルターに通し、超遠心分離用のポリアロマーチューブに移し、4°C、100,000 $\times$ g、1 時間遠心分離した。上清をきれいに取り除き、1mL の PBS をゆっくりと加えて、再度 4°C、100,000 $\times$ g、1 時間遠心分離し沈殿中のタンパク質を質量分析により解析した。

(2). 精製した外膜画分に含まれるタンパク質の質量分析による解析

以前の論文を参考にした[4]。超遠心分離後のサンプルを 0.1% RapiGest™ SF (Waters) 中に再懸濁し、最終濃度 5mM になるようにジチオトレイノールを加えた。次に最終濃度 15mM になるようにヨードアセトアミドを加えた後にトリプシン (Promega) によりタンパク質を消化した。トリプシン消化後のサンプルを、C18 カラム (0.1  $\times$  150 mm) ナノキャピラリー逆相液体クロマトグラフィー (Advance, Michrom BioResources) と イオントラップ型質量分析計 LTQ Orbitrap Velos™ (Thermo Fisher) により構成される LC-ESI-MS により解析した。移動相は、A: 0.1%ギ酸、B: アセトニトリルを用いてグラジェント溶離

とした。グラジエント条件は 5-40% B を 100 分かけて流速 500nL/min で行った。質量分析条件は次のとおりである。Mass scanning range ;  $m/z$  350–1500、Ion spray voltage ; ポジティブイオンモードにおいて 2.0 kV、collisional energy ; 35%、collision gas ; ヘリウムガス。ペプチドのフラグメント化には衝突誘起解離 (CID) を用いた。手得された MS/MS スペクトルは Mascot (Matrix science, London, UK) により解析した。検索設定は、NCBI prot 20180103 database cer. unknown (*Vibrio vulnificus* CMCP6 選択; 4,138 proteins) をデータベースとし、fragment-ion mass tolerance は 0.80 Da、parent ion tolerance は 10.0 ppm とした。最大 missed cleavage site 数は 1 に設定した。修飾に関しては、static modification としてシステインの Carbamidomethylation、dynamic modification としてメチオニンの oxidation とペプチド N 末端の acetylation を設定した。取得したデータを Scaffold3 に取り込み、Spectral counting 法 (Normalization 済み、Quantitative value 表示) によって半定量解析した。

### 3. 蛍光抗体法による GroEL の菌体内分布の観察

*V. vulnificus* は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 0.25mL を新しい LB 培地 5mL に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整し、4,500 × g、3 分間遠心分離後、上清を捨て、Hank's

バッファー (0.14 g  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g  $\text{KCl}$ , 0.06 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.35 g  $\text{NaHCO}_3$ , 8 g  $\text{NaCl}$ , 0.048 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g D-グルコースを超純水で 1L にメスアップした。) で再懸濁して、 $4,500 \times g$ 、3 分間遠心分離した。上清を捨て、3% (wt/vol) パラホルムアルデヒド含有 Hank's バッファーに置換し、室温で 15 分間インキュベートすることで細菌を固定した。固定された細菌は、0.5mL の Hank's バッファーで、遠心洗浄後、1mL の Hank's バッファーで再懸濁し、0.02mL をカバースリップ上に風乾した。風乾したカバースリップを PBS で 2 回洗浄し、超純水で 1 度洗浄した後、0.5% TritonX-100 含有 PBS を満載し、室温で 15 分間インキュベートした。カバースリップを PBS で 2 回洗浄し、超純水で 1 度洗浄した後、10%の牛胎児血清を含んだ PBS (以下 10% FBS in PBS とする) で 1,000 倍に希釈した抗 GroEL 抗体 (MBL) を添加し、室温で 45 分間インキュベートした。カバースリップを PBS で 2 回洗浄し、超純水で 1 度洗浄した後、10% FBS in PBS で 10,000 倍に希釈した Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 標識抗ウサギ抗体 (Molecular Probe) を添加し、室温で 45 分間インキュベートした。共焦点レーザー顕微鏡 (ZWISS LSM710) を用いて、菌体内の GroEL の分布を観察した。

#### 4. 菌体成分の分画

##### (1). ペリプラズム画分と細胞質画分の分画

ペリプラズム画分と細胞質画分の分画には以前の論文を参照した[3]。*V. vulnificus* は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 2.5mL を新しい LB 培地 50mL に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整し、4°C、12,100 × g、5 分間遠心分離後、上清をきれいに取り除き、0.75mL の 0.2M Tris-HCl (pH8.0) で再懸濁して、15mL チューブに移した。そこに、0.5mL の 1M スクロース溶液、0.05mL の 10mM EDTA (pH8.0)、0.05mL の Lysozyme (2mg/mL)、および 1.6mL の滅菌 DW を順にひとつずつ加え、加えるたびに転倒混和した後、室温で 10 分間静置した。静置後、3,000rpm、15 分間遠心分離し、上清を別の 15mL チューブに移し、トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿法により濃縮したものをペリプラズム画分とした。沈査は 0.5mL の 10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.1% deoxycholate に再懸濁し、4°C、12,000 × g、20 分間遠心分離した。その遠心上清を別のチューブに移して細胞質画分とした。

## (2). 外膜画分の分画

外膜画分の分画には以前の論文を参照した[75]。*V. vulnificus* は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 2.5mL を新しい LB 培地 50mL に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整し、4°C、7,000 × g、20 分間遠心分離後、上清を取

り除き、10mL の cOmplete™ mini 含有 10mM HEPES (pH7.4) で再懸濁して、超音波破碎した (Amplitude を 30% に設定し、3 秒 sonicate, 6 秒 stop を 20 サイクル)。超音波は最後に 4°C、2,600×g、30 分間遠心分離後、上清を超遠心分離用のポリアロマーチューブに移し、4°C、100,000×g、1 時間超遠心分離した。上清をきれいに取り除き、5mL の 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt 含有 0.1M Tris-HCl (pH7.2) で再懸濁し、再度 4°C、100,000×g、1 時間遠心分離した。超遠心分離後の沈査を外膜画分とした。

(3). ウェスタンブロッティングによるそれぞれのタンパク質に局在するタンパク質の検出

試料を SDS-PAGE (10% アクリルアミドゲル) 後、Western transfer buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS、10% メタノール; pH 8.3) に浸して平衡化し、15 分間ゆっくり振盪した。同時に PVDF メンブレン (MILLIPORE Immobilon®-P transfer membranes) をメタノールに 1 分間浸した後、Western transfer buffer に移し、15 分間ゆっくり振盪した。転写装置 (TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL) に Western transfer buffer に浸した 2 枚のろ紙を置き、その上に PVDF メンブレン、ゲル、ろ紙 (2 枚) の順に重ね、パワーサプライ (POWER PAC™ 200) を用いて 15 V で 60 分間転写した。転写後、PVDF メンブレンを 0.5% Tween 20 加 PBS (以下 PBS-T とする) に 5% スキムミルクを加えた 5% スキムミルク加 PBS-T に浸し、37°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキ

ング後のメンブレンを PBS-T で軽く洗浄し、このメンブレンと 10%FBS 含有 PBS-T で 1,000 倍希釈した、抗マルトース結合タンパク質 (MBP) 抗体 (Bioss)、抗 GroEL 抗体または 2000 倍希釈した抗外膜タンパク質 A (OmpA) 抗体 (CUSABIO) を 4°C で一晩反応させた。または、1,000 倍希釈した抗 RNA ポリメラーゼ抗体 (abcam) または抗ヒスチジン抗体 (Roche) を室温で 1 時間反応させた。反応後のメンブレンを PBS-T に浸し、5 分間の振盪を 2 回、20 分間の振盪を 1 回行って洗浄した。洗浄後、10%FBS 含有 PBS-T で 2,000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRPO) 標識抗ウサギ抗体 (ICN) あるいは、HRPO 標識抗マウス抗体 (abcam) とメンブレンを室温で 1 時間反応させた。反応後、5 分間の振盪を 2 回、20 分間の振盪を 1 回行って洗浄した後、Immuno Star LD (和光純薬工業株式会社) と室温で 1 分間反応させ、発光・蛍光撮影出力装置 (BERTHOLD Micro Chemi) を用いてシグナルを検出した。

#### 5. 免疫沈降アッセイによる 0055 と GroEL の相互作用の検出

0055-His を発現する p0055 は 5 mL の LB 培地で 37°C、12 時間振盪培養した。培養した菌液 5mL を新しい LB 培地 100mL に植え継ぎ 37°C、2 時間振盪培養した。分光光度計を用いて OD600 にて培養後の菌液の濁度を測定した。それを OD600 = 1.0 に調整し、4°C、9,100 × g、5 分間遠心分離後、上清をきれいに取り除き、20mL の PBS で再懸濁することで遠心洗浄を行った。遠心洗浄を合計 3 回繰り返した

後、cOmplete™ mini 含有 DW1350 $\mu$ L で再懸濁し、Micro Tip により超音波破碎した。超音波破碎後 150 $\mu$ L の 1M NaCl in 100mM Tris-HCl (pH8.0)を加えて 4°C、13,000rpm、10 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し、再度 4°C、15,400 $\times$  g、10 分間遠心分離した。上清を 700 $\mu$ L ずつ 2 本のチューブに分けて、片方には 50 $\mu$ L の PBS を、もう片方には 50 $\mu$ L の プロテイン A アガロース結合抗ヒスチジン抗体 (MBL) を加えて、4 °Cで一晩転倒混和した。混和後、4°C、2,200 $\times$  g、1 分間遠心分離し上清を除き、0.5mL の 100mM NaCl in 10mM Tris-HCl (pH8.0)で再懸濁することで、遠心洗浄を行った。合計 3 回の遠心洗浄の後、沈査に 0.5mL の 100mM Glycine-HCl (pH3.0)を加えてタッピングし、抗原抗体反応の解離を行った。4°C、2,200 $\times$  g、1 分間遠心分離し上清 0.45mL を、50 $\mu$ L の 1M NaCl in 100mM Tris-HCl (pH8.0)が入ったチューブに移した。これをメタノール-クロロホルム沈殿法により濃縮し、質量分析により解析した (前項参照)。

### III. 実験成績

#### 1 . 0055と 0056のモチーフ解析および膜貫通領域予測

ISLAP 法により検出された未知の好中球逃避機構に関与する 9 つの遺伝子のうち、0055 と 0056 はクロモソーム上に連続して存在していたことから、これらふたつの遺伝子を解析することとした。0055 と 0056 の機能を予測するため、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)によりモチーフ解析



を行った結果、0055にはシグナルシーケンスと、リポプロ  
テインの輸送に関与する LolA のモチーフが含まれていた（図  
10A）。なお、TMHMM Server v. 2.0  
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)により膜貫通領域を  
予測したが、膜貫通領域は存在しなかった（データは示してい  
ない）。LolA は、ペリプラズムにおいて、内膜に局在する  
LolCDE 複合体からリポプロテインを受け取り、外膜に局在す  
る LolB へと渡すタンパク質であることが知られている[26,  
54]。これらのことから、0055 の機能は LolA と類似している  
と考えられた。一方、0056 には Mycobacterial membrane  
protein Large (MMPL) ファミリータンパク質とそのヌクレオチ  
ドバインディングドメイン、および AcrB タンパク質のドメイ  
ンが含まれていた（図 10B）。MMPL ファミリータンパク質  
は、脂質の輸送に関与する ABC トランスポーターである  
[17]。AcrB タンパク質は、グラム陰性細菌において抗生物質  
の菌体外への排出に関与する AcrABZ タンパク質複合体のサブ  
ユニットのひとつで、菌体内膜に局在する[5]。加えて、膜貫  
通領域予測を行った結果、12 回膜貫通型のタンパク質である  
と予測された（図 10B）。これらの結果から、0056 は菌体内膜  
に局在する脂質トランスポーターであることが示唆された。以  
上の結果から、0055 と 0056 は、*V. vulnificus* の好中球逃避機  
構に関与する未知のタンパク質の外膜への輸送に関与すると考  
えられた。

## 2. 0055と0056周囲の遺伝子の解析

0055 と 0056 が輸送しているタンパク質を予測するため、クロモソーム上で 0055 と 0056 の周囲に存在する遺伝子を、KEGG データベースを利用して調査した。その結果、0055 および 0056 は、VV1\_0045 から VV1\_0061 の同一方向を向いた 17 遺伝子の中に含まれていた（図 11）。細菌において、このように近接して同方向に配置された遺伝子は、同時期に発現し、同じ機能に関与している可能性が高い。加えて、17 遺伝子中 11 の遺伝子がタンパク質にアシル基を付加するアシル化に関与するものであった（表 3）。タンパク質のアシル化は翻訳後修飾の一種であり、lolA に輸送されるリポプロテインもアシル化タンパク質のひとつである [57]。これらの結果から、0055 と 0056 が輸送に関与するタンパク質は、リポプロテインである可能性が示唆された。

### 3. 外膜に局在するタンパク質の半定量解析

0055 と 0056 が外膜へのタンパク質の輸送に関与することが示唆されたことから、 $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 の外膜画分を超遠心分離により粗精製し、外膜に局在するタンパク質を LC-ESI-MS により同定したところ、10 種類のタンパク質が検出された。それらタンパク質の半定量解析を Spectral counting method により行い、WT を基準としたタンパク質量の変化を Fold change として表し、ヒートマップ解析を行った。その結果  $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 の両者において減少し、それぞれの相補株においてその量が WT と同程度に回復していたタンパク質として 2 種類の GroEL のみが検出された（図 12）。GroEL

は、菌体の細胞質内において変性したタンパク質を捕捉し、再度、折りたたむ役割を持っている[6, 7, 12, 21]。また、*Vibrio cholerae*において、菌体に含まれる全てのGroELのうち、30%前後のGroELがペリプラズムまたは外膜に存在することが報告されている[39]。しかしながら、GroELのペリプラズムまたは外膜への局在メカニズムは未だ明らかにされていない。

#### 4. GroELの蛍光顕微鏡下での観察

0055 と 0056 が GroEL の輸送に関与することが示唆されたことから、菌体内における GroEL の分布を蛍光顕微鏡により観察した。抗 GroEL 抗体により染色された GroEL は、WT とそれぞれの相補株においては菌体全体に分布していた。一方  $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 においてはその分布が変化しており、菌体の両端や、中央部に強いシグナルを発する部位がみられた（図 13）。これらの結果は、0055 と 0056 が GroEL の局在に関与することを支持するものである。

#### 5. 超遠心分離による細胞分画における GroEL の局在解析

これまでの結果から、0055 と 0056 が GroEL の局在に関与することが示唆されている。そこで超遠心分離により、菌体を細胞質画分、ペリプラズム画分、および外膜画分に分離・精製し、それぞれの画分に局在する GroEL をウェスタンブロッティングにより検出した。GroEL の解析の予備実験として、まずは各画分の精製度を、それぞれの画分に存在

することが明らかなタンパク質を使用して確認した（図 14）。細胞質局在タンパク質として RNA ポリメラーゼを、ペリプラズム局在タンパク質としてマルトース結合タンパク質（MBP）を、外膜局在タンパク質として外膜タンパク質 A（OmpA）に対する抗体を使用した。その結果、各画分において、それぞれの画分に局在するタンパク質のみが検出されたため（図 14）、正確に分画できていることが明らかとなった。そこで、本分画手法を用いて GroEL の局在を解析した（図 15）。その結果、WT において GroEL は、細胞質内とペリプラズムに検出されたが、外膜には検出されなかった（図 15）。そこで、WT、 $\Delta$  0055、 $\Delta$  0056 およびそれぞれの相補株のペリプラズムに GroEL が局在するか否かを解析した。その結果、GroEL は WT とそれぞれの相補株のペリプラズムに検出されたが、 $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 のペリプラズムには検出されなかった（図 15）。これらの結果は、0055 と 0056 が GroEL のペリプラズムへの局在に関与することを示している。

## 6. 0055の局在、および0055とGroELの相互作用の解析

これまでの結果から、0055 と 0056 が GroEL のペリプラズムへの局在に必要であることが明らかとなった。実験成績 1.において、0055 は LolA と類似したタンパク質であると予想された（図 10）。LolA は、ペリプラズムに局在し、内膜に局在する LolCDE 複合体からリポプロテインを受け取り、外膜に局在する LolB へと渡すタンパク質である[26, 54]。

これらの事実から、0055 も、1) ペリプラズムに局在しており、2) 輸送対象であると思われる GroEL と結合して、ペリプラズムへと誘導する、ふたつの性質を持つと考えられた。そこでまず、0055 の局在を前項の分画法により確認した (図 16)。これまで使用してきた相補株 p0055 が発現している 0055 の C 末端には 6×ヒスチジンタグが付加されており、抗ヒスチジン抗体により 0055 を検出することが可能である。分画の結果、0055 は予想された通りペリプラズムに局在することが明らかになった (図 16)。次に 0055 と GroEL が結合しているか否か検討するため、免疫沈降アッセイを実施した。p0055 の破碎産物を作製し、二つに分け、片方には PBS を、他方にはプロテイン A アガロース結合抗ヒスチジン抗体を加え、遠心分離と PBS による洗浄を繰り返して、それぞれに含まれるタンパク質を LC-ESI-MS により同定した。これにより検出されたタンパク質の半定量解析を Spectral counting method により行った。算出されたデータを用いて PBS 添加サンプルを基準として、抗ヒスチジン抗体添加サンプル内におけるタンパク質量の変化を Fold change として表し GroEL の量的変化を解析した。その結果、抗ヒスチジン抗体の添加により、検出されたタンパク質量は、VV1\_1260 GroEL において 1.6 倍、VV2\_1134 GroEL においては 2.13 倍増加した (表 4)。これらの結果は、0055 が GroEL と相互作用することを示唆するものである。

#### IV. 考察

本章では、*V. vulnificus* の新規好中球逃避機構を解明するために、第 2 章で同定した好中球逃避に必要な新規遺伝子である 0055 と 0056 の機能解析を行った。データベースを用いた機能予測と、それに基づいたタンパク質の局在解析の結果、0055 と 0056 が GroEL のペリプラズムへの局在に関与することが明らかとなった。

0055 と 0056 の周囲に存在する遺伝子の解析から、タンパク質のアシル化に関与する遺伝子群の中に、0055 と 0056 が含まれていた。しかし、タンパク質のアシル化と、GroEL のペリプラズムへの局在の関連性について明らかにすることは出来なかった。リポプロテインの外膜への輸送は、菌体内膜のペリプラズム側において始まる [2]。リポプロテインの N 末端には Lipobox [57] と呼ばれるロイシン-(アラニンまたはセリン)-(グリシンまたはアラニン)-システインからなる配列が含まれており、これにより、以下の一連の輸送経路にリポプロテインは外膜に輸送される。1) リポプロテインは菌体内膜のペリプラズム側に、N 末端を内膜に貫通させた状態で局在する [57]。2) その後 N 末端のペプチドは prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt)、protein-specific signal peptidase (Lsp)、apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt) の働きにより、トリアシル化される [67, 76]。3) トリアシル化されたリポプロテインは、内膜に局在する LolCDE 複合体により内膜から取り出され [76]、ペリプラズムに局在する LolA へと渡されて、LolA は外膜に局在する LolB へとリポプロテインを輸送する [53]。Lgt は 0055 と 0056 を含む遺伝子群のうちの VV1\_0050 と相同性があったが、Lst, Lnt については、遺伝子群に含まれていなかった。また、GroEL の N 末端においても

システイン残基は含まれておらず、LipoBox は検出されなかった。加えて、GroEL がアシル化されるという報告もこれまでにない。以上のことから、ひとつの可能性として、VV1\_0045 から VV1\_0061 の 17 遺伝子から構成される遺伝子群が GroEL を含めたタンパク質のアシル化に関与しており、アシル化されたタンパク質を 0055 と 0056 が共同してペリプラズムへと輸送する可能性が考えられた。しかしながら、現時点で、GroEL とこれらの遺伝子に直接の関係性を示す証拠はなく、 $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 において、二次的に GroEL のペリプラズムへの局在に障害が生じている可能性もある。

外膜に局在するタンパク質の半定量解析を行い、ヒートマップ解析を行った結果  $\Delta$  0055 と  $\Delta$  0056 の両者において減少していたが、それぞれの相補株においてその量が WT と同程度に回復していたタンパク質として VV1\_1260 と VV2\_1134 の 2 種類の GroEL (以下 GroEL\_1 と GroEL\_2 とする) が検出された(図 12)。これらは、*V. vulnificus* のクロモソーム上に別々に局在している。Vibrio 属菌は 2 本の環状ゲノムを有しているが、概ね、クロモソーム 1 には生育に必要な遺伝子がコードされており[27, 52]、クロモソーム 2 には環境変化への適応や病原性に関する遺伝子がコードされている[52]。GroEL に関しては、クロモソーム 1 に GroEL\_1 が、一方、クロモソーム 2 には GroEL\_2 がコードされていた。GroEL\_1 は 546 残基のアミノ酸から、GroEL\_2 は 532 残基のアミノ酸から構成され、これらの相同性は、Identities = 413/523 (79%), Positives = 476/523 (91%)であり、酷似していた。*V. vulnificus* におけるこれら 2 種類の GroEL 遺伝子の対数増殖期または定常増殖期における発現量が、以前の論文で調べられており、どちらの条件においても、

GroEL<sub>1</sub> の発現量が GroEL<sub>2</sub> よりも多かったこと、および、どちらの GroEL に関しても欠失変異株の作製は不可能であったことが報告されており[18]、GroEL<sub>1</sub> と GroEL<sub>2</sub> の役割はいまだ明らかにされていない。

GroEL の発現量はストレス暴露時に上昇することが知られている[24, 33]。しかし、*Vibrio cholerae* において、熱ショック時の GroEL の局在を電子顕微鏡下において観察した研究では[39]、菌体外膜付近の GroEL 量に変化はなかったと報告されている。本研究においてもペリプラズムに局在する GroEL 量が、生体ストレスにより変化するか否かを検討するために、10%ヒト血清添加 Hank's バッファー内で WT を培養し、GroEL の局在量を解析したが、血清非添加時と比較して差は見られなかった（データは示していない）。これらのことから、GroEL はストレス応答によりペリプラズムに局在するのではなく、*V. vulnificus* のペリプラズムに、常に一定量局在しており、それが生体内において *V. vulnificus* が暴露されるストレスへの耐性に必要であることが考えられた。

本研究において、0055 と 0056 は、GroEL をペリプラズムまたは外膜へと拡散させることで、感染時に *V. vulnificus* が好中球存在下で受ける様々なストレスに暴露された際に、菌体内環境を健全に保つことで、菌体をストレス変化からレスキューし、生体内での増殖性を維持する、一種のホメオスタシス機構であると予想された。



図表

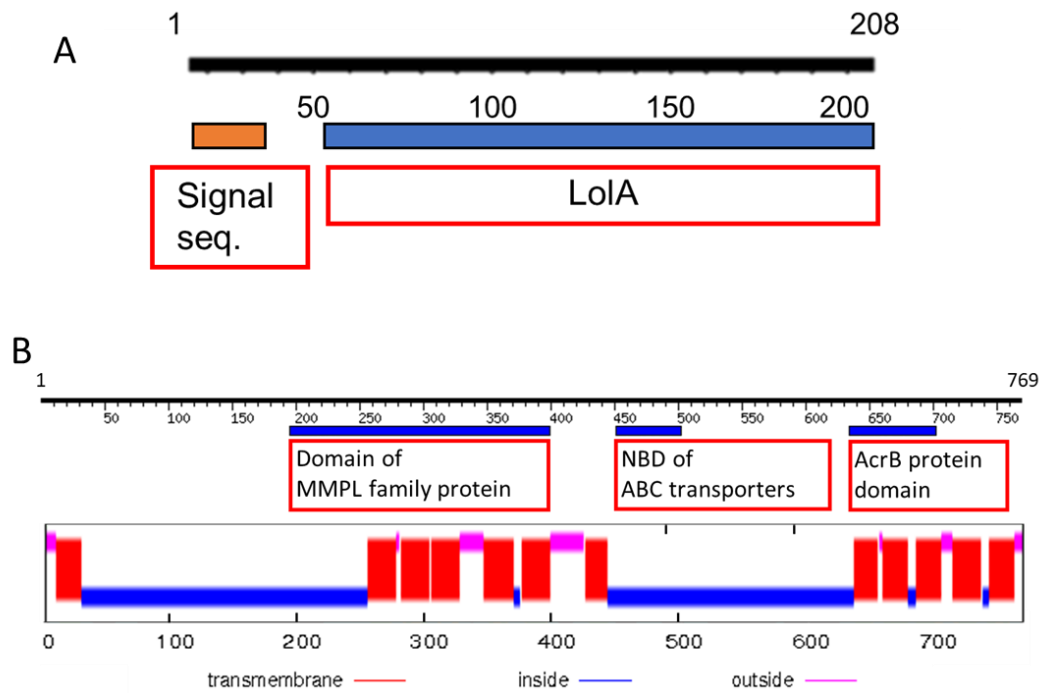


図 10 0055 と 0056 のモチーフ解析および膜貫通領域予測

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)において 0055 (A)と 0056 (B)のタンパク質中に含まれるドメインを解析した。また、TMHMM Server v. 2.0 により、0056 の膜貫通領域予測を行った。

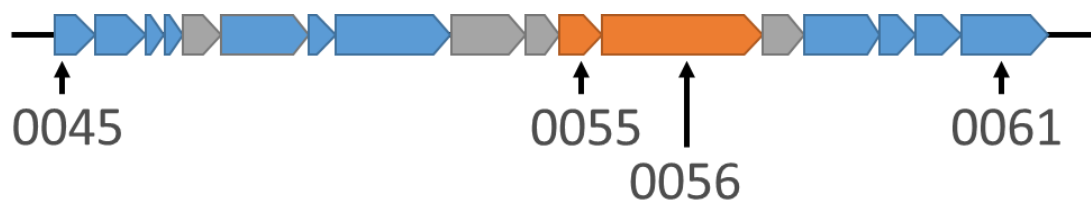


図 11 0055 と 0056 遺伝子周囲の遺伝子地図

KEGG において 0055 と 0056 遺伝子の周囲に存在する遺伝子を解析した。オレンジ色は 0055 と 0056 遺伝子を示す。青色は、タンパク質のアシル化に関与すると予想された遺伝子を示す。

表 3 0055 と 0056 を含む遺伝子群に存在していた遺伝子

遺伝子番号	コードされるタンパク質名
VV1_0045	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase
VV1_0046	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
VV1_0047	Acyl carrier protein
VV1_0048	Acyl carrier protein
VV1_0049	Z4855 protein
VV1_0050	prolipoprotein diacylglycerol transferase
VV1_0051	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase
VV1_0052	Acyltransferase
VV1_0053	Putative histidine ammonia-lyase protein
VV1_0054	acyl-CoA thioester hydrolase
VV1_0055	Putative transmembrane protein
VV1_0056	Membrane protein
VV1_0057	hypothetical protein
VV1_0058	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I
VV1_0059	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase
VV1_0060	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase
VV1_0061	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II

青字は、タンパク質のアシル化に関与すると予想された遺伝子を示す。

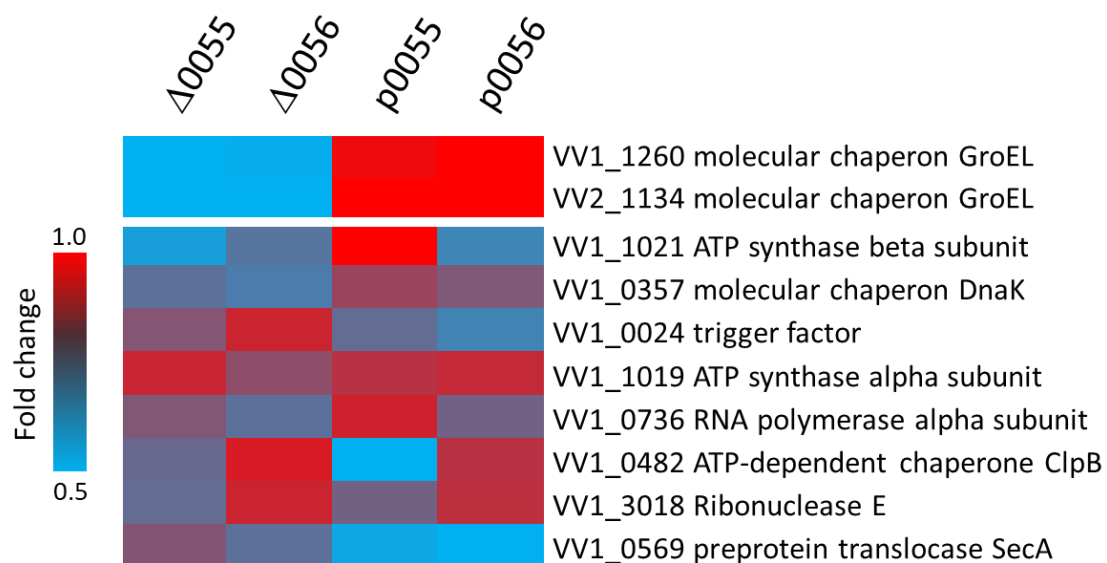


図 12 外膜に局在するタンパク質のヒートマップ解析

WT、Δ 0055、Δ 0056、p0055、および p0056 の外膜に局在するタンパク質を LC-ESI-MS により同定し、取得されたタンパク質の半定量解析を Spectral counting method により行った。算出されたデータを用いて WT を基準としたタンパク質量の変化を Fold change として表し、ヒートマップ解析を行った。

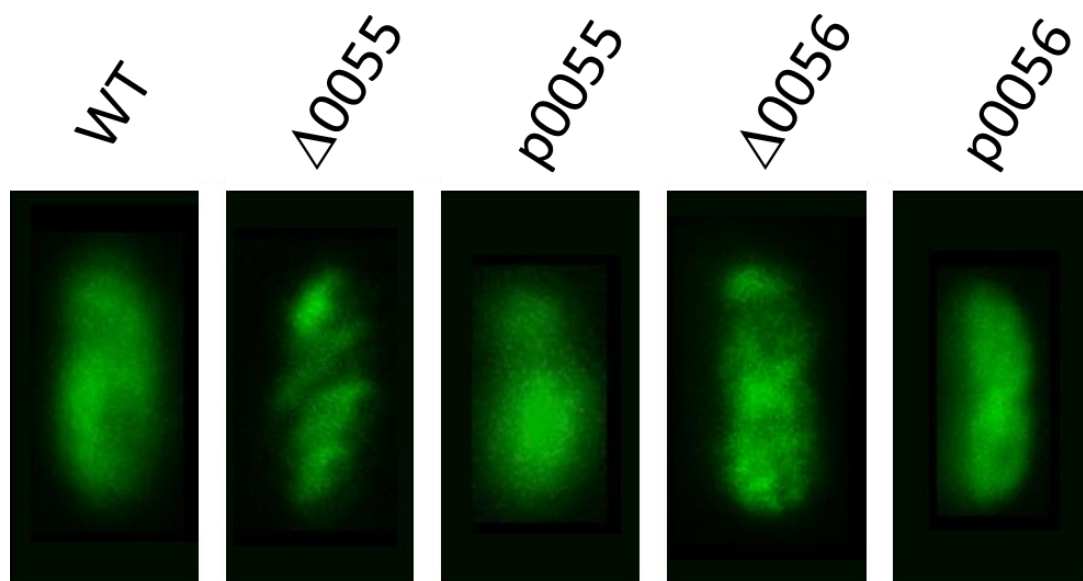


図 13 GroEL の蛍光顕微鏡下での観察

WT、 $\Delta 0055$ 、 $\Delta 0056$ 、p0055、および p0056 の菌体内における GroEL を抗 GroEL 抗体により染色し、分布を蛍光顕微鏡により観察した。

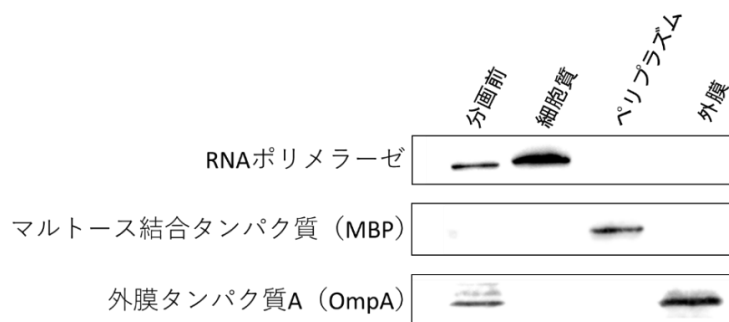


図 14 細胞分画におけるそれぞれの画分の精製度の確認

超遠心分離により、菌体を細胞質画分、ペリプラズム画分、および外膜画分に分離・精製し、各画分の精製度を、それぞれの画分に存在することが明らかなタンパク質に対する抗体を使用したウェスタンブロッティングにより解析した。細胞質局在タンパク質に対する抗体として抗 RNA ポリメラーゼ抗体を、ペリプラズム局在タンパク質として抗マルトース結合タンパク質抗体を、外膜局在タンパク質として抗外膜タンパク質 A 抗体を使用した。

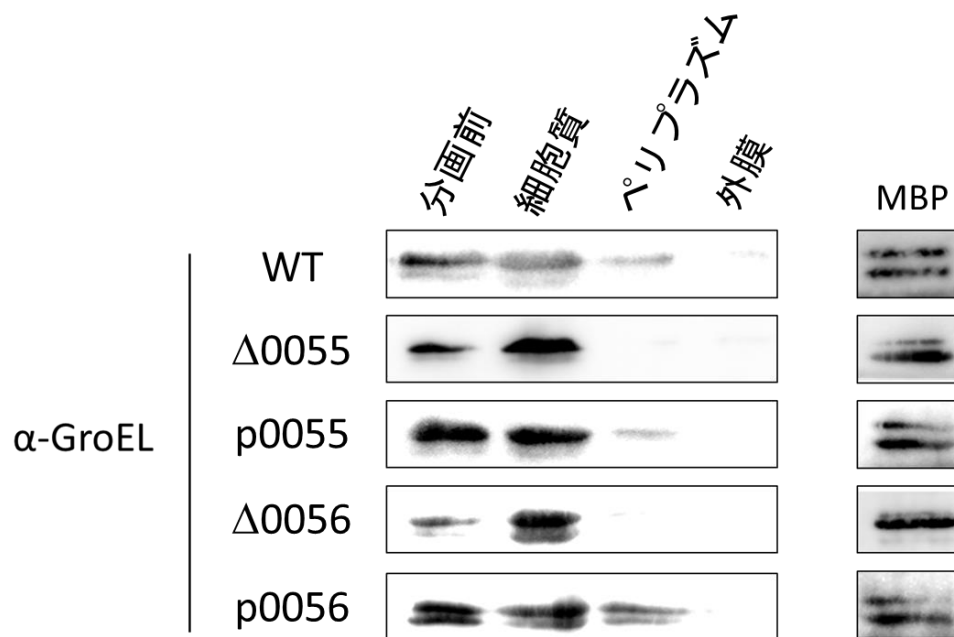


図 15 GroEL の局在の同定

WT、Δ 0055、Δ 0056、p0055、および p0056 の菌体を超遠心分離により、細胞質画分、ペリプラズム画分、および外膜画分に分離・精製し、それぞれの画分に局在する GroEL を、抗 GroEL 抗体を用いたウェスタングロブリングにより解析した。ペリプラズムに局在するタンパク質量のコントロールとして、抗 MBP 抗体を用いたウェスタングロブリング像を示した。

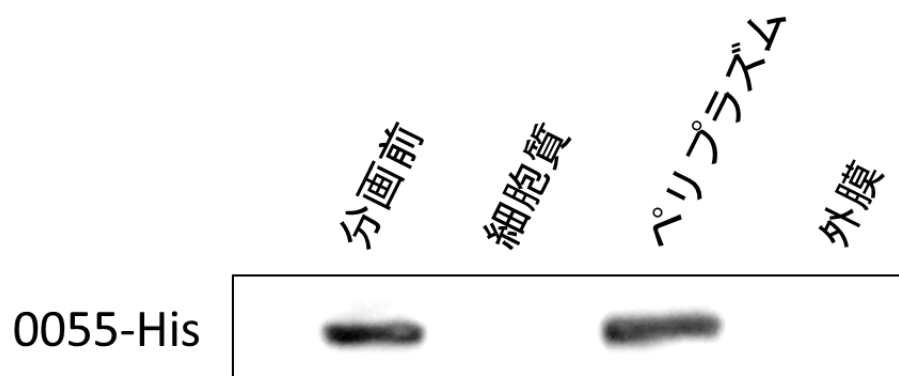


図 16 0055 の局在の同定

p0055 の菌体を細胞質画分、ペリプラズム画分、および外膜画分に分離・精製し、0055 を検出した。p0055 が発現している 0055 の C 末端には 6×ヒスチジンタグが付加されているため、抗ヒスチジン抗体により 0055 を検出することが可能である。



表 4 免疫沈降アッセイによる 0055 と GroEL との相互作用の解析

	Fold change	
	PBS	抗ヒスチジン抗体添加
VV1_1260 GroEL	1	1.60
VV1_1134 GroEL	1	2.13

## 総括

標的とした機能に關与する遺伝子を網羅的に同定可能な新規手法、ISLAP 法の開発に成功した。本手法を用いて、*V. vulnificus* のもつ好中球逃避機構關連遺伝子に必須の遺伝子を網羅的に選抜・同定した結果、既知の好中球逃避に關与する 9 遺伝子と未知の好中球逃避に關与する 10 遺伝子が得られた。既知の遺伝子の解析により、*V. vulnificus* が生体内において、1) 運動性により好中球から逃避する、2) 莢膜により貪食を逃れる、および、3) 感染局所において好中球よりも鉄を効率よく取り込むことで、効率的に増殖可能であることが明らかとなった。すなわち、ISLAP 法を使用することで、生体内における病原細菌の特定病原機構に關与する遺伝子を網羅的に同定でき、それらから病原機構を統合的に理解することが可能であると証明された。

一方機能未知遺伝子において、近接して同方向に配置されていた 0055 と 0056 が担う好中球逃避機構について解析した結果、これらの遺伝子は、GroEL をペリプラズムへと拡散させることで、感染時に *V. vulnificus* が好中球存在下で受ける様々なストレスに暴露した際に、菌体をストレス変化からレスキューし、菌体内環境を健全に保つことで、生体内での増殖性を維持する一種のホメオスタシス機構を担うことが示唆された。

本研究において開発した ISLAP 法は、バイオインフォーマティクスの限界を超え、生体内で発現する遺伝子の感染における役割を解明可能な画期的手法であることから、*V. vulnificus* のみに留まら

ず、様々な細菌の病原性研究の飛躍的发展に寄与することが予想される。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました北里大学獣医学部 上野俊治教授、柏本孝茂准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当たり、貴重な御助言を頂いた、北里大学獣医学部細胞分子機能学研究室 山本裕司講師、大阪大学病院感染制御部 明田幸宏講師、大阪大学微生物病研究所病原微生物資源室 児玉年央准教授、岐阜大学病原体制御学分野 山崎浩平研究員に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Adkinson, Bennett, J. E., Blaser, M. J., Dolin, R., et al. 2010. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Seventh Edition). *sciencedirect*. v-xxvi.
2. Aguilar, C., Flores, N., Riveros-McKay, F., Sahonero-Canavesi, D., Carmona, S., Geiger, O., Escalante, A. and Bolívar, F. 2015. Deletion of the 2-acyl-glycerophosphoethanolamine cycle improve glucose metabolism in *Escherichia coli* strains employed for overproduction of aromatic compounds. *Microbial Cell Factories*. **14**: 194.
3. Ahn, S.-H. H., Han, J.-H. H., Lee, J.-H. H., Park, K.-J. J. and Kong, I.-S. S. 2005. Identification of an iron-regulated hemin-binding outer membrane protein, HupO, in *Vibrio fluvialis*: effects on hemolytic activity and the oxidative stress response. *Infection and immunity*. **73**: 722-9.
4. Akeda, Y., Kodama, T., Saito, K., Iida, T., Oishi, K. and Honda, T. 2011. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2-associated

chaperone VocC for the T3SS2-specific effector VopC. *FEMS Microbiology Letters*. **324**: 156–164.

5. Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S. and Martins, M. 2015. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. **6**: 587.

6. Azem, A., Diamant, S. and Goloubinoff, P. 1994. Effect of Divalent Cations on the Molecular Structure of the GroEL Oligomer. *Biochemistry*. **33**: 6671–6675.

7. Azem, A., Kessel, M. and Goloubinoff, P. 1994. Characterization of a functional GroEL14(GroES7)2 chaperonin hetero-oligomer. *Science*. **265**: 653–656.

8. Baker-Austin, C. and Oliver, J. D. 2016. Rapidly developing and fatal *Vibrio vulnificus* wound infection. *IDCases*. **6**: 13.

9. Baker-Austin, C. and Oliver, J. D. 2018. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environmental Microbiology*. **20**: 423–430.

10. Bao, G.-H., Ho, C.-T. and Barasch, J. 2015. The ligands of neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

*RSC Advances*. **5**: 104363–104374.

11. Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C. 1979. Disease Caused by a Marine *Vibrio* — Clinical Characteristics and Epidemiology. *The New England Journal of Medicine*. **300**: 1–5.

12. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D., Joachimiak, A., Horwich, A. and Sigler, P. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*. **371**: 578–86.

13. Browning, D. F. and Busby, S. J. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*. **2**: nrmicro787.

14. Chen, C., Xing, D., Tan, L., Li, H., Zhou, G., Huang, L. and Xie, S. X. 2017. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science*. **356**: 189–194.

15. Chen, C.-Y., Wu, K.-M., Chang, Y.-C., Chang, C.-H., Tsai, H.-C., Liao, T.-L., Liu, Y.-M., Chen, H.-J., Shen, A., Li, J.-C., Su, T.-L., Shao, C.-P., Lee, C.-T., Hor,

- L.-I. and Tsai, S.-F. 2003. Comparative Genome Analysis of *Vibrio vulnificus*, a Marine Pathogen. *Genome Research*. **13**: 2577–2587.
16. Chiang, S.-R. and Chuang, Y.-C. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. **36**: 81–8.
17. Chim, N., Torres, R., Liu, Y., Capri, J., Batot, G., Whitelegge, J. P. and Goulding, C. W. 2015. The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol*. **22**: 1098–107.
18. Chowdhury, N., Kingston, J. J., Whitaker, B. W., Carpenter, M. R., Cohen, A. and Boyd, F. E. 2014. Sequence and expression divergence of an ancient duplication of the chaperonin groESEL operon in *Vibrio* species. *Microbiology*. **160**: 1953–1963.
19. Croucher, N. J. and Thomson, N. R. 2010. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*. **13**: 619–624.



20. Eller, K., Schroll, A., Banas, M., Kirsch, A. H., Huber, J. M., Nairz, M., Skvortsov, S., Weiss, G., Rosenkranz, A. R. and Theurl, I. 2013. Lipocalin-2 Expressed in Innate Immune Cells Is an Endogenous Inhibitor of Inflammation in Murine Nephrotoxic Serum Nephritis. *PLoS ONE*. **8**: e67693.

21. Ellis, R. 1993. The general concept of molecular chaperones. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **339**: 257–61.

22. Finkelstein, R., Edelstein, S. and Mahamid, G. 2002. Fulminant wound infections due to vibrio vulnificus. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. **4**: 654–5.

23. Fleck, R., Romero-Steiner, S. and Nahm, M. 2005. Use of HL-60 Cell Line To Measure Opsonic Capacity of Pneumococcal Antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **12**: 19–27.

24. Frydman, J. 2001. FOLDING OF NEWLY TRANSLATED PROTEINS IN VIVO: The Role of

Molecular Chaperones. *Biochemistry*. **70**: 603–647.

25. Gauthier, J. D., Jones, M. K., Thiaville, P., Joseph, J. L., Swain, R. A., Krediet, C. J., Gulig, P. A., Teplitski, M. and Wright, A. C. 2010. Role of GacA in virulence of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology*. **156**: 3722–3733.

26. Grabowicz, M. and Silhavy, T. J. 2017. Redefining the essential trafficking pathway for outer membrane lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **114**: 4769–4774.

27. Gray, L. D. and Kreger, A. S. 1989. Detection of *Vibrio vulnificus* cytotoxin in *V. vulnificus*-infected mice. *Toxicon*. **27**: 459–464.

28. GREEN, J., BENNETT, B., JORDAN, P., RAL, E. T., THOON, A. J. and GUEST, J. R. 1996. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. *Biochemical Journal*. **316**: 887–892.

29. Hakkarainen, T. W., Kopari, N. M., Pham, T. N. and Evans, H. L. 2014. Necrotizing soft tissue infections:

Review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes. *Current Problems in Surgery*. **51**: 344–362.

30. Haq, S. M. and Dayal, H. H. 2005. Chronic Liver Disease and Consumption of Raw Oysters: A Potentially Lethal Combination—A Review of *Vibrio vulnificus* Septicemia. *The American Journal of Gastroenterology*. **100**: ajg2005200.

31. Hensel, M., Shea, J., Gleeson, C., Jones, Dalton, E. and Holden, D. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science (New York, N.Y.)*. **269**: 400–3.

32. Hlady, G. W. and Klontz, K. C. 1996. The Epidemiology of *Vibrio* Infections in Florida, 1981–1993. *The Journal of Infectious Diseases*. **173**: 1176–1183.

33. Horwich, A. L., Low, K. B., Fenton, W. A., Hirshfield, I. N. and Furtak, K. 1993. Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: Role of GroEL. *Cell*. **74**: 909–917.

34. Houpt, E. R. 2005. Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease By Michael Wilson Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 2005. 476 pp., illustrated. \$65.00 (cloth). *Clinical Infectious Diseases*. **41**: 768–768.
35. INOUE, Y., ONO, T., MATSUI, T., MIYASAKA, J., KINOSHITA, Y. and IHN, H. 2008. Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003. *The Journal of Dermatology*. **35**: 129–139.
36. Johnston, J. M., Becker, S. F. and McFarland, L. M. 1986. Gastroenteritis in patients with stool isolates of *vibrio vulnificus*. *The American Journal of Medicine*. **80**: 336–338.
37. Jones, E. H., Feldman, K. A., Palmer, A., Butlera, E., Blythe, D. and Mitchell, C. S. 2013. *Vibrio* Infections and Surveillance in Maryland, 2002–2008. *Public Health Reports*. **128**: 537–545.
38. Jones, M. K. and Oliver, J. D. 2009. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis ▽. *Infection and Immunity*. **77**: 1723–1733.

39. Jyot, J., Gautam, J., Raje, M. and Ghosh, A. 1999. Localization of DnaK and GroEL in *Vibrio cholerae*. *FEMS microbiology letters*. **172**: 165–171.
40. Kashimoto, T., Iwasaki, C., Gojo, M., Sugiyama, H., Yoshioka, K., Yamamoto, Y., Okamura, M., Susa, N. and Ueno, S. 2015. *Vibrio vulnificus* detected in the spleen leads to fatal outcome in a mouse oral infection model. *FEMS microbiology letters*. **362**:.
41. Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H. and Kiley, P. J. 1997. Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**: 6087–6092.
42. Kiley, P. J. and Beinert, H. 2003. The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **6**: 181–185.
43. Klontz, K., Lieb, S., hreiber, Janowski, H., Baldy, L. and Gunn, R. 1988. Syndromes of *Vibrio vulnificus* Infections: Clinical and Epidemiologic Features in

Florida Cases, 1981-1987. *Annals of Internal Medicine*.  
**109**: 318.

44. Kobayashi, S. D., Malachowa, N. and DeLeo, F. R.  
2018. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion.  
*Journal of Innate Immunity*. **10**: 432–441.

45. Koenig, K., Mueller, J. and Rose, T. 1991. *Vibrio*  
*vulnificus*. Hazard on the half shell. *The Western*  
*journal of medicine*. **155**: 400–3.

46. Krieg, N. R. 2001. Bergey's Manual® of Systematic  
Bacteriology. *springer*. 21–25.

47. Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. and Haas, D.  
2007. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-  
proteobacteria: from RNA recognition to regulation of  
social behaviour. *Molecular microbiology*. **67**: 241–53.

48. Lewis, P. R., Cook, L., Drewitt-Smith, J., McEwen,  
A. D. and Granger, L. V. 2005. Septicaemia secondary to  
*Vibrio vulnificus* cellulitis. *Communicable diseases*  
*intelligence quarterly report*. **29**: 305–7.

49. Iley, J., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner,

- J. S. and Albina, J. E. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology*. **83**: 64–70.
50. Lo, H.-R., Lin, J.-H., Chen, Y.-H., Chen, C.-L., Shao, C.-P., Lai, Y.-C. and Hor, L.-I. 2011. RTX Toxin Enhances the Survival of *Vibrio vulnificus* During Infection by Protecting the Organism From Phagocytosis. *The Journal of Infectious Diseases*. **203**: 1866–1874.
51. Mahan, M., Jauch, Hanna, P., Camilli, A., Tobias, J., Waldor, M. and Mekalanos, J. 1993. Selection for bacterial genes that are specifically induced in host tissues: the hunt for virulence factors. *Infectious agents and disease*. **2**: 263–8.
52. Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M. and Iida, T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet*. **361**: 743–749.

53. Matsuyama, S., Yokota, N. and Tokuda, H. 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*. **16**: 6947–6955.
54. Matsuyama, S., Tajima, T. and Tokuda, H. 1995. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *The EMBO journal*. **14**: 3365–72.
55. Melhus, Å., Holmdahl, T. and Tjernberg, I. 2009. First Documented Case of Bacteremia with *Vibrio vulnificus* in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **27**: 81–82.
56. Nestle, F. O., Meglio, P., Qin, J.-Z. and Nickoloff, B. J. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. **9**: 679–691.
57. Okuda, S. and Tokuda, H. 2011. Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Microbiology*. **65**: 239–259.
58. Okujo, N., Saito, M., Yamamoto, S., Yoshida, T.,



Miyoshi, S. and Shinoda, S. 1994. Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *Biometals*. **7**: 109–116.

59. Oliver, J. D. 2015. The Biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology Spectrum*. **3**:.

60. Oliver, J. D. 2013. *Vibrio vulnificus*: Death on the Half Shell. A Personal Journey with the Pathogen and its Ecology. *Microbial Ecology*. **65**: 793–799.

61. van Opijnen, T., Bodi, K. L. and Camilli, A. 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nature Methods*. **6**: nmeth.1377.

62. Pasparakis, M., Haase, I. and Nestle, F. O. 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. **14**: 289–301.

63. Ponnusamy, D., Kozlova, E. V., Sha, J., Erova, T. E., Azar, S. R., Fitts, E. C., Kirtley, M. L., Tiner, B. L., Andersson, J. A., Grim, C. J., Isom, R. P., Hasan, N. A., Colwell, R. R. and Chopra, A. K. 2016. Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in

mixed infection leading to necrotizing fasciitis.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*. **113**: 722–727.

64. Potempa, J. and Pike, R. N. 2009. Corruption of Innate Immunity by Bacterial Proteases. *Journal of Innate Immunity*. **1**: 70–87.

65. Roje, Z., Roje, Ž., Matić, D., Librenjak, D., Dokuzović, S. and Varvodić, J. 2011. Necrotizing fasciitis: literature review of contemporary strategies for diagnosing and management with three case reports: torso, abdominal wall, upper and lower limbs. *World Journal of Emergency Surgery*. **6**: 46.

66. Romero-Steiner, S., Libutti, D., Pais, L., Dykes, J., Anderson, P., Whitin, J., Keyserling, H. and Carlone, G. 1997. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. **4**: 415–22.

67. Sankaran, K. and Wu, H. 1994. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol

moiety from phosphatidylglycerol. *The Journal of biological chemistry*. **269**: 19701–6.

68. Sarani, B., Strong, M., Pascual, J. and Schwab, W. C. 2009. Necrotizing Fasciitis: Current Concepts and Review of the Literature. *Journal of the American College of Surgeons*. **208**: 279–288.

69. Shao, C.-P., Lo, H.-R., Lin, J.-H. and Hor, L.-I. 2011. Regulation of Cytotoxicity by Quorum-Sensing Signaling in *Vibrio vulnificus* Is Mediated by SmcR, a Repressor of hlyU. *Journal of Bacteriology*. **193**: 2557–2565.

70. Shapiro, R., Altekruse, S., Hutwagner, L., Bishop, R., Hammond, R., Wilson, S., Ray, B., Thompson, S., Tauxe, R. and Griffin, P. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. *Vibrio Working Group. The Journal of infectious diseases*. **178**: 752–9.

71. Spiro, S., Roberts, R. and Guest, J. 1989. FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichia coli* and metal ion requirement for FNR-regulated gene

expression. *Molecular Microbiology*. **3**: 601–608.

72. Strom, M. S. and Paranjpye, R. N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*. **2**: 177–188.

73. Swartz, M. N. 2004. Clinical practice. Cellulitis. *The New England journal of medicine*. **350**: 904–12.

74. Tanabe, T., Naka, A., Aso, H., Nakao, H., Narimatsu, S., Inoue, Y., Ono, T. and Yamamoto, S. 2005. A Novel Aerobactin Utilization Cluster in *Vibrio vulnificus* with a Gene Involved in the Transcription Regulation of the *iutA* Homologue. *Microbiology and Immunology*. **49**: 823–834.

75. Tapia-Pastrana, G., Chavez-Dueñas, L., Lanz-Mendoza, H., Teter, K. and Navarro-García, F. 2012. VirK Is a Periplasmic Protein Required for Efficient Secretion of Plasmid-Encoded Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. **80**: 2276–2285.

76. Tokunaga, M., Tokunaga, H. and Wu, H. 1982. Post-translational modification and processing of

*Escherichia coli* prolipoprotein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **79**: 2255–2259.

77. Tran, Q., Bongaerts, J., Vlad, D. and Unden, G. 1997. Requirement for the Proton-Pumping NADH Dehydrogenase I of *Escherichia Coli* in Respiration of NADH to Fumarate and Its Bioenergetic Implications. *European Journal of Biochemistry*. **244**: 155–160.

78. Tran, Q. and Unden, G. 2017. Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *European Journal of Biochemistry*. **251**: 538–543.

79. Westermann, A. J., Förstner, K. U., Amman, F., Barquist, L., Chao, Y., Schulte, L. N., Müller, L., Reinhardt, R., Stadler, P. F. and Vogel, J. 2016. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature*. **529**: 496–501.

80. Wright, A., Lmpson, Oliver, J. and Morris, J. 1990. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*. **58**: 1769–73.

81. Yamazaki, K. Elucidation of the mechanisms by which *Vibrio vulnificus* causes necrotizing soft-tissue infections in healthy hosts. 北里大学獣医学系研究科博士論文.