

学位論文要旨

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～

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

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

門 武宏

Takehiro Kado

指導教授 上野 俊治

バイオインフォーマティクスの発展により、生体内で発現する病原体遺伝子の網羅的同定技術が次々と開発されている。しかし、同定された遺伝子の生体内における真の機能や、その感染における役割の解明は未だ不可能である。そこで本研究ではこれを可能にするために、バイオインフォーマティクスと感染実験を融合させた、新規病原遺伝子網羅的同定法 Identification of Specific genes using a Library of Avirulent Phenotypes (ISLAP)法を開発し、*Vibrio vulnificus* (以下 *V. vulnificus*) の生体内増殖機構の解明を試みた。

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。

V. vulnificus の経口感染において、主要増殖部位が腸管内であることが明らかにされている。すなわち大気中（酸素濃度 8.06mM）にあった食物と共に摂取された *V. vulnificus* は、腸管（酸素濃度 1.0～1.3mM）において急激な酸素濃度の減少に適応しなければならない。そこで第 1 章では、本菌の持つ低酸素環境への適応機構と腸管内増殖の関係性の解明と同時に、*V. vulnificus* における選択的遺伝子ノックアウト技術や感染実験技術などの基礎的手法の習得を目指した。

低酸素環境への適応に重要なタンパク質として、菌の代謝機構を好気呼吸から嫌気呼吸へとスイッチさせる FNR が知られている。そこで、相同組み換えを利用して、FNR 遺伝子 (*fnr*) とエリスロマイシン耐性遺伝子を置換した株 (*fnr::erm*) の作製に成功した。野生株 (WT) と *fnr::erm* の好気培養および嫌気培養下での増殖性を比較した。その結果、*fnr::erm* の増殖性は嫌気培養下で

のみ WT よりも低下した。次に、*fnr* が腸管内増殖に必要なか否か調査するために WT と *fnr::erm* を 1 : 1 で混合して、マウス腸管ループ内に接種して、10 時間後の生菌数の存在比を観察した結果、WT と *fnr::erm* の存在比は、2.6 : 1 となり、WT と *fnr::erm* の間に競合が認められた。これらの結果から、*V. vulnificus* が腸管内増殖に FNR を必要とすることが示唆された。

第 2 章では、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、ISLAP 法の開発を試みた。

第 2 章 新規病原遺伝子網羅的同定法 ISLAP 法の開発

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。しかし、バイオインフォマティクスのみでは、同定した遺伝子の感染における役割を実証することは出来ない。そこで、第 2 章では、生体内で発現する無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可能な ISLAP 法の開発を試みた。選抜対象とする遺伝子は、*V. vulnificus* のもつ好中球逃避機構関連遺伝子とし、ISLAP 法により、それに必須の遺伝子を網羅的に選抜・同定した。

抗 Ly6G 抗体の接種により好中球を枯渇させたマウスを用いて、ISLAP 法を実施し、*V. vulnificus* の好中球逃避に関与する 19 の遺伝子を同定した。9 遺伝子は好中球逃避に関与する既知の遺伝子であり、10 遺伝子はこれまでに好中球との関連が明らかにされていない遺伝子であった。これらのうちゲノム上に連続して位置し

ていた VV1_0055 と VV1_0056 に着目し、それぞれの遺伝子のノックアウト株（以下 Δ0055 と Δ0056 とする）を作製した。それぞれを健常および好中球枯渇マウスに皮下接種し、マウスの生存時間を WT 接種マウスのそれと比較した結果、健常マウスでは生存時間が延長したが、好中球枯渇マウスでは WT と同じであった。次に、Δ0055 と Δ0056 の感染動態を解析するため、接種局所における増殖性を In vivo imaging system により観察した結果、増殖の遅延が観察された。

以上の結果は、0055 と 0056 が感染局所での好中球逃避に関与することを示すと共に、ISLAP 法により特定機能に関与する病原遺伝子の網羅的同定が可能であることを示している。

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

第 2 章において ISLAP 法により同定した 0055 と 0056 の機能を、データベースを用いて予測した結果、グラム陰性細菌の内膜に局在する 0056 が、ペリプラズムに局在する 0055 へとタンパク質を受け渡し、ペリプラズムまたは外膜へとそのタンパク質を輸送することが予測された。そこで第 3 章では、0055 と 0056 がどのように *V. vulnificus* の好中球逃避に関与するのか、その機能解明を目的とし、0055 と 0056 が輸送するタンパク質の同定を試みた。

V. vulnificus のペリプラズムと外膜に含まれるタンパク質を粗精製し、それらを質量分析により同定・定量した結果、Δ0055 と Δ0056 のそれぞれの KO 株において、シャペロンタンパク質 GroEL の量が減少していた。この減少はそれぞれの相補株において回復

していた。また、ペリプラズムに局在する 0055 にヒスチジンタグを付加した 0055-His を利用した共沈降実験により、0055 と相互作用するタンパク質を解析したところ、GroEL が含まれていた。以上の結果から、0055 と 0056 は、GroEL のペリプラズムまたは外膜への輸送に関与することが示唆された。

グラム陰性細菌において、ストレス環境下では、ペリプラズムに局在するタンパク質の立体構造が崩れること、および、それらタンパク質を再フォールディングまたは分解するために、GroEL がペリプラズム領域や外膜に拡散することが報告されている。すなわち、0055 と 0056 は、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抵抗するため、GroEL をペリプラズムまたは外膜へと拡散させることで、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予想された。

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発展に寄与することが予想される。