

氏名	山本 真衣
授与した学位	博士
専攻分野の名称	栄養学
学位授与番号	博甲第106号
学位授与の日付	平成28年3月24日
学位論文の題目	Study on the virulence factors of <i>Vibrio vulnificus</i> by transposon insertion mutagenesis (トランスポゾン挿入 変異による <i>Vibrio vulnificus</i> 病原因子の研究)
学位審査委員会	主査 田中晃一 副査 伊東秀之 副査 山本登志子 副査 中村孝文 副査 高橋 徹

## 学位論文内容の要旨

本学位論文は、新しい2つの方法を用いて生体内で *Vibrio vulnificus* の病原遺伝子を調べたものである。

*V. vulnificus* はコレラ菌や腸炎ビブリオと同じビブリオ科に属するグラム陰性嫌気性細菌である。本菌は海や海水と淡水が混ざり合う汽水域に生息しており、魚介類を生食することや手足の傷口が本菌を含む海水と直接触れることで人体に侵入する。健康な人が本菌に感染しても胃腸炎症状を起こす程度で治まるが、肝硬変や糖尿病などの基礎疾患を患っている人では数時間から2日間の短期間で敗血症を発症することがあり、その場合の死亡率は50%を超える。感染者の増加とともに *V. vulnificus* の病原因子に関する研究は増えてきたが、*V. vulnificus* が人体内で急激に増殖・拡散するメカニズムについては未だ十分に解明されていない。本菌感染症は死に至る感染症であり、生の魚介類を食べることや手足の傷口から感染するため、四方を海に囲まれ、刺身や寿司などの魚介類を生食する食文化をもつわが国にとって、食品衛生また公衆衛生の観点から重要な感染症である。本学位論文では新しい2つの方法を用いて生体内での *V. vulnificus* 病原因子の探索を試みた。本論文の内容は以下の通りである。

第1章では *V. vulnificus* の特徴と感染状況、病原因子の研究状況を概観した。また、病原因子の探索を目的に頻用されているトランスポゾン挿入変異法について述べた。

第2章では署名タグトランスポゾン挿入変異法を用いた病原遺伝子の特定を行った。署名タグトランスポゾンが挿入された挿入変異株は、ハイブリダイゼーション法で署名タグを検出することによって混合菌液の中から識別することができる。したがって、弱毒化変異株のスクリーニング時に使用する実験動物の数を大幅に減らすことができる。81種類の異なる署名タグを持つ署名タグトランスポゾンを用いて、1タグにつき80株の挿入変異株を作製した。合計6480株の挿入変異株ライブラリーを作製し、鉄投与マウス

感染モデルを用いて弱毒化変異株のスクリーニングを行った。得られた *V. vulnificus* 弱毒化株は ① 核酸、アミノ酸代謝に関わる遺伝子、② 糖合成に関わる遺伝子、③ 膜輸送に関わる遺伝子にトランスポゾンが挿入されており、これらの遺伝子が *V. vulnificus* の感染に必要であることが示唆された。さらにトランスポゾン挿入により著しく弱毒化していた核酸合成に関連する遺伝子における挿入変異弱株を生ワクチンとしてマウスに接種したところ、*V. vulnificus* 感染症に対する防御効果があることも見出した。

第3章では、カイコを感染モデルとして適応することを試みた。まずカイコに *V. vulnificus* が感染することを確認するために、*V. vulnificus* 培養菌液（生菌）、培養上清または菌液の希釈液である PBSG を5齢のカイコの静脈に接種した。培養上清または PBSG を接種したカイコは生存したが、生菌を接種したカイコは2日間で全数死亡することから *V. vulnificus* がカイコに感染することが示された。次に1061株のトランスポゾン挿入変異株を1株ずつ5齢のカイコの静脈に接種し、カイコが死亡しない株を弱毒化変異株としてスクリーニングした。その結果、カイコに対して毒性を失った弱毒化変異株が1株得られ、そのトランスポゾン挿入部位には *V. vulnificus* が分泌する毒素の中でも強力な細胞傷害性を有する RTX 毒素遺伝子が見出された。

最終章では、第2章および第3章にて得られた結果をまとめている。*V. vulnificus* の病原遺伝子を特定するために、これまで様々な研究が行われてきた。マウスなどの実験動物を用いることにより、生体外実験では見逃す可能性がある病原因子を見いだせるかもしれないが、実験動物を使うことのコストや倫理的問題は大きく、生体内で *V. vulnificus* の病原因子探索を試みたものは少ない。本研究で署名タグトランスポゾン挿入変異法および、カイコをモデル動物とした方法が *V. vulnificus* の病原遺伝子を特定するために適応できることが証明された。これらにより使用するマウスの数を減らすことができ、また哺乳動物を使わずに、生体内で *V. vulnificus* の病原遺伝子を探索することが可能になった。また得られた弱毒化株に生ワクチンとしての感染防御効果が見出され、効果的な予防開発に寄与することができると考えられる。本研究で得られた成果は、*V. vulnificus* 病原因子の関する研究に有用な方法を提供するものである。

主業績

No.1	
論文題目	Signature-tagged mutagenesis of <i>Vibrio vulnificus</i>
著者名	Mai YAMAMOTO, Takashige KASHIMOTO, Ping TONG, Jianbo XIAO, Michiko SUGIYAMA, Miyuki INOUE, Rie MATSUNAGA, Kohei HOSOHARA, Kazue NAKATA, Kenji YOKOTA, Keiji OGUMA Koichiro YAMAMOTO
発表誌名	The Journal of Veterinary Medical Science, Volume 77, Issues 7, 9 March 2015, Pages 823-828

副業績

No.1	
論文題目	A silkworm infection model to study the <i>Vibrio vulnificus</i> virulence genes
著者名	Mai YAMAMOTO, Takashige KASHIMOTO, Yukihiko YOSHIMURA, Nao TACHIBANA, Shiho KURODA, Yoshiko MIKI, Sou KITABAYASHI, Ping TONG, Jianbo XIAO, Koichi TANAKA Hiroshi HAMAMOTO, Kazuhisa SEKIMIZU, Koichiro YAMAMOTO
発表誌名	Molecular Medicine Reports (accepted for publication)

## 論文審査結果の要旨

ビブリオ科に属するグラム陰性嫌気性細菌の *Vibrio vulnificus* は、人に感染すると急速に組織を破壊して死亡させることがあり、別名人食いバクテリアと呼ばれる。健常人への感染はほとんど無症状だが、肝疾患や免疫不全などリスク要因を持つ人が感染すると、極めて短時間で敗血症を発症する恐れがあり、その場合の致死率は50%を超える。近年、世界的に感染者が増加しつつあるが、この菌が体内で急激に増殖して組織を壊死させる仕組みは未だ不明である。本論文は、動物体内での *V. vulnificus* の増殖及び毒性発現の機構を明らかにする目的で、2つの手法を用いて病原因子を探索した研究の報告である。

### 1. 署名タグトランスポゾン挿入変異法による探索

本方法は、トランスポゾン（転移性 DNA）を *V. vulnificus* のゲノム DNA にランダムに挿入して作成した変異株群の中から、病原因子遺伝子が破壊されて弱毒化した株を探索する方法である。更にトランスポゾンに識別可能な配列（署名タグ）を付加し、81変異株の毒性を1匹のマウスで同時に評価することを可能にしている。申請者は計6480変異株を試験し、感染後にマウス体内で増殖しない11株を同定した。同定された株では、核酸・アミノ酸代謝、糖合成、膜輸送などに関わる遺伝子が破壊されていたため、これらの経路が *V. vulnificus* の感染後増殖に重要であると結論した。また、弱毒化株を生ワクチンとして接種したマウスは、*V. vulnificus* の感染に対して強い耐性を獲得した。

### 2. カイコを感染モデルとした探索

*V. vulnificus* のように生体内での増殖に伴って病原性を発現する菌の解析には、生きた実験動物を使用せざるをえないが、マウスなど脊椎動物の使用はコストや倫理面での問題が大きい。そこで申請者は感染モデルにカイコを利用することを試みた。はじめに、*V. vulnificus* がカイコにも病原性を示すことを確認した。次に、1061株のトランスポゾン挿入変異株の中から、接種してもカイコが死なない株を探索し、細胞傷害性 RTX 毒素遺伝子が破壊された株を得た。従って、カイコをモデル動物とした方法は *V. vulnificus* の病原因子の探索に有効であると結論した。

四方を海に囲まれ、刺身や寿司など魚介類を生食する食文化を持つわが国にとって、*V. vulnificus* 感染症は食品衛生及び公衆衛生の点から重大な問題である。今回の成果は、*V. vulnificus* 感染症に対する治療法、予防法の確立に貢献すると共に、病原因子の更なる研究に有用な方法を提供するものである。以上の結果より、本論文は博士（栄養学）の学位論文として価値あるものと認める。