

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～1012

課題番号：22790422

研究課題名（和文）人獣共通感染症病原体レプトスピラによる宿主適応戦略の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Study on the molecular mechanisms of host adaptation of *Leptospira interrogans*

研究代表者

小泉 信夫 (NOBUO KOIZUMI)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：10333361

研究成果の概要（和文）：レプトスピラの細胞接着タンパク質の同定を目的とし、ファージディスプレイ法およびAIDA transporterとの融合タンパク質としての大腸菌細胞表面に発現させる系を用いて培養細胞に接着するクローンの単離を行ったが、特定のクローンを得ることはできなかった。大腸菌との接合により、レプトスピラで *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法を確立した。

研究成果の概要（英文）：To identify leptospiral proteins which function in cell attachment, we employed recombinant T7 phage and *Escherichia coli* which expresses leptospiral proteins fused with 10B capsid protein and AIDA transporter protein on its cell surface, respectively. We screened recombinant phages and *E coli* cells which bound to cultured cells but failed to obtain specific clones. We established a method of *mariner* transposon mediated mutagenesis in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp by conjugational transfer with *E coli*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	900,000	0	900,000
2012年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	0	2,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性・人獣共通感染症・レプトスピラ・スピロヘータ

## 1. 研究開始当初の背景

レプトスピラは、スピロヘータ目レプトスピラ科に属するグラム陰性細菌で、人獣共通感染症であるレプトスピラ症の病原体である。レプトスピラは、野生動物（ネズミなどのげっ歯類など）、家畜（ウシ、ブタ）、愛玩動物（イヌ）の腎臓に長期間定着し尿中へ

と排出される。動物とそれに保菌されるレプトスピラには特異的な関連があり、特定の動物種の腎臓に特定のレプトスピラ血清型が定着することが知られている。たとえば、血清型 *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni* はドブネズミ、血清型 *Canicola* はイヌ、血清型 *Hardjo* はウシの腎臓に特異的に定着する

ことが明らかになっている。レプトスピラの宿主組織や細胞接着に関する研究は、これまで培養細胞を用いた *in vitro* の実験により、レプトスピラの細胞への接着・侵入が観察されている。しかしながら、レプトスピラでは遺伝学的方法の欠如により、腸内細菌などで行われている遺伝子破壊とその遺伝子の相補実験を行うことができないため、レプトスピラの腎臓への定着の分子機構については明らかになっていない。

レプトスピラが自然界で生存を維持するためには、動物の腎臓に定着し、そこから尿中へと排出され、新たな宿主へと伝播を繰り返していく必要がある。特定のレプトスピラの血清型が、特定の動物種の腎臓に定着指向性があるということは、レプトスピラは生存範囲を拡大するために、特定の動物を宿主としてその腎臓に定着できるよう自身を適応させていったと考えることができる。その適応戦略としては、あるひとつの接着因子をそれぞれの動物種の受容体の変異に対応できるように改変していった、あるいはそれぞれの血清型が、各動物種にのみ特異的に存在する受容体を認識することができる異なる接着因子を獲得してきたと考えられるが、どちらの戦略をレプトスピラがとってきたかは不明である。

ヒトおよび動物は、保菌動物の尿や尿に汚染された環境（水や土壌）との接触よりレプトスピラに感染する。したがって、レプトスピラの腎臓定着機構を解明することは、レプトスピラの腎臓定着を阻害できるような薬剤やワクチンの開発につながることを期待され、レプトスピラ症の制御においても重要である。

## 2. 研究の目的

人獣共通感染症の病原体レプトスピラの宿主適応戦略の分子基盤を解明するために、レプトスピラが血清型特異的に特定の動物種の腎臓に定着できる分子機構を明らかにすることを目的とする。ドブネズミに特異的に保菌されている血清型 Copenhageni から、ラット腎臓由来培養細胞への結合を指標に生化学的および分子生物学的手法を用いて、細胞への接着に必須な因子（結合タンパク質）の同定を行う。同定されたレプトスピラ腎臓結合タンパク質の宿主細胞受容体を、ラット腎臓由来培養細胞より生化学的および分子生物学的手法により探索する。血清型 Copenhageni から同定された接着因子について、これ以外の血清型の相同遺伝子、また宿主受容体のラット以外の動物種の相同遺伝子を探索すること、また同定された接着因子/受容体の相互作用（結合）に必須の領域を決定し、その領域配列を比較する。

## 3. 研究の方法

(1) ファージディスプレイ法によるレプトスピラ細胞接着タンパク質の同定

①組換えファージの作製：レプトスピラ血清型 Copenhageni (Fiocruz L1-130 株) および血清型 Manilae (UP-MMC-NIID 株) から抽出したゲノム DNA を超音波処理により断片化した。断片化 DNA のアガロース電気泳動を行い、500~2000 bp の DNA 断片をゲルから抽出した。抽出した DNA 断片の平滑末端化を行い、*EcoR* I アダプターおよび *Hind*III アダプター付加を行った。アダプターを付加したレプトスピラ DNA 断片を *EcoR* I / *Hind*III 消化 T7 ファージゲノム (T7Select10-3, Novagen) とライゲーションし、*in vitro* packaging を行い組換えファージを得た。

②細胞接着実験：ラット腎臓由来培養細胞 NRK52E を 12 ウェルプレートで培養した。一部の培養細胞はパラホルムアルデヒドで固定を行った。10<sup>9</sup> pfu 組換えファージを培養細胞に加え室温で 1 時間静置した。培養液で 6 回洗浄を行った後、1% SDS/SM で細胞に結合したファージを回収した。回収したファージを大腸菌に感染・増殖後に、上記のスクリーニングを計 5 回行った。最終スクリーニング後のファージから、インサートレプトスピラ DNA を PCR で増幅し、その塩基配列を決定した。オリジナルの組換えファージ 10<sup>5</sup> pfu 相当のスクリーニングを行った。

(2) 大腸菌 AIDA 融合タンパク質発現法による細胞接着タンパク質の同定

①組換え大腸菌の作製：上記の平滑末端化したレプトスピラゲノムを AIDA translocator を発現するプラスミド pMK90 の *Sma* I サイトにクローニングした。プラスミドを大腸菌 UT4400 に導入しレプトスピラゲノムライブラリーを作製した。

②細胞接着実験：NRK52E あるいは HeLa 細胞を 12 ウェルプレートで培養した。10<sup>8</sup> 組換え大腸菌を培養細胞に加え遠心分離 (1000×g, 5 分間) 後、37°C で 1 時間培養した。培養液で 6 回洗浄後、大腸菌を回収しプレート培養した。回収された大腸菌を用いて上記のスクリーニングを 5 回繰り返した。5 回目スクリーニング後の大腸菌が保持するプラスミドのインサートを PCR で増幅し、塩基配列を決定した。オリジナルの組換えファージ 10<sup>5</sup> pfu 相当のスクリーニングを行った。

(3) トランスポゾンを用いたレプトスピラの突然変異体作製

①形質転換法：*Himar*1 トランスポゾンをコードするプラスミド pSHTK を、エレクトロポレーションにより病原性レプトスピラ UP-MMC-NIID 株、血清型 Hebdomadis (OK2 株)、非病原性レプトスピラ血清型 Patoc (Patoc

I 株)により導入した。また同トランスポゾンコードする pCjSK2 を大腸菌に保持させ、接合により上記 3 株への導入を行った。エレクトロポレーションおよび接合の条件は Slanti & Picardeau の方法 (Methods Mol Biol 859:169-176, 2012) に従って行った。②マイクロドロプレット法による形質転換体の単離：上記形質転換後のレプトスピラ培養液 500  $\mu$ l にプルロニック溶液 50  $\mu$ l および 2%アガロース 5 ml を混合し、孔径 10  $\mu$ m の疎水性膜 (SPG シリンジコネクタ) を通して、エマルジョンオイル中でアガロースドロップを作製した。ドロップを遠心分離により回収・洗浄し、EMJH 培地中で培養した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ファージディスプレイ法によるレプトスピラ細胞接着タンパク質の同定

レプトスピラ Fiocruz L1-130 株あるいは UP-MMC-NIID 株の全タンパク質を 10B キャプシドタンパク質との融合タンパク質として T7 ファージ上に提示するゲノムライブラリーを作製した。オリジナル  $10^5$  pfu 相当の組換えファージライブラリーから、これらレプトスピラの保菌動物であるラットの腎臓由来培養細胞 NRK52E に結合するクローンのスクリーニングを行った。パラホルムアルデヒドによる培養細胞の固定の有無、洗浄条件 (バッファーや回数) を変えてスクリーニングを行い、最終的に得られたクローンのインサート塩基配列を決定したが、配列が重複するものがなく、培養細胞に特異的に結合すると考えられた組換えファージを得ることはできなかった。

##### (2) 大腸菌 AIDA 融合タンパク質発現法による細胞接着タンパク質の同定

レプトスピラ Fiocruz L1-130 株あるいは UP-MMC-NIID 株の全タンパク質を大腸菌の AIDA transporter の translocator ドメインとの融合タンパク質として大腸菌の細胞表面に発現させるゲノムライブラリーを作製した。このライブラリーを、上述の NRK52E 細胞およびレプトスピラの接着性が高かった HeLa 細胞へ結合するクローンのスクリーニングを行った。コントロールとして、これまでの研究から細胞接着への関与が示唆されているレプトスピラ leucine-rich repeat タンパク質 (LA3321) のリピート部分を pMK90 にクローニングし大腸菌で発現させた。LA3321/AIDA 融合タンパク質を発現する大腸菌を抗 LA3321 抗体で免疫染色を行ったところ、細胞表面での発現が確認された (図 1)。またこの大腸菌を HeLa 細胞に感染させたところ、図 2 のように細胞への接着がみられた。

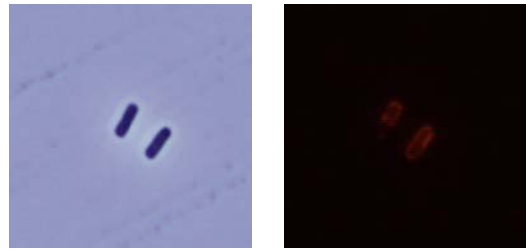


図 1. LA3321/AIDA 融合タンパク質を発現する大腸菌。左:位相差顕微鏡像, 右:抗 LA3321 を用いた免疫染色像

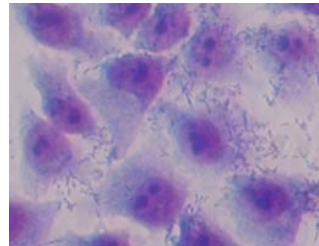


図 2. LA3321/AIDA 融合タンパク質を発現する大腸菌の HeLa 細胞への接着 (ギムザ染色)

この細胞接着実験系を用いてオリジナル  $10^5$  組換え大腸菌のスクリーニングを行い、最終的に得られたクローンのインサート塩基配列を決定したが、配列が重複するものがなく、培養細胞に特異的に結合すると考えられた組換え大腸菌を得ることはできなかった。

今後はゲノム配列情報から外膜タンパク質と考えられる遺伝子を個別にクローニングし、本実験系で結合タンパク質の同定を試みる。

##### (3) トランスポゾンを用いたレプトスピラの突然変異体作製

レプトスピラでは腸内細菌で用いられているような遺伝学的ツールがなく、遺伝子破壊株の作製ができなかったが、最近 *Himar1* トランスポゾンを利用したランダム突然変異体の作製法が報告された。そこで研究代表者が保有する実験動物に感染性のあるレプトスピラ UP-MMC-NIID 株および OK2 株で、このトランスポゾンを用いたランダム突然変異体の作製を行った。まずエレクトロポレーションによる pSHTK を用いた変異体作製を試みたが、その効率は UP-MMC-NIID で  $10^{-11}$  と低く、また OK2 では変異体を得ることができなかった。また変異体の単離を効率よく行うために、エレクトロポレーション後のレプトスピラ 1 細胞をアガロースドロップ内に封入して培養するマイクロドロプレット法による変異株のクローニングを試みたが、効率の良いクローニング条件を決定することはできなかった。続いてトランスポゾンベクター-pCjSK2 を保持する大腸菌との接合による

変異体作製を試みたところ、UP-MMC-NIID において  $10^{-8}$  効率で変異体を得ることができた。この効率は既報の効率と同程度であった。一方 OK2 の効率は  $10^{-9}$  以下であった。現在変異株のトランスポゾン挿入部位の決定を順次行っており、遺伝子が破壊されている株の細胞接着性を今後調査する。また非病原性レプトスピラ Patoc I 株においては本接合法により  $10^{-6}$  の効率で変異体を得られたことから、今後とも高い形質転換能をもつ病原性レプトスピラの探索を継続していく。

## 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 2 件)

- ① 小泉信夫, レプトスピラ症の現状, 獣医畜産新報, 査読無, 66 巻, 2013, 252-254
- ② 小泉信夫, レプトスピラ症, 化学療法の領域, 査読無, 29 巻, 2013, 670-678

[学会発表] (計 1 件)

- ① 小泉信夫, レプトスピラ症の現状, 第 12 回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 2012 年 11 月 3 日, 東京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小泉 信夫 (KOIZUMI NOBUO)  
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官  
研究者番号: 10333361

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし