

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590528

研究課題名(和文) 病原性レプトスピラの宿主細胞への侵入機構

研究課題名(英文) Mechanism of *Leptospira interrogans* host cell invasion

研究代表者

Toma Claudia (TOMA, Claudia)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40325832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：病原性レプトスピラは、人獣共通感染症であるレプトスピラ症を引き起こす。本菌の宿主細胞への侵入性は病態形成に関与すると報告されているが、侵入機構の詳細についてはほとんど理解されていないのが現状である。本研究では、高病原性株(LP株)と低病原性株(HP株)の遺伝子発現プロファイルを解析した結果、HP株ではImb216とligBの発現が顕著に減少していることを明らかにした。LMB216とLigBはファイブロネクチン結合性外膜タンパクであり、変異株等を用いてマクロファージへの侵入に必要な因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Leptospira interrogans is responsible for the zoonotic disease leptospirosis. The pathogenic mechanisms of this spirochete remain poorly understood. Leptospiral outer membrane proteins are thought to be responsible for persistence in vivo via interaction with specific host components. In this study, we analyzed the transcriptional profile of a virulent strain and its culture-attenuated derivative strain to identify bacterial factors that may be involved in pathogenesis. Two outer membrane proteins, LMB216 and LigB were downregulated more than ten-fold in the culture-attenuated strain. We show that both proteins play a role in leptospiral uptake by macrophages and that LMB216, as well as LigB, enhances the binding of leptospires to fibronectin. Taken together, our results indicate that LMB216 plays a role in pathogen interaction with host molecule/s, which may contribute to pathogenesis of leptospirosis.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 レプトスピラ 外膜タンパク マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

病原性レプトスピラは多くの哺乳動物に感染し、腎尿細管で増殖し尿中へと排出される。ヒトは、この尿との直接的な接触、あるいは尿に汚染された水や土壌との接触により感染する。レプトスピラ症の軽症型の場合は風邪と似た症状でやがて回復するが、重症型（ワイル病）の場合は黄疸、出血、肝・腎臓の障害などの症状がみられ高い死亡率を示す。レプトスピラ感染患者は世界で年間30-50万人と推定されており、中南米、東南アジアなどの熱帯、亜熱帯地域ではマラリアやデング熱に次いで重要な感染症である。レプトスピラ症の病態形成のメカニズムはほとんど解明されておらず、病原因子としては溶血毒素や、宿主細胞外マトリックスへの接着に関与している外膜タンパク等の報告があった。また、本菌の宿主細胞への侵入性は病態形成に関与すると報告されていたが、侵入機構の詳細についてはほとんど理解されてないのが現状であった。

様々な病原細菌の宿主細胞への侵入機構が報告されていたが、いずれも桿菌か球菌を用いた研究であり、スピロヘータの細胞侵入機構の報告はなかった。それまでに報告されていた機構は大きくトリガーモデルとジッパーモデルに分けることができ、各モデルではいくつもの共通点があった。トリガーモデルでは、III型分泌装置で分泌されるエフェクターがマクロピノサイトシスを誘導し、菌は侵入することが明らかになっていた。病原性レプトスピラの全ゲノム配列が決定されていたが、ゲノムの解析によるとレプトスピラにはIII型分泌装置は存在しておらず、宿主タンパクと相互作用可能な外膜蛋白が多くコードされていることが明らかになっていた。

### 2. 研究の目的

本菌の宿主細胞への侵入過程は、病態形成の鍵となる重要なステップであるが、病原性レプトスピラの侵入機構はほとんど理解されてなかった。本研究では、病原性レプトスピラが細胞内へ取り込まれるために必要な病原因子および宿主因子を同定し、病原性レプトスピラの細胞侵入の分子機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究を遂行するにあたり、病原性レプトスピラとして *L. interrogans* 血清型 Manilae low-passage (LP) 株 と high-passage (HP) 株を用いた。LP 株、すなわち動物に感染後に腎臓から分離し、継代数の少ない株は高い病原性を持ち CH3/HeJ マウスに対して致死を誘導する。一方、HP 株、すなわち LP 株を人工培地 (EMJH 培地) にて継代を長期間繰り返した株は、マウスに対して非致死性となり病原性が低下する。

(2) 菌の細胞内への侵入はマウス骨髄由来

マクロファージに LP 株および HP 株を感染させ、蛍光免疫染色にて評価した。また、細胞内の菌数の定量化は、リアルタイム PCR 法で行った。

(3) ニンブルジェンのマイクロアレイにて両株の発現プロファイルの解析を行い、候補因子については qRT-PCR で発現の差異の確認を行った。

(4) 抗 LMB216 抗体を得るために、合成ペプチド 3159 (GSIPFTYNTVQTIPNLNVVTDK) 又はペプチド 3160 (YKPGYIATIEIVFNPNVKKK) を用いてウサギを免疫した。

(5) 菌の宿主細胞外マトリクスタンパク質への結合は ELISA で定量化した。

### 4. 研究成果

HP 株は LP 株よりマクロファージへの定着・侵入が低下していた (図 1)。また、LP 株の細胞への侵入かアクチン重合の阻害剤である cytochalasin D で減少した (図 2)。

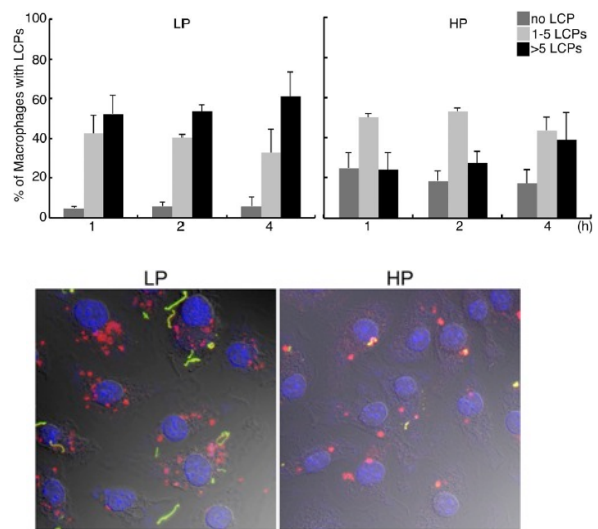


図 1. マクロファージ感染後の細胞内外のレプトスピラを蛍光染色にて解析した。緑色：細胞外の菌を示す。赤色：細胞内の菌を示す。青色：マクロファージの核を示す。LCP: Leptospira-containing phagosomes.

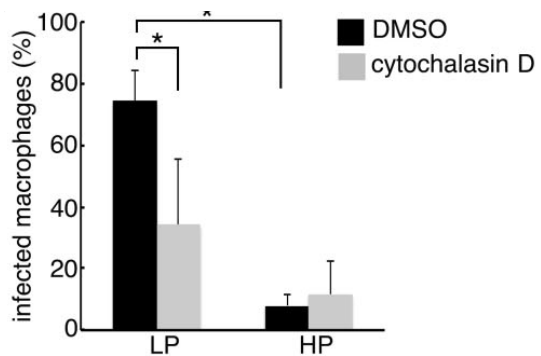


図 2. 阻害剤 (cytochalasin D) で 30 分間前処理したマクロファージを感染させ、感染したマクロファージを定量化した。

両株の遺伝子発現プロファイルを解析した結果、14 個の遺伝子が HP 株での発現が 10 倍

以上減少していた。その中で2つの外膜タンパク(LMB216とLigB)に注目し、定量RT-PCRでmRNAが顕著に減少していることを確認した(図3)。

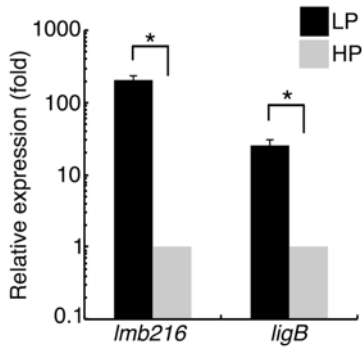


図3. qRT-PCRにて*lmb216*と*ligB*の発現量の差を認めた。\*  $p < 0.05$  Mann-Whitney *U* test.

LigBは既に宿主の細胞外マトリクス結合性外膜タンパクとして報告されていた。LP株とHP株の細胞外マトリクスタンパクへの結合性をELISAで調べた結果、両株ではファイブロネクチン・ラミニン・コラーゲンへの結合性の差を認めた(図4)。

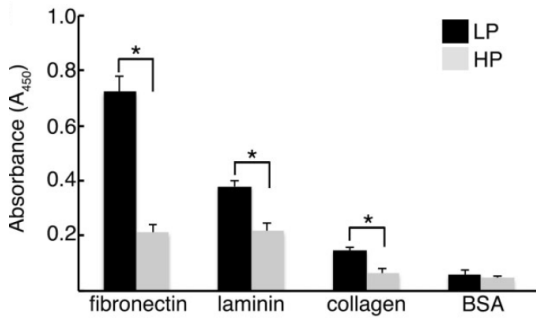


図4. 細胞マトリクスタンパクへの結合性(ELISA). BSAは陰性コントロール。\*  $p < 0.05$  Mann-Whitney *U* test.

LMB216は新規病原因子として着目した。抗-LMB216抗体を作製し、タンパク質レベルでの解析も行った。LP株ではLMB216は約120kDaの位置で泳動したが、HP株では検出されなかった(図5)。

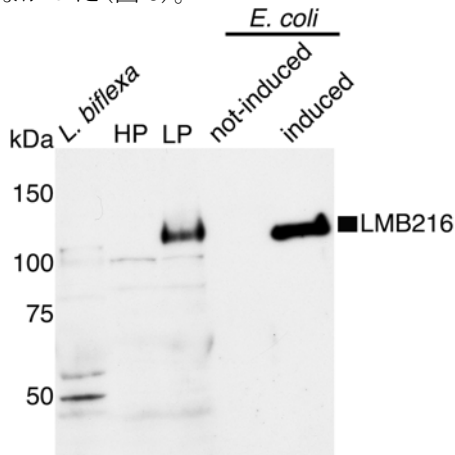


図5. 菌体のインムノブロット。*L. biflexa*: 非病原性レプトスピラ。また、2%パラホルムアルデヒド(2%PFA)

固定後に蛍光免疫染色にてLMB216が検出できた。2%PFA固定では膜構造が保持されるため細胞内のタンパク質は染色されない。この結果は、LMB216は菌体表面に突出している外膜タンパクであることが示唆された(図6)。

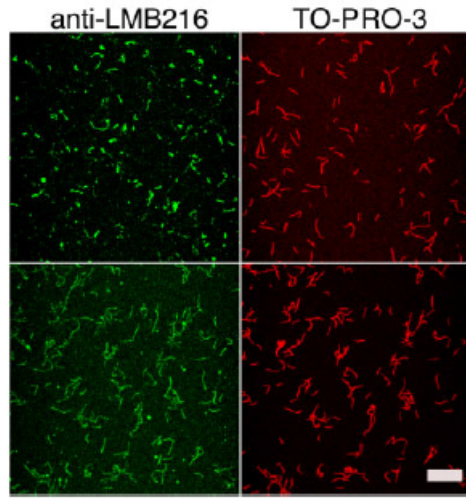


図6. 2%PFA(上)又はメタノール(下)で固定した菌体を抗LMB216抗体で蛍光免疫染色を行った。コントロールとしてTO-PRO-3で菌の染色体を染めた。

次に、これらの外膜タンパクの役割を明らかにするために、LMB216とLigBをコードする遺伝子をトランスポゾン導入によって破壊し、変異株を作製した。変異株は野生株(LP株)よりマクロファージへの侵入が低下することがみとめられ、*lmb216*遺伝子はマクロファージへの侵入に必要であることが判明した(図7)。

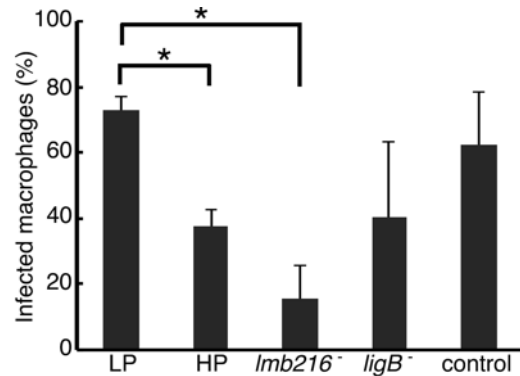
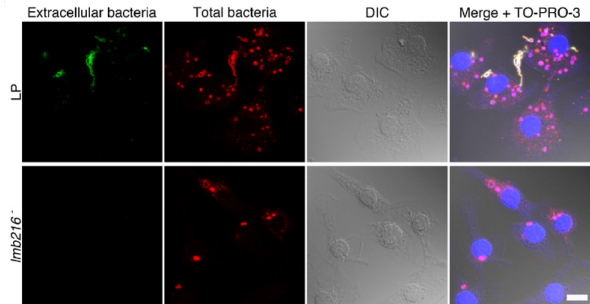


図7. マクロファージをLP, HP及び各変異株で感染し、一時間後に固定し蛍光免疫染色を行い感染したマクロファージを定量化した。\*  $p < 0.05$  Mann-Whitney *U* test.

さらに、本来侵入能をもたない非病原性レプトスピラ *L. biflexa* で LMB216 と LigB を発現させることにより、両タンパクはファイブロネクチンへの結合性とマクロファージへの侵入能を付加することがわかった (図 8、図 9)。

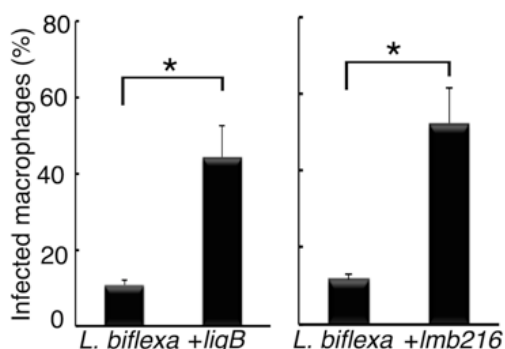


図 8. 野生株の *L. biflexa* または *L. biflexa* で LigB あるいは LMB216 を発現させた株でマクロファージを感染させ、一時間後に感染したマクロファージを定量化した。  
\*  $p < 0.05$  Mann-Whitney *U* test.

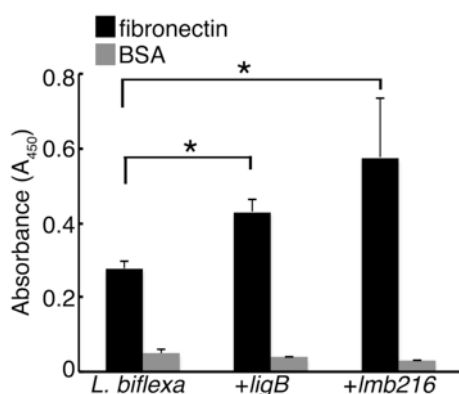


図 9. ファイブロネクチンへの結合性 (ELISA) . BSA は陰性コントロール. \*  $p < 0.05$  Mann-Whitney *U* test.

これらの結果より、新規因子 LMB216 はファイブロネクチン結合性な外膜タンパクであり、マクロファージへの侵入に必要な因子であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Toma C, Murray GL, Nohara T, Mizuyama M, Koizumi N, Adler B and Suzuki T. *Leptospira* outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. *Cell Microbiol.* 2014, 16: 1366-1377. doi: 10.1111/cmi.12296. 査読有

② King AM, Petre G, Bartpho T, Swermswan RW, Toma C, Suzuki T, Eshghi A, Picardeau M, Adler B and Murray GL. High-temperature protein G is an essential virulence factor of

*Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2014, 82: 1123-1131. doi:10.1128/IAI.01546-13. 査読有

③ Higa N, Toma C, Nohara T, Nakasone N, Takaesu G and Suzuki T. Lose the battle to win the war: bacterial strategies for evading host inflammasome activation. *Trends Microbiol.* 2013, 21: 342-349. doi: 10.1016/j.tim.2013.04.005. 査読有

④ Higa N, Toma C, Koizumi Y, Nakasone N, Nohara T, Masumoto J, Kodama T, Iida T and Suzuki T. *Vibrio parahaemolyticus* effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling. *PLoS Pathog.* 2013, 9: e1003142. doi: 10.1371/journal.ppat.1003142. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Toma C, Murray GL, Higa N, Nakasone N, Nohara T, Takaesu G, Koizumi H, Adler B and Suzuki T. Analysis of the bacterial factors involved in *Leptospira interrogans*-macrophage interactions. 8<sup>th</sup> Scientific Meeting of International Leptospirosis Society. October 9, 2013. 九州大学医学部 百年講堂 (福岡県、福岡市) .

② King AM, Bartpho T, Swermswan RW, Toma C, Suzuki T, Picardeau M, Adler B and Murray GL. High temperature protein G (HtpG) is essential for acute leptospirosis in hamsters. 8<sup>th</sup> Scientific Meeting of International Leptospirosis Society. October 8, 2013. 九州大学医学部 百年講堂 (福岡県、福岡市) .

③ Toma C, Murray GL, Higa N, Nakasone N, Nohara T, Koizumi N, Adler B and Suzuki T. Analysis of the virulence factors involved in *Leptospira interrogans*-macrophage interactions. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 幕張メッセ国際会議場 (千葉県、千葉市) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

Toma Claudia (TOMA Claudia)  
琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：40325832

### (2) 研究分担者

鈴木 敏彦 (SUZUKI Toshihiko)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10292848