

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08797

研究課題名(和文)レプトスピラの維持宿主動物における持続感染機構の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of persistent infection of *Leptospira interrogans* in maintenance host animal

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：人獣共通感染症病原体レプトスピラの維持宿主動物の腎臓への持続感染に必須の因子を明らかにするために、トランスポゾン挿入変異体を作製し、ラット感染実験を行った。レプトスピラ変異体96株を1群あるいは414株を1群としてラットに接種し、接種培養液DNAと接種3週間後の腎臓培養DNAのトランスポゾン挿入位置の近傍の配列を次世代シーケンサーにより決定し比較を行った。その結果、96株を接種した実験では2遺伝子、414株を接種した実験では7遺伝子が腎臓から検出されなかった。したがってこれら9遺伝子が維持宿主における持続感染に必須な遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって病原性レプトスピラにおいて効率的なトランスポゾン挿入変異法を確立し、動物感染実験と次世代シーケンサーを用いた大規模シーケンシングによって、感染に必須なレプトスピラ遺伝子の網羅的同定が可能となった。本研究によって明らかとなった、また今後この方法により同定されるレプトスピラ因子をターゲットとして、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およびヒトの健康増進に寄与しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify genes of *Leptospira interrogans*, a zoonotic bacterium, essential for persistent infection in kidney tissues of maintenance host animals, we conducted infection experiments of rats using *Leptospira* mutants created by random transposon mutagenesis. A group of 96 mutants or a group of 414 mutants was inoculated to rats. Then, leptospiral DNA sequences adjacent to transposon from inoculum and kidney culture were sequenced by next generation sequencer and the sequences were mapped to the reference genome. As a result, two and nine genes were not detected in the kidney culture of 96 mutant- and 414 mutant-inoculated rats, respectively, suggesting that these genes are essential for persistent infection in rats.

研究分野：細菌学

キーワード：レプトスピラ 維持宿主 持続感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は、スピロヘータの1種である病原性レプトスピラによって引き起こされる人獣共通感染症である。発症者の大部分は、インフルエンザ様症状で軽快する軽症型であるが、5~10%の患者は黄疸・出血・腎不全を伴う重症型に発展する。

病原性レプトスピラは、自然界では維持宿主と呼ばれる哺乳動物の腎臓に持続感染している。レプトスピラは尿とともに排出され、経皮あるいは経粘膜的に宿主動物に感染する。ヒトや家畜などは、レプトスピラを含む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偶発的に感染し発症する。したがって、維持宿主動物の腎臓へのレプトスピラの定着(保有体化)を阻害することはレプトスピラ症の制御に重要であり、このためにはレプトスピラの維持宿主における持続感染の機構を解明することが必須である。

維持宿主動物における持続感染の成立には、細胞バリアを貫通して血流に侵入し、血液の殺菌機構に抵抗して腎臓に到達し、腎臓に定着をする必要がある。しかしながら、レプトスピラでは効率的な遺伝学的方法の欠如により、補体成分や細胞外マトリックス構成タンパク質に結合するレプトスピラタンパク質の持続感染における役割・意義や、細胞バリア貫通や腎臓の定着に必須の因子、そして持続感染が成立するための詳細な機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

レプトスピラの維持宿主動物の腎臓への持続感染に必須の因子を明らかにするために、病原性レプトスピラのトランスポゾン挿入ランダム変異法を確立し、変異体ライブラリーのラット感染実験を行い、感染ラット腎臓中のレプトスピラ変異体 DNA を次世代シーケンサーで解析することで、持続感染に関与するレプトスピラ遺伝子の網羅的探索を目的とした。また研究代表者が明らかにした、レプトスピラ血清型 Hebdomadis 感染でみられる雄ハムスターの肺出血のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 個別培養したトランスポゾン挿入変異体 96 株のラット感染実験

トランスポゾンランダム挿入変異法により *L. interrogans* 血清型 Manilae の変異体ライブラリーを作製した。個別に培養した変異体 96 株を 1 群として、 1×10^8 細胞 (各株 1×10^6 細胞) を 6 週齢のラット WKAH/Hkm に腹腔内接種するとともに、接種レプトスピラ群から DNA 抽出を行った (この DNA を input DNA とする)。接種 3 週間後にラットを安楽死させ腎臓を摘出し、コルトフ培地で培養を行った。培養 8 日後に菌を回収して DNA 抽出を行った (この DNA を output DNA とする)。次世代シーケンサーを用いて input DNA と output DNA のトランスポゾン挿入位置の近傍の配列を決定した。ここから、リード数が input DNA で 9000 以上かつ output DNA で 10 未満の配列を選抜した。選抜したレプトスピラ DNA 配列特異的プライマーとトランスポゾンプライマーを用いて腎臓に定着できなかった変異体を 96 株から特定した。さらに、腎臓に定着できなかった変異体 11 株とコントロール群 3 株を 1 群として計 1.4×10^8 細胞 (各 1.0×10^7 細胞) を 6 週齢のラット WKAH に接種して、変異体の腎臓定着能を追試した。追試したそれぞれの配列について output DNA / input DNA 比を求めることで、腎臓の定着に必須な遺伝子を特定した。

(2) 腎定着欠損株の増殖速度および血漿抵抗性の比較

得られた腎定着欠損株 (RS05355, RS09165) について、*in vitro* での実験を行った。静止期初期の変異体および野生株培養液を新鮮な EMJH 培地に 1:100 で植え継ぎ 24 時間ごとに 420 nm の吸光度を測定し、増殖速度を比較した。血漿抵抗性については、各株培養液 50 μ l に同量のヒト血漿を加え、30 で 3 時間培養した後、顕微鏡で運動している菌数を測定することで野生株と変異体 2 株の生存数を比較した。

(3) トランスポゾン挿入変異体 414 株のラット感染実験

EMJH 培地 100 ml に変異体 414 株を一括で培養し、 1×10^8 細胞 (各 2.5×10^5) を 6 週齢のラット WKAH/Hkm に接種した。その後、前述の方法で解析を行い、リード数が input DNA で 5000 以上かつ output DNA で 100 未満の配列を特定した。

(4) レプトスピラ血清型 Hebdomadis 感染でみられる雄ハムスターの肺出血のメカニズム

L. interrogans 血清型 Hebdomadis 1×10^6 細胞を 6 週齢雌雄のシリアンハムスターの腹腔に接種し 120 時間後に解剖した。腎臓、肝臓および肺の組織病理、腎臓、肝臓、肺、血液のレプトスピラ DNA 定量、サイトカイン遺伝子発現の比較を、Fujita らの方法 (PLoS ONE 10:e0132694) に従って行った。

4. 研究成果

(1) 個別培養したトランスポゾン挿入変異体 96 株のラット感染実験

変異体 96 株を接種したラット感染実験において、リード数が input DNA で 9000 以上かつ output DNA で 10 未満の配列は 11 あり (表 1), それらにトランスポゾンが挿入された変異体を各配列特異的なプライマーを用いた PCR より特定した。これらの変異体 11 株について再度、感染実験を行った結果、遺伝子 RS05355 と RS09165 にトランスポゾンが挿入された変異体が腎臓に定着できなかったことが明らかになった (図 1)。したがって、この 2 遺伝子が持続感染に関与することが強く示唆された。

(2) 腎定着欠損株の増殖速度および血漿抵抗性の比較
RS05355 および RS09165 遺伝子の機能を明らかにするため、変異体の *in vitro* での増殖速度を野生株と比較した。その結果、腎定着欠損株と野生株の増殖速度に違いがみられなかった (図 2)。

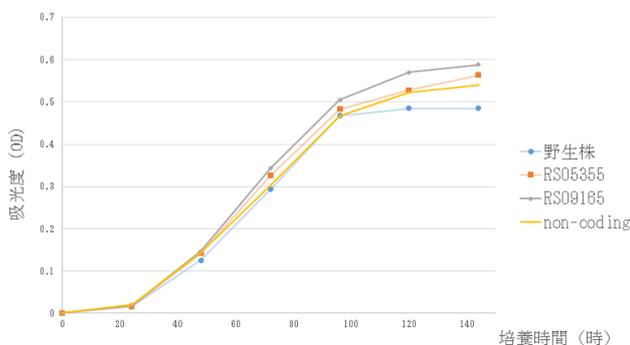


図2. 腎臓定着欠損株および野生株の *in vitro* での増殖速度
腎臓定着欠損株および野生株を 1:100 で EMJH 液体培地に植え継ぎ、経時的に波長 420 nm における吸光度を測定した。

(3) トランスポゾン挿入変異体 414 株のラット感染実験

変異体 414 株接種した実験において、リード数が input DNA で 5000 以上かつ output DNA で 100 未満の配列は 7 配列であり (表 2), これら 7 遺伝子が持続感染に関与していることが示唆された。このうち、LipL32 は病原

性レプトスピラでのみ発現している細胞外膜の主要なタンパク質であり、病原性への関与が示唆されている。しかし、*L. interrogans* serovar Manilae strain L495 の LipL32 欠損株 1.0×10^8 細胞を 6 週齢のラット Wistar に腹腔内接種した場合、接種 2 週間後に腎臓への定着がみられるという報告がある。本研究とはラットの系統や接種した菌数、解剖までの日数が異なっている。今後、条件をそろえて感染実験を行い、LipL32 の持続感染への関与を検証する必要がある。個別培養した変異体 96 株を接種した実験において、1 回目の実験では各変異体を 1.0×10^6 細胞接種し、腎定着欠損株が 11 株見いだされた。一方、追試では各変異体を 1.0×10^7 細胞接種した結果、2 株のみが腎臓に定着できないことが明らかとなった。このことから、接種する菌数によって腎臓への定着結果が異なることが明らかになった。変異体 414 株接種した実験

表1. 変異体96株接種ラット腎臓から検出されなかった変異体のトランスポゾンが挿入された遺伝子

<i>L. interrogans</i> 血清型 Manilae UP-MMC-NIID株		リード数	
Locus_tag	Product	input	output
LIMLP_RS00410	Hypothetical protein	12437	0
LIMLP_RS00835	Malate dehydrogenase	14000	1
LIMLP_RS02835	Methyl-accepting chemotaxis protein	15153	0
LIMLP_RS20535	Hypothetical protein	9446	2
LIMLP_RS05355	Hypothetical protein	18821	1
LIMLP_RS06945	Sensor histidine kinase	18811	1
LIMLP_RS09165	Hypothetical protein	14014	2
LIMLP_RS14125	M4 family peptidase	14224	2
LIMLP_RS14475	Hypothetical protein	16399	0
LIMLP_RS16480	DNA repair exonuclease	11400	0
LIMLP_RS16820	DUF1554 domain-containing protein	20598	1

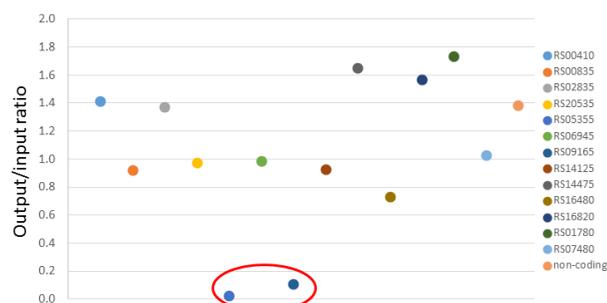


図1. 腎臓定着欠損株11株特異配列の2回目の感染実験におけるoutput/input比
検出されたoutput DNAとinput DNAの特定配列のリード数を全リード数で割るこ
とで割合に変換し、output DNA/input DNAで表した。

つづいて、腎定着欠損株のヒト血漿抵抗性を野生株と比較した結果、血漿混合 3 時間後の生存率は、野生株は 145%, RS05355 は 133%, RS09165 は 113%であった。したがってこの 2 遺伝子は増殖や血漿抵抗性には関与しないことが示唆された。今後は、血球による殺菌に対する抵抗性、運動能、細胞接着能を *in vitro* で野生株と比較し、持続感染におけるこれら遺伝子の機能について明らかにしていく。

表2. 変異体414株接種ラット腎臓から検出されなかった変異体のトランスポゾンが挿入された遺伝子

<i>L. interrogans</i> 血清型 Manilae UP-MMC-NIID株		リード数	
Locus_tag	Product	input	output
LIMLP_RS00285	Septal ring lytic transglycosylase RlpA family protein	14149	10
LIMLP_RS00325	HAMP domain-containing protein	5926	0
LIMLP_RS04860	16S ribosomal RNA	22435	89
LIMLP_RS06140	Ppx/GppA family phosphatase	6108	0
LIMLP_RS08590	Outer membrane surface lipoprotein LipL32	8942	4
LIMLP_RS09560	DUF1577 domain-containing protein	5421	0
LIMLP_RS16085	Methyltransferase domain-containing protein	9936	2

では各株を 2.5×10^5 細胞接種した。したがって今回特定したトランスポゾン挿入変異体 7 株の中にも、接種菌数を増やすことで結果が異なる可能性がある。今後、これら 7 遺伝子のノックアウト株を作製し、感染実験を行い、これら遺伝子が持続感染に関与するか検証する必要がある。

(4) レプトスピラ血清型 Hebdomadis 感染でみられる雄ハムスターの肺出血のメカニズム
Hebdomadis 感染によりオスでのみ感染 120 時間後に肺出血がみられたが、その時点ではレプトスピラ DNA は検出されなかったことから、感染にともなう肺出血は宿主の免疫応答に起因することが示唆された。また肺出血のみられない感染 96 時間後のメスおよび感染 120 時間後に肺出血のみられなかったオス個体で一酸化窒素合成酵素遺伝子 *inos* や *enos* の発現が有意に上昇したことから、レプトスピラ感染にともなう肺出血の抑制に一酸化窒素が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tomizawa Rina, Sugiyama Hiromu, Sato Ryoichi, Ohnishi Makoto, Koizumi Nobuo, Male-specific pulmonary hemorrhage and cytokine gene expression in golden hamster in early-phase *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis infection, *Microbial Pathogenesis*, 査読有, 111, 2017, 33–40
DOI: 10.1016/j.micpath.2017.08.016

Sasaki Yuya, Kawamoto Akihiro, Tahara Hajime, Kasuga Kie, Sato Ryoichi, Ohnishi Makoto, Nakamura Shuichi, Koizumi Nobuo, Leptospiral flagellar sheath protein FcpA interacts with FlaA2 and FlaB1 in *Leptospira biflexa*, *PLoS ONE*, 査読有, 13, 2018, e0194923
DOI: 10.1371/journal.pone.0194923

〔学会発表〕(計 2 件)

富澤莉那, 小泉信夫, 杉山広, 佐藤令一, 大西真, Gender difference of histopathology and cytokine gene expression in hamsters in *Leptospira* infection, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017

富澤莉那, 杉山広, 佐藤令一, 大西真, 小泉信夫, レプトスピラ感染ハムスターの組織病理とサイトカイン遺伝子発現の雌雄間比較, 第 54 回レプトスピラシンポジウム, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐々木祐哉

ローマ字氏名：Yuya Sasaki

研究協力者氏名：杉山広

ローマ字氏名：Hiromu Sugiyama

研究協力者氏名：富澤 莉那

ローマ字氏名：Rina Tomizawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。