

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07132

研究課題名（和文）新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の血清耐性因子の機能解析研究課題名（英文）Molecular mechanism of serum resistance on *Borrelia miyamotoi*

研究代表者

川端 寛樹 (Kawabata, Hiroki)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：60280765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の血清耐性メカニズム解析をおこなった。本研究では、*B. miyamotoi* プラスミド上にコードされる bom1093 ならびに bom1515 遺伝子が *B. miyamotoi* の血清耐性メカニズムに深く関与していること、ならびにこれらの機能は血清中のビトロネクチンに結合することで、補体系ターミナルパスウェイを負に制御し、これによる殺菌機構を回避することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興回帰熱起因菌である *Borrelia miyamotoi* の病原メカニズムはほとんど解明されていない。本研究は新興回帰熱患者が高度の菌血症を呈することから、病原体 *B. miyamotoi* は、ヒト自然免疫機構の一つである補体系への抵抗性を示すと考えられた。この作業仮説を元に、本研究では *B. miyamotoi* の新規病原因子 BOM1093 が血清中のビトロネクチンへ結合することで補体系の Terminal pathway を負に制御することを明らかにした。これらの発見は、新興回帰熱の病態を理解する上で有意義な発見となった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the serum resistance mechanism of *Borrelia miyamotoi*, an emerging relapsing fever pathogen. We found that the bom1093 and bom1515 genes encoded on *B. miyamotoi* episomal chromosome are deeply involved in the serum resistance mechanism of *B. miyamotoi*, and that their function is to bind to vitronectin in serum. These factors could negatively regulate the complement terminal pathway, thereby circumventing the bactericidal mechanism.

研究分野：細菌感染症学

キーワード：新興回帰熱 血清耐性

1. 研究開始当初の背景

新興回帰熱患者が高度の菌血症を呈することは、病原ボレリアがヒトの自然免疫から逃れるための病原メカニズムを備えているためと考えられた。ボレリア属細菌の宿主免疫回避機構として、1) 表層抗原遺伝子の組換えによる表層抗原の変換、2) 赤血球結合性による食細胞からの物理的隔離、3) 宿主補体系の攪乱による免疫回避機構が知られている。特にライム病ボレリアでは、補体系の負の制御因子(H因子等)と結合する事による補体反応の阻害等が報告されている。他方、ライム病ボレリアと比較して、新興回帰熱病原体である *Borrelia miyamotoi* がどのようなメカニズムでヒト宿主免疫機構から逃避しているか、ほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

新興回帰熱病原体 *B. miyamotoi* の血清耐性機序解明を目的とした。血清感受性でかつ形質転換が可能なライム病ボレリア *Borrelia garinii* 株を親株として構築した *B. miyamotoi* 由来膜抗原遺伝子ライブラリーから、単独で血清耐性の表現型を親株に付与した *B. miyamotoi* 由来の機能未知遺伝子について、各々の機能解析を行う。見出された候補遺伝子はヒト補体系による殺菌に対して抵抗性を付与している推定されることから、本研究では各々のボレリア因子について補体系制御に与るメカニズムを生化学的、分子生物学的に解析を行う。

3. 研究の方法

補体反応による殺菌機構はよく調べられており、概ね図1のような経路で反応が進む。推定されるボレリア側の補体抵抗機構として、1) C3 コンバーターゼ活性を負に制御する H 因子等と結合し、その下流の反応を抑制する、2) Vitronectin などの生体分子との結合により membrane attack complex (MAC) 構造の形成阻害を行う、3) 宿主 CD59-like 抗原を菌側が有することで MAC 構造の稼働を抑制する等が推定される。本研究では補体反応に関わる成分に対する抗体を用い、これを用いて補体因子の検出を蛍光顕微鏡下で観察するとともに、Affinity ligand binding assay により補体成分との結合性を確認した。次いで、補体各々のボレリア因子についてその機能ドメインを同定するために、遺伝子の一部を欠失させた変異体を作成し、補体抵抗性ならびに生体分子結合能を確認した。

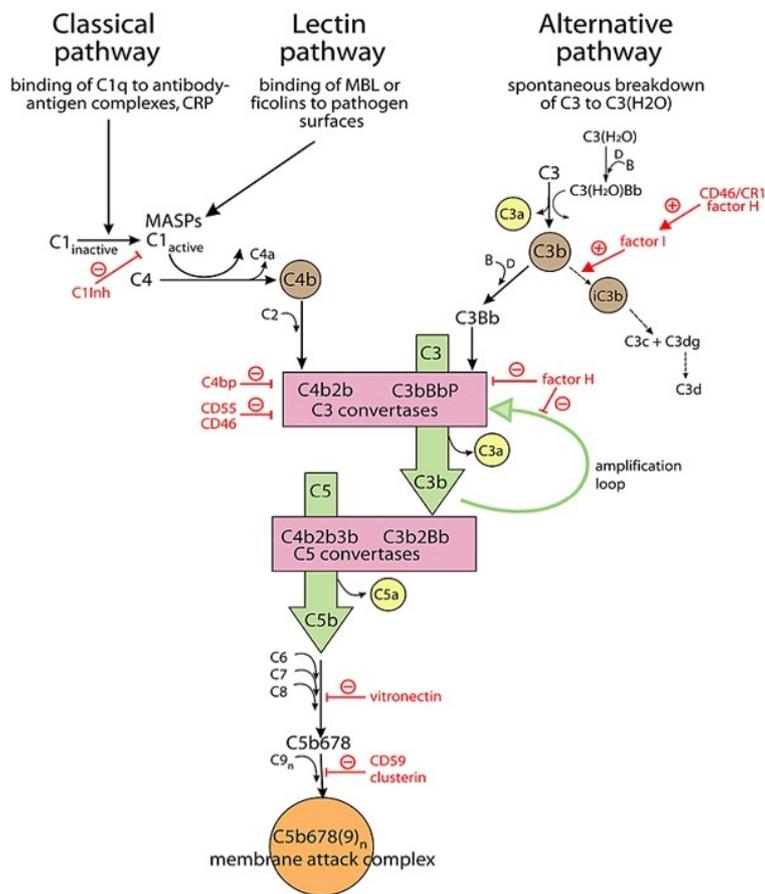


図1. ヒト補体系による殺菌機構の概略

4. 研究成果

B. miyamotoi 血清耐性機序解明を目的として、形質転換可能かつ血清感受性の *B. garinii* 株を recipient として、*B. miyamotoi* の表層抗原遺伝子を個別に導入したライブラリーを作成し、この内 *B. miyamotoi* 由来の *bom1093* ならびに *bom1515* 遺伝子が *B. garinii* に血清耐性を付与した。これら遺伝子は一次配列で 95%以上の相同性を示したことからその機能

性については *bom1093*, *bom1515* 遺伝子ともに共通と推測し, 本研究では *bom1093* 遺伝子に絞って解析を実施した (図2). *bom1093* 遺伝子は mock control に対して 1000cfu 以上の血清耐性能を親株に付与した. また *bom1093* 遺伝子の 3' 側より欠失変異株を作成し, 血清耐性に必要なドメインが C 末端側に存在することを明らかにした (図3). また Bom1093 抗原はクラスタリンとの結合能を有することに加えて本抗原がビトロネクチン結合能を有することが pull down assay などから明らかとなった. Bom1093 抗原のビトロネクチン結合ドメインは C 末端側に存在することも本研究で明らかとなった. これは欠失変異株を用いた血清感受性試験に基づく機能ドメイン解析結果と矛盾は生じなかった.

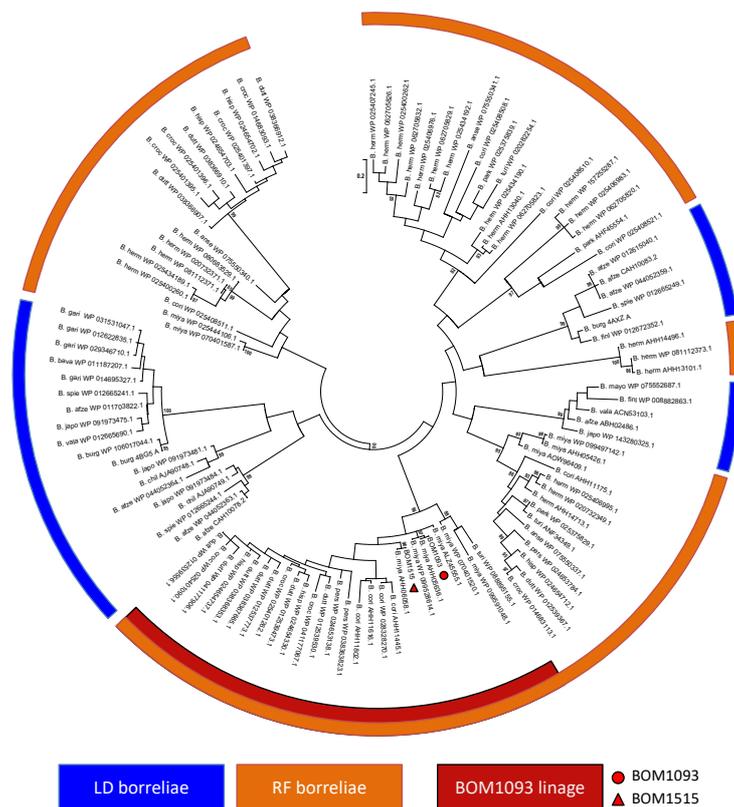


図2. Bom1093ならびにBom1515抗原のアミノ酸配列に基づいた系統解析

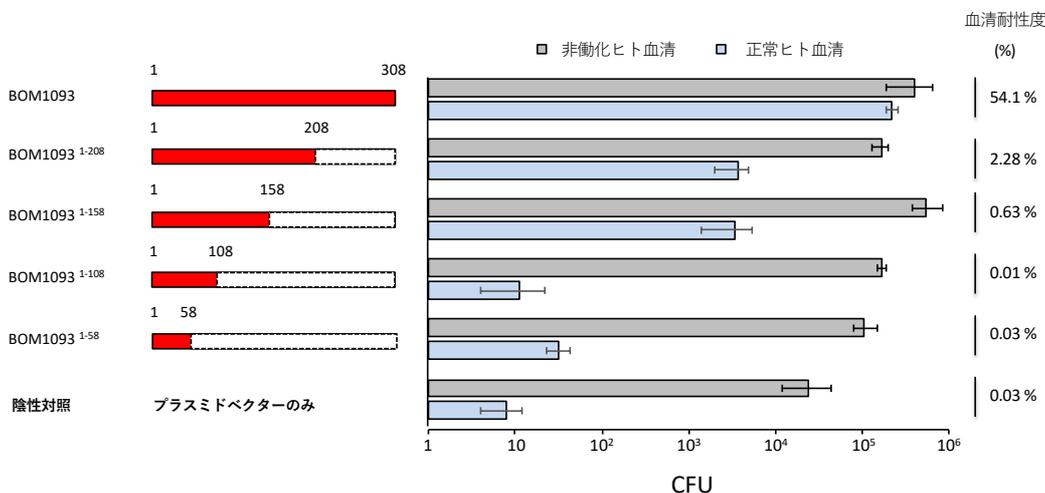


図3. Bom1093遺伝子を3'末端側より段階的に欠失させた変異体の血清感受性の変化

また正常ヒト血清からビトロネクチンを枯渇させた血清に対して *bom1093* 遺伝子を導入した *B. garinii* 株は血清感受性を示す一方で, 組換え体ビトロネクチンをビトロネクチン枯渇血清に相補することで, *bom1093* 遺伝子を導入した *B. garinii* 株の血清耐性能は回復した (図4). ビトロネクチンは血清中に豊富に含まれるタンパク質で補体系の負のレギュレーターであるとともに, インテグリンなど血管内皮細胞表面に提示される抗原とも結合する. 本遺伝子はボレリアミヤモトイ病原体 *B. miyamotoi* の血清耐性能に深く関与することは明らかとなった. これに加えて血管内皮細胞などへの病原体接着にも関与する可能性も考えられた.

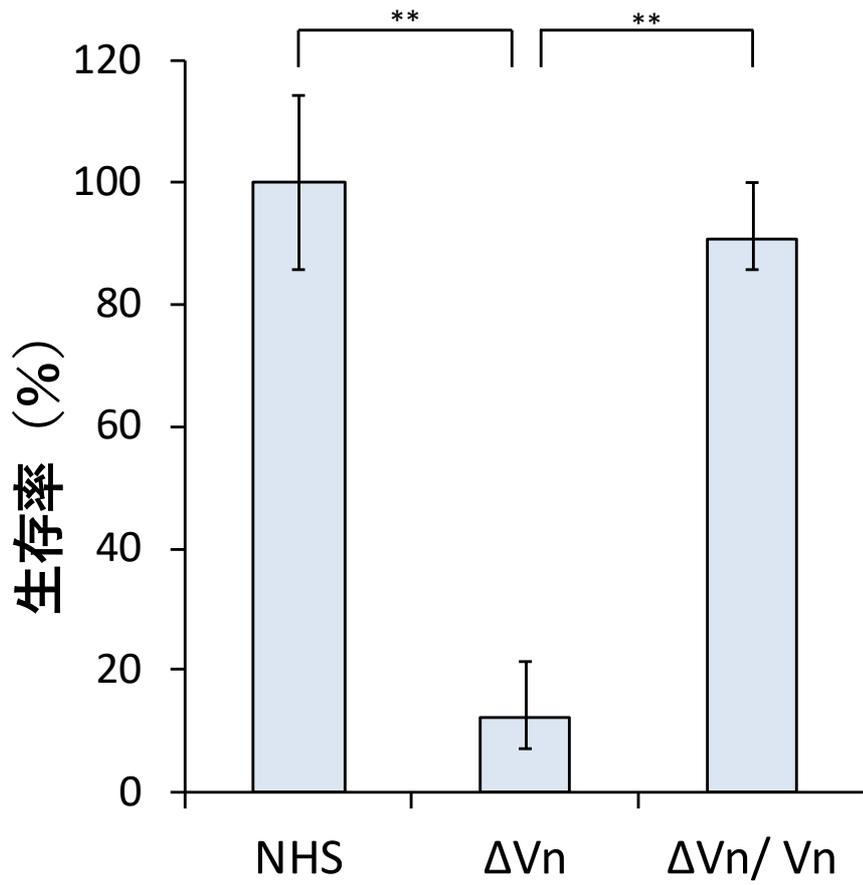


図4. ビトロネクチンの枯渇と相補による影響

NHS: 正常ヒト血清

ΔVn : ヒト血清よりビトロネクチンを枯渇させた血清

$\Delta Vn/Vn$: 組換えビトロネクチンを相補した血清

** : 統計的に有意の差が見られた組み合わせ ($P < 0.01$)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Sato Kozue, Kumagai Yumi, Sekizuka Tsuyoshi, Kuroda Makoto, Hayashi Tetsuya, Takano Ai, Gaowa, Taylor Kyle R., Ohnishi Makoto, Kawabata Hiroki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Vitronectin binding protein, BOM1093, confers serum resistance on Borrelia miyamotoi | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 5462 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85069-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤梢, 熊谷由美, 関塚剛史, 黒田誠, 林哲也, 高野愛, 大西真, 川端寛樹. |
| 2. 発表標題 ボレリアの新規病原性評価ツールによる血清耐性機能の解析. |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤梢, 熊谷由美, 林哲也, 高野愛, 大西真, 川端寛樹. |
| 2. 発表標題 ボレリア属細菌の新規病原性評価ツールの開発とその応用. |
| 3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会. |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤梢, 熊谷由美, 林哲也, 高野愛, 大西真, 川端寛樹. |
| 2. 発表標題 ボレリア属細菌の新規病原性評価ツールの開発とその応用. |
| 3. 学会等名 第26回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤梢, 熊谷由美, 林哲也, 高野愛, 大西真, 川端寛樹. |
| 2. 発表標題 ボレリア属細菌の新規病原性評価ツールの開発とその応用. |
| 3. 学会等名 第70回日本衛生動物学会大会. |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |