

平成22年 6月15日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成19年度～平成21年度

課題番号：19590437

研究課題名(和文) ボレリアのマダニ体内動態に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular analysis of Borrelia-binding to tick organs

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

研究成果の概要(和文)：

- 1) 国内分離のライム病病原体であるボレリア・ガリニゲノムからマダニ唾液腺へのボレリア接着因子として、機能未同定の遺伝子を複数検出した。表層抗原であるBB0616ホモログは、マダニ唾液腺への接着に関与していると思われる。一方、その機能ドメイン、接着リガンドなどは未同定である。
- 2) 国内分離ボレリアのマダニ中腸への接着性についても検討を行った。ボレリアの中腸組織への接着は、未吸血マダニ中腸組織で見出された。また、接着阻害実験に用いた細胞間マトリックスの一部は、その接着を阻害した。他方、これまで知られている glycosaminoglycans への結合能は本ボレリアでは見出されなかったが、ボレリアのマダニ中腸組織への結合を阻害した。今後、これらボレリアの接着因子の同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：

- 1) Using a phage display library of *Borrelia garinii* DNA, a candidate ligand for tick salivary gland was isolated. Six surface exposure antigen genes were especially estimated as the gene encoding borrelial binding factor to tick salivary gland.
- 2) *Borrelia* sp. tAG, originally isolated from *Amblyomma* tick, was colonized into tick midgut. In this study, we experimentally confirmed borrelia bound to tick midgut organ. The borrelial binding to tick midgut was inhibited by Collagen-I and some glycosaminoglycans (Dermatan, Heparan and Chondroitin).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,000,000	0	1,000,000
平成20年度	900,000	0	900,000
平成21年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：ボレリア,

1. 研究開始当初の背景

ライム病、回帰熱は動物由来のスピロヘータ感染症で、マダニ媒介性の病原体ボレリア感染に起因する。ボレリアは、野生哺乳類、鳥類を **reservoir**（保菌宿主）とし、*Ixodes* 属等のマダニによって伝播される。本マダニは吸血の過程で保菌動物からボレリア感染をうける。マダニは吸血後、脱皮するが、脱皮によっても病原体は消失しない。しかしながら一部のリケッチア細菌とは異なり、マダニ卵内にはボレリアは移行しないため、卵から孵った未吸血幼虫は病原体を保有しない。通常ボレリアはマダニ中腸内に生息するが、吸血に伴い中腸内で増殖→中腸壁を突破→マダニ体腔内での生存→唾液腺へ侵入（増殖）→マダニ唾液成分と同時に動物体内へ注入→感染成立、の一連の流れに沿って伝播される。近年、マダニ中腸で発現している抗原とボレリア表層抗原(OspA)の結合が上記過程の一部に必要であることが示された(Pal U et al. Cell, 2004)。また、唾液腺成分である Salp15 はボレリア OspC と共役して、宿主感染を促進する可能性が示されている(Ramamoorthi N et al. Nature, 2005)。一方、ボレリアのマダニ中腸への接着は抗 OspA 抗体により完全には阻害されない。また唾液腺に生着しているボレリアの OspC 発現は一樣ではなく、OspC 非発現細胞が多数見られる(Ohnishi Jet al. PNAS, 2001)ことが報告されている。また、我々の最近の研究で発見された *Borrelia* sp. tAG はマダニ中腸に生着しているにも係わらず ospA 遺伝子の homolog が見出されない。このことは、これら既報の因子以外に、中腸への接着、唾液腺へ侵入、生着に働く何らかの未知のボレリア因子の存在が示されている。

2. 研究の目的

ライム病病原体ボレリアなどのボレリア属細菌は、その生活環のなかで、媒介マダニからヒトを含むほ乳類へ伝播するためにマダニ中腸内で生着後、体腔内への播種、さらには、マダニ唾液腺へ移行、生着、および増殖することが必須となる。そこで本研究では、マダニ中腸および唾液腺への接着メカニズムに焦点をあて、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マダニ唾液腺へのボレリア接着に関与する遺伝子の単離

マダニ唾液腺へ接着するために必須のボレリア遺伝子単離には、*B. garinii* 北海道株を使用した。これらボレリア株は、*Ixodes persulcatus* より分離された株である。本ボレリア株由来 DNA library を T7 phage を用いて作成し、発現ライブラリーを得た。Phage library の scale はボレリアゲノムサイズ(約 1.5×10^6 bp) と比し、冗率約 10 倍のものを作成した。唾液腺接着遺伝子の単離アッセイは Phage panning 法を用いた。Phage panning 法は Coburn らの方法(Coburn et al. Mol Microbiol, 1999) に準拠して行った。

(2) マダニ中腸へのボレリア接着と阻害実験等による結合リガンド推定

吸血および未吸血マダニ(*Amblyomma geoemydae*)の中腸を顕微鏡下採取し、ホモジナイズ後 96 穴マイクロプレートにコーティングし、これへのボレリアの結合を anti-borrelia FlaB 抗体により検出した。ボレリア株は *A. geoemydae* より分離された *Borrelia* sp. tAG を用いた。またグリコサミノグリカンによる接着阻害は Leong らの方法(Leong JM et al. Infect Immun, 1998)に準拠して行った。

4. 研究成果

(1) マダニ唾液腺へのボレリア接着に関与する遺伝子の単離

Phage display 法による panning は 2-4 回繰り返した。それぞれの panning で 12-85 プラークに cloning されたボレリア DNA の塩基配列を決定した結果、ボレリアゲノム中の 12 遺伝子が単離された。このうち表層抗原と推定された遺伝子は BB0616, BB0646, BB0037, BB0637, BB0751, BBR26-homolog である。これら遺伝子については、その機能解析を今後行う予定である。

(2) マダニ中腸へのボレリア接着

Borrelia sp. tAG のマダニ中腸への接着試験結果を図 1 に示す。マダニの吸血の有無にかかわらずボレリアは、マダニ中腸組織へ結合した。またマダニの中腸組織量と比例してボレリア結合が認められた(図 1a)。またマウスを用いて作成した抗 *Borrelia* sp. tAG 血清はボレリアの中腸組織への接着を阻害した(data not shown)。

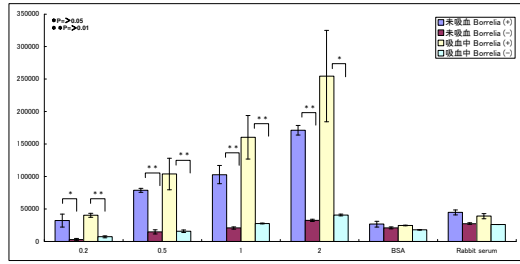


図 1. *Borrelia* sp. tAG は *A. geoemydae* 中腸組織へ用量依存的に接着する。

(2) I 型コラーゲンとボレリアの接着、および中腸組織への接着阻害

使用した *Borrelia* sp. tAG は I 型コラーゲンと用量依存的に接着することが明らかとなった (図 2)。また 10ug/well 量で中腸組織と *Borrelia* sp. tAG との接着を約 60%阻害した (data not shown)。

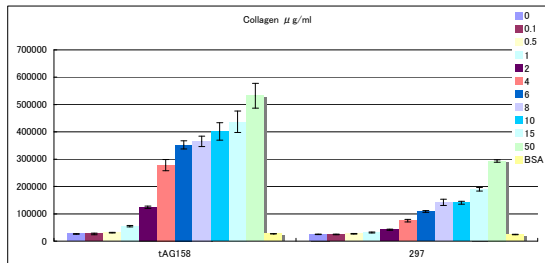


図 2. I 型コラーゲンと *Borrelia* sp. tAG の接着。陽性対照である *B. burgdorferi* 297 同様、用量依存的に *Borrelia* sp. tAG は I 型コラーゲンに接着する。

このことは、マダニ中腸組織中のコラーゲン様物質に対し、ボレリアが接着することを示している。本マダニ物質の同定とその局在については今後の検討課題である。

(3) グリコサミノグリカンによるボレリアの接着阻害

ボレリアはプロテオグリカン側鎖である糖鎖を認識して細胞接着することが知られている。そこで本研究ではグリコサミノグリカンである Heparin, Chondroitin, Dermatan を用いて接着阻害がおこるか否かを調べた。その結果、いずれのグリコサミノグリカンによってもボレリアの中腸組織への接着阻害が見られた (図 3-4)。

一方、これらグリコサミノグリカンへのボレリアの直接の接着は見出されなかった (図 5)。このことは、*Borrelia* sp. tAG の中腸への接着阻害は、競合的阻害である可能性も考えられたがその機序は不明である。

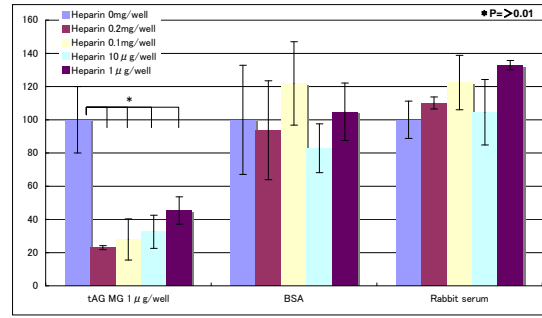
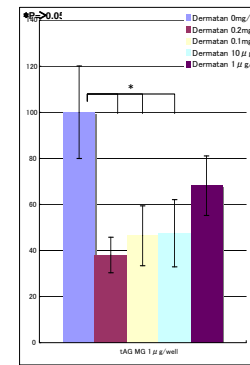
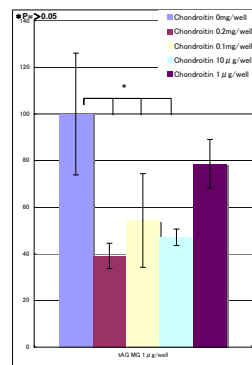


図 3. Heparin によるボレリアの中腸組織への結合阻害。BSA, Rabbit serum はコントロールとして用いた。



a. Chondroitin-SO₄

b. Dermatan-SO₄

図 4. Chondroitin-SO₄ (a), Dermatan-SO₄ (b) によるボレリアの中腸組織への結合阻害。

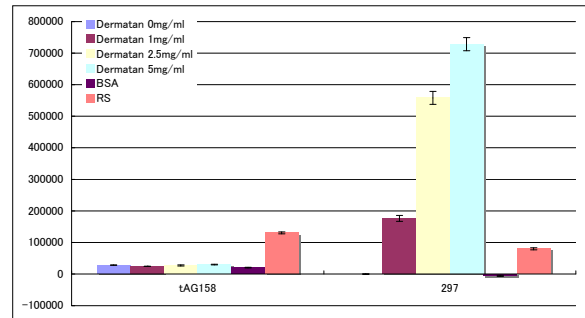


図 5. *Borrelia* sp. tAG の Dermatan-SO₄ への結合は見られない。 *B. burgdorferi* 297 は Dermatan-SO₄ への接着が既に報告されている。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 7 件)

① 高野愛, 藤田博己, 角坂照貴, 今内覚,

田島朋子, 武藤麻紀, 小笠原由美子, 川端寛樹, 渡邊治雄. 国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. 鳥取.

- ② 今内覚, 村瀬優介, 山田慎二, 肥田野新, 伊東拓也, 川端寛樹, 小沼操, 大橋和彦. シュルツェマダニにおけるライム病ボレリア伝播関連遺伝子の同定. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. 鳥取.
- ③ 高野愛, 川端寛樹, 渡邊治雄. ボレリアとマダニの共種分化の可能性. 第17回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー. 2009年6月. 福井.
- ④ 川端寛樹, 高野愛, 渡邊治雄. 実験室内に病原体の姿を探る. 第63回日本衛生動物学会西日本支部大会. 2008年11月. 神戸.
- ⑤ 高野愛, 鶴見みや古, 尾崎清明, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. 宮崎.
- ⑥ 高野愛, 川端寛樹, 渡邊治雄, 藤田博己, 椎野貞一郎, 五箇公一, 宇根有美. 爬虫類から見出された新規ボレリア:ボレリア-媒介節足動物間のcoevolutionに関する新見解. 第53回日本応用動物昆虫学会大会. 2009年3月. 札幌.
- ⑦ 高野愛, 藤田博己, 安藤秀二, 川端寛樹, 渡邊治雄. 野生鳥類を主とした国内生態系におけるボレリアの存在様式と病原体拡散に関するリスクの検討. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月. 名古屋.

〔図書〕(計5件)

- ① 高野 愛, 渡邊治雄, 川端寛樹. 日本環境衛生センター. 地球温暖化とダニ媒介性感染症. 生活と環境. 2009年. 5ページ.
- ② 川端寛樹, 高野愛, 渡邊治雄. メディカルサイエンス. ライム病. 「ズーノーシスハンドブック」2009年. 3ページ.
- ③ 川端寛樹, 高野愛, 渡邊治雄. メディカルサイエンス. 回帰熱. 「ズーノーシスハンドブック」2009年. 2ページ.

- ④ 川端寛樹. 医学書院. ボレリア感染症. 今日の治療指針. 2008年. 2ページ.
- ⑤ 川端寛樹. 医歯薬出版. ボレリア・ブルクドルフェリ抗体. 新・臨床検査項辞典. 2008年. 2ページ.

〔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
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
田島朋子 (TAJIMA TOMOKO)
大阪府立大学・生命環境化科学研究科・助手
研究者番号: 90173145