

平成 30 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：2015～2017

課題番号：15K08487

研究課題名(和文) 新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の補体系からの逃避機構の解明研究課題名(英文) Escaping mechanism of emerging relapsing fever pathogen, *Borrelia miyamotoi*, from complement pathway

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ボレリアの血清耐性を調べるための基盤実験系の確立を行った。本研究で樹立したヒト血清感受性でかつ形質転換可能な *B. garinii* 株を用い、大腸菌-ボレリア shuttle vector pBSV2 を用いて、ヒト血清非感受性の *B. miyamotoi* MYK3 株由来遺伝子を導入したボレリア株のアーカイブ作成を行った。これを用い、*B. miyamotoi* MYK3 株由来のヒト血清非感受性を親株に付与する遺伝子群の単離、同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：A experimental system to examine the serum susceptibility of *Borreliae* has been established in this study. Using this system, we obtained *Borrelia* transforms which were introduced with outer surface protein encoding gene of *B. miyamotoi*, and were examined its human serum susceptibility. As a result, I found several genes from *B. miyamotoi* are independently contributing its serum susceptibility.

研究分野：細菌感染症学

キーワード：ボレリア 新興回帰熱 血清感受性

1. 研究開始当初の背景

ボレリア属細菌は遺伝学的に大きく3群に分けられ、内2群がヒトの感染症の原因となる。1群はライム病である。欧米を中心に年間11万人以上の患者が報告されること、予防ワクチンが市販されていないことなどから、病原体発見以来30年以上が経過した現在でも、公衆衛生上重要な問題となっている。回帰熱はライム病群ボレリアとは異なる1群のボレリア属細菌による感染症で、ヒマラヤ山脈、南欧、南アフリカを結ぶ大きな三角地帯から砂漠地域を除いた全域が流行地である。これら地域内では、散発的、もしくは集発的な感染が報告され、かつ死亡例も散見される。我が国においてライム病は、感染症法施行以来、年間10例前後の国内感染例が報告されていることから、希少な感染症ではあるが、感染の機会が存在することが社会的によく知られている。他方、回帰熱は、伝染病予防法、感染症法による統計では、1950年代から2009年までは1例も報告が無かったことから、「国内には存在しない、海外で流行している病気」として認識されていた。しかしながら、2010年、2012年に相次いで海外からの輸入例が報告されたこと、またロシア、欧州、米国での *Borrelia miyamotoi* 感染による新興回帰熱の報告に加え、国内感染例が発生したことにより、急速に「身近な感染症」になりつつあった。

ライム病と回帰熱は、いずれもボレリア属細菌感染症であるが、その臨床病態は各々で異なる。ライム病は、一過的な菌血症によって播種した先の臓器における持続的感染による炎症と、これによる組織の可逆的もしくは不可逆的変性によりその病態が説明されている。他方、回帰熱は繰り返される高度な菌血症に

よる高熱や髄膜炎等を主訴とする。また抗菌薬投与によってしばしば引き起こされるヤーリッシュ・ヘルクスハイマー反応による致死例も存在する一方、慢性的な感染を引き起こすことはほとんどない。研究実施者である川端は、新興回帰熱である *B. miyamotoi* 感染症の国内疫学調査を行ってきたが、これに関して、本ボレリア感染の患者は回帰熱に特徴的な高熱を伴った菌血症を呈していることを見出している。他方、海外での症例報告を見る限り、高熱を呈する疾患や慢性の髄膜炎を示す等症例は見られるが、再帰性の発熱を示す例は少ない。また *B. miyamotoi* は *Borrelia hermsii* 等の旧来の回帰熱病原体とは遺伝学的に異なることから、その病原機序は既存の回帰熱病原体とは異なる可能性もある。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) 髄膜炎菌等でも報告されている、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。新興回帰熱病原体である *B. miyamotoi* 感染例では菌血症が見られることから、これら宿主免疫回避機構を備えていると考えられるが、その分子メカニズムについては、本ボレリアの難培養性のため、全く未知の状態であった。

B. miyamotoi は1995年に初めて発見されたが、2010年まで非病原性ボレリアと考えられてきた。しかしながら、2011年のロシアでの報告を皮切りに、現在までオランダ、アメリカ、日本で患者が報告され、ヒト病原細菌であることが確定した。他方、*B. miyamotoi* は人

工培地では極めて難培養性である。米国の *Borrelia miyamotoi* は人工培養できず、現在免疫抑制マウスで経継維持されている。人口培地で安定的に培養に成功しているのは申請者と、Wagemakers ら (Parasite Vector 2014) であった。

宿主補体系からの回避について、研究実施者は *B. miyamotoi* MYK3 株がヒト血清に対して非感受性であることを予備実験で確認していた。また、draft genome 上に code される *B. miyamotoi* 遺伝子 BOM1283 を Factor H binding protein (FhbA) 遺伝子-homolog と推測し、これが宿主補体系からの回避に寄与するものと推定していた。しかしながら、Fine らは、旧来の回帰熱病原体である *B. hermsii* の FhbA は in vitro では H 因子と結合するが、ヒト血清耐性には寄与しないことを発表した (Infection Immunity 2014)。このことから、*B. miyamotoi* は *fhbA*-homolog を有しているが、これがヒト血清耐性に寄与せず、FhbA 非依存的な血清耐性機構を *B. miyamotoi* が有している可能性も考えられた。

2. 研究の目的

ヒト血清感受性株 *Borrelia garinii* を用いた遺伝子導入系の確立、およびこれを用いた *B. miyamotoi* 血清非感受性メカニズムの探索を目的とする。

3. 研究の方法

ライム病ボレリア血清感受性 *B. garinii* 株を用いた遺伝子導入系の確立

ボレリアの膜構造は大腸菌等と異なるため、大腸菌を用いたボレリア表層抗原の機能解析は極めて難しいとされる。このため、大腸菌 background での血清耐性を付与するボレリア遺伝子の単離は困難が予想される。また、ヒト血清に

感受性である株は *B. garinii* で多く見出される。一方、このボレリア種で容易に遺伝子導入が可能な株の報告は無い。そこで本研究ではまず、ヒト血清感受性かつ遺伝子導入が容易である株の樹立を行った。本研究では、国内外で分離された *B. garinii* 株でヒト血清に感受性である株を対象に、*E.coli-Borrelia* shuttle vector を用いた形質転換を試み、遺伝子導入可能な株を検索した。シャトルベクターは *Borrelia burgdorferi* の形質転換で用いた pBSV2 を用いた。

次いで、recipient となる *B. garinii* 株がボレリア遺伝子の機能解析に適していることを確認する為に、*B. burgdorferi cspZ* を、上記 pBSV2 を用いて導入し、H 因子結合能の確認の有無について検討を行った。

B. miyamotoi 株の外膜抗原遺伝子の導入

B. miyamotoi 株の draft genome をもとに、常法に従い推定される外膜抗原遺伝子を web 上で公開されている LipoP 1.0 および SignalP 4.1 を用いて抽出した。これら遺伝子を *B. miyamotoi* 株精製ゲノム DNA を用い、個々の遺伝子から Signal 配列を含む orf 全体を適切な primer により増幅後、pBSV2 上に cloning し、前記実験で確立した *B. garinii* 株へ導入した。導入した遺伝子は *Borrelia* 属細菌で報告される遺伝子発現制御系の影響を受けにくい flagellin 遺伝子 (*flaB*) プロモーターにより発現させた。

B. garinii 形質転換株の表現型

B. garinii 形質転換株はヒト血清感受性試験を行った。ヒト血清感受性試験は非働化ヒト血清を陰性対照として 40% ヒト血清存在化、24 時間での生存率を指標に評価を行った。対象となる Mock

control には *B. burgdorferi flaB* プロモーターのみ持たせた pBSV2 を導入した *B. garinii* を用いた。

4. 研究成果

1) ライム病ボレリア血清感受性 *B. garinii* 株を用いた遺伝子導入系の確立を行った。試験に用いた 8 株中 1 株のみ形質転換が可能であった。pBSV2 を用いた場合の本株の形質転換効率は 19 transformants / ug DNA であり、海外で報告された *B. garinii* G1 株の 380 倍の形質転換効率を示した。

2) *B. miyamotoi* draft genome 配列より、表層抗原をコードすると推定された 90 orf 中、74 orf について *B. garinii* へ、各々導入し、血清感受性などを評価するためのアーカイブを構築した。

3) 74 orf 中、ボレリア属の P35 superfamily の一部と考えられる 2 遺伝子(T-027, T-076)が親株へ血清耐性の表現系を付与した(図1)。

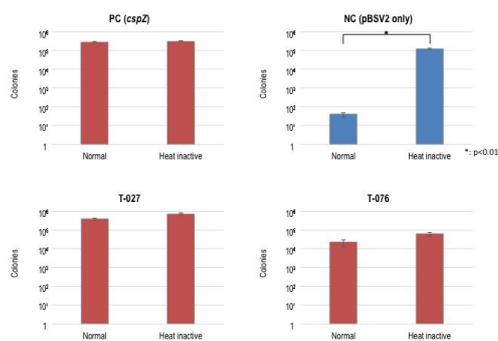


図1. 血清耐性遺伝子を導入した *B. garinii* 株の血清感受性の変化

これら遺伝子群はボレリア属で既知の血清耐性に関与する遺伝子群とは相同性が低く(図2) 新規の血清耐性遺伝子であることが考えられた。

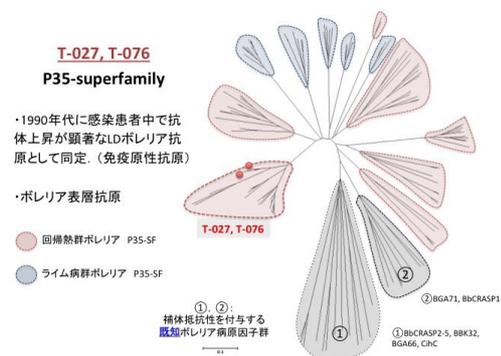


図2. 本研究で見出された血清感受性 *B. garinii* 株へ血清耐性を付与する遺伝子のアミノ酸配列に基づく系統樹解析

本研究で開発した *Borrelia* 外膜抗原の機能解析ツールは、今後、既報の *B. burgdorferi* background では困難な、血清感受性解析、*Ixodes scapularis* 伝達性解析などへの応用が見込まれる。

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)
なし

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤梢, 熊谷由美, 林哲也, 高野愛, 大西真, 川端寛樹. 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. 第70回日本衛生動物学会大会.

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
なし

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
なし

(4)研究協力者
高野愛 (Takano, Ai)
林哲也 (Hayashi, Tetsuya)
熊谷由美 (Kumagai, Yumi)
佐藤梢 (Sato, Kozue)