

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15685

研究課題名(和文) マダニ体内での効率的な感染に関与すると考えられるボレリア菌保有因子の分子機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of borrelial factors which may be involved in efficient infection in tick.

研究代表者

高野 愛 (Takano, Ai)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：90700055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マダニ媒介性感染症病原体の一部が獲得した、効率的なマダニ体内伝播に関与すると考えられる因子の究明を目的として行ったものであり、マダニ媒介性病原体の1つである回帰熱群ボレリアに特異的に見いだされ、マダニ体腔内で発現が上昇している複数遺伝子について、マダニ体腔内において菌の生存率に与える影響を解析した。本研究の結果、回帰熱群ボレリアが保有する複数の遺伝子が協調してマダニ体腔内での生存に寄与している可能性が強く示唆された。これらの遺伝子は、回帰熱群ボレリアが進化の過程で獲得した病原体の維持・伝播機構の一端であることが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダニ媒介性感染症は世界中に存在し、多くの健康被害を引き起こしている。しかしながら、マダニを自然環境から完全に除去することは不可能であるため、その制御は非常に困難であるのが現状である。他方、これら感染症病原体は、マダニ体内で維持され、宿主に伝播されることで初めて感染が成立する。マダニには病原体を含む異物を認識し排除する自然免疫が備わっているにも関わらず、なぜ病原体がマダニ体内で維持されるかは不明な点が多い。本研究で得られた情報は、マダニにおける病原体の維持機構の一端を明らかにするもので、マダニ媒介性感染症の新しい予防法開発のための基礎的情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lyme disease and relapsing fever are arthropod-borne infectious diseases caused by the genus *Borrelia*. These infectious pathogens are maintained by wildlife reservoirs and are transmitted to humans by arthropod vectors. It is, therefore, impossible to eradicate these pathogens from the environment. For this reason, there is currently an international trend toward focusing on understanding the mechanisms of pathogen maintenance or transmission in order to ultimately prevent disease by interrupting the route of transmission. We try to analyze the bacterial factors which essential for efficient transmission in vector ticks. In this study, we constructed several recombinants which expressed candidate genes. And the survival rate of recombinant in ticks were analyzed. Consequently, it was suggested that, multiple genes were coordinately contributed to survival in ticks.

研究分野：マダニ媒介性細菌感染症

キーワード：マダニ ボレリア菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マダニ媒介性感染症は、マダニの刺咬により人や家畜に病原体を伝播されることで発症する。なぜマダニが病原微生物を含む多種多様な微生物群に感染し、病原体がマダニ体内で移行し、宿主に伝播するかについて(病原体の維持・伝播機構)その基礎的情報はこれまでほとんど未解明であった。その理由として、マダニは蚊などの昆虫と異なり、生活環が数年と非常に長く、さらに人工物を使った実験室内吸血が難しいこと、ショウジョウバエのような遺伝系統の確立がなされていないことなどが挙げられる。

マダニ媒介性感染症病原体の1つであるボレリア属細菌は、3種類に大きく大別される。この内、回帰熱群ボレリアのみが脱皮後の媒介マダニ体内において効率的に全身に移行、生着する形質を保有していることが既報および近年の申請者らの研究により明らかとなっている。申請者はこれまで、回帰熱群ボレリアのみが保有する遺伝子のうち、菌がマダニ感染中に特に発現が上昇している複数の遺伝子群を同定してきた。

### 2. 研究の目的

マダニ媒介性病原体の1つである回帰熱群ボレリアが進化の過程で獲得した、マダニ体内での効率的な感染・伝播に関連する新規遺伝子群の同定を目的とし、候補遺伝子の機能解析を行う。これらの情報は、マダニにおける病原体の維持機構を明らかにできる可能性があり、将来的には新しい感染症予防法開発のための基礎的情報となることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 候補遺伝子を単独導入した形質転換ボレリア菌の作成

これまでの研究ですでに抽出されていた候補遺伝子群について、ボレリア菌用のプラスミドベクターに当該遺伝子の導入を行い、大腸菌にてプラスミドを増やしたのち、ライム病ボレリア菌である *Borrelia burgdorferi* B31 株を用いて形質転換を行なった。得られた組換え体は、遺伝子の発現を RT-PCR にて、導入遺伝子の配列をダイレクトシーケンス解析にて確認した。

#### (2) 単独遺伝子導入株のマダニへの人工接種

上記で得られた組換え体をマダニ体内に接種し、菌の生存率を比較した。

#### (3) 候補遺伝子のランダム導入株を用いた *in vivo* スクリーニング

(2) と同時並行で、候補遺伝子をランダムに導入した組換え体を作成し、マダニに接種することでスクリーニングを行なった。

#### (4) *in vivo* スクリーニングの発現解析

(3) で分離されてきた株について、RT-PCR にて発現遺伝子の確認を行なった。

#### (5) 複数遺伝子導入株の作成

(4) の結果スクリーニングされてきた遺伝子について、複数遺伝子を導入したプラスミドを作成し、組換え体を作成した。得られた組換え体は、遺伝子の発現を RT-PCR にて、導入遺伝子の配列をダイレクトシーケンス解析にて確認した。

#### (6) 複数遺伝子導入株のマダニへの人工接種

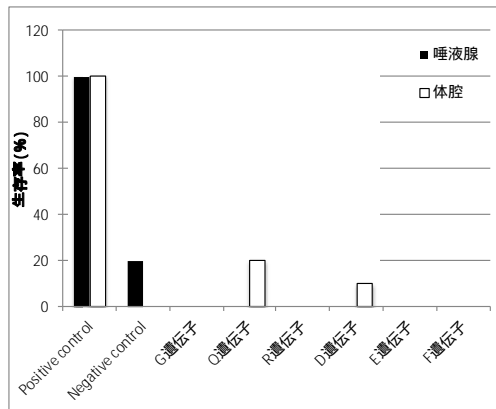
上記で得られた組換え体をマダニ体内に接種し、菌の生存率を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 候補遺伝子を単独導入した形質転換ボレリア菌の作成

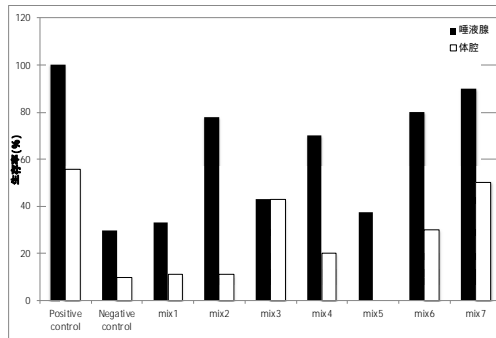
これまでの研究ですでに抽出されていた 21 個の候補遺伝子について、ボレリア菌用のプラスミドベクター; pTM61 に導入を行い、大腸菌 DH5 にてプラスミドを増やしたのち、ライム病ボレリア菌である *Borrelia burgdorferi* B31 5A18NP1 株を用いて形質転換を行なった。なお、本実験は国立大学法人山口大学組換え DNA 実験安全管理規則に則り、承認を受けて実施した(承認番号 J16008、J16009)。得られた組換え体は、GFP の発現を確認した後、各導入遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した。また、導入遺伝子の配列をダイレクトシーケンス解析にて確認した。これにより、21 遺伝子全ての組換え体の作成に成功している。

(2) 単独遺伝子導入株のマダニへの人工接種  
組換え体のマダニへの接種に先立ち、空のプラスミドベクター (Negative control) および親株である回帰熱ボレリア (Positive control) を用いて条件設定を行い、 $10^6$  個を接種し、接種後 21 日あるいは 28 日で解剖を行い、生存率を比較することとした。次に、各遺伝子をそれぞれ保有する組換え体を接種して比較した所、negative control と同等の結果となり、生存率に差が見られなかった。(右図)



(3) 候補遺伝子のランダム導入株を用いた *in vivo* スクリーニング

上記結果を受け、候補遺伝子をランダムに導入した組換え体を作成し、マダニに接種することで *in vivo* スクリーニングを行なった。その結果、複数の組換え体において Positive control と同様の結果となり、生存率が大幅に上昇する結果となった。(右図)



(4) *in vivo* スクリーニングの発現解析

(3)の実験で得られた分離株について、リアルタイム RT-PCR を行い、発現している遺伝子を解析した結果、(2)の実験で解析をした 2 遺伝子を含め、計 7 遺伝子の発現が確認される株が多いことが判明した。また、1つの分離株から多い株では 16 遺伝子の発現が確認された(右図)。

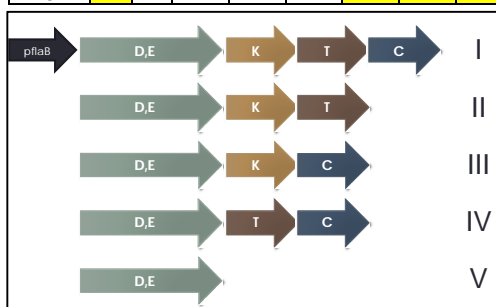
以上の結果から、単独の遺伝子ではなく、複数の遺伝子が協調してマダニ体内での生存に寄与している可能性が強く示唆された。

遺伝子名	Ly	pTM 61	mix1	mix2	mix4	mix5	mix6	mix7
A	+							
B	+							
C	+			+	+		+	+
D	+		+	+	+		+	+
E	+		+	+	+	+	+	+
F	+						+	
G	+			+			+	
H	+						+	+
I	+						+	
J	+			+			+	+
K	+			+	+		+	+
L	+				+		+	+
M	+				+		+	+
N	+						+	+
O	+		+		+		+	+
P	+						+	+
Q	+		+				+	
R	+				+		+	+
S	+			+			+	+
T	+			+	+		+	+
U	+					+	+	+

(5) 複数遺伝子導入株の作成

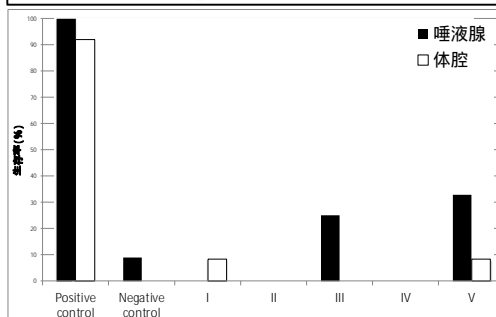
15 遺伝子全てを導入することは、プラスミドを用いた組換え体の作成モデルでは不可能であること、ボレリア菌に使用可能なプラスミドベクターが限られていることなどから、まずは複数遺伝子を 1 本のプラスミド上に導入することとした。

まずは、多くの分離株で発現が見られた 5 遺伝子 (C, D, E, K, T 遺伝子) について、1つのプロモーター配列の下流に 5 遺伝子全てを導入した組換え体および、そこから 1 遺伝子ずつ減らした組換え体を (1) と同様の手法で作成した(右図)。



(6) 複数遺伝子導入株のマダニへの人工接種

(5) で得られた組換え体を実験的にマダニ体内に接種し、菌の生存率を比較した。その結果、5 遺伝子全てを導入した組換え体で多少生存率が上昇したものの、優位な差とはならず、逆に導入遺伝子数が少ない組換え体の方で生存率が高い傾向が見られた。これは、複数の遺伝子導入により、菌の増殖が遅くなっている可能性が考えられた。また、事前の RT-PCR の結果、全ての遺伝子が発現していることは確認していたが、プロモーターが 1 つであったため、下流の遺伝子発現が相対的に弱かった可能性が考えられた。



今後、上記実験で対象とした 5 遺伝子のうち、2 遺伝子 (D, E) については単独でも 2 遺伝子両方導入でも生存率に差が見られなかったため、候補から除外し、代わりに 3 遺伝子を追加した計 6 遺伝子についてプロモーターの数を増やした上でプラスミドの作成および組換え体の作成を行なう予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuno Kiwa, Lee Kyunglee, Itoh Yukie, Suzuki Kazuo, Yonemitsu Kenzo, Kuwata Ryusei, Shimoda Hiroshi, Watarai Masahisa, Maeda Ken, Takano Ai	4. 巻 12
2. 論文標題 Epidemiological study of relapsing fever borreliae detected in Haemaphysalis ticks and wild animals in the western part of Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0174727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0174727	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 -

1. 著者名 Iwabu-Itoh Yukie, Bazartseren Boldbaatar, Naranbaatar Oyunnomin, Yondonjamts Enkhmandakh, Furuno Kiwa, Lee Kyunglee, Sato Kozue, Kawabata Hiroki, Takada Nobuhiro, Andoh Masako, Kajita Hiroko, Oikawa Yosaburo, Nakao Minoru, Ohnishi Makoto, Watarai Masahisa, Shimoda Hiroshi, Maeda Ken, Takano Ai	4. 巻 8
2. 論文標題 Tick surveillance for Borrelia miyamotoi and phylogenetic analysis of isolates in Mongolia and Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 850 ~ 857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2017.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mafie Eliakunda, Rupa Fatema Hashem, Takano Ai, Suzuki Kazuo, Maeda Ken, Sato Hiroshi	4. 巻 117
2. 論文標題 First record of Trypanosoma dionisii of the T. cruzi clade from the Eastern bent-winged bat (Miniopterus fuliginosus) in the Far East	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 673 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00436-017-5717-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Supriyono, Takano Ai, Kuwata Ryusei, Shimoda Hiroshi, Hadi Upik K., Setiyono Agus, Agungpriyono Srihadi, Maeda Ken	4. 巻 63
2. 論文標題 Detection and isolation of tick borne bacteria (Anaplasma spp., Rickettsia spp., and Borrelia spp.) in Amblyomma varanense ticks on lizard (Varanus salvator)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 328-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野 愛, 石原 翔, 南 昌平, 仲村 昇, 出口智広, 下田 宙, 前田 健.
2. 発表標題 野鳥が保有するライム病ボレリア菌のMLSA解析.
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 高野 愛, 野口慧多, 前田 健.
2. 発表標題 動物が保有するマダニ媒介感染症.
3. 学会等名 第73日本衛生動物学会西日本支部大会. (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤幸枝, 高野愛, 鎌田龍星, 中尾稔, 下田宙, 前田健.
2. 発表標題 シュルツエマダニ ( <i>Ixodes persulcatus</i> ) における転写制御因子の発現解析.
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野愛, 鎌田龍星, 下田宙, 前田健
2. 発表標題 節足動物媒介性感染症の現状と課題.
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Supriyono, Takano A, Kuwata R, Shimoda H, Panpiansil J, Hadi UK, Setiyono A, Agungpriyono S, Hondo E, Maeda K.
2. 発表標題 Detection and isolation of tick-borne bacteria in Aponomma lucasi ticks on lizard (Varanus salvator) in Indonesia
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野愛, 伊藤幸枝, DeMar Taylor, 川端寛樹, 前田健
2. 発表標題 ボレリア感染症研究の現状
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾蘭那, 伊藤幸枝, 川端寛樹, 林哲也, 小椋義俊, 鎌田龍星, 下田宙, 前田健, 高野愛
2. 発表標題 新興回歸熱病原体Borrelia miyamotoiの病原性関連因子の探索.
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠間健太郎, 後藤恭宏, 小椋義俊, 山本正悟, 藤田博己, 高野 愛, 安藤秀二, 林哲也, 笠間健太郎, 後藤恭宏, 小椋義俊, 山本正悟, 藤田博己, 高野 愛, 安藤秀二, 林哲也.
2. 発表標題 ダイレクトシーケンス法によるRickettsia sp. Lonとマダニ宿主の多様性と共進化の解明.
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾蘭那、笠間健太郎、小椋義俊、林哲也、川端寛樹、下田宙、前田健、高野愛。
2. 発表標題 硬ダニ媒介性回帰熱群ボレリア菌のゲノム解析。
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----