

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 18890206
 研究課題名（和文） レプトスピラの宿主創傷面へのナビゲーション蛋白質の
 機能解析と新規ワクチンへの応用
 研究課題名（英文） Characterization and vaccine application of leptospiral navigation
 proteins to reach the host wound.
 研究代表者
 福井 貴史（FUKUI TAKASHI）
 千葉科学大学・薬学部・助教
 研究者番号： 10453482

研究成果の概要：病原性を有するレプトスピラ株の一部が、鉄欠乏状態においてヘモグロビンに対する走化性を示すことが明らかとなった。走化性を示すレプトスピラの菌体表層より、ヘモグロビン結合性を示す蛋白質として外膜リポ蛋白質 LipL32 を同定した。LipL32 のヘモグロビンへの結合はヘミンの有無に依存せず、また、これまで LipL32 のリガンドと考えられている細胞外マトリクスに対する結合性よりも強いことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,080,000	324,000	1,404,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	324,000	2,724,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：レプトスピラ、細菌、感染症、走化性、ヘモグロビン結合蛋白質、
 microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs)

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ (*Leptospira*) は世界中に広く分布する、人獣共通感染症の代表的な病原体のひとつである。主にレプトスピラ感染動物の尿、あるいは尿で汚染された土壌、水系との接触により、表皮の創傷を介して感染する。高温多湿の熱帯、亜熱帯地方ではレプトスピラが環境中で長期生存可能なため、雨季に感染が多発し大規模な集団発生もしばしば見られる。げっ歯類をはじめとした多様な動物

種を保有体とするため、根絶はほぼ不可能である。ワクチン接種が最善の予防策であるが、200 を超える血清型が存在し、全てに交差するワクチンは現在に至るも存在しない。

重要な感染症のひとつにもかかわらず、レプトスピラの病原発揮機構についてはほとんど明らかになってはいなかった。病原因子の候補として、溶血因子であるスフィンゴミエリナーゼ C、孔形成性溶血毒素 SphH、HlyX

が同定されている。これらの因子により赤血球に孔を形成し、増殖に必要な鉄、及び高級脂肪酸を獲得すると考えられている。レプトスピラはその炭素原、及びエネルギー源として高級脂肪酸のみを代謝する非常に特異な細菌であることから、その増殖や病原性発現と溶血因子の産生は密接に関係すると考えられる。溶血因子に加え、モルモットに対して強毒性のレプトスピラの一部がヘモグロビンに対する走化性を示すことが報告されている (Yuri *et al.* Infect. Immun. 61, 1993)。この報告以降、レプトスピラの鉄獲得機構や病原性と走化性の関係を示唆する報告は皆無であるが、示された事実はレプトスピラが創傷部から漏出する赤血球中のヘモグロビンを感知し、能動的に傷口に達して宿主内に侵入感染する可能性を示唆するものである。宿主に到達するためのセンサー蛋白質は、感染初期イベントに関係する重要な病原因子と考えられ、診断抗原やワクチンの候補蛋白質としても期待される。

レプトスピラ症は主に熱帯、亜熱帯地域を中心とした発展途上国で問題となっているため、先進国での研究が積極的になされていないこと、レプトスピラにおける分子生物学的手法が確立されていないことなどからその病原機構の解明といった研究は大幅に遅れている。

また、本邦では衛生環境の向上などにより現在の患者数は激減しているものの、海外渡航者は増加している。さらに多様な動物の輸入、特に愛玩動物への嗜好の変化によるエキゾチックアニマル輸入発注量の急激な増加は、これを介した本症の増加の可能性を多分にはらんでいる。このとき、本来国内に存在しない血清型の株による感染の危険性が考えられる。よって血清型に依存しない新規感染防御ワクチンならびに診断用抗原の探索と実用化が切実に求められている。これらの

現状から未知の病原因子を探索し、感染成立初期の機構解明を目指すとともに、血清型に依存しない新規ワクチン及び診断抗原の開発を念頭において研究計画を立案した。

2. 研究の目的

背景に示したように、レプトスピラが病原株に特異的なヘモグロビンセンサーを有し、「創傷から漏出する微量ヘモグロビンを感知することで、鞭毛モーターが駆動され宿主に到達し感染が成立する」という作業仮説を設定し、それに基づきヘモグロビン結合性センサー蛋白質の同定と機能解析を行うことを目的とした。さらに同定された分子を用いた血清型に依存しない新型ワクチンの開発の可能性を追究することを念頭に置いた。具体的には以下の5項目、即ち1) レプトスピラのヘモグロビンに対する走化条件を決定する、2) レプトスピラ菌体表層に存在するヘモグロビン結合蛋白質の検出と遺伝子を同定する、3) 遺伝子組み換えヘモグロビン結合蛋白質、及びそのヘモグロビン結合蛋白質を認識する単クローン抗体を作製する、4) ヘモグロビン結合蛋白質の結合親和性を測定する、5) ヘモグロビン結合蛋白質の変異体を作製し、ヘモグロビン親和性の変化や立体構造の変化への影響を解析する、以上の段階的な目標設定を行った。

3. 研究方法

(1) 菌株及びプラスミド

すでにヘモグロビン走化性が報告されている *L. interrogans* Shibaura Line1 株をハムスターに接種し、腎より再分離したのちに実験に用いた。蛋白質の発現には宿主として *Escherichia coli* BL21 (DE3)、発現ベクターとして pET28a を用いた。

(2) ヘモグロビン走化性試験

前述の Yuri らの方法に準じて行った。内径 6 mm の U 字型ガラスキャピラリーを用い、0.3 % 軟寒天 EMJH 培地を 220 μ L 充填し、一

方に 0.5 % ヒトヘモグロビン溶液、または対照として PBS を 100 μL 加えた。もう一方に鉄欠乏状態を作り出すため鉄キレート剤である 2, 2'-bipyridine を終濃度 400 μM で添加したレプトスピラ Protein free Medium (PMF)、もしくは 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ FeSO_4 添加 PMF で一晚培養したレプトスピラ菌液を 1×10^7 cells / tube となるように重層し、30°C で培養した。この間、毎日ヘモグロビン溶液、もしくは PBS 側に移行したレプトスピラ菌数を暗視野顕微鏡下にて計数した。

(3) レプトスピラ菌体表層蛋白質の抽出と

ヘモグロビン結合蛋白質の探索

FeSO_4 未添加 EMJH 培地で培養したレプトスピラより、Hakke らの方法 (Infect. Immun. 70, 2002) に準じてレプトスピラ菌体表層蛋白質を調製した。即ち、5mM MgCl_2 -PBS で洗浄した菌体を、氷上で菌数が 5×10^9 cells / mL になるように 1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl、0.1 % TritonX-114、150 mM NaCl (pH8.0) に懸濁し、可溶性画分をアセトン沈殿後、凍結乾燥した。凍結乾燥後の試料 1.5 mg を 1mL の 4 M 塩酸グアニジン、50 mM DTT、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) にて溶解し、50 mL の 50 mM NaCl、1mM EDTA、50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に滴下することで、希釈法による蛋白質の巻き戻しをおこなった。ヘモグロビン固相化セファロースカラムに展開し、洗浄後 0.1 M 酢酸 0.5 M NaCl、ついで 2 M 塩酸グアニジン 50 mM Tris-HCl (pH8.0) でヘモグロビン結合蛋白質を溶出した。脱塩後、試料を二次元電気泳動により展開した。

(4) LipL32 のクローニングと発現精製

L. interrogans Shibaura Line1 株ゲノムを鋳型として、*lipL32* 遺伝子のシグナル配列部を除いた全長を PCR 法により増幅した。発現ベクター pET28a に組み込み、配列を確認し pET28a-LipL32 とした。プラスミド

pET28a-LipL32 で *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換し、1 mM IPTG による発現誘導を行った。菌体を破碎し、可溶性画分より陰イオン交換クロマトグラフィー、及びゲルろ過クロマトグラフィーにより目的の蛋白質を精製した。SDS-PAGE により最終生成物を 32 kDa 付近の単一のバンドとして確認した。

(5) ヘモグロビン結合試験

1 μM ヒトヘモグロビン溶液を 50 μL を 96 穴 ELISA 用プレートに固相化し、5 % skim milk-PBS にてブロッキングした。各穴にプローブとして段階希釈した組み換え型 LipL32 を 50 μL 加え、ついで 2C11 抗 LipL32 マウスモノクローナル抗体 50 μL 、HRP 標識ヤギ抗マウス抗体 50 μL を二次抗体として加えた。2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate] (ABTS) 溶液を基質溶液として加え 405 nm における吸光度を測定した。ヘミンに対する結合試験は Asuthkar らの方法 (Infect. Immun. 75, 2007) に準じて行った。ドットプロット法ではニトロセルロース膜にヘモグロビン溶液、あるいは細胞外マトリクス溶液を段階希釈した上で固相化し、プローブとして 1 μM ビオチン標識 LipL32 溶液を作用させた。発色基質は 3,3'-Diaminobenzidine を用いた。

(6) 遠紫外部円偏光二色性 (CD) スペクトル

CD スペクトルは J-820 spectropolarimeter (日本分光) を用いて、室温にて、光路長 1 mm のキュベットを用いて測定した。蛋白質濃度は終濃度 5 μM に調整し、各リガンドを加えて測定した。

4. 研究成果

(1) 走化性試験

鉄欠乏条件化で培養したレプトスピラは、接種後 1 日目よりヘモグロビンに対する走化性が観察された。一方で、鉄添加培地にて培養したレプトスピラでは、ヘモグロビン側に

移行した菌数は、鉄欠乏条件で培養したレプトスピラに比較し低値であった。対照として用いた PBS に対しては、いずれの株も走化性をほとんど示さなかった。各条件において 10 検体ずつ実験を行ったが、走化性が観察できない検体が存在した。鉄欠乏下で培養したレプトスピラ接種後 1 日目におけるヘモグロビン側で観察された一視野あたりの平均菌数は 1.54、陰性対照の PBS では 0.1 であった (図 1)。データには示していないが、ヘモグロビン走化性は菌株の継代数などにより変動することが示唆された。レプトスピラの病原性は継代とともに病原性が減弱、喪失することが知られており、レプトスピラの走化性を規定する因子の発現は、病原性と深く関与することが考えられた。

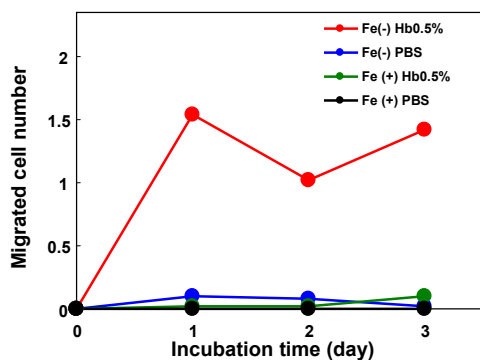


図1 *L. interrogans* Shibaura Line1株のヘモグロビン走化性

(2) レプトスピラ菌体表層蛋白質画分からのヘモグロビン結合蛋白質の探索

走化性を示したレプトスピラの菌体表層蛋白質画分をヘモグロビン固相化セファロースに展開し、酢酸緩衝液 (pH4.0)、及び 2M 塩酸グアニジン溶液にて溶出することで、外膜蛋白質画分に存在するヘモグロビン結合蛋白質を得た。これらの溶出画分を二次元電気泳動により展開し、銀染色により、それぞれ酢酸緩衝液溶出画分では 9 個 (データは示していない)、塩酸グアニジン溶出画分では 23 個のスポットを得、さらに LipL32 特異的モノクローナル抗体を用いたウエスタン

ブロット法により LipL32 を検出した (図 2)。それぞれのゲルに存在するスポットのうち等電点 pI 7-9 付近、分子量 15kDa、及び 30kDa 付近の強度の強いスポットの一群はカラム由来のヘモグロビンと考えられた。また、LipL32 はヘモグロビン固相化セファロースに結合し、それは酢酸緩衝液 (pH4.0) 溶出画分では溶出されず、2M 塩酸グアニジン溶出画分に溶出されることをウエスタンブロット法により明らかにした (図 3)。つまり LipL32 が pH4.0 の酸性条件では溶出されず、強い変性剤存在下で溶出されるという事実から、LipL32 のヘモグロビンに対する結合性が非常に強いものであることが示唆された。

LipL32 は溶血因子であるスフィンゴミエリナーゼ *sphH* 遺伝子の近傍に存在する hemolysis associated protein-1 (*hap-1*) 遺伝子産物 Hap-1 と同一であることが報告されており (Lee *et al.* Infect. Immun. 70, 2002)、さらには LipL32 自身も溶血活性を有し、HlyX 共存下ではそれぞれの溶血活性が相乗的に増加するという報告 (Hauk *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 333, 2005) も存在する。以上の報告も踏まえ、LipL32 はレプトスピラが感染宿主からの漏出ヘモグロビンを介した鉄獲得を担う因子のひとつであることが推測された。LipL32 以外のスポットについては現在解析を進めている。

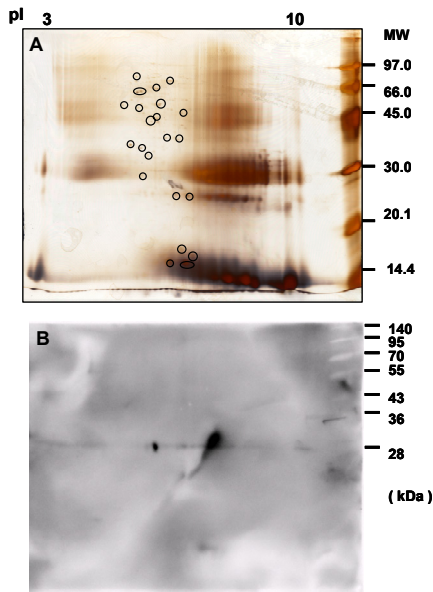


図2 レプトスピラ菌体表層に存在するヘモグロビン結合蛋白質の二次元電気泳動
 A 2M塩酸グアニジン溶出画分(銀染色)。23個のスポットが観察された。
 B 2M塩酸グアニジン溶出画分の抗LipL32抗体によるウェスタンブロット

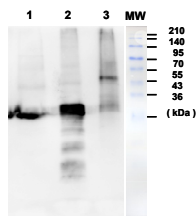


図3 ウェスタンブロット法による各溶出画分からのLipL32の検出
 2M塩酸グアニジン溶出画分 (lane 1)、全外膜蛋白質 (lane 2) よりLipL32を検出した。
 一方、酢酸緩衝液(pH4.0)溶出画分 (lane 3) からは検出されなかった。

(3) ヘモグロビンに対する LipL32 の *in vitro* 結合試験と認識部位の決定

ヘモグロビン $1\mu\text{M}$ を $50\mu\text{l/well}$ で固相化し、各濃度の組み換え型 LipL32 との結合性を ELISA の系で評価した結果、LipL32 は濃度依存的にヘモグロビンに結合することが明らかとなった(図4)。また、得られた結果より乖離定数を算出した場合 $1.20\pm 0.06\mu\text{M}$ であった。最近、LipL32がIV型コラーゲン、血清フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外マトリクスに結合することが相次いで報告された(Hoke *et al.* Infect Immun. 76, 2008, Hauk *et al.* Infect. Immun. 76, 2008)。Hauk らは LipL32 の C 末領域に細胞外マトリクスに対する結合領域が存在し、IV型コラーゲン、及び血清フィブロネクチンに対する結合定数はそれぞれ 5.99 ± 0.12 , $10.10\pm 0.30\mu\text{M}$

であると報告している。今回求めた LipL32 のヒトヘモグロビンに対する乖離定数は、これら細胞外マトリクスに対する乖離定数よりも小さく、より強い結合性を示すことが明らかとなった(表1)。また、血清フィブロネクチン、IV型コラーゲン、及びヘモグロビンの固相化量を一定とし、LipL32 のリガンドへの結合性を比較するために、ビオチン標識 LipL32 をプローブとして用いたドットブロットを行ったところ、LipL32 が細胞外マトリクスに対してよりもヘモグロビンに対してのほうがより強く結合することが明らかとなった(図5)。

さらに LipL32 はアポヘモグロビンに対しても、ヘモグロビンと同等以上の結合性を示したのに対し、ヘミンに対する結合性は認められなかったことから、LipL32 はヘモグロビンの蛋白質部分を認識していることが明らかとなった(図6)。

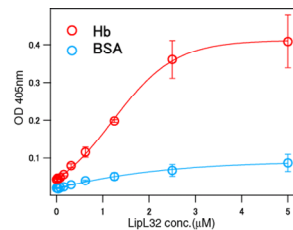


図4 LipL32のヘモグロビンに対する濃度依存的結合

Plasma fibronectin*	Collagen type IV *	Human hemoglobin
10.10 ± 0.30	5.99 ± 0.12	1.20 ± 0.06

(μM)

* Hauk, P. *et al.* Infect. Immun. 76 (2008)

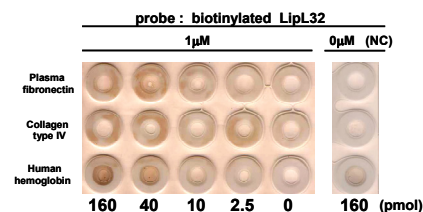


図5 ドットブロット法によるLipL32の各リガンドに対する結合性の評価

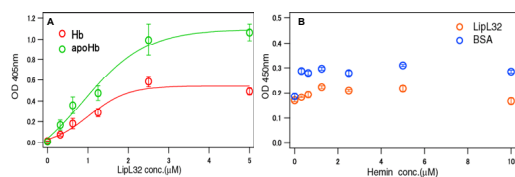


図6 LipL32のヘモグロビン認識部位の決定
 LipL32はアポヘモグロビンに対してヘモグロビンと同等以上の結合性を示した (A) のに対し、ヘミンに対して結合しなかった (B)。

(4)リガンド結合時における LipL32 の構造変化の観察

LipL32 がリガンドと結合した際の構造変化を調べるために、ヘモグロビン、ヘミン、すでに LipL32 との結合性が報告されているフィブロネクチン N 末 30kDa フラグメント、及び 45kDa フラグメントを LipL32 と混和し CD スペクトルを測定した。その際、ヘモグロビン、フィブロネクチンの各フラグメントでは、ピークシフトは観察されないものの、楕円率の変化が認められた。対して、ヘミンではスペクトル変化が観察されなかった(図 7)。以上のことから、LipL32 は、細胞外マトリクスのみならずヘモグロビンに対する結合能を有しており、ヘモグロビンの蛋白質部分のみを認識していること、結合時の CD スペクトル変化がヘモグロビンとフィブロネクチンとで類似することから、LipL32 によるヘモグロビンの認識はヘミンの有無に依存せず、フィブロネクチンなどの細胞外マトリクスを認識する機構と同様であることが示唆された。

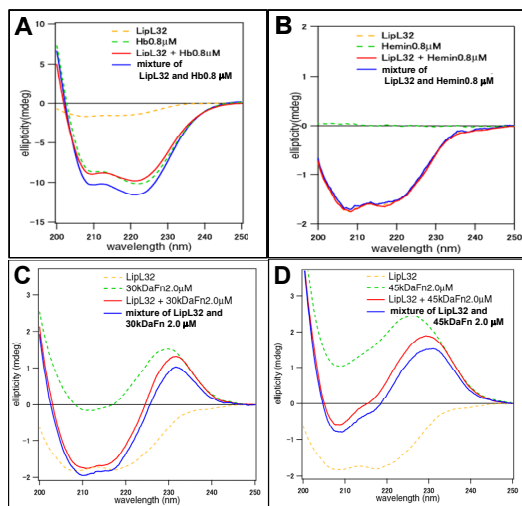


図7 リガンド結合時のCDスペクトル変化

LipL32をヘモグロビン (A)、フィブロネクチンN末フラグメント (C, D) と混合した場合、楕円率の変化が認められた。一方、ヘミン (B) を混和した場合は楕円率の変化が認められなかった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①川島遙、福井貴史、岡本能弘、増澤俊幸
レプトスピラ外膜リポ蛋白質 LipL32 のヘモグロビン結合性
第 46 回レプトスピラ・シンポジウム
2009 年 3 月 11 日 名古屋市

②福井貴史、野村聡子、松永恵理子、村田由奈、川島遙、岡本能弘、増澤俊幸
レプトスピラのヘモグロビン走化性にかかわる因子の探索と同定
第 45 回レプトスピラ・シンポジウム
2008 年 3 月 23 日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 貴史 (FUKUI TAKASHI)
千葉科学大学・薬学部・助教
研究者番号： 10453482

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

以上