

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07571

研究課題名(和文)トランスポゾン挿入変異体を用いたレプトスピラの宿主持続感染機構の総合的な解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the mechanism of persistent infection of *Leptospira interrogans* in rats using transposon insertion mutants

研究代表者

小泉 信夫 (Koizumi, Nobuo)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：10333361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラ血清型Manilaeのトランスポゾン変異体ライブラリーから、Tn-Seq法によりラット腎臓への定着能が低下した変異体の責任遺伝子129遺伝子を同定した。それら変異体のうちRS00325株あるいはRS01180株を野生株と同時にラットに感染させた場合、感染3日目の血中のRS00325株は野生株の約1/1000、RS01180株は約1/60に低下していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプトスピラの宿主持続感染機構を解明することは、本菌が引き起こす疾患であるレプトスピラ症のコントロールのために重要である。本研究で得られた変異体の解析により持続感染に関わるレプトスピラ因子を明らかにすることで、それらをターゲットとしたワクチンや治療薬の開発も期待される。

研究成果の概要(英文)：Tn-seq using transposon mutant library of *Leptospira interrogans* serovar Manilae identified 129 mutants whose capacity to colonize kidney tissues of rats were reduced. When mutant strain RS00325 or RS01180 were inoculated with their parental strain to rats, the number of RS00325 and RS01180 mutants in blood at three days post infection was reduced to 1/1000 and 1/60 compared to the parental strain.

研究分野：細菌学

キーワード：レプトスピラ 持続感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は、スピロヘータの 1 種である病原性レプトスピラによって引き起こされる人獣共通感染症である。発症者の大部分は、インフルエンザ様症状で軽快する軽症型であるが、5 ~ 10% の患者は黄疸・出血・腎不全を伴う重症型に発展し、早期に適切な治療が行われない場合には致死率は 15% にもなる。

病原性レプトスピラは、自然界ではラットなどの哺乳動物の腎臓に持続感染している。レプトスピラは尿とともに排出され、経皮あるいは経粘膜的に宿主動物に感染する。ヒトは、レプトスピラを含む尿との直接的な接触、あるいは尿に汚染された水や土壌との接触により偶発的に感染し発症する。したがって、宿主動物の腎臓へのレプトスピラの定着(保有体化)を阻害することはレプトスピラ症の制御に重要であり、このためにはレプトスピラの宿主における持続感染のメカニズムを解明することが必須である。

宿主動物における持続感染の成立には、細胞バリアを貫通して血流に侵入し、血液および食細胞の殺菌機構に抵抗して腎臓に到達し、腎臓に定着する必要がある。しかしながら、レプトスピラでは効率的な遺伝学的方法の欠如により、これらのステップに必須のレプトスピラ遺伝子や、補体成分に結合するレプトスピラタンパク質の持続感染における役割、そして持続感染が成立するための詳細な機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

レプトスピラの維持宿主動物の腎臓への持続感染に必須の因子を明らかにするために、トランスポゾンを利用したランダム挿入変異法によりゲノムワイドなレプトスピラ変異体ライブラリーを作製し、宿主動物であるラットの感染実験および Tn-seq を行うことで、腎臓に定着できない変異体を網羅的に同定することを目的とした。また、レプトスピラの感染メカニズムを明らかにするうえで必要となってくる遺伝学的ツールの開発とその応用も目的とした。

3. 研究の方法

(1) トランスポゾン挿入変異体ライブラリーのラット感染実験

大腸菌との接合によるトランスポゾンランダム挿入変異法により *Leptospira interrogans* 血清型 Manilae の変異体ライブラリーを作製した。トランスポゾン変異体を 96 ウエルプレート (2 mL ウエル) で個別に培養し、96 株を 1 群として 1×10^8 細胞 (各株 1×10^6 細胞) を 6 週齢のラット WKAH/Hkm に腹腔内接種するとともに、接種レプトスピラ群から DNA 抽出を行った (この DNA を input DNA とする)。感染実験は計 15 群 (15 プレート) 行った。接種 3 週間後にラットを安楽殺して腎臓を摘出し、コルトフ培地で培養を行った。培養 8 日後に菌を回収して DNA 抽出を行った (この DNA を output DNA とする)。次世代シーケンサーを用いて input DNA と output DNA のトランスポゾン挿入位置の近傍の配列を決定した (Tn-seq)。ここから、インプットに対するアウトプット比が 10% 以下となった DNA 配列を同定した。

(2) トランスポゾン挿入変異体の同定

選抜したレプトスピラ DNA 配列特異的プライマーとトランスポゾンプライマーを用いて腎臓に定着できなかった変異体をライブラリーから特定した。

(3) 腎臓定着低下株の in vitro および血中増殖性の比較

ラット感染実験によって得られた腎臓への定着が著しく低下した RS00325 株および RS01180 株、また腎臓への定着能が変わらなかったトランスポゾン挿入株 10-5-7 (コントロール株) の in vitro およびラット体内での挙動を調査した。野生株およびそれぞれのトランスポゾン挿入株の in vitro 培養液 OD₄₂₀ 0.3 を 1:100 で新鮮な培地に植え継ぎ 24 時間ごとに OD₄₂₀ の吸光度を測定した。また野生株と 10-5-7 をそれぞれ 5×10^7 細胞を 6 週齢のラット WKAH/Hkm に腹腔内接種に接種し、3、4、5 日後に採血を行い、血液中のそれぞれの株の DNA 量を qPCR により測定した。また 10-5-7 と RS00325 株あるいは RS01180 株をそれぞれ 5×10^7 細胞を 6 週齢のラット WKAH/Hkm に腹腔内接種に接種し、3 日後に採血を行い、血液中のそれぞれ株の DNA 量を qPCR により測定した。

(4) レプトスピラの遺伝学的ツールの開発とその応用

L. interrogans serovar Canicola Gui44 株の持つプラスミド pGui1 の *rep-parB-parA* 領域を PCR により増幅し、PCR で増幅した同領域を除く pCjSpLe94 にクローニングして病原性レプトスピラ *L. interrogans* で複製可能なプラスミド pNKLIG1 を構築した。蛍光タンパク質 AcGFP を pNKLIG1 の *SaI* 部位にクローニングし Manilae 株に導入した。

光に応答して運動を行う *Leptospira kobayashii* E30 の完全長ゲノム配列を MiSeq およびナノ

ポアシーケンシングにより決定した。また申請者が確立したトランスポゾン挿入ランダム変異法を用いて E30 株のトランスポゾン挿入株ライブラリーを作製して光応答性がなくなった変異体の同定およびその責任遺伝子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 腎臓定着能が低下した変異体の責任遺伝子の同定

トランスポゾン挿入変異体計約 1500 株のラットに感染させ、接種群の DNA 比率と感染 3 週間後の腎臓から回収された変異体群の DNA 比率を比較することにより、腎臓への定着が低下した変異体においてトランスポゾンが挿入されている 129 の遺伝子を同定した。独立した複数の腎臓定着能が低下した変異体がえられた遺伝子には 16S リボソーム遺伝子があった。他に複数の変異体が得られた 2 遺伝子について、それぞれ RS00325 株および RS01180 株を選抜し解析を行った。

(2) 腎臓定着低下株の in vitro および血中増殖性の比較

腎臓への定着が低下した RS00325 株および RS01180 株、また腎臓への定着が低下しなかった 10-5-7 の in vitro での増殖速度は野生株と変わらないことが明らかとなった (図 1)。続いて 10-5-7 株がトランスポゾン挿入株感染実験のコントロールとして使用できるかを検討するために、野生株とともにそれぞれ 5×10^7 細胞をラットに接種した結果、感染 3 日目に血中の DNA 量は最大の 200 ~ 500 ゲノム相当量/ μL となり、野生株と 10-5-7 株で有意な差は見られなかった (図 2)。また感染 4 日後には 3 匹中 1 匹でのみ DNA が検出され、5 日後にはすべてのラットでレプトスピラ DNA は検出されなかった (図 2)。また感染 3 週間後の腎臓に定着していた 10-5-7 株と野生株の割合も同じであった。一方腎臓への定着が著しく低下した RS00325 株あるいは RS01180 株を 10-5-7 と同時に接種した場合、感染 3 日目の血中の RS00325 株は 10-5-7 の約 1/1000、RS01180 株は約 1/60 に低下していることが明らかとなった。

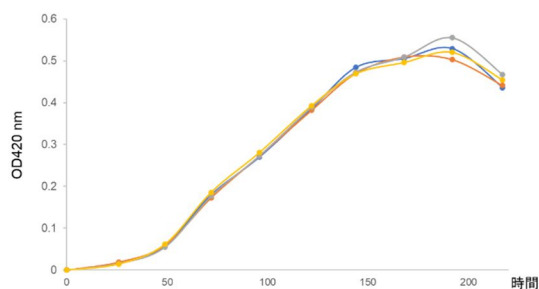


図1. レプトスピラ野生株および腎臓定着変異体の in vitro での増殖速度
野生株 ●; 10-5-7 ○; RS00325 ●; RS01180 ●

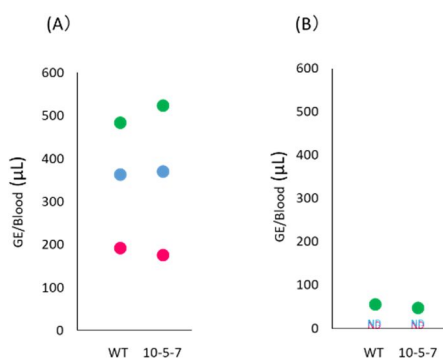


図2. 感染3日後(A)および4日後(B)の血中DNA量
同色の丸はそれぞれ同じラットを表している。WT: 野生株

(3) レプトスピラの遺伝学的ツールの開発とその応用

病原性レプトスピラで複製可能なプラスミド pNKLiG1 を構築し、GFP を発現する *L. interrogans* 変異体の作製することが可能となった。GFP 発現株を利用することで *L. interrogans* の培養細胞上での運動解析を行えるようになり、レプトスピラの病原性と細胞上でのクロウリング運動様式の関連性を明らかにした (Front Microbiol, 2020)。

また *L. kobayashii* E30 の光応答性運動の責任遺伝子を同定するために E30 株の完全長ゲノム配列を決定した (Microbiol Resour Announc, 2021)。またトランスポゾンランダム挿入変異法を確立して光不応答トランスポゾン挿入変異体 Prd を得て、トランスポゾン挿入部位の決定および相補実験により、その責任遺伝子 *lprA* を同定した (図 3, Sci Rep, 2022 改変)。

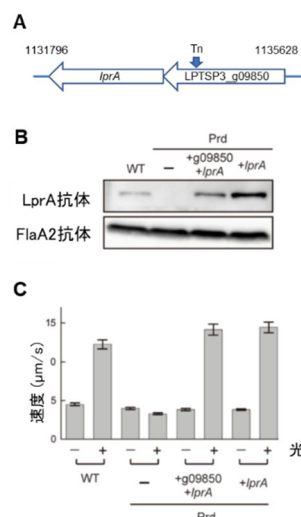


図3. 光応答遺伝子の同定
(A) トランスポゾン挿入位置。(B) 相補株のウェスタンプロットニング。(C) 相補株光応答性。WT: 野生株

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Xu Jun, Koizumi Nobuo, Morimoto Yusuke V., Ozuru Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Nakamura Shuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Light dependent synthesis of a nucleotide second messenger controls the motility of a spirochete bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10556-7	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 Nakao Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Nakamura Shuichi, Koizumi Nobuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Leptospira kobayashii Strain E30, Isolated from Soil in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00907-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00907-21	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 Xu J, Koizumi N, Nakamura S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Crawling motility on the host tissue surfaces is associated with the pathogenicity of the zoonotic spirochete Leptospira.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01886	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木祐哉, 森田昌知, 大西 真, 小泉信夫
2. 発表標題 レプトスピラの維持宿主における持続感染に必須な遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第57回レプトスピラ・シンポジウム
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
研究 分 担 者	中村 修一 (Nakamura Shuichi) (90580308)	東北大学・工学研究科・准教授 (11301)	

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
---------	---------