

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860291

研究課題名(和文) 効率的なマダニ体内伝播に係わるボレリア属細菌新規因子の同定

研究課題名(英文) The exploration 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(テニュアトラック)

研究者番号：90700055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000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、脱皮後マダニ体腔内で発現が上昇している複数遺伝子を同定した。これら遺伝子は、マダニ体内、特に未吸血状態での回帰熱群ボレリアの生存に強く関与していることが示唆され、回帰熱群ボレリアが進化の過程で獲得した効率的な病原体の維持・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 identify the bacterial factors which essential for efficient transmission in vector ticks. In this study, we compared the expression level of several genes, which selected by in silico analysis of whole genome sequences of borreliae, in vector tick and in artificial culture medium. Consequently, several genes were up-regulated in ticks. The result suggested that these genes might be involved in essential infection of ticks.

研究分野：マダニ媒介性細菌感染症

キーワード：ボレリア菌 マダニ

## 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伝播に関連する新規遺伝子群を同定する。これらの情報は、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) マダニに人工的にボレリアを接種し、ボレリア菌の生存の有無を確認

(2) 回帰熱群ボレリアと、その他の2群のボレリアについて、全ゲノム情報を元に、回帰熱群ボレリアのみ保有する遺伝子群を *in silico* で抽出

(3) 2で抽出した遺伝子群を検出するリアルタイム PCR 系を確立

(4) マダニ体内に生着する菌と、培地中の菌からそれぞれ RNA を抽出し、上記で抽出した各遺伝子群の発現レベルを比較

## 4. 研究成果

(1) マダニ体内における生存確認

複数回の実験で回帰熱群ボレリアのみ2週間後も体腔液中に菌が生きていることが明らかとなった。

(2) 候補遺伝子の抽出

すでに公開されているライム病群ボレリア3種、回帰熱群ボレリア2種、当研究室で解析した爬虫類関連ボレリア1種の全ゲノ

ム配列を元に、回帰熱群ボレリアのみが保有する遺伝子群を抽出した。BlastP 解析は Linux server 上で行い、得られた結果について、さらに LipoP による *in silico* 解析を行った。

その結果、100 個前後の遺伝子が抽出され、その中から既報等の情報を加味し、94 遺伝子を候補遺伝子として抽出した。

なおボレリアは、大腸菌のようにランダムな変異挿入破壊によるスクリーニング系が確立されていないほか、現状では発現 RNA を比較する市販のマイクロアレイもないため、特定の遺伝子に絞って、詳細に表現系を解析する逆遺伝学的な方法に頼らざるを得ない。

(3) リアルタイム PCR 系の確立

上記2で抽出した94 遺伝子について、Primer express 3 を用いてプライマーを個別に設計した。続いて、実験に用いている回帰熱群ボレリアのゲノム DNA を用い、抽出された各遺伝子が保存されているかをリアルタイム PCR にて確認した。その結果、一部の遺伝子は増幅が見られず、プラスミド欠落に起因すると思われる欠如、あるいは配列に一部違いがあることが明らかとなった。後者に関しては周辺配列約 15Kbp について公開ゲノム配列と実験に用いている株(公開ゲノム株と由来は同一)間で、ゲノム構造が異なる部分が多数あり、この領域について当研究室保有菌株のゲノム配列を決定した。なお、同一由来株にも係わらず、公開ゲノム配列と配列が異なった理由は、クローニングの過程で異なるクローンが選抜された可能性あるいは、公開ゲノム側のシーケンスエラーの可能性が考えられた。(当該領域は類似配列がタンデムに並ぶ構造のため)

さらに、当該領域は回帰熱群ボレリアのみが保有する遺伝子がタンデムに並んでいる領域であったことから、保有菌株のゲノム配列の解析を進める中で新たに見つかった2 遺伝子についても追加でプライマー設計を行い、候補遺伝子としてその後の解析に用いた。最終的に、82 の候補遺伝子およびコントロール遺伝子の合計 83 遺伝子についてリアルタイム PCR 系の確立を行った。

(4) 発現解析

1と同様に実験的にマダニ体内にボレリア菌を接種し、数日後にこれらマダニの臓器あるいは体液から RNA を抽出した。他方、培地にて増殖中の菌からも RNA を抽出し、2者間での候補遺伝子群の発現状態を比較解析した。なお、マダニ体内の発現解析は独立した実験を3回行い評価した。

当初、ランダムプライマーと oligo dT を用い合成した cDNA を鋳型にリアルタイム PCR を行った所、マダニ体内のボレリア菌の発現解析結果が独立実験間で安定せず、結果にバラツキが見られた。これは、マダニ体内の菌

数が少ないことによる検出感度の問題であることが明らかとなった。そこで、抽出した RNA から直接 One-step RT realtime PCR を行うことで検出感度を上げ、再度実験を行った。

結果、培地生育中の菌と比較し、マダニ体内の菌で 3 倍以上発現量が増加していた遺伝子が 27 個抽出された ( 図 1 )

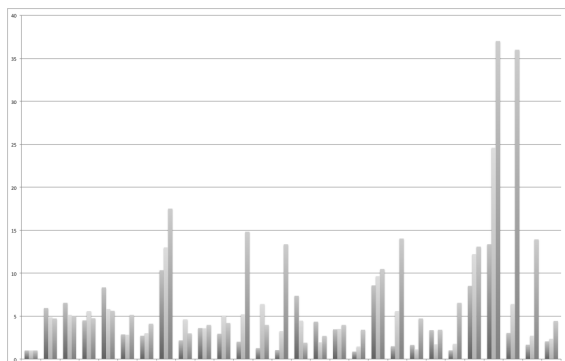


図 1 . マダニ体内においてコントロールと比較し、相対的に発現が上昇していた遺伝子

続いて、抽出された 27 遺伝子について、スピロヘータ特異的リポプロテイン推定アルゴリズム (SpLip) および一般的なタンパク解析ソフトの Sosui・LipoP を用い、*in silico* 解析を行い、細胞内で機能していると考えられる遺伝子を除外した ( 下表 )

No.	SpLip	Sosui, LipoP
1	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
2	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
3	probable Lipoprotein	putative membrane protein
4	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
5	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
6	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
7	Not Lipoprotein	putative soluble protein
8	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
9	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
10	probable Lipoprotein	putative soluble protein
11	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
12	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
13	probable Lipoprotein	putative membrane protein?
14	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
15	probable Lipoprotein	putative membrane protein
16	probable Lipoprotein	putative soluble protein?, SpLip
17	Not Lipoprotein	putative soluble protein?, SpLip
18	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
19	probable Lipoprotein	putative soluble protein?, SpLip
20	Not Lipoprotein	putative soluble protein
21	probable Lipoprotein	putative membrane protein
22	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
23	Not Lipoprotein	putative soluble protein
24	probable Lipoprotein	putative membrane protein, SpLip
25	Not Lipoprotein	putative soluble protein
26	Not Lipoprotein	putative soluble protein
27	Not Lipoprotein	putative soluble protein

その結果、リポプロテインと想定された 21 遺伝子とコントロール遺伝子について、それぞれベクターに挿入し、大腸菌を用いて標準プラスミドを作成した。なお、本実験は、山口大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けて実験を行った。( 承認番号 ; J16008 および J16009 )

作成したプラスミドを用い、定量的な One-step RT realtime PCR を行った所、全ての遺伝子において、5 倍から 100 倍以上マダニ体内で発現が上昇していることが明らかとなった ( 図 2 )

現在、作成したプラスミドをライム病群ボレリアで遺伝子改変が可能な株に形質転換を行っている。今後、各遺伝子の機能解析を進める予定である。

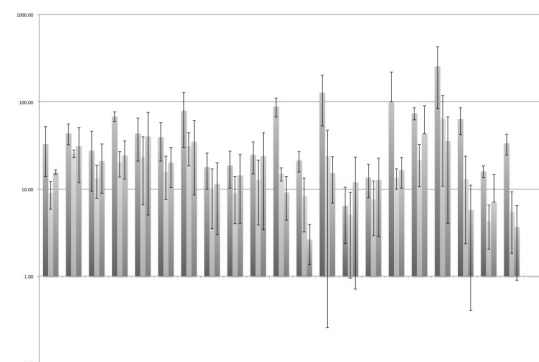


図 2 . 培地中の菌と比較し、マダニ体内で発現が上昇していた遺伝子

## 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 12 件 )

Furuno K, Lee K, Itoh Y, Suzuki K, Yonemitsu K, Kuwata R, Shimoda H, Watarai M, Maeda K, Takano A. (2017): Epidemiological study of relapsing fever borreliae detected in *Haemaphysalis* ticks and wild animals in the western part of Japan. PLOS One 12(3) e0174727. 査読有

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28362864>

Khasnatinov MA, Danchinoca GA, Takano A, Kawabata H, Ohashi N, Masuzawa T. (2016): Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* in Irkutsk City and its neighboring territories, Russia. Ticks Tick Borne Dis., 7(2): 394-397. 査読有

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26750571>

Toyomane K, Konnai S, Niwa A, Githaka WN, Isezaki M, Yamada S, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohashi K. (2016): Identification and the preliminary in vitro characterization of IRIS homologue from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze. Ticks Tick Borne Dis., 7(1): 119-125. 査読有

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26460162>

Margos G, Chu CY, Takano A, Jiang BG, Liu W, Kurtenbach K, Masuzawa T, Fingerle V, Cao WC, Kawabata H. (2015): *Borrelia yangtzensis* sp. nov. a rodent associated species in Asia is related to *B. valaisiana*. Int J Syst Evol Microbiol. 65: 3836-3840. 査読有

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26239825>

Murase Y, Konnai S, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, and Ohashi K. (2015): An investigation of binding ability of *Ixodes persulcatus* Schulze Salp15 with Lyme disease spirochetes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60: 59-67. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25796479>

Gatzmann F, Metzler D, Krebs S, Blum H, Sing A, Takano A, Kawabata H, Fingerle V, Margos G, and Becker NS. (2015): NGS population genetics analyses reveal divergent evolution of a Lyme Borreliosis agent in Europe and Asia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(3): 344-351. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25766392>

高野 愛 . マダニの生態とマダニ媒介性感染症 . 山口獣医学雑誌 . 42 , 1-8 , 2015 . 査読無

高野 愛 , 伊藤幸枝 , 下田 宙 , 濱崎千菜美 , 前田 健 . マダニの生態と予防の重要性 . アニマル・メディア社 info vets 7月号 2015年7月15日 . 査読無

Takano A , Toyomane K, Konnai S, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, and Kawabata H. (2014): Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *PLOS One*, 9(8): e104532. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111141>

Lee K, Takano A , Taylor KR, Sashika M, Shimozuru M, Konnai S, Kawabata H, and Tsubota T (2014): A Relapsing fever group *Borrelia* sp. similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5: 841-847. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108784>

Sato K, Takano A , Konnai S, Nakao M, Ito T, Koyama K, Kaneko M, Ohnishi M, and Kawabata H. (2014): Human *Borrelia miyamotoi* infections in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 20(8): 1391-1394. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25061761>

Hidano A, Konnai S, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Higuchi H, Nagahata H, Ito T, Takano A , Ando S, Kawabata H, Murata S, and Ohashi K. (2014): Suppressing effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Molecular Biology*, 23(4): 466-474. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469849>

〔学会発表〕(計 9 件)

高野 愛、伊藤幸枝、DeMar Taylor、川端寛樹、前田 健 . マダニ体内での効率的な感染に關与すると推察されるボレリア属細菌遺伝子群の検索 . 第 90 回日本細菌学会 . 2017.3.19-21 . 仙台国際センター , 宮城県仙台市

伊藤幸枝 , 古野希和 , Bazartsuren B , Naranbaatar O , Yondonjams E , 川端寛樹 , 高田伸弘 , 安藤匡子 , 藤田博己 , 度会雅久 , 下田 宙 , 前田 健 , 高野 愛 . 国内およびモンゴル国にて採取したマダニにおける新興回帰熱群ボレリアの疫学調査研究 . 第 159 回日本獣医学会学術集会 . 2016.9.6-8 . 日本大学湘南キャンパス , 神奈川県藤沢市 .

古野希和 , 鈴木和男 , 李 景利 , 伊藤幸枝 , 鎌田龍星 , 下田 宙 , 前田 健 , 高野 愛 . 本州のマダニおよび野生動物における新興回帰熱群ボレリアの疫学調査研究 . 第 159 回日本獣医学会学術集会 . 2016.9.6-8 . 日本大学湘南キャンパス , 神奈川県藤沢市 .

越智 晶絵 , 今内 寛 , 伊東拓也 , 川端寛樹 , 高野 愛 , 安藤秀二 , 村田史郎 , 大橋和彦 . シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 由来 sialostatinL2 の機能解析 . 第 159 回日本獣医学会学術集会 . 2016.9.6-8 . 日本大学湘南キャンパス , 神奈川県藤沢市 .

村瀬優介 , 今内 寛 , 伊東拓也 , 高野 愛 , 川端寛樹 , 安藤秀二 , 村田史郎 , 大橋和彦 . シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 由来 Salp15 因子によるライム病ボレリア伝播促進機能の解析 . 第 158 回日本獣医学会学術集会 . 2015.9.7-9 . 北里大学十和田キャンパス , 青森県十和田市 .

高野 愛 , 川端寛樹 . 広域で分離され

た *Borrelia miyamotoi* の MLST 解析ならびに推定媒介マダニにおける体内動態解析 . 第 88 回日本細菌学会総会 . 2015.3.26-28 . 長良川国際会議場 , 岐阜県岐阜市

**高野 愛** , Boldbaatar Bazartseren , Erdenechimeg Dashzeveg , Myagmarsukh Yondon , Gabriele Margos . モンゴル国北部にて採取したマダニにおける *B.miyamotoi* の疫学調査研究 . 第 157 回日本獣医学会学術集会 . 2014.9.9-12 . 北海道大学 , 北海道札幌市

松本苑子 , 橋野正紀 , 鈴木 尋 , **高野 愛** , 藤田 修 , 堀田明豊 , 森川 茂 , 高田伸弘 , 渡邊健太 , 清水 隆 , 度会雅久 . ダニにおける *Francisella tularensis* の全国的疫学調査 . 第 157 回日本獣医学会学術集会 . 2014.9.9-12 . 北海道大学 , 北海道札幌市

李 景利 , **高野 愛** , Kyle Taylor , 左鹿万里子 , 下鶴倫人 , 今内 覚 , 川端寛樹 , 坪田敏男 . A RF *Borrelia* sp. found among wild sika deer and Haemaphysalis ticks in Hokkaido. 第 157 回日本獣医学会学術集会 . 2014.9.9-12 . 北海道大学 , 北海道札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :

番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高野 愛 (TAKANO, Ai)  
山口大学・共同獣医学部・准教授 (テニユアトラック)  
研究者番号 : 90700055

(2) 研究協力者

伊藤 幸枝 (ITOH, Yukie)

(3) 研究協力者

川端 寛樹 (KAWABATA, Hiroki)

(4) 研究協力者

DeMar Taylor (TAYLOR, DeMar)