

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

ダニ媒介性病原体の伝播機序の解明と制御法の開発

研究分担者	今内 覚	北海道大学大学院獣医学研究科
研究協力者	川端 寛樹	国立感染症研究所細菌第一部(研究分担者)
	高野 愛	山口大学共同獣医学部病態制御学(研究分担者)
	伊東 拓也	北海道衛生研究所
	中尾 稔	旭川医科大学医学部寄生虫学講座

研究要旨

ライム病はスピロヘータの一種であるボレリア菌 (*Borrelia* spp.)によって引き起こされる人獣共通感染症である。ボレリア菌は野鼠や小鳥などの保菌動物と *Ixodes* 属のマダニ間で維持されており、ヒトへの伝播はボレリア菌に感染したマダニの吸血により成立する。ライム病の症状はマダニの刺咬部を中心とした遊走性紅斑が特徴的で、その後神経症状や関節痛などの症状を呈する。現在ライム病に対するワクチンはなく、幅広くボレリア菌を防ぐワクチンの開発が望まれている。近年、マダニの吸血及びダニ媒介性疾病を防除する新たな手段として、マダニ由来の蛋白質を用いた抗ダニワクチンが研究されている。シカダニ (*Ixodes scapularis*) から同定された Salp15 は宿主の局所免疫を抑制する一方で、*Borrelia burgdorferi* の Outer surface protein C (OspC) に結合し、宿主が産生する抗体や補体からのボレリア菌の中和を防ぐことが明らかとなっている。Salp15 様因子はボレリア菌を伝播する *Ixodes* 属のマダニから広く同定されており、ボレリア菌伝播における Salp15 の重要性が示唆されている。我々は以前、日本においてボレリア菌を伝播するシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) について 2 種類の Salp15 様因子 (Salp15 Iper)、Salp15 Iper-1 及び Salp15 Iper-2 を同定した。そこで本年度は、昆虫細胞由来組換え Salp15 Iper-1 及び Salp15 Iper-2 を作製し、その機能解析を行った。組換え Salp15 Iper とボレリア菌 OspC の結合を調べるため、Solid-phase overlay assay 及び蛍光抗体法を行った。組換え Salp15 Iper は *B. burgdorferi*、*B. garinii* 及び *B. afzelii* の OspC へ結合することが明らかとなった。また、抗ボレリア菌抗血清を用いて組換え Salp15 Iper のボレリア菌保護機能を評価したところ、対照蛋白質と比較して有意に生存ボレリア菌数の上昇が認められた。ボレリア菌伝播促進機能を評価するため、組換え Salp15 Iper と反応させたボレリア菌をマウスへ接種した。ボレリア菌感染量を定量 PCR 法にて評価し、感染局所では組換え Salp15 Iper-2 と反

応させた群においてボレリア菌感染量が増加する傾向がみられた。また、ボレリア菌が血行性に播種する組織では Salp15 Iper-1 と反応させた群においてボレリア菌感染量が増加する傾向がみられた。以上の結果から、本因子は宿主が産生する抗体からボレリア菌を保護することが明らかとなり、ボレリア菌伝播において重要な役割を果たす可能性が示唆された。今後 Salp15 Iper のさらなる機能の解析及びボレリア菌伝播における分子メカニズムを明らかにすることで、宿主の免疫を抑制するマダニの複雑な戦略の解明に寄与するとともに複数の病原体伝播を同時に阻害できるような効率のよい抗ダニワクチンの開発が期待される。

A. 研究目的

シュルツェマダニ(*Ixodes persulcatus*: *I. persulcatus*)は、本邦におけるヒトのライム病ボレリア(*Borrelia garinii*および*B. afzelii*)の唯一のベクターである。北米に分布するシカダニ(*I. scapularis*)は、同じくライム病ボレリア(*B. burgdorferi*)を媒介し、ダニ中腸内のボレリアレセプターが同定されている。そのレセプターは、ボレリア菌の表面蛋白 Outer surface protein A(OspA)に結合することから Tick receptor for OspA (TROSPA)と呼ばれている。また、15-kDa *I. scapularis* salivary gland protein (Salp15)はボレリア菌の表面蛋白 OspC に結合し、抗体の結合を阻害することでボレリアの伝播を助長することが報告されている。本研究では、機能が明らかでない本邦におけるライム病ボレリアのベクターである *I. persulcatus* の Salp15 機能解析を行った。

B. 研究方法

1) マダニ由来 RNA の調製

マダニは、北海道大学獣医学部バイオハザード P3 施設において、ハムスター (Syrian, メス, リタイア; 日本 SLC 社) を用いて継代したシュルツェマダニ実験室株を使用した (北海道大学実験動物許可番号 09-0113)。ハム

スターに 4 日間吸血させた成ダニ (メス) を実体顕微鏡下で解剖して唾液腺を採取し、TRIZOL 試薬 (Invitrogen 社) を用いて全細胞 RNA を抽出した。

2) Schneider 2 (S2) 細胞を用いた組換え Salp15 Iper の作製

ダニより抽出した *Salp15 Iper-1* 及び *Iper-2* 遺伝子を pMT/Bip/V5-His A vector に挿入した。組換え Salp15 Iper-1 及び Iper-2 安定発現細胞株樹立のために、 6×10^6 個の S2 細胞を Schneider's Drosophila medium (Gibco 社) 3ml で一晩培養したのち、抽出したプラスミドと pCoHygro (Invitrogen 社) 1.0 mg を Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen 社) を用いて常法に従い共導入した。対照の GFP 蛋白質については pMT/Bip/V5-His GFP vector 及び pCoHygro をそれぞれ共導入した S2 細胞より同様に調製した。プラスミド導入 48 時間後、細胞を回収し、選択培養を行うため終濃度 300 μ g/ml の Hygromycin B (Invitrogen 社) 及び 10% bovine serum albumin (BSA) (Gibco 社)を含む培地で 5 週間継代を行った後 Hygromycin B 抵抗性 S2 細胞を得た。得られた Hygromycin B 抵抗性 S2 細胞の培養には Shields and Sang M3 Insect Medium (Sigma 社) 及び Insect Medium

Supplement (10×) (Sigma 社) を用いて 4×10^8 個の細胞数になるまで培養した。組換え Salp15 Iper-1 及び Iper-2 の発現を誘導するために終濃度 500 mM となるよう CuSO_4 を加え、4 日後に培養液を回収し 1,000g、10 分、4°C で遠心を行い細胞片を除去し、組換え Salp15 Iper-1 または Iper-2 を含む培養上清を得た。昆虫細胞培養上清はアフィニティークロマトグラフィーを用いて組換え Salp15 Iper-1 及び Iper-2 を精製した。

3) Solid-phase overlay assay

ボレリア菌 OspC と組換え Salp15 Iper との結合を検討するため、Solid-phase overlay assay を行った。ボレリア菌培養液 (1.0×10^8 細胞) を 4,000 rpm、4°C、5 分遠心し、PBS で 2 回洗浄した。PBS 100 μ l に懸濁後、SDS-PAGE サンプルに調製した。15%ポリアクリルアミドゲルにて SDS-PAGE を行い、転写した転写膜に対し、3%スキムミルク (森永乳業社) 及び 1.5% BSA 加 PBST 中で 4°C、1 晩ブロッキングを行った。その後、組換え Salp15 Iper-1、Iper-2 または GFP 蛋白質溶液 (各 50 μ g/ml) を室温にて 90 分反応させた。反応後、ウェスタンブロッティングを行った。1 次抗体には 2,000 倍希釈の抗 V5 タグモノクローナル抗体、2 次抗体には 1,000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を用いた。

4) 蛍光抗体法

ボレリア菌培養液 (1.0×10^7 細胞) を 4,000rpm、4°C、5 分遠心し、PBS で 2 回洗浄した。ボレリア菌体を 250 μ l の PBS に懸濁し、15 μ l をスライドガラス (Molecular Probes 社) に滴下した。室温で 2 時間乾燥後、-20°C に冷却したアセトン を 4 μ l 滴下し、5 分間室温

で固定した。0.1M Glycine-PBS を 10 μ l ずつ滴下し、室温で 10 分反応させた。反応後、上清を除去し、3% BSA-PBS を 10 μ l 滴下し、室温で 30 分ブロッキングを行った。ブロッキング後、上清を除去し、組み換え Salp15 Iper-1、Iper-2 または GFP を 30 μ g/ml、15 μ l 滴下し、室温で 90 分反応させた。反応後、1% BSA-PBS で 5 回洗浄し、200 倍希釈した抗 V5 タグウサギモノクローナル抗体及び 100 倍希釈したマウス抗 OspC モノクローナル抗体 (国立感染症研究所 川端寛樹博士より分与) を 10 μ l 滴下し、湿潤な密閉容器の中で 4°C、一晩反応させた。反応後、1% BSA-PBS で 5 回洗浄後、200 倍希釈 FITC 標識抗ウサギ IgG(H+L)ヤギ F(ab')₂ モノクローナル抗体 (Beckman Coulter 社) 及び 200 倍希釈 PE 標識抗マウス IgG (H+L) ヤギ F(ab')₂ モノクローナル抗体 (Beckman Coulter 社) を 10 μ l ずつ滴下し、湿潤な密閉容器内で遮光、室温条件下で 90 分反応させた。反応後、1% BSA-PBS で 5 回洗浄し、Slowfade Gold anti-fade reagent with DAPI (Invitrogen 社) を 10 μ l 滴下した。4°C、遮光条件下で 3 時間乾燥させ、LSM700 (Zeiss 社) にて観察した。各抗体の希釈には 1% BSA-PBS を用いた。

5) *in vitro* 培養条件化におけるボレリア菌保護機能の検討

抗ボレリア菌血清存在下における組換え Salp15 Iper によるボレリア菌保護作用を検討した。マウス (C3H/HeJ Jcl、メス、3 週齢; 日本 SLC 社) 2 匹 1 群に対し、ボレリア菌培養液 (1.0×10^7 細胞) 1ml を背部皮下に皮下接種した。接種 3 週間後、マウスをイソフルランで麻酔後、全採血し、抗ボレリア菌マウス血清を分離した。ボレリア菌培養液 (1.0×10^8 細胞) を

4,000rpm、4℃、5分遠心し、0.85%NaCl溶液で2回洗浄した。得られたペレットを50 μ lのBSK-H mediumに懸濁し、組換えSalp15 Iper-1、Iper-2及びGFPを終濃度50 μ g/mlになるように加え、33℃、1時間反応させた。さらに200倍希釈抗ボレリア菌血清またはボレリア非菌感染マウス血清を加え18時間反応させた。反応後、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (Invitrogen社)を用いて定法に従って生菌、死菌をそれぞれ染色した。無作為に抽出した20視野における平均生菌数を求め、非ボレリア菌感染マウス血清を加えた場合の生菌数を100%として算出した。

6) 組換えSalp15 Iperのボレリア菌伝播促進機能の評価

ボレリア菌培養液(1.0 \times 10⁶細胞)を4,000rpm、4℃、5分遠心し、PBSで2回洗浄した。ボレリア菌の菌体をBSK-H medium 1mlに懸濁し、組換えSalp15 Iper-1、Iper-2または対照蛋白質としてGFPを50 μ g/ml加え、33℃1時間反応させた。反応後、再度混和し、マウス(C3H/HeJ Jcl、メス、3週齢;日本SLC社)の背部に皮下接種した。ボレリア菌接種3週間後、イソフルラン麻酔下にて安楽殺し、皮膚、耳、心臓、膀胱、足根関節を採材した。各臓器は0.1% コラゲナーゼ(和光純薬工業株式会社)(w/v)-PBS 500 μ lを加え、37℃、6時間反応させた。反応後、5.5 U Proteinase K(和光純薬工業株式会社)を含有したDNA抽出緩衝液(20mM Tris-HCl [pH8.0], 5mM EDTA, 400mM NaCl, 0.3% SDS)を500 μ l加え、55℃、18時間反応させた。反応後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)(PCI)(和光純薬工業株式会社)抽出及びエタノール沈殿を行い、全細胞

DNAを回収し、滅菌2次蒸留水100 μ lに溶解した。RNA除去操作を行うため、4mg/ml RNase A (Promega社)を3 μ l加え、37℃、30分間反応させた。再度PCI抽出及びエタノール沈殿を行い滅菌2次蒸留水100 μ lに溶解した。得られたDNA溶液は定量PCR法による解析に供するまで-30℃で保存した。ボレリア菌感染量を比較するため、ボレリア菌flagellin遺伝子を標的とした定量PCR法をLight cyclerTM 480 (Roche Diagnostics社)を用いて行った。上記DNA 5ngをそれぞれ鋳型として、各プライマー6pmol、SYBR Premix DimerEraserTM (TaKaRa社)5 μ lを含む10 μ lのPCR反応液中で、熱変性95℃5秒間(初回のみ30秒間)-アニーリング53℃30秒間-伸張反応72℃1分間よりなる反応を60サイクル繰り返した。また内部標準であるマウス β -actin遺伝子についても同様に解析を行い、結果はflagellin遺伝子量/ β -actin遺伝子量比として示した。遺伝子定量に必要な標準濃度曲線はpGEM-T easy vectorに各標的遺伝子を組み込んだプラスミド(10²~10²pg)を用いて作成した。各試料について3回の定量を行い、その平均値を算出した。また、結果はGFP投与群のボレリア菌感染量からの変動率(*x*-fold)で示した。

7) 統計解析

統計解析にはStacle2 software (OMS社)を使用した。標本が等分散の場合はStudentの*t*検定、不等分散の場合にはWelchの*t*検定を用いた。また標本が離散値である場合にはMann-Whitney検定による有意差検定を行った。各検定において危険率0.05未満(*)あるいは0.01未満(**)を有意な差とした。

(倫理面からの配慮について)
該当しない。

C. 研究結果

1) 組換え Salp15 Iper のボレリア菌実験室株 OspC への結合能の検討

組換え Salp15 Iper と OspC の結合能を Solid-phase overlay assay により検討した。対照蛋白質 GFP と反応させた場合では特異的シグナルは検出されなかったが、組換え Salp15 Iper-1 または Iper-2 と反応させた場合ではボレリア菌 3 種全てにおいて 22kDa の位置に特異的シグナルが検出され、組換え Salp15 Iper-1 及び Iper-2 は *B.burgdorferi*, *B.garinii*, *B.afzelii* の OspC と結合すると考えられた。OspC は生体条件において 2 量体の膜蛋白質として発現している。そこで非変性条件における組換え Salp15 Iper の OspC への結合能を蛍光抗体法により検討した。組換え Salp15 Iper-1, Iper-2 または GFP を *B.burgdorferi*, *B.garinii* 及び *B.afzelii* と反応させ、ボレリア菌に結合した組換え蛋白質を緑色発光、OspC を赤色発光として検出した。その結果、GFP と反応させた場合ではボレリア菌 3 種全てにおいて OspC の局在のみが検出された。一方、組換え Salp15 Iper-1 または Iper-2 を反応させた場合では、組換え Salp15 Iper 及び OspC が菌体表面に観察された。以上の結果より Salp15 Iper はボレリア菌体表面に発現する OspC に結合するものと考えられた。

2) 組換え Salp15 Iper のボレリア菌野外株 OspC への結合能の検討

北海道に分布するボレリア菌 OspC の LBD2 の予想アミノ酸配列を決定し、組換え Salp15 Iper のボレリア菌野外株 OspC への

結合能を検討した。北海道にて採取したシュルツェマダニのオスからボレリア菌野外株 5 株を分離し、それぞれを Hokkaido *Borrelia* (HB) 1, 2, 3, 4 及び 5 株と名付けた。RFLP 法によりボレリア菌種を決定したところ、HB1, 2, 3, 5 株は *B.garinii*, HB4 株は *B.afzelii* であることが明らかとなった。ボレリア菌実験室株及び HB 株の OspC の LBD1 及び LBD2 の多型を比較するため、塩基配列解析を行った。得られた予想アミノ酸配列を比較したところ、LBD1 では、32 アミノ酸中 16 アミノ酸が保存されていたのに対し、LBD2 では 15 アミノ酸中 8 アミノ酸が保存されていた。次に OspC グループ間における LBD1 及び LBD2 のアミノ酸配列の比較を行った。OspC グループ A-U の配列を比較したところ、LBD1 では 67.6% から 100% の相同性を示した。一方、LBD2 では 41.2% から 100% の相同性を示し、LBD2 領域に多型が集中することを確認した。続いてシュルツェマダニにより伝播されるボレリア菌野外株を用いて、組換え Salp15 Iper と OspC の結合能を検討した。ボレリア菌野外株には LBD2 のアミノ酸配列が異なる HB2, 3, 5 株を用いた。その結果、GFP と反応させた場合ではボレリア菌 3 種全てにおいて OspC の局在のみが検出されが、組換え Salp15 Iper-1 または Iper-2 を反応させた場合では、組換え Salp15 Iper 及び OspC が菌体表面に観察された。以上の結果より Salp15 Iper はボレリア菌野外株においても菌体表面に発現する OspC に結合するものと考えられた。また Salp15 Iper の OspC への結合は LBD2 のアミノ酸配列に依存しないことが示唆された。

3) 組換え Salp15 Iper によるボレリア菌保護機能の評価

組換え Salp15 Iper がボレリア菌に結合す

ることが明らかとなったため、組換え Salp15 Iper のボレリア菌保護機能を検討した。マウスに *B.burgdorferi*、*B.garinii* または *B.afzelii* を皮下接種し、それぞれのボレリア菌に対する抗血清を得た。ボレリア菌と組換え蛋白質及び抗ボレリア菌血清と共に培養し、蛍光色素を用いて生菌及び死菌を染め分けた。1 視野における平均生菌数を求め、対照マウス血清を加えた場合の平均生菌数を 100%として求めた。その結果、*B.garinii* に対して GFP を反応させた場合では 51.9±5.4%のボレリア菌が生存していたのに対し、Salp15 Iper-1 または Iper-2 と反応させた場合では 79.6±6.8%、88.0±4.9%と有意に生菌数に差が認められた (Iper-1: $p=0.00233$; Iper-2: $p=0.0000241$ Mann-Whitney 検定)。*B.burgdorferi* 及び *B.afzelii* に対しても同様に組換え Salp15 Iper のボレリア菌保護機能を評価した。*B.burgdorferi* または *B.afzelii* においても組換え Salp15 Iper と反応させた場合において有意に生菌数の増加が認められた。以上の結果から、組換え Salp15 Iper-1 及び Iper-2 は抗ボレリア菌血清に対して保護効果を示すことが明らかとなった。また組換え Salp15 Iper-1 及び Salp15 Iper-2 は *B.garinii* のみならず *B.burgdorferi* 及び *B.afzelii* に対しても保護機能を示した。

4) 組換え Salp15 Iper のボレリア菌伝播促進機能の評価

組換え Salp15 Iper のボレリア菌保護機能が明らかとなったため、組換え Salp15 Iper のボレリア菌伝播促進機能を評価した。ボレリア菌と組換え Salp15 Iper-1、Iper-2、GFP または PBS を反応させ、マウスの皮下に接種した。3 週間後、皮膚、耳、心臓、膀胱、足根関節を採材し、各局所におけるボレリア菌感染量を

リアルタイム PCR により相対評価した。皮膚や耳など、ボレリア菌感染局所におけるボレリア菌感染量は Salp15 Iper-2 と反応させた群において最高平均値を示した。GFP と反応させた群と統計学的有意差は認められなかったものの、皮膚における感染量は 29.4±17.9 倍 (平均値±標準誤差) を示し、また耳における感染量は 44.1±24.6 倍であった ($p=0.203$ 及び $p=0.227$ Welch の t 検定)。また心臓や足根関節、膀胱などの組織では Salp15 Iper-1 と反応させた群で最高平均値を示した。GFP と反応させた群と統計学的有意差は認められなかったが、心臓では 1260±686 倍、足根関節では 8.56±1.07 倍、膀胱では 1.64±1.13 倍の感染量であった ($p=0.139$ 、 $p=0.426$ 及び $p=0.696$ Welch の t 検定)。以上の結果から組換え Salp15 Iper-1 及び Iper-2 はボレリア菌伝播を促進する傾向が示唆された。

D. 考察

本研究により、組換え Salp15 Iper の抗ボレリア菌血清からボレリア菌を保護する機能が明らかとなった。また、マウスを用いた感染実験ではボレリア菌を組換え Salp15 Iper 反応させた場合に高い感染量を示す傾向にあった。Salp15 をターゲットとしたワクチネーション試験ではシカダニからのボレリア菌の伝播を阻害することが明らかとなっている (Dai *et al.*, 2009)。また、抗 Salp15 抗体をマウスへ投与した実験では有意にボレリア菌の伝播を阻害し、さらに抗 OspA 抗体または抗 OspC 抗体を併用することでさらなる防御効果が得られることが明らかとなった (Dai *et al.*, 2009)。マダニの唾液腺には複数のボレリア菌伝播促進因子が存在するものと考えられる。ボレリア菌と唾液腺抽出物を反応させマウスへ投与した感染

実験では、有意にボレリア菌の伝播を促進する結果が明らかとなっている (Zeidner *et al.*, 2002)。またシカダニから同定された sL2 はカテプシン L 及び S の活性を阻害し、細胞障害性 T 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった (Kotsyfakis *et al.*, 2006)。さらに sL2 で免疫した動物はダニの吸血を阻害し、さらにボレリア菌伝播を阻害することが明らかになっている (Kotsyfakis *et al.*, 2010a; Kotsyfakis *et al.*, 2010b)。マダニ唾液腺内には Salp15 様因子の他にボレリア菌伝播に関与する因子の存在する可能性が考えられるため、ボレリア菌感染シュルツェマダニを用いた感染実験を行い、ボレリア伝播における Salp15 Iper の重要性を示す必要があると考えられる。

E. 結論

近年、ダニ吸血局所における免疫応答を抑制することで病原体伝播を助長する因子が同定されている。本研究より組換え Salp15 Iper が OspC に結合することが確認された。組換え Salp15 Iper の結合また組換え Salp15 Iper は抗ボレリア菌血清からボレリア菌を保護することも確認された。ライム病に対するワクチンは OspA や OspC を標的としたワクチンが研究されている。しかし、ボレリア菌株間で交差反応性が得られないため幅広くボレリア菌を防ぐワクチンの開発が望まれている。本研究より Salp15 Iper は OspC の LBD2 のアミノ酸配列によらずに結合することが明らかとなった。従って組換え Salp15 Iper をターゲットとしたワクチネーションは OspC をターゲットとしたワクチネーションよりも幅広くボレリア菌感染を防ぐ可能性が考えられる。今後 Salp15 Iper のさらなる機能の解析及びボレリア菌伝播における分子メカニズムを明らかにすることで、宿主

の免疫を抑制するマダニの複雑な戦略の解明に寄与すると共に、複数の病原体伝播を同時に阻害する効率の良い抗ダニワクチンの開発が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murase Y, **Konnai S**, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohashi K. An investigation of binding ability of *Ixodes persulcatus* Schulze Salp15 with Lyme disease spirochetes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (*in press*)
- 2) Parizi L, Sabadin G, Alzugaray M, Seixas A, Logullo C, **Konnai S**, Ohashi K, Masuda A, Itabajara da S. Vaz Jr. *Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ovatus* cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response. *Parasite and Vectors*. (*in press*)
- 3) da Silva RM, Della Noce B, Waltero CF, Costa EP, de Abreu LA, Githaka NW, Moraes J, Gomes HF, **Konnai S**, da Silva Vaz I, Ohashi K, Logullo C. Non-Classical Gluconeogenesis-Dependent Glucose Metabolism in *Rhipicephalus microplus* Embryonic Cell Line BME26. *International Journal of Molecular Sciences* 16(1):1821-1839, 2015.

- 4) Lee K, Takano A, Taylor K, Sasika M, Shimozuru M, **Konnai S**, Kawabata H, Tsubota T. 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, 2014.
- 5) Githaka N, **Konnai S**, Bishop R, Odongo D, Lekolool I, Kariuki E, Gakuya F, Kamau L, Isezaki M, Murata S, Ohashi K. Identification and sequence characterization of novel *Theileria* genotypes from the waterbuck (*Kobus defassa*) in a *Theileria parva*-endemic area in Kenya. **Veterinary Parasitology** 202(3-4):180-193, 2014.
- 6) Ali A, Tirloni L, Isezaki M, Seixas A, **Konnai S**, Ohashi K, da Silva Vaz Junior I, Termignoni C. Reprolysin metalloproteases from *Ixodes persulcatus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology** 63(4):559-578, 2014.
- 7) Takano A, Toyomane K, **Konnai S**, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, Kawabata H. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. **PLoS One** 9(8): e104532, 2014.
- 8) Sato K, Takano A, **Konnai S**, Nakao M, Ito T, Kaneko M, Koyama K, Ohnishi M, Kawabata H. Human *Borrelia miyamotoi* infection in Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 20(8): 1391-1393, 2014.
- 9) Hidano A, **Konnai S**, Yamada S, Githaka N, Isezaki M, Higuchi H, Nagahata H, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohahsi K. Suppressive effects of nutrophil by Salp16 Iper, a salivary gland protein, from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Molecular Biology**. 23(4), 466-474, 2014.
- 10) Toyomane K, **Konnai S**, Niwa A, Githaka N, Isezaki M, Yamada S, Ito T, Takano A, Ando S, Kawabata H, Murata S, Ohahsi K. Molecular cloning and the preliminary *in vitro* characterization of the two transcripts identified from the salivary glands of *I. persulcatus* (*in submission*).
- 11) Ochirkhuu N, **Konnai S**, Mingala C, Okagawa T, Villanueva M, Pilapil F, Murata S, Ohahsi K. Molecular epidemiological survey and genetic analysis of vector-borne infections of cattle in Luzon Island, the Philippines (*in submission*).

2. 学会発表

- 1) 川端寛樹, 今内 覚, 高野 愛, 中尾 稔, 伊東拓也, 佐藤 梢. 北海道におけるマダニ

媒介性新興回帰熱病原体ボレリアの分布調査. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)

2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

2) Ochirkhuu N, Konnai S, Mingala C, Okagawa T, Villanueva M, Pilapil F, Murata S, Ohahsi K. Molecular epidemiological survey of tick-borne diseases in cattle of Philippine. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, (2014.9.24)

3) Ochirkhuu N, Konnai S, Mingala C, Okagawa T, Murata S, Ohahsi K. Molecular epidemiological survey of tick-borne diseases in cattle of Philippine. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9.9)

4) Kyunglee Lee, 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. 札幌, (2014.9.9)

5) 今内 覚, 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*)由来免疫抑制因子の性状解析 22nd Seminar on Acari-Diseases Interface. 福岡, (2014.7.4)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

アナプラズマ症の血清検査による実態調査

研究分担者	大橋 典男	静岡県立大学 食品栄養科学部 教授
研究協力者	吉川 悠子	静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
	川森 文彦	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 部長
	池ヶ谷 朝香	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 主査
	呉東興 (ウソソ)	静岡県立大学大学院博士課程 3 学年
	川上 万里	岡山済生会総合病院
	岸本 壽男	岡山県環境保健センター(研究分担者)
	森田 裕司	明神診療所
	中堂園 文子	鹿児島県環境保健センター
	御供田 睦代	鹿児島県環境保健センター
	能勢 裕久	鹿児島市立病院
	池田 賢一	鹿児島市立病院
	増澤 俊幸	千葉科学大学
	安藤 秀二	国立感染症研究所(研究代表者)

研究要旨

アナプラズマ症は、リケッチア目、アナプラズマ科に属する *Anaplasma phagocytophilum* により引き起こされるリケッチア関連感染症で、新興感染症として位置付けられている。本年度は、昨年度に見出した血清診断に利用可能な 3 種の P44 外膜蛋白質について、これらの組換え蛋白質 (rP44-18ES、rP44-47E、rP44-60) を利用した検査によるアナプラズマ症の実態調査を開始した。検査対象の血清検体は、2012 年の和歌山県での不明熱 8 症例、2013 年の岡山県での不明熱 2 症例、2001 年の長野県での不明熱 1 症例、および 2014 年の鹿児島県での不明熱 1 症例である。検査は、THP-1 および HL60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原とした免疫蛍光抗体法 (IFA) および 3 種の組換え蛋白質を抗原とした Western blotting で行った。その結果、4 県の各 1 名ずつからこれらの抗原と反応し陽性を示す血清が見つかった。よって、これらの 4 名の患者はアナプラズマ症である可能性が極めて高い。このように、IFA と組換え蛋白質の Western blotting を組み合わせた血清診断法はアナプラズマ症の判定のためには有効であると考えられる。しかし、この 3 種の組換え蛋白質は大量培養および蛋白質精製が非常に困難であるため、今後は、P44-18ES、P44-47E、P44-60 のエピトープを同定し、合成ペプチドを抗原とした血清診断法を検討する予定である。

A. 研究目的と背景

「アナプラズマ症」は、1990年代に米国で発見されたマダニ媒介性の新興感染症で、その病原体はリケッチア目、アナプラズマ科に属する偏性寄生性細菌の *Anaplasma phagocytophilum* である。症状は、発熱、白血球減少、血小板減少などであるが、これと類似の症状を示す感染症として、近年、中国で発見され、最近、日本でも確認された「重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome [SFTS]) が知られている。実は、中国の SFTS は当初、*A. phagocytophilum* 感染による「アナプラズマ症」が疑われていた。

日本国内においては、最近になって、我々の retrospective な解析により、高知県の2名の発熱性疾患の患者から *A. phagocytophilum* の特異遺伝子と抗体を検出することに成功し、日本国内でのヒト感染の存在が初めて明らかとなった。この2名のうち1名は日本紅斑熱リケッチアとの混合感染であることも判明した。実は、血清診断では、国内の患者血清は HL60 よりはむしろ THP-1 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原として認識するケースが多いことが判ってきた。つまり、抗原性の異なる *A. phagocytophilum* が THP-1 と HL60 細胞でそれぞれ優位的に増殖するのである。

昨年度は、THP-1 および HL60 細胞の双方で培養した *A. phagocytophilum* を抗原として用いて、2010年～2011年にかけて静岡県内で発生した9名の不明発熱性疾患の患者血清を調べ、そのうち4名の患者が *A. phagocytophilum* に対する抗体を保有することを明らかにし、さらに THP-1 と HL60 細胞で優位的に増殖した *A. phagocytophilum* がそれぞれ発現する異なった抗体結合蛋白質種の同定に成功した。本年度は、これら抗体

結合蛋白質の組換え蛋白質を作製し、これを用いた Western blotting と間接免疫蛍光抗体法 (IFA) を組み合わせた血清診断により、これまで不明熱患者とされた血清中における *A. phagocytophilum* に対する抗体の検出を試みた。

B. 研究方法

1. 間接免疫蛍光抗体法 (IFA)

IFA法の抗原としては、*A. phagocytophilum* を HL60 細胞と THP-1 細胞に感染させ培養したものをを用いた。

2. 組換え蛋白質の作製

THP-1 感染 *A. phagocytophilum* の発現している可能性の高い P44-47E と P44-60 外膜蛋白質、および HL60 感染 *A. phagocytophilum* で時折優位に発現することが報告されている P44-18ES 蛋白質をそれぞれの cell line の代表として選び、これらの組換え蛋白質を作製した。ここでは、組換え蛋白質を作製する際、大腸菌を用いた蛋白発現ではヒト血清の大腸菌蛋白質のコンタミへの非特異反応が極めて強いため、昆虫由来無細胞系のインビトロ発現システムを利用した。まず、*A. phagocytophilum* の P44-18ES、P44-47E および P44-60 蛋白質をコードする遺伝子の中心部に存在する超可変領域 (654~681 bp) を、昆虫でのコドン利用率を考慮して、人工的に全合成し、pUC57 に組み込んだ後、そのインサート領域を PCR により増幅し、in-fusion 法により、pTD1 発現 vector に組み込んだ。その後、その組換えプラスミドを鋳型として、T7 RiboMAX express large scale RNA production system (Promega 社) を用いて、目的遺伝子配列を含む mRNA を *in vitro* 転写反応 (37°C、30分) により合成した。続いて、昆虫由来無細胞タンパク質合成キット Transdirect insect cell (島津製) を用いて、転写後の反応液を翻訳液に添

加して 25°C で 5 時間反応させ、上記 3 種類の組換え P44 (rP44) 蛋白質を得た。そして、これらの rP44 蛋白質と患者血清との反応性を Western blot 法により解析した。

C. 研究結果および D. 考察

和歌山県、岡山県、長野県、鹿児島県の不明熱患者からの *A. phagocytophilum* に対する抗体の検出

検査対象の血清検体は、アナプラズマ症検査の依頼があった、2012 年の和歌山県での不明熱 8 症例、2013 年の岡山県での不明熱 2 症例、2001 年の長野県での不明熱 1 症例、および 2014 年の鹿児島県での不明熱 1 症例である(図1)。まず、THP-1 および HL60 細胞で培養した *A. phagocytophilum* を抗原とした IFA を行ったところ、4 県の各 1 名ずつがいずれかの抗原と反応し抗体陽性であることが判った(表 1)。続いて、THP-1 感染 *A. phagocytophilum* で発現している P44-47E と P44-60、および HL60 感染 *A. phagocytophilum* で発現している P44-18ES について、昆虫由来無細胞系インビトロ発現システムにより組換え蛋白質を作製し、これらの患者血清との反応性を調べた。その結果、IFA で THP-1 感染 *A. phagocytophilum* に反応性を示した血清はそのほとんどが P44-47E あるいは P44-60 (THP-1 で発現) に反応し、IFA で HL60 感染 *A. phagocytophilum* と反応した血清は P44-18ES (HL60 で発現) と結合することが明らかとなり、IFA の結果とほぼ一致した(図 2、表 1)。鹿児島県の患者の場合は、IFA および Western blotting のいずれも用いた抗原が古く、反応性が鈍かった可能性が考えられた。よって、新しい抗原を用いて、再度検査を行う予定である。

以上のように、作製した 3 種の rP44 蛋白質 (rP44-18ES、rP44-47E、rP44-60) は我が国のアナプラズマ症患者の血清診断に極めて

有効であることが明らかとなった。特に、昆虫系の発現系システムを用いたことにより、免疫反応の非特異反応が非常に抑えられたことが感度・精度ともに良好だったものと考えられる。ここで行った Western blotting は組換え蛋白質の精製は行っておらず、それでも結果は明瞭に得られている。しかし、課題もある。我々は *in vitro* 大量発現が可能なキットを用いているが、実際に大量発現を行うと非常にコストがかかる。もう一つは、この組換え蛋白質には Strep-tag を組み込んで蛋白質精製が可能なようにデザインしてありこれまで幾度となく工夫して組換え蛋白質の精製を試みたが、いまだに蛋白質精製に成功していない。原因としては、Strep-tag の結合が弱いことや P44 蛋白質が疎水性蛋白質であり可溶化が必要なことなどがあげられるが、はっきりした原因は不明である。過去の経験から、Urea で可溶化した組換え蛋白質は His-tag を用いることができることが判っている。しかし、His-tag はヒトの血清と非特異反応を引き起こす場合があるので、His-tag の使用は避けたいところである。

そこで、現在、我々はこれらの 3 種の rP44 蛋白質 (rP44-18ES、rP44-47E、rP44-60) において、患者血清が反応するエピトープのマッピングを考案中である。もし、これに成功すれば、合成ペプチドを抗原とした血清診断法の開発が可能となり、実用化が一段と加速するものと考ええる。

一方で、アナプラズマ症の血清診断では、抗原として利用できる国内の分離株が存在しないため、IFA による血清診断が困難であった。実際、IFA の血清診断には反応性が乏しい HL60 細胞に感染させた *A. phagocytophilum* 米国株を抗原として使用する以外に方法はなかった。しかし、我々の研究

で、THP-1 細胞に感染させた米国株を抗原として用いることが比較的有効であることが判明し、この得られた新たな知見は国内のアナプラズマ症の実態解明のために極めて重要と考える。

E. 結論

国内のアナプラズマ症の血清診断においては、ペア血清を用いて、THP-1 および HL60 感染細胞を抗原とした両方の IFA と 3 種の組換え蛋白質を利用した Western blotting の 2 種類の検査を行うことが確定診断として極めて有効である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wu D, Wuritu, Yoshikawa Y, Gaowa, Kawamori F, Ikegaya A, Ohtake M, Ohashi M, Shimada M, Takada A, Iwai K, Ohashi N.: Molecular and serological survey of *Rickettsiales* bacteria in wild sika deer (*Cervus nippon nippon*) in Shizuoka prefecture, Japan: High prevalence of *Anaplasma* species. *Jpn. J. Infect. Dis.* in press.
- 2) Gaowa, Yoshikawa Y, Ohashi N, Wu D, Kawamori F, Ikegaya A, Watanabe T, Saitoh K, Takechi D, Murakami Y, Shichi D, Aso K, Ando S.: *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in humans, Japan, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 20, 508-509 (2014)

2. 学会発表

- 1) 大橋典男: 日本国内の「アナプラズマ症」と血清診断について、厚生労働省健康局・結核感染症課/国立感染症研究所主催 希少感染症診断技術研修会(東京)2014年2月20日
- 2) Yoshikawa Y, Sugimoto K, Gaowa, Ohashi N.: Accommodation responses of *Anaplasma phagocytophilum* during the multiplication in the host cells, 第87回日本細菌学会総会(東京)2014年3月26-27日
- 3) 宮井莉奈, 高野愛, 川端寛樹, 大橋典男, 福井貴史, 岡本能弘, 増澤俊幸: 極東ロシアとモンゴル由来マダニの回帰熱ボレリアの保有率と遺伝系統解析, 第87回日本細菌学会総会(東京)2014年3月26-27日
- 4) 川森文彦, 大橋典男: わが国の新興アナプラズマ症, 衛生微生物技術協議会第35回研究会(東京)2014年6月26-27日
- 5) Ohashi N, Yoshikawa Y, Gaowa, Wuritu, Wu D, Kawamori F.: Tick-associated Anaplasmataceae pathogens in Japan., XIV International Congress of Acarology(京都)2014年7月18日
- 6) 大橋典男: 日本国内に潜在する新興感染症「アナプラズマ症」, 平成26年度中部地区獣医師大会・獣医学術中部地区学会特別公演(静岡)2014年8月31日
- 7) 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 小柳純子, 佐原啓二, 大橋典男: One-tube nested PCRによる *Orientia tsutugamushi* の検出, 第157回日本獣医学会学術集会(札幌)2014年9月9-12日
- 8) 高田歩, 佐々木彰央, 吉川悠子, 大橋典

男: 南アルプス産トガリネズミ2種に寄生するケモチダニ類の新たな知見, 2014年度日本ダニ学会(盛岡)2014年10月18日

9) 呉東興, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 川上万理, 岸本壽男, 森田裕司, 増澤俊幸, 安藤秀二, 大橋典男: *Anaplasma phagocytophilum*感染患者血清中に存在する抗体の検出法に関する検討, 第97回日本細菌学会関東支部総会(東京)2014年10月31日

10) 中堂園文子, 御供田睦代, 川森文彦, 大橋典男: Multiplex リアルタイムPCR 検査法について, 第21回リケッチア研究会 研究発表会(東京)2014年12月20日

11) 呉東興, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 川上万里, 岸本壽男, 森田裕司, 中堂園文子, 御供田睦代, 能勢裕久, 池田賢一, 増澤俊幸, 安藤秀二, 大橋典男: アナプラズマ症の特異抗体検出による患者探索の現状報告, 第21回リケッチア研究会 研究発表会(東京)2014年12月20日

12) 御供田睦代, 岩元由佳, 中堂園文子, 岩切忠文, 福盛順子, 藤田博己, 山本正悟, 角坂照貴, 高橋 守, 川端寛樹, 本田俊郎, 坂元修治, 蔵元 強, 北野智一, 矢野浩二, 藤田信子, 島崎裕子, 門馬直太, 安藤匡子, 高野 愛, 矢野泰弘, 糸川健太郎, 田原研司, 及川陽三郎, 川森文彦, 大橋典男, 高田伸弘, 安藤秀二: 薩南諸島のリケッチア症について, 第21回リケッチア研究会 研究発表会(東京)2014年12月21日

13) 池ヶ谷朝香, 小柳純子, 佐原啓二, 川森文彦, 大橋典男: 静岡県におけるつつが虫病の動向, 第21回リケッチア研究会 研究発表会(東京)2014年12月21日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

Table 1. IFA antibody titers to *A. phagocytophilum* in sera from 4 patients with unknown fever in Wakayama, Okayama, Nagano, and Kagoshima

Case-Patient No.	Day of blood collected	Antigen			
		<i>A. phagocytophilum</i> propagated in THP-1 cells (rP44 species)		<i>A. phagocytophilum</i> propagated in HL60 cells (rP44 species)	
		IgM	IgG	IgM	IgG
1 (Wakayama)	2012.01.13	80 (r47E, r60)	< 20	40 (r18ES)	< 20
	2013.06.11	< 20	40 (r60)	< 20	40 (r18ES)
2 (Okayama)	2013.06.20	< 20	80 (r60)	< 20	80 (r18ES)
	2001.09.13	320(r47E, r60)	80 (r60)	320(r18ES)	320(r18ES)
3 (Nagano)	2001.09.21	320(r47E, r60)	40 (r60)	320(r18ES)	320(r18ES)
	2014.08.23	20 (r47E, r60)	40	20	20
4 (Kagoshima)	2014.09.05	20 (r47E, r60)	40	20	40
	2014.09.19	20 (r47E, r60)	80	20	80

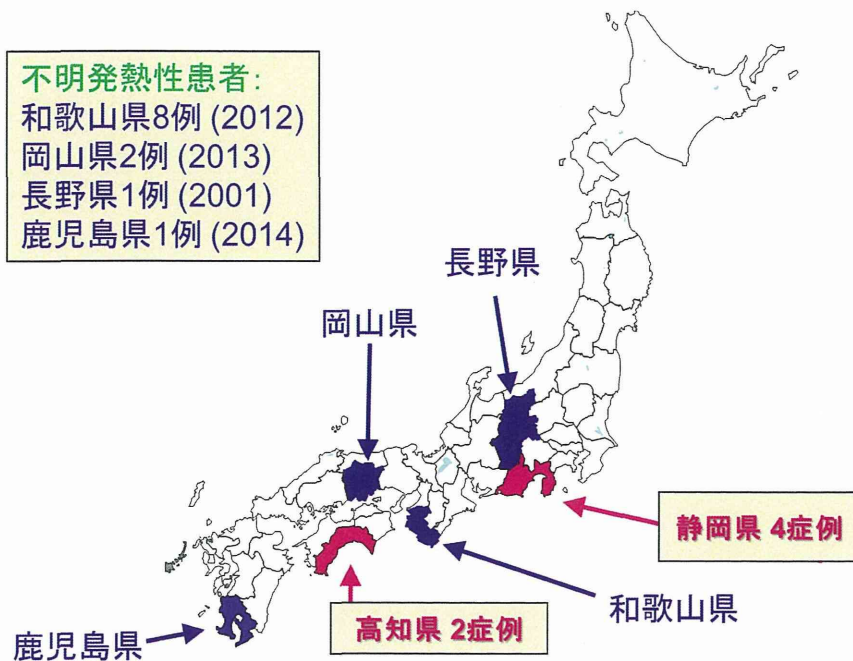


Fig. 1. Geographic representation of patients with unknown fever tested in Japan

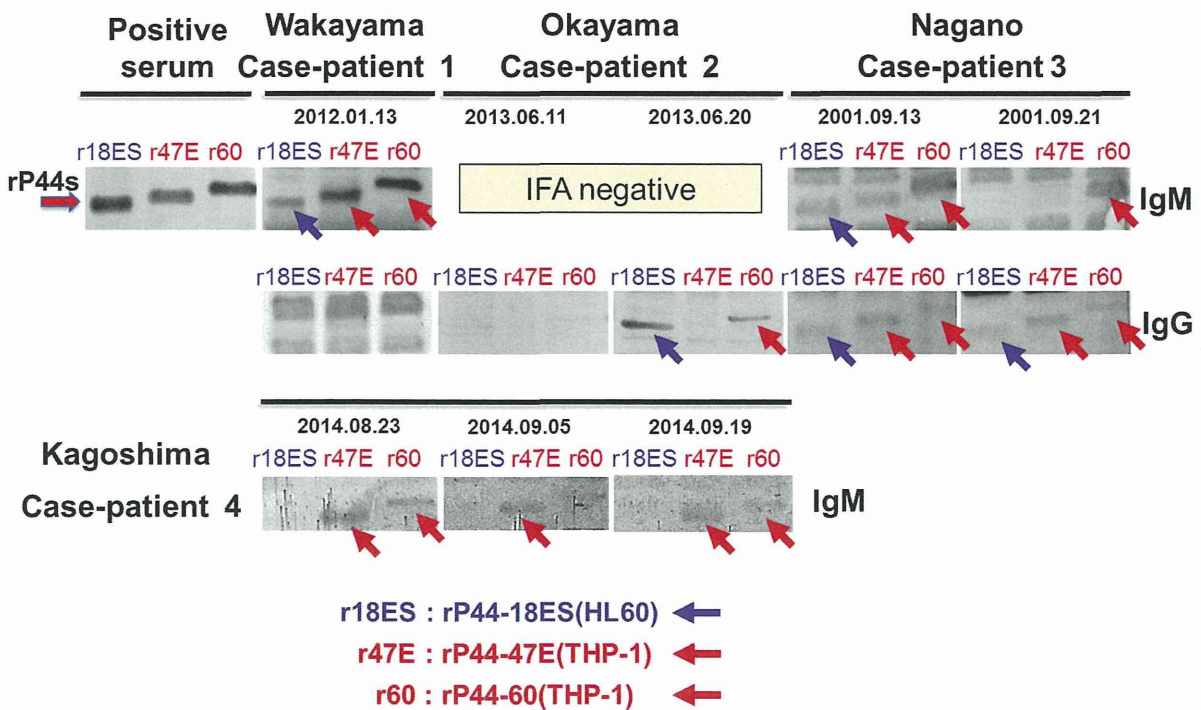


Fig. 2. Reactivity of 3 different P44 recombinant protein species (r18ES, r47E, or r60) with sera from 4 case-patients (Wakayama, Okayama, Nagano, Kagoshima) in western blot analysis

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究
分担研究報告書

リケッチア等の分離株に関するゲノム解析

研究分担者	林 哲也	宮崎大学 教授
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学 助教
	大岡 唯祐	宮崎大学 助教
	山本 正悟	宮崎大学 客員研究員
	北野 智一	宮崎県都城食肉衛生検査所 主任技師

研究要旨

本研究の目的は、国内に存在するリケッチア科細菌のゲノム解析とゲノム情報に基づいた臨床検体からの遺伝子検査法の確立・改良、およびそのためのレファレンスの整備である。本年度は昨年度に継続して ①日本紅斑熱リケッチア *Rickettsia japonica* (2株)、新興リケッチア *R. heilonjiangensis*、ダニ由来 *Rickettsia* sp. LON-type の全ゲノム配列の解析(アノテーションとゲノム比較)と②沖縄・池間島(近年初めてツツガムシ病患者が発生)のオリエンチア・ツツガムシ株の比較解析のための国内(本土)分離株の解析を進めるとともに、③日本各地で分離された *R. japonica* 株のゲノム解析を行った。その結果、上記のリケッチア 4 株の全ゲノム配列の最終決定と *R. japonica* (2株)のアノテーションとゲノム比較が終了した(*R. heilonjiangensis* と LON-type のアノテーションは進行中)。さらに、*R. japonica* に関しては、「上記の *R. japonica* 2 株間には、分離地域・分離年が全く異なるにも係わらず、5 つの SNP と 4 つの Indel のみの違いしか存在しない」という昨年度の結果を受けて、12 株の患者・ダニ由来株のゲノム配列(完全長または 1 ギャップ)を新たに取得し、比較解析を行った。その結果、1 株のダニ由来株以外の菌株間では、いずれも数個の SNP のみが検出された。現在、さらに 24 株のゲノム解析が進行中であるが、本菌は遺伝的に極めて均一であり、その株識別には全ゲノムレベルでの SNP 解析が必要であることが明確になった。LON-type についても、*R. japonica* との比較という観点から、10 株のゲノム解析が進行中である。池間島オリエンチア株の解析に関しては、池間島に棲息する菌株が本土で分離される菌株とは異なる系統に属し、台湾や東南アジアの菌株に近い系統であることを明確にするために、本土株の MLSA 解析を追加実施し、現在論文作成中である。

A. 研究目的

偏性細胞内寄生菌であるリケッチア科細菌の分離には高度な技術が必要であり、時間もかかることから、ゲノム情報に基づいた臨床検体からの新たな遺伝子検査法(迅速診断・疫学あるいは発生動向モニタリングのための菌株タイピング)の確立や既存の検査法の改良が必要である。そのため、我々のグループは、国内に存在するリケッチア科細菌のゲノム解析を行い、ゲノム情報に基づいて臨床検体からの遺伝子検査法の確立・改良を行うこと、また、そのためのレファレンス(バイオリソースと情報リソース・ゲノム情報基盤)を整備することを目的として研究を進めた。主な研究対象は、日本紅斑熱リケッチア *R. japonica*、*R. heilonjiangensis*、*Rickettsia* sp. LON-type、*Orientia tsutsugamushi* である。

R. japonica (以下、RJ) は、我が国における主要な病原リケッチアである。一方、*R. heilonjiangensis* (以下、RH) は近年国内にも存在することが明らかとなった新興リケッチアで、平成 20 年に宮城県仙台市において、本菌による紅斑熱群リケッチア症患者が国内で初めて確認された。その後、イスカチマダニが本菌を保有することが明らかになり、宮城県以外の地域においても本菌によるリケッチア症が存在する可能性が示唆されている。一方、フタトゲチマダニが保有する LON-type のリケッチア(以下、LON) は哺乳動物に対して病原性を示さないが、RJ と遺伝学的に非常に近縁であることが示唆されている。しかし、その分類学的な地位は確定していない。したがって、これらのリケッチア菌種のゲノム配列を決定し、3 菌種間の正確な進化系統関係を説明するとともに、RJ や RH の病原性に関与する遺伝学特性や菌種あるいは菌株識別に有

用な遺伝子マーカーを同定することは重要な研究課題である。

一方、ツツガムシ病病原体である *Orientia tsutsugamushi* (以下、OT) に関しては、これまで沖縄では患者の報告がなかったが、2008 年に宮古島市池間島において沖縄県初となるツツガムシ病が確認された。その後の野外調査から、ベクター種として疑われる *Leptotrombidium deliense* の浸潤およびオリエンチアを保有するネズミの分布と患者の発生との間に関連があることが示唆された。また、*L. deliense* は日本本土とは異なるベクター種で、東南アジアにおけるオリエンチアの主要ベクターであることから、池間島におけるツツガムシ病の感染環が注目された。しかし、池間島という限定的な地域において *L. deliense* が単一のベクター種として強く疑われたにも関わらず、患者や野外調査で捕獲したネズミから検出されたオリエンチアの主要外膜抗原蛋白質 56KDa Type specific antigen (TSA) 遺伝子の配列には、3タイプが同定され、予想外の多様性を示した。さらに、本研究の先行研究において 11 種類の house-keeping 遺伝子の配列を用いたオリエンチアの MLS (Multi locus sequence) 解析法を確立し、池間島の野外調査において分離された菌株の進化系統解析を行った結果、池間島に棲息するオリエンチア菌株は本州で分離される主要系統とは異なる系統に属する可能性が示唆された。したがって、本菌の伝播・生息域の拡大を理解する上で、池間島のオリエンチア菌株の由来や伝播経路等を明らかにすることが重要であり、池間島のオリエンチア菌株の進化系統解析を進めることとした。

昨年度までに、①2株の RJ (YH 株と

MZ08014 株)、RH (Sendai-29 株)、LON (LON-90 株)の全ゲノム配列の決定と決定したゲノム配列を用いた近縁リケッチア間でのゲノム比較、②沖縄・池間島でのフィールド調査で分離された OT 株の進化系統解析を行った。本年度は、昨年度に引き続き、①上記の RJ (2株)、RH (1株)、LON (1株) の全ゲノム配列の解析(アノテーションとゲノム比較)を進めるとともに、②日本各地で分離された RJ 株のゲノム解析をおこなった。また、OT に関しては、③沖縄・池間島の OT 株の比較解析のための本土で分離された OT 株の MLSA 解析を追加実施した。

B. 研究方法

①RJ (YH 株と MZ08014 株)、RH (Sendai-29 株)、LON (LON-90 株)のゲノム解析:

YH 株は 1984 年に徳島で分離され、本菌種の代表株として使われている菌株である。MZ08014 株は 2008 年に宮崎県で分離された死亡患者由来株である。Sendai-29 株と LON-90 株はいずれも大原総合病院附属大原研究所の藤田博己博士より分与を受けた。

4 株の全ゲノム配列の解析(遺伝子の同定とアノテーション)には主に IMC プログラムを用いた。菌株間での配列多型解析 [SNP (single nucleotide polymorphism)と InDel (挿入・脱落)の同定]は Mummur プログラムを用いて行った。RH の菌種内比較解析には、2011 年末に報告された RH 中国株のゲノム配列を使用した。

②日本各地で分離された RJ 株のゲノム解析:

本事業に参加している研究者の協力を得て、菌株あるいはゲノム DNA の収集を行い、イルミナ Miseq を用いたドラフトゲノム配列決定を

行った。完全配列取得のためのフィニッシング作業は、PCR 産物の direct sequencing あるいは PCR 産物の random shotgun sequencing により行った。一部の菌株については、PacBio シーケンサによる解析を追加した。

③OT の解析:

解析のメインターゲットである池間島 OT 株は、福井大学・高田博士、国立感染症研究所・安藤博士、大原総合病院附属大原研究所・藤田博士および本研究グループの山本・北野らによって、2010～2011 年にかけて実施された野外調査で得られた分離株である(クマネズミ由来 11 株、ドブネズミ由来 2 株、*L. deliense* 由来 1 株の計 14 株)。以前に収集済みの本土分離菌株を L 細胞を用いて培養し、培養できた菌株から順次 DNA を調整した。DNA の調整および 11 種類の house-keeping 遺伝子の内部領域を用いた OT における Multi locus sequencing analysis (MLSA) は、初年度の報告書に記載した方法によって実施した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は、「宮崎大学病原体等安全管理規定」および「宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に則り、必要に応じて宮崎大学の病原体等安全管理委員会および遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を受けた後に実施した。

C. 結果および D. 考察

①RJ (YH 株と MZ08014 株)、RH (Sendai-29 株)、LON (LON-90 株)のゲノム解析:

昨年(2011)の報告書に記載したように、RJ の YH

株と MZ08014 株の環状染色体のサイズは、1,284,030 bp および 1,284,046 bp であり、いずれにもプラスミドは存在しない。また、蛋白質コード遺伝子は、それぞれ 1285 および 1284 個存在し、tRNA 遺伝子は両株ともに 33 個、rRNA 遺伝子も両株ともに 1 セット同定された。さらに詳細なゲノム比較により、2 株間には、rOmpA 遺伝子を除くと、わずか 5 箇所の SNPs と 3 箇所の small InDel(1bp-InDel が 2 箇所、9 bp-InDel が 1 箇所)のみであった。主要外膜蛋白質(主要抗原)をコードする rOmpA 遺伝子に関しては、2 種類の遺伝子内 repeat 配列の繰り返し数の違いと 216 bp の InDel が存在することが示唆されていたが、PacBio による解析の結果等から、MZ08014 株の配列が間違っている可能性が示唆されたため現在再確認を行っている。rOmpA 遺伝子に関しても、両株が同一の配列を有する可能性が高い。

RH Sendai-29 株の環状染色体は 1,279,159 bp であり、プラスミドは存在しない。アノテーションは完全に終了していないが、中国株(054 株)の染色体(1,278,471 bp)との DNA 配列比較では、78 SNPs と 10 の small InDel が検出されている。従って、両株の類似性は非常に高いものの、RJ 株間ほどのレベルではない。

LON-90 株の環状染色体 1,325,627 bp であり、やはりプラスミドが存在しない(アノテーションは未完了)。

なお、RJ、RH、LON と他の既にゲノムが決定されている 16 菌種のリケッチア属細菌との比較ゲノム解析(リケッチア内での進化遺伝学的地位の解析)については、昨年度までの報告書に記載しているため詳細は割愛するが、紅斑熱群リケッチアは、今回解析した RJ など

を含め、ほぼ 1.3 MB 前後と極めて類似したゲノムサイズをもつこと、average nucleotide identity (ANI) が 95%以上であり、一般的には同一菌種のレベルであることが明らかになっている。なお、RJ と RH の間での菌種特異的配列の解析、他のリケッチア属細菌に対する RJ 特異的配列の同定作業は、RH のアノテーション終了を待って実施することとし、予備的な解析のみを行ったため、その詳細は割愛するが、数十の *R. japonica* 特異的配列の存在が検出されており、これらは本菌の迅速検出・迅速識別のための遺伝子検査法の開発に利用できると考えられる。

②日本各地で分離された RJ 株のゲノム解析:

①の解析で、RJ 集団の驚くべき遺伝的均一性(多様性の低さ)が示唆されたため、本事業に参加している研究者の協力を得て、日本各地で分離された菌株あるいはゲノム DNA を収集し、ゲノム配列決定を行った。12 株のゲノム配列を取得し(一部は、現在ドラフト配列)、YH 株と MZ08014 株との比較を行った結果、1 株のダニ由来株以外の菌株間では、いずれも数個の SNP と InDel のみの違いしか存在しないことが判明した(rOmpA 遺伝子を含む: 図参照)。現在、24 株のゲノム解析を進めている途中である。これらの nation-wide な RJ の大規模ゲノム比較とゲノムレベルでの高精度系統解析により、RJ の驚くべき遺伝的均一性が最終確認できるものと期待される。また、RJ との比較という観点から、LON に関しても、10 株のゲノム比較解析およびゲノムレベルでの高精度系統解析を行うため、現在ゲノム配列の取得を進めている。

③OT の解析:

昨年度までの解析で、池間島の OT 分離株