

厚生労働科学研究費補助金 [新興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)]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

輸入回帰熱の診断法確立と標準化

研究分担者 川端寛樹 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 高野 愛 (山口大学 共同獣医学部)

研究協力者 佐藤 梢 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究要旨：回帰熱はアフリカ、中近東、中央アジアで流行するダニ媒介性感染症であり、特にアフリカではマラリアと誤診断されるケースが報告されている。そこで本研究では、新規の回帰熱の抗体検査抗原を開発に着手した。本研究では、輸入例における抗体検査法ならびに、ライム病、新興回帰熱との鑑別法も確立することを目標としている。

A. 研究目的

回帰熱はライム病群ボレリアとは異なる 1 群のボレリア属細菌による感染症で、アフリカ諸国での感染例が最も多く、北米や南欧、中近東、中央アジアなどでも感染例が報告されている。これら地域内では、散発的、もしくは集発的な感染が報告され、かつ死亡例も散見される。回帰熱には、ヒメダニが媒介する種類とシラミによって媒介されるものがあるが、現在上記地域で流行しているもののほとんどがヒメダニ媒介性回帰熱である。バルトネラ属細菌感染症の塹壕熱やリケッチア属細菌感染症である発疹チフス同様、シラミによって媒介される回帰熱は、戦争等により衛生状況が悪化し、シラミ寄生が蔓延した場合に流行する。第一次世界大戦中、兵士や避難民の間で回帰熱が流行し、

1919 年から 1923 年の間におよそ 500 万人の患者が亡くなったと推計されている。ダニ媒介性の回帰熱は 2 つに大別される。1 つは旧来から知られているヒメダニ媒介性回帰熱(古典的回帰熱の一部) で、抗菌薬による治療を行わない場合、その致死率はヒメダニ媒介性回帰熱では 2-5% とされている (シラミ媒介性回帰熱では 4-40% とされている)。もう一つは、2011 年に初めて報告された *Borrelia miyamotoi* 感染による新興回帰熱である。*B. miyamotoi* は 1995 年に我が国で発見・同定されたボレリアで、発見当時はその病原性は不明であったが、2011 年のロシアでの感染例を皮切りに、アメリカ、オランダ、日本で患者が報告された。本ボレリア感染症の全容は未だ不明であるが、*Ixodes* 属マダニが病原体を伝播すると考えられている。

我が国では2010年、2012年に中央アジア、アフリカからの「古典的回帰熱」の輸入例が報告されるとともに、新興回帰熱の国内感染例が2013年に報告され、急速に未自家な感染症となりつつある。一方、古典的回帰熱、新興回帰熱の抗体検査用として確立された抗原として glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) があるが、必ずしも検査感度は高い訳ではないことから、新規の診断抗原開発が急務とされてきた。

そこで本研究では、回帰熱ボレリアに特異的な抗原を組換え体として作成し検査用抗原としての可否を評価するとともに、古典的回帰熱と新興回帰熱の鑑別法を確立することを最終目的とし、以下研究を開始した。

B. 研究方法

1) 比較ゲノム解析による回帰熱ボレリア特異的遺伝子の検索

Draft genome 配列として公開されている回帰熱群ボレリアの一種 *Borrelia miyamotoi* FR64b ゲノム配列 (ゲノムサイズ:1.38Mb, Accession 番号: CP004217-CP004266, 変更修正日:2014/10/01)の内、ボレリア種間で variation が多いプラスミド性配列と推測される 48 contig (CP004218- CP004266)に含まれる 649 orfs の各々について、BLASTP 解析を行った。BLASTP 解析はライム病群ボレリアの3種 {*Borrelia burgdorferi* B31 (taxid:224326)、*Borrelia garinii* PBi (taxid:290434)、および *Borrelia afzelii* PKo (taxid:390236)} ならびに回帰熱群ボレリア3種 {*Borrelia turicatae* 91E135 (taxid:314724)、*Borrelia recurrentis* A1

(taxid:412418)、および *Borrelia duttonii* (taxid:40834)}のゲノム配列を参照して実施し、相同性の有無を Cutoff E-value:1e-5 で判定した。

2) 抽出された候補遺伝子群の特性解析

抽出された候補遺伝子群について、そのアミノ酸配列から、各々の1)シグナル配列の有無、2)Lipoprotein である可能性の予測、ならびに3)膜貫入ドメインの有無に関する予測を行い、候補抗原の性質について計算・予測を行った。またこれに先立ち、ボレリア属細菌の抗原で、その Localization が明らかな 28 抗原(膜タンパク質、ペリプラズマ抗原、ならびに細胞質タンパク質)について同様の計算を行い、予測の正確性について検証を行った。これら解析は CBS prediction server (www.cbs.dtu.dk) を用いて行った。

3) 抽出された候補遺伝子群のパラログ解析

抽出された遺伝子について、各々 Position-Specific Iterated-BLAST(PSI-BLAST)により「Coverage (>80%) および Identical (>80%)」条件下で *B. miyamotoi* FR64b(taxid:1292392) genome 内に配列が見つかったものをパラログとした。

4)候補遺伝子の大家菌を用いたクローニング
候補遺伝子から必要に応じて5'末端側の推定シグナル配列を除いた配列を、*Borrelia miyamotoi* FR64b 株 DNA を鋳型とし、KOD-FX Neo (TOYOBO)を用い PCR で増幅した。PCR 産物の精製には HighPure PCR product purification kit(Roche)を用いた。精製した PCR 産物は T4 DNA polymerase 処理により5'突出末端を形成させた後、pET46 Ek/Lic ベクター (Novagen)とアニーリングさせた。本ベクター

での組換えタンパク質はその N 末端に 6XHis が付加されるよう設計した。クローニングした遺伝子の発現には大腸菌 Rossetta (DE3) pLys 株を用いた。以上の組換え DNA 実験は、国立感染症研究所 組換え DNA 実験安全委員会により承認を受けて行われた(承認番号:機 26-83)。

4)組換え抗原の発現

大腸菌での組換え抗原発現を見るため、形質転換を行った大腸菌を LB 培地もしくは SOB 培地で 37℃、一晚震盪培養した後、培養液を MagicMedia (Lifetechnologie)へ 1/100 接種し、20℃もしくは 28-30℃で 36-46時間震盪培養を行った。培養液は、2XSDS-PAGE buffer と等量混和後、SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルは常法に従い PVDF 膜(Bio-Rad)へ転写した。一次抗体には Anti-His monoclonal 抗体(BDL)、二次抗体には HRP ラベルされた Anti-mouse IgG(KPL)を用い、HRP の検出には ECL prime kit(GE Healthcare)を用いた。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

1) In silico 解析

BLASTP 解析により全 649 orfs は、回帰熱群ボレリア間で保存される 45 orfs、*B. miyamotoi* FR64b 株に特異的な 34 orfs、Variable membrane protein (VMP) 遺伝子群 64 orfs、ならびに *Borrelia* 属で保存されている 506 orfs に分けられた(表 1)。これら各群から paralog family を PSI-BLAST により検索し、それぞれの中から代表的な 1 orf を組換え抗原作製候補として選

定した(表 1、表 2)。また、*Borrelia* 属で保存されている 506orfs 中、推定される homolog に対して相同性が低い 12orfs 中、paralog を除いた 7orfs も候補に加えた(表 1)。

ボレリア属細菌の既知抗原を用いた細胞内局在を SignalP 4.0/LipoP 1.0/TMHMN 2.0 protocol によって推定した場合、SignalP 4.0/LipoP 1.0 protocol により、細胞質抗原と膜抗原/ペリプラズム抗原間には、SignalP による D 値および SpI/SpII サイトの有無により高確度で判別可能である(data not shown)。本研究で候補に選定した 59orfs の内 26orfs は膜抗原/ペリプラズム抗原と推定された(表 2)。

2)各 59orfs の組換え抗原の大腸菌による発現成績

試験に供した 59orfs 中、3orfs(BOM 1320, BOM 1183, BOM 1515)を除き、大腸菌の形質転換株が得られた。これら各々の orf 形質転換株について、anti-His 抗体を用いた Immunoblot 法によりいずれかの条件で組換え抗原の発現が見られた株は 44orf を保持する大腸菌株であった(表 3)。

D. 考察

ボレリア属細菌は大腸菌等で血清型決定基となるような LPS を持たないこと、また鞭毛抗原遺伝子は高度に保存されていること等からこれらをもとにした血清型による型別や感染病原体種の血清学的同定が不可能である。これらのことから、いずれのボレリア感染症においても抗体検査によってその感染種の同定は困難とされてきた。しかしながら、ゲノム解析技術の向上により、回帰熱群特異的抗原や新興

回帰熱群特異的抗原が in silica 解析で抽出できるようになってきた。本研究で候補として選定した 59orfs の内、44 orfs (74.5%)が大腸菌を用いて単離・発現させることができた。今後、これら組換え抗原を用いて、まず、回帰熱群ボレリア、新興回帰熱ボレリア、ライム病群ボレリアを感染させたマウス血清を用い、抗体が誘導される抗原の選定・絞り込みを行う。次いで海外研究機関と連携し、絞り込まれた抗原の感度、特異性を検討する予定である。

E. 結論

海外から輸入される回帰熱について、ゲノム情報を活用した新規抗体検査系確立のための基礎的情報を提供した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Medical Entomology and Zoology*. 65(1): 13-21, 2014.
- 2) Oda S, Kabeya H, Sato S, Shimonagane A, Inoue K, Hayashidani H, Takada N, Fujita H, Kawabata H, Maruyama S. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 in

from *Apodemus* mice in Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 51(1): 260-264, 2015.

2.学会発表

- 1) 藤田信子, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 川端寛樹. 四国型恙虫病の媒介種トサツガムシの現況 (予報). 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 2) 川端寛樹. 新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の病原性解析. 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 3) 梶田弘子, 岩淵香織, 高橋雅輝, 佐藤直人, 山内貴義, 斎藤幸一, 高野愛, 川端寛樹, 宇田晶彦, 森川茂. 岩手県におけるマダニの生息調査および病原体保有状況. 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 大場真己, 大松勉, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 片山幸枝, 古谷哲也, 長井誠, 水谷哲也. コウモリマルヒメダニから分離され

- た新規ブニヤウイルスについて．第 157 回
日本獣医学会学術集会．札幌, (2014.9)
- 7) 川端寛樹 .ダニ媒介性細菌感染症の疫学および診断法 第 157 回日本獣医学会学術集会．
札幌, (2014.9)
- 8) 川端寛樹 ,高野愛 ,大西真 .後向きサーベイ
ランスにより明らかとなった新興回帰熱の
2 例．第 88 回日本感染症学会学術講演会．
福岡, (2014.6)
- 9) 岡恵子 , 川端寛樹 .スウェーデンで *Borrelia*
保有のマダニに咬着された 2 例．第 30 回臨
床皮膚科医会総会．横浜, (2014.4)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし．
3. その他
なし．

表3. 大腸菌を用いた、Anti His-Tag 抗体による各々の組換え抗原発現の有無.

No.	30M N .	試験条件			いずれかの条件で発現が 見られたもの
		20 , 36hrs	30 , 36hrs	28-30 , 46hrs	
1	885	+	+	+	+
2	947	+	+	-	+
3	1172	-	-	-	
4	1280	-	-	+	+
5	1284	-	-	+	+
6	1341	+	+	+	+
7	1367	-	-	-	
8	1374	-	-	+	+
9	1378	+	+	+	+
10	1381	+	+	-	+
11	1440	+	+	+	+
12	1441	+	+	+	+
13	1092	+	+	+	+
14	1167	-	-	-	
15	1197	-	-	+	+
16	1218	-	-	-	
17	1226	-	-	+	+
18	1232	+	+	+	+
19	1318	+	+	+	+
20	1320	/	/	/	/
21	1385	+	+	+	+
22	1394	+	+	+	+
23	1470	+	+	+	+
<hr/>					
1	886	-	-	-	
2	889	-	-	+	+
3	891	+	+	+	+
4	892	+	+	-	+
5	896	+	+	+	+
6	897	+	+	+	+
7	899	+	+	+	+
8	900	+	+	+	+
9	902	+	+	-	+
10	903	+	+	+	+
11	911	+	+	+	+
12	930	-	-	-	
13	931	+	+	+	+
14	932	-	-	+	+
15	934	+	+	+	+
16	937	-	-	+	+
17	1029	-	-	-	
18	1071	-	-	-	
19	1134	+	+	+	+
20	1137	+	+	+	+
21	1183	/	/	/	/
22	1195	-	-	+	+
23	1323	+	+	+	+
24	1377	+	+	+	+
25	1379	+	+	-	+
26	1399	+	+	+	+
27	1486	-	-	-	
28	1065	-	-	-	
29	1515	/	/	/	/
<hr/>					
1	1038	+	+	+	+
2	1147	+	+	+	+
3	1148	+	+	+	+
4	1149	+	+	+	+
5	1382	-	-	+	+
6	1383	+	+	+	+
7	1384	-	-	-	

BOM 1320, BOM 1183 および BOM1515 の各 orf は大腸菌を用いて単離出来なかった。

表 2 . 本研究で組換え抗原を作製した *Borrelia miyamotoi* 由来 orfs と各種 In silico 解析結果

No.	3OM No.	Annotation	BLASTP	PSI-BLAST B.miyamotoi FR64b (txid:1292392) Independency [Coverage (>80%) & Identical (>80%)]	SignalP 4.1	LipoP 1.0		
20	1	885	Hypothetical protein	M23 peptidase domain-containing protein	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.256)	-
30	2	947	Hypothetical protein	holin [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.110)	-
38	3	1172	Hypothetical protein	Single-strand DNA binding protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	969 (969,1172,1307,1340)	- (0.086)	-
44	4	1280	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01449 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.220)	SpII
45	5	1284	Hypothetical protein	Smf protein [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.087)	-
46	6	1341	Hypothetical protein	DNA gyrase subunit A [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	1341 (970,1171,1341)	- (0.208)	-
47	7	1367	Hypothetical protein	BppA [Borrelia duttonii]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.185)	-
16	8	1374	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01449 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.287)	SpII
49	9	1378	Hypothetical protein	putative lipoprotein [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.145)	-
51	10	1381	Hypothetical protein	adenine specific DNA methyltransferase [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.107)	-
57	11	1440	Hypothetical protein	oligoendopeptidase F [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.219)	SpII
18	12	1441	Hypothetical protein	hypothetical protein BAPKO_3547 [Borrelia afzelii PKo]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	1441(1198,1199, 1285, 1441)	+ (0.526)	SpII
9	13	1092	Fibronectin-binding lipoprotein	antigenic protein P35 [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	1092 (1516,1517,1092)	+ (0.538)	SpII
37	14	1167	Mlp lipoprotein family protein	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.332)	SpII
41	15	1197	Mlp lipoprotein family protein	protein MlpJ [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.279)	-
42	16	1218	Mlp lipoprotein family protein	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.366)	-
12	17	1226	Congo red-binding lipoprotein NlpH	Mlp lipoprotein family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.299)	-
43	18	1232	Mlp lipoprotein family protein	MlpJ protein [Borrelia duttonii]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.325)	SpII
13	19	1318	Hypothetical protein	antigen P35-like protein [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.376)	SpI
14	20	1320	Hypothetical protein	Mlp lipoprotein family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.279)	SpII
55	21	1385	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	+ (0.545)	SpII
17	22	1394	Fibronectin-binding lipoprotein	hypothetical protein BDCR2A_01902 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	1394 (1375,1394)	+ (0.538)	SpII
58	23	1470	Putative cytosolic protein	immunogenic protein P37 [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.256)	SpII
21	1	886	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA011 [Borrelia turicatae]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.377)	SpII
22	2	889	Hypothetical protein	hypothetical protein BRE_1030 [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.162)	-
1	3	891	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01136 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.189)	SpII
23	4	892	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]1	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.124)	-
2	5	896	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA034 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.403)	SpII
3	6	897	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA035 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.274)	SpII
24	7	899	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.229)	SpII
4	8	900	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA044 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.861)	SpII
25	9	902	Hypothetical protein	putative lipoprotein [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.135)	-

26	10	903	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	ribonucleoside reductase beta subunit [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.104)	-
5	11	911	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA055 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.636)	SpII
27	12	930	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA073 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.203)	-
28	13	931	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA073 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.298)	-
6	14	932	Hypothetical protein	immunogenic protein A [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	932 (932,933)	+ (0.487)	SpII
60	15	933	Hypothetical protein	immunogenic protein A [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	932 (932,933)	+ (0.485)	SpII
29	16	934	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA092 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.264)	-
7	17	937	Hypothetical protein	arthropod-associated lipoprotein [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.711)	SpII
31	18	1029	BDR-repeat family protein	BDR-repeat family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	1029 (1403,1029,1164,978,1220)	- (0.110)	-
8	19	1071	Hypothetical protein	membrane protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.291)	-
10	20	1134	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01220 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.562)	SpII
11	21	1137	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	1137(1137,1472)	- (0.287)	SpII
39	22	1183	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01356 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	1183 (960, 1017,1140, 1183)	- (0.137)	-
40	23	1195	BDR-repeat family protein	bdr proitein [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	1195 (1195, 1510,1512, 1461)	- (0.101)	-
15	24	1323	Congo red-binding lipoprotein NlpH	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.313)	SpII
48	25	1377	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA111 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.123)	-
50	26	1379	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.111)	-
56	27	1399	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia persica]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.404)	SpII
59	28	1486	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	1486 (1395, 1466, 1486, 1505)	- (0.085)	-
33	29	1065	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific. Low similarity was found in LD group	Independent	- (0.290)	-
19	30	1515	Antigen P35	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific. Low similarity was found in LD group	1515 (1093, 1515)	-(0.307)	SpII
32	1	1038	BDR-repeat family protein	hypothetical protein BAPKO_2516 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.119)	-
34	2	1147	Hypothetical protein	hypothetical protein BB_Q23 [Borrelia burgdorferi B31]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	1147 (953, 1147, 1420)	- (0.138)	-
35	3	1148	Hypothetical protein	hypothetical protein BB_Q22 [Borrelia burgdorferi B31]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	1148 (952,1148,1419)	- (0.110)	-
36	4	1149	Hypothetical protein	hypothetical protein BafPKo_Q0007 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	1149 (1149, 1418)	- (0.098)	-
52	5	1382	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BafPKo_Q0015 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.116)	-
53	6	1383	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BAPKO_3518 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.107)	-
54	7	1384	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BafPKo_Q0015 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.138)	-

