

コウモリを自然宿主とする *Bartonella* 属菌の分子生態学的研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

鍋島 圭

2020

目次

第1章 序論.....	6
第2章 わが国のコウモリにおける <i>Bartonella</i> 属菌の分布とその宿主特異性の検討..	17
2.1 はじめに	18
2.2 材料および方法	20
2.2.1 採材地域及び検査材料	
2.2.2 血液からの <i>Bartonella</i> 属菌の分離培養法および分離株の保存法	
2.2.3 分離株からの DNA 抽出法	
2.2.4 PCR による分離株の <i>gltA</i> および <i>rpoB</i> 領域の検出法	
2.2.5 PCR 産物の確認法	
2.2.6 PCR 産物の精製法	
2.2.7 分離株の塩基配列の決定法	
2.2.8 <i>gltA</i> 領域の塩基配列データの解析法	

2.2.9	<i>gltA</i> 領域の塩基配列に基づく系統解析法	
2.3	成績	29
2.3.1	わが国のコウモリにおける <i>Bartonella</i> 属菌の保菌状況	
2.3.2	コウモリ分離株の遺伝子型別および相同性解析	
2.3.3	<i>gltA</i> 領域の塩基配列に基づくコウモリ分離株の系統解析	
2.4	考察	35
2.5	小括	40
2.6	第 2 章で使用した試薬類の組成	42
第 3 章	コウモリ間で <i>Bartonella</i> を媒介するベクターの検討.....	44
3.1	はじめに	45
3.2	材料および方法	46
3.2.1	検査材料	
3.2.2	コウモリの吸血性節足動物種の同定法	
3.2.3	吸血性節足動物からの Total DNA の抽出法	
3.2.4	吸血性節足動物種の分子生物学的同定法	

3.2.5 吸血性節足動物からの <i>Bartonella</i> DNA の検出	
3.2.6 吸血性節足動物からの <i>Bartonella</i> の分離培養法	
3.2.7 吸血性節足動物由来 <i>Bartonella</i> の遺伝子型別法	
3.2.8 吸血性節足動物由来 <i>Bartonella</i> の系統解析法	
3.3 成績	55
3.3.1 吸血性節足動物種の同定	
3.3.2 吸血性節足動物からの <i>Bartonella</i> の検出状況	
3.3.3 吸血性節足動物由来 <i>Bartonella</i> の遺伝子型別	
3.3.4 吸血性節足動物由来 <i>Bartonella</i> の <i>gltA</i> 配列に基づく系統解析	
3.4 考察	68
3.5 小括	73
3.6 第3章で使用した試薬類の組成	76
第4章 コウモリ由来 <i>Bartonella</i> の全ゲノム解析による病原因子と宿主における感染機 序の解明	78
4.1 はじめに	79

4.2 材料および方法	82
4.2.1 検査材料	
4.2.2 分離株からの DNA 抽出	
4.2.3 Nanopore MinION によるシーケンシング	
4.2.4 MiSeq システムによるシーケンシング	
4.2.5 コウモリ由来株の参照配列の作成	
4.2.6 ドラフトゲノム配列の作成	
4.2.7 遺伝子のアノテーションおよび病原関連遺伝子の探索	
4.2.8 完全長ゲノム配列の決定	
4.3 成績	94
4.3.1 ドラフトゲノム配列の評価	
4.3.2 コウモリ由来株の病原関連遺伝子の保有状況	
4.3.3 EN2-1 株の完全長ゲノムの決定と T4SS 構造遺伝子の座位	
4.4 考察	105
4.5 小括	110
第 5 章 総括	112

謝辞.....	121
引用文献.....	122
業績一覽.....	133
受賞一覽.....	135

第 1 章

序論

わが国には多様な野生動物が生息しており、哺乳類の数は外来種を含め 170 種に達する (Ohdachi et al., 2009)。このうちコウモリ目は少なくとも 2 種のオオコウモリと 33 種の食虫性のココウモリが存在しており、げっ歯類の 26 種を抑えて国内で最も多様な種を構築している (松江ら., 2006)。世界的にみると、約 1,000 種のコウモリが極地や高地を除くすべての地域に分布している (Thomas et al., 2005)。コウモリは系統分類学的にはローラシア獣上目、翼手目に分類される哺乳類で、その進化系統に関しては不明な点が多い。これまで形態学的にオオコウモリとココウモリに分類されていたが、近年、分子生物学的分類に基づき、Yangochiroptera 亜目と Yinpterochiroptera 亜目に再分類された。Yangochiroptera 亜目には従来の 14 科のココウモリが、Yinpterochiroptera 亜目にはアラコウモリ科、オナガコウモリ科、カグラコウモリ科、キクガシラコウモリ科、ブタバナコウモリ科、およびすべてのオオコウモリ科が分類された (Springer et al., 2001)。すべてのオオコウモリは食果性であるが、ココウモリの食性は非常に多様で、食虫性、食肉性 (吸血性)、魚食性、食果性、蜜食性の種が存在する。オオコウモリは主に視覚に頼った行動様式をとっているが、その他の多くのココウモリはエコーロケーションを利用して行動している。また、コウモリの生息環境も極めて多様で、樹洞や葉の裏、洞窟、樹上などの自然物や廃隧道、排水路、家屋などの人工物を利用している場合もある (Thomas et al., 2005)。

コウモリは各種新興・再興感染症の病原巣あるいは感染源として重要な役割を担っており、ヘンドラウイルス感染症、ニパウイルス感染症や狂犬病、重症急性呼吸器

症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS)、エボラ出血熱などの人に対する病原性が極めて高いウイルス性感染症の病原体を保有していることが明らかにされている (Letko et al., 2020)。また、コウモリは種々の食中毒菌の他に、*Leptospira*、*Borrelia* などの病原性細菌を保有していることが報告されているものの、その情報量はウイルスに比較すると極めて少ない (Mühldorfer K., 2013; Sun et al., 2020)。コウモリからヒトへ病原体が伝播する経路には、家畜などの増幅動物を介して感染する例、コウモリの咬傷や体液に接触して感染する例、あるいはコウモリに寄生している節足動物などのベクターによって媒介され感染する例等が知られている (Melaun et al., 2014)。コウモリの多くは森林や洞窟に生息しているが、一部のコウモリ種 (*Preropus* spp.等)は自然環境の破壊により、本来の生息地を追われ、家屋や人家、家畜の飼育場周辺に生息する例もあることから、コウモリと人との接触機会が増加することで、新たな人獣共通感染症が発生することも危惧されている (Plowright et al., 2015)。

Bartonella はグラム陰性の短桿菌で、培養には血液成分の一つであるヘミンを必要とし、5%の CO₂ 濃度、20~37°C環境下で 7~21 日を要する。本属菌は人を含む多くの哺乳類を自然宿主とし、宿主の血管内皮細胞および赤血球に持続感染して、長期間の菌血症を引き起こす細胞内寄生菌である (Welch, D. F. 2015)。本菌は、Proteobacteria 門 Alphaproteobacteria 綱 Rizobium 目 Bartonella 科 Bartonella 属に分類され、34 菌種 3 亜種が菌種記載されている。また、菌種記載されていないものの、ジリスを自然宿主とする *B. washoensis*、羊を自然宿主とする *B. melophagi*、ドーベントンコウモリを自然宿主とす

る *Candidatus B. mayotimonensis* も *Bartonella* 属菌として広く認知されている (Table 1)。このうち、人に病原性を有する *Bartonella* は、少なくとも 13 種 2 亜種で、*B. alsatica* は野兎、*B. elizabethae*、*B. grahamii*、*B. vinsonii* subsp. *arupensis* はげっ歯類、*B. washoensis* はジリス、*B. henselae*、*B. clarridgeiae* および *B. koehlerae* はネコ科動物、*B. ancashensis* と *B. bacilliformis* はヒト、*B. quintana* はマカク属の猿とヒト、*B. rochalimae* はアライグマやキツネ、タヌキなどの食肉目動物を、*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* はコヨーテと犬をそれぞれ自然宿主とする (Breitschwerdt EB. 2014)。

バルトネラ症の症状は菌種によって様々である。代表的な病原性 *Bartonella* である *B. henselae* は受傷部の丘疹や膿疱、発熱、数週間から数ヶ月続くリンパ節の腫脹を主徴とする猫ひっかき病 (CSD) を引き起こす。*B. quintana* は、回帰性の頭痛、発熱、脛骨の痛みを主徴とする塹壕熱の原因となる。また、免疫不全患者では *B. henselae* と *B. quintana* は心内膜炎や細菌性血管腫症を引き起こすことも知られている (Breitschwerdt EB. 2014)。

過去の研究において、少なくとも 30 の国や地域に生息する 88 種のコウモリから *Bartonella* が分離あるいは、その DNA が検出されていることから、世界各地のコウモリには本菌が広く分布していると考えられる (Stuckey et al., 2017a)。2010 年に Lin ら (2010) は、心内膜炎患者から新種と考えられる *Candidatus Bartonella mayotimonensis* の DNA を検出した。その後、2014 年に Veikkolainen ら (2014) は、*Myotis daubentonii* および *Eptesicus nilssonii* から *Candidatus B. mayotimonensis* に近縁な細菌を分離した。さらに、

2017年にLileyら(2017)はヨーロッパ、Stuckeyら(2017b)は北アメリカの*Myotis*属コウモリから *Candidatus B. mayotimonensis* に近縁な *Bartonella* DNA をそれぞれ検出している。同年Urushadzeら(2017)が*Myotis*属コウモリから分離した株は、ポーランドの林業従事者から検出された*Bartonella*と同一種であることが明らかとなった。これらの事実から、コウモリが保有する*Bartonella*の一部は、ヒトに対して病原性を有している可能性がある。

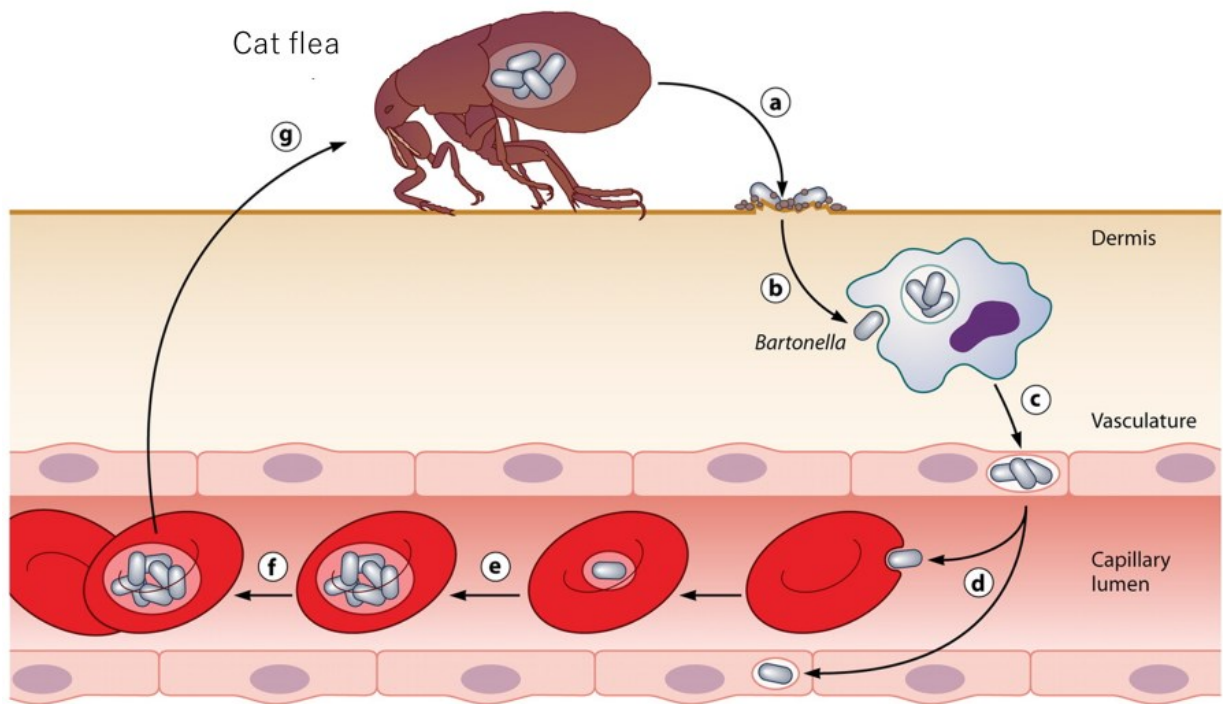
*Bartonella*は菌種ごとに様々な吸血性節足動物をベクターとして宿主間に伝播されている。*B. henselae*ではネコノミを(Chomel et al., 1996)、*B. bacilliformis*ではサンショウバエを(Garcia-Quintanilla et al., 2019)、*B. quintana*ではコロモジラミをそれぞれベクターとしている(Fournier et al., 2001)。その他の*Bartonella*種では、ネズミノミやウサギノミ、ヒトノミやシラミバエなどの多様な吸血性節足動物がベクターとして宿主間、あるいは宿主からヒトへの伝播に関与していると考えられている。一方、コウモリ固有の吸血性節足動物であるクモバエから高率に*Bartonella*が検出されていることから、コウモリではクモバエが有力なベクターの1つであると考えられている(Becker et al., 2018)。しかしながら、少数ではあるが、コウモリトコジラミ(McKee et al., 2019)やコウモリノミ(Veikkolainen et al., 2014)、コウモリダニ(Szubert-Kruszynska et al., 2019)などからも*Bartonella*が検出されているため、そのベクターについては未だ不明な点が多い。

*Bartonella*の感染成立には複数のステージがある。CSDの原因菌である*B. henselae*の場合、ベクターであるネコノミの糞便中に排出された*B. henselae*が、猫がグ

ルーミングする際にノミの刺咬部位から皮下に侵入し、真皮中の樹状細胞に感染する。その後、感染した菌は樹状細胞から血管内皮細胞に移行し、そこで増殖する。次いで、血管内皮細胞から血管内腔に遊離し、赤血球に接着・侵入することで菌血症を引き起こし、再びネコノミに吸血されることで感染が他の猫に伝播される (図 1; Harms, A., and Dehio, C. 2012)。これらの感染ステージのうち、血管内皮細胞への感染は主に BadA を介した接着から、次いで IV 型分泌機構 (Type IV Secretion System; T4SS) によるエフェクタータンパク質である *Bartonella* effector proteins (Beps) の細胞内への注入によって制御されており、また Beps は病原性の発現にも関与している。*B. henselae* は BepA から BepG まで 7 つの Beps を保有しており、BepB、BepD の機能は不明ながら、ノミの刺咬から樹状細胞への感染には BepE (Okujava et al., 2014) が、樹状細胞から血管内皮細胞に移行する際には BepC、BepF、BepG が関与している (Truttmann MC et al., 2011; Rhomberg et al., 2009)。また、BepA は宿主細胞に作用して、アポトーシスの阻害を引き起こすことが報告されている (Schmid et al., 2004)。*Bartonella* 属菌の T4SS と Beps の遺伝子は染色体上に Pathogenicity island (PAI) として存在していることから、これらの遺伝子を解析することによりヒト以外の哺乳類を宿主とする *Bartonella* の病原性を評価することが試みられている (Tay et al., 2016)。

上述したように、広範な地域に生息する多種多様なコウモリが *Bartonella* を保有しており、また、一部のコウモリ由来 *Bartonella* は心内膜炎に罹患した患者から検出されていることから、コウモリは新たなバルトネラ症の感染源となる可能性が考えられる。

コウモリにおける *Bartonella* 属菌の生態を明らかにし、その遺伝子性状からコウモリ由来 *Bartonella* の病原性を詳細に評価することは、バルトネラ症の防遏上極めて重要であると考えられる。しかしながら、わが国のコウモリにおける *Bartonella* の分布、保有菌種とその遺伝子性状、さらには本菌を媒介するベクターについて検討した研究は無いため、全く不明の状況である。そこで、本学位論文では、わが国のバルトネラ症の疫学解明の一環として、日本のコウモリにおける *Bartonella* の生態を解明することを目的とした。第2章では4種のコウモリにおける *Bartonella* の分布状況と分離株の遺伝子性状を検討した。第3章では検討した各コウモリ種の集団内で *Bartonella* を媒介するベクターを明らかにするために、採取した吸血性節足動物の種を形態学的、分子生物学的に同定するとともに、分離・検出した *Bartonella* 菌株の遺伝子を宿主のコウモリ由来株とともに解析することで、各コウモリに寄生する外部寄生虫相とそれらのベクターとしての役割を検討した。第4章ではコウモリから分離された *Bartonella* の全ゲノム解析に基づいて、8つの病原因子をコードする遺伝子群の保有状況を *B. henselae* と比較検討することで、宿主における持続感染機序を推定した。



(Harms, A., and Dehio, C. 2012 を基に改編)

図 1.宿主体内における *B. henselae* の感染環

- a. ネコノミ糞便中への *B. henselae* の排菌
- b. 真皮中の樹状細胞への感染
- c. 樹状細胞から血管内皮細胞への移行
- d. 血管内皮細胞から赤血球への移行
- e. 赤血球内での複製
- f. 赤血球内での持続感染
- g. ネコノミの吸血による *B. henselae* の取り込み

Table.1 *Bartonella* 属菌 37 種 3 亜種の自然宿主と人に対する病原性

種名	自然宿主	人に対する病原性
<i>B. acomydis</i>	<i>Acomys russatus</i>	不明
<i>B. alsatica</i>	Leporinae	心内膜炎
<i>B. ancashensis</i>	<i>Homo sapiens</i>	ペルー疣病様症状
<i>B. apis</i>	<i>Apis</i> sp.	不明
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Homo sapiens</i>	カリオン病
<i>B. birtlesii</i>	<i>Apodemus speciosus</i>	不明
<i>B. bovis</i>	<i>Bos taurus</i>	不明
<i>B. callosciuri</i>	<i>Callosciurus notatus</i>	不明
<i>B. capreoli</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	不明
<i>B. chomelii</i>	<i>Bos taurus</i>	不明
<i>B. clarridgeiae</i>	Felidae	猫ひっかき病
<i>B. coopersplainsensis</i>	<i>Rattus leucopus</i>	不明
<i>B. doshiae</i>	<i>Microtus agrestis</i>	不明
<i>B. elizabethae</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	心内膜炎
<i>B. florencae</i>	<i>Crocidura russula</i>	不明
<i>B. fuyuanensis</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	不明
<i>B. grahamii</i>	Rodentia	視神経網膜炎
<i>B. heixiaziensis</i>	<i>Myodes rutilus</i>	不明

Table.1 *Bartonella* 属菌 37 種 3 亜種の自然宿主と人への病原性 (つづき)

種名	自然宿主	人に対する病原性
<i>B. henselae</i>	Felidae	猫ひっかき病
<i>B. jaculi</i>	<i>Jaculus orientalis</i>	不明
<i>B. japonica</i>	<i>Apodemus argenteus</i>	不明
<i>B. koehlerae</i>	Felidae	心内膜炎
<i>B. pachyuromydis</i>	<i>Pachyuromys duprasi</i>	不明
<i>B. queenslandensis</i>	<i>Melomys</i> spp.	不明
<i>B. quintana</i>	<i>Homo sapiens</i> , <i>Macaca</i> spp.	塹壕熱
<i>B. rattaaustraliani</i>	<i>Melomys</i> spp.	不明
<i>B. rochalimae</i>	Carnivora	関節炎、脾腫、発熱
<i>B. schoenbuchensis</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	不明
<i>B. senegalensis</i>	Unknown	不明
<i>B. silvatica</i>	<i>Apodemus speciosus</i>	不明
<i>B. tamiae</i>	Unknown	筋肉痛、発熱
<i>B. taylorii</i>	<i>Apodemus</i> spp.	不明
<i>B. tribocorum</i>	<i>Rattus</i> spp.	不明
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	<i>Peromyscus leucopus</i>	心内膜炎
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Canidae	心内膜炎
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	<i>Microtus montebelli</i>	不明

Table.1 *Bartonella* 属菌 37 種 3 亜種の自然宿主と人への病原性 (つづき)

種名	自然宿主	人に対する 病原性
<i>B. washoensis</i>	<i>Otospermophilus beecheyi</i>	心筋炎、髄膜炎
<i>B. melophagi</i>	<i>Ovis aries</i>	筋肉痛、発熱
<i>Candidatus B. mayotimonensis</i>	<i>Myotis daubentoni</i>	心内膜炎

第2章

わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の分布とその宿主特異性の検討

2.1 はじめに

2005年に Concannon ら (2005) が、*Pipistrellus* sp.、*Myotis daubentonii*、*Nyctalus noctula* などのコウモリから *Bartonella* DNA を検出して以降、2020年までに30の国や地域の88種のコウモリで *Bartonella* の感染が確認されている。このことからコウモリは多くの *Bartonella* の宿主の一つを構成していることが判明している (Stuckey et al., 2017a)。

2010年に Lin ら (2010)は、心内膜炎患者から新種と考えられる *Candidatus Bartonella mayotimonensis* のDNAを検出した。その後、2014年に Veikkolainen ら (2014) は、*Myotis daubentonii* および *Eptesicus nilssonii* から *Candidatus B. mayotimonensis* に近縁な細菌を分離した。さらに、2017年に Lilley ら (2017) はヨーロッパ、Stuckey ら (2017b)は北アメリカの *Myotis* 属コウモリから *Candidatus B. mayotimonensis* に近縁な *Bartonella* DNA をそれぞれ検出している。同年 Urushadze ら (2017)が *Myotis* 属コウモリから分離した株は、ポーランドの林業従事者から検出された *Bartonella* と同一種であることが明らかとなった。これらの事実から、*Myotis* 属や *Eptesicus* 属のコウモリは人に対して病原性を有する *Bartonella* の病原巣であると考えられる。

日本に生息する35種のコウモリのうち、17種は絶滅危惧種II以上であることから、鳥獣保護管理法により厳しく保護されている。また、多くのコウモリ種の生息地が限られていること、その生息数が少ないこと、コウモリ類の捕獲・調査が技術的に難しいこと等から (松江ら., 2006)、わが国のコウモリ種についてその病原性 *Bartonella* の

分布は全く検討されていない。

そこで本章では、わが国のバルトネラ症の疫学解明の基礎研究として、日本国内に生息するコウモリを対象に、*Bartonella* 属菌の保有状況を細菌学的に検討した。さらに、分離株のクエン酸合成酵素遺伝子 (*gltA*)領域の塩基配列を決定し、海外のコウモリ由来株と *Bartonella* 標準株とともに系統解析することで、わが国のコウモリが保有する *Bartonella* の遺伝子系統を明らかにした。

2.2 材料および方法

2.2.1 採材地域及び検査材料

2013年3月に和歌山県田辺市でユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*)を50頭、2017年8月と2018年8月に、北海道二海郡八雲町でキタクビワコウモリ (*Eptesicus nilssonii*)を123頭、2018年8月と2019年8月に静岡県富士宮市でキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*)を1頭とモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*)を4頭捕獲した。なお、コウモリの捕獲にあたっては、事前に各自治体から捕獲許可を取得した。ユビナガコウモリは導水トンネルに、キタクビワコウモリは廃屋の戸袋に密集して生息していた個体を捕獲した。キクガシラコウモリとモモジロコウモリは森林内を飛翔している個体をハープトラップにより捕獲した (図 2.1)。捕獲したコウモリは、CO₂あるいはエーテル麻酔下で安楽殺し、心臓から無菌的に採取した血液を、2ml用EDTA入り真空採血管 (TERUMO 社)に分取した。採取したコウモリの血液は直ちにドライアイス冷凍下で日本大学生物資源科学部 獣医公衆衛生学研究室に輸送した後、実験に供試するまで-70°Cで冷凍保存した。

2.2.2 血液からの *Bartonella* 属菌の分離培養法および分離株の保存法

冷凍保存していた各コウモリの血液を室温で解凍・溶血した後、1.5ml滅菌プラスチックチューブに100μlずつ分取し、*Bartonella* 属菌分離用 Medium199^{*1}の100μlと十分に混合した。混合液の100μlをそれぞれ2枚の5%兔血液加 Heart Infusion Agar (HIA)^{*2}

に塗抹後、35°C、5%CO₂環境下で約1カ月間培養し、2〜3日毎に培地上のコロニーの発育状況を観察した。培地上に発育した *Bartonella* 属菌を疑うコロニーを各検体から無作為に3コロニーを釣菌し、5%兔血液加 HIA 培地を用いて 35°C、5%CO₂の気相で7〜14日間の純培養を行った。純培養した各分離株を1白金耳量回収し、1mlの *Bartonella* 属菌保存用培地^{*3}に懸濁し、各種解析まで−70°Cで凍結保存した。

2.2.3 分離株からの DNA 抽出法

培地上で純培養した各分離株の約1/4白金耳量を採取し、1mlの滅菌PBSを加えた1.5ml尖底プラスチックチューブ内で混和した。ボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、14,400×g (12,000rpm)で5分間遠心洗浄した。上清を除去した後、InstaGene Matrix (Bio Rad 社)を30μl加え、再び混和した後、56°Cで30分間加熱処理し、菌体内のヌクレアーゼを不活性化した。ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した後、100°Cで8分間煮沸して菌体を溶解した。再度ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した後、14,400×g (12,000rpm)で5分間遠心し、その上清をDNA抽出原液とした。DNA抽出原液は波長260nmにおける吸光度 (OD)からDNA濃度、OD 260nm/280nm比からDNA純度を算出し、OD 260nm/280nm比が1.8〜2.0の検体について、Nuclease-Free Water (Invitrogen 社) (以下、NFW)でDNA濃度を20ng/μlに調整した。

2.2.4 PCR による分離株の *gltA* および *rpoB* 遺伝子領域の検出法

分離株の *gltA* および RNA ポリメラーゼ β サブユニット遺伝子 (*rpoB*) 領域の検出は、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法により行った (Norman et al., 1995; Renesto et al., 2001)。PCR 法は、0.2ml の滅菌した PCR 用マイクロチューブに 20ng/ μ l に調整した DNA 溶液を 1 μ l、10 μ M の PCR 用プライマーを各 1 μ l、さらに Go-Taq Master Mix (Promega 社) を 10 μ l 加え、Nuclease-Free Water で全量を 20 μ l とした。*gltA*、*rpoB* 領域を増幅するためのプライマーの塩基配列は表 2-1 に、PCR 条件は、表 2-2 に示した。なお、陽性対照として *B. alsatica* から抽出した DNA 溶液、陰性対照として NFW をそれぞれ用いた。

2.2.5 PCR 産物の確認法

Mupid 電気泳動槽 (Advance 社) に TAE buffer を約 350ml 入れた後、2%アガロースゲル (Agarose S: ニッポン・ジーン社) を泳動槽に設置した。各 PCR 産物の 5 μ l ならびに DNA サイズマーカーとして 100bp DNA ladder (ニッポンジーン社) の 5 μ l をゲルのウェル内に添加し、電圧 100V 下で約 30 分間電気泳動した後、ゲルを 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で 10 分間染色した。染色したゲルは精製水に 15 分間浸漬して脱色した後、紫外線ゲル撮影装置 (Atto 社) を用いて増幅バンドを確認した。*gltA* 領域で約 380bp および *rpoB* 領域で約 900bp の位置に各遺伝子の増幅バンドが認められた株を *Bartonella* 属菌と判定した。

2.2.6 PCR 産物の精製法

PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社)を用いて精製した。すなわち、PCR 産物 15 μ l に Membrane Binding Solution を 15 μ l 添加して充分混和した後、Wizard® SV Mini column 上に滴下し、1 分間室温で静置した。その後、カラムを 15,800 \times g (13,200rpm)、1 分間遠心して濾液を除去した後、Membrane Wash Solution の 700 μ l を滴下し、再度 15,800 \times g (13,200rpm)で 1 分間遠心した。濾液を除去した後、Membrane Wash Solution の 500 μ l を再度滴下し、15,800 \times g (13,200rpm)で 5 分間遠心した。遠心後、Wizard SV Mini columns を 1.5ml 尖底プラスチックチューブに装着し、カラム濾紙の中央に NFW を 30 μ l 滴下して室温で 1 分間静置した。さらに、15,800 \times g (13,200rpm)で 2 分間遠心し、溶出液を精製 DNA 溶液とした。

2.2.7 分離株の塩基配列の決定法

滅菌した 0.2ml PCR 用マイクロチューブに 200ng/ μ l の濃度に調整した精製 DNA 溶液を 1 μ l、1.6 μ M の DNA シーケンス用プライマー (表 2-1)を 1 μ l、NFW を 5.5 μ l、BigDye (Applied Biosystems 社)を 1 μ l、Sequence buffer (Applied Biosystems 社)を 1.5 μ l 加え、充分混和した。サイクルシーケンス反応は、96 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 15 秒間のアニーリング、および 60 $^{\circ}$ C で 4 分間の伸長反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。反応終了後、エタノール沈殿溶液*4 の 40 μ l を反応液に添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、室温で 15 分間静置した。15,800 \times g (13,200rpm)で 20 分間遠心した

後、上清を除去し、70%エタノールを 250 μ l 加え、さらに 15,800 \times g (13,200rpm)で 5 分間遠心した。再び上清を除去して、50 $^{\circ}$ Cで 10 分間静置した後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 社)を 15 μ l 加え、100 $^{\circ}$ Cのヒートブロック上で 2 分間処理した後、チューブを 5 分間氷冷し、全量を DNA シーケンス用 96 穴プレートに移した。各 PCR 産物の塩基配列は Applied Biosystems model 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem 社)を用いて決定した。

2.2.8 *gltA* 領域の塩基配列データの解析法

得られたシーケンスデータは、ATGC ソフトウェア (Genetyx 社)を用いて結合した。マルチプルアラインメントは、*gltA* 領域の塩基長 338bp に基づき、*Bartonella* 標準株 44 株とともに Clustal W を用いて行った。

分離株の遺伝子型は Genetyx software (Genetyx 社)を用いて各株間の塩基配列を比較しすることで決定した。各遺伝子型の中から無作為に 1 株を選抜して代表株とした。各代表株の *gltA* 領域の塩基配列を用いて BLAST 検索を行い、最も近縁な *Bartonella* 属菌株との相同性を検討した。

2.2.9 *gltA* 領域の塩基配列に基づく系統解析法

本研究で分離されたコウモリ由来株 13 株、海外のコウモリ由来株およびコウモリの吸血性節足動物由来株、合計 420 株、および *Bartonella* 標準株 35 株とともに系統解

析を行った。系統樹は解析ソフトウェア MEGA7 を用いて、最尤法 (Maximum Likelihood method; ML 法)によって作成した。



図 2.1 研究対象としたコウモリの生息環境

A : ユビナガコウモリを捕獲した和歌山県田辺市内の導水トンネル

a : 導水トンネルの天井部に密集して生息しているユビナガコウモリ

B : キタクビワコウモリを捕獲した北海道二海郡八雲町内の廃屋

b : 廃屋の戸袋内に密集して生息しているキタクビワコウモリ

C : 静岡県富士宮市の森林内に設置したハーブトラップ

c : ハーブトラップで捕獲したモモジロコウモリ

表 2.1 *Bartonella* 属菌の *gltA* と *rpoB* 領域の PCR、および DNA シーケンスに用いたプライマーの塩基配列

遺伝子領域	プライマー名	用途	塩基配列
<i>gltA</i>	BhCS.781p	PCR/シーケンス	5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3'
	BhCS.1137n	PCR/シーケンス	5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3'
<i>rpoB</i>	1400F	PCR	5'-CGCATTGGCTTACTTCGTATG-3'
	2300R	PCR	5'-GTAGACTGATTAGAACGCTG-3'

表 2.2 *Bartonella* 属菌の *gltA* および *rpoB* 領域を増幅するために使用した PCR の条件

遺伝子領域	反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)	
<i>gltA</i>	初期熱変性 (×1)	94	300	
	増幅 (×35)	熱変性	94	20
		アニーリング	53	30
		伸長反応	72	30
	最終伸長 (×1)	72	300	
<i>rpoB</i>	初期熱変性 (×1)	94	300	
	増幅 (×35)	熱変性	94	30
		アニーリング	53	30
		伸長反応	72	60
	最終伸長 (×1)	72	300	

2.3 成績

2.3.1 わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の保菌状況

分離培養の結果、和歌山県で捕獲したユビナガコウモリ 50 頭のうち 12 頭 (24%)、北海道で捕獲したキタクビワコウモリ 123 頭のうち 32 頭 (26%)、静岡県で捕獲したキクガシラコウモリ 1 頭およびモモジロコウモリ 4 頭のすべての個体から *Bartonella* が分離された (表 2.3)。

2.3.2 コウモリ分離株の遺伝子型別および相同性解析

49 頭のコウモリから分離された *Bartonella* 147 株について、*gltA* 領域の一塩基多型に基づく遺伝子型別を行ったところ、13 の *gltA* 遺伝子型に分類された。ユビナガコウモリ由来の 36 株は遺伝子型 1~5 に、キタクビワコウモリ由来の 96 株は遺伝子型 6~8 に、モモジロコウモリ由来の 12 株は遺伝子型 9~12 に、キクガシラコウモリ由来の 3 株は遺伝子型 13 に分類された (表 2.4)。

各遺伝子型代表株の BLAST 検索の結果、ユビナガコウモリ由来の遺伝子型 1~4 は台湾の *Miniopterus schreibersii* 由来株と 99.7~100%の相同性を、遺伝子型 5 はアメリカのドブネズミに寄生していたケオプスネズミノミの *Bartonella* DNA と 88.1%の相同性を示した。

キタクビワコウモリ由来株の遺伝子型 6 と 7 は、フィンランドのキタクビワコウモリ由来株およびオランダの *E. serotinus* のコウモリノミ由来株と 97.9%、遺伝子型 8 はケニアのジネズミ由来株と 95.9%の相同性を示した。

モモジロコウモリ由来の遺伝子型 9、10、11 は、中国の *Myotis fimbriatus* 由来株と 99.1~100%、遺伝子型 12 は中国とジョージアの *Myotis* 属由来株と 98.8%の相同性を示した。

キクガシラコウモリ由来株の遺伝子型 13 はジョージアの *Myotis* 属およびキクガシラコウモリ由来株と 99.7%の相同性を示した (表 2.4)。

2.3.3 *gltA* 配列に基づくコウモリ分離株の系統解析

系統解析では、遺伝子型 1~4 は台湾の *Miniopterus schreibersii* 由来株と系統 A に、遺伝子型 11 は中国の *Myotis* 属由来株と系統 B に分類された。遺伝子型 13 はジョージア、ルーマニアの *Rhinolophus* 属由来株、*Rhinolophus* 属に寄生していたクモバエの *Bartonella* DNA とジョージアの *Myotis* 属由来株とともに系統 C を形成した。遺伝子型 10 と 12 は中国の *Myotis* 属由来株と系統 D を、遺伝子型 6、7、12 は英国、中国、ジョージア、オランダの *Vespertilionidae* 科のコウモリとその外部寄生虫由来株とともに系統 G を形成した。

遺伝子型 5 と 8 は、同じ系統に分類される株は無く、それぞれ単系統の E および F に分類された (図 2.2 ; 表 2.5)。

表 2.3 わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の陽性率

コウモリ種 (学名)	捕獲地域	検体数	陽性数 (%)
ユビナガコウモリ (<i>Mi. fliginosus</i>)	和歌山県田辺市	50	12 (24)
キタクビワコウモリ (<i>E. nilssonii</i>)	北海道二世郡	123	32 (26)
モモジロコウモリ (<i>My. macrodactylus</i>)	静岡県富士宮市	4	4 (100)
キクガシラコウモリ (<i>R. ferrumequinum</i>)		1	1 (100)

表 2.4 コウモリ由来 *Bartonella* の *gltA* 遺伝子型と BLAST 検索による相同性

由来コウモリ種	遺伝子型	代表株	株数	BLAST 検索結果 (相同性)	Accession No.	由来動物 (国名)
ユビナガコウモリ	1	bat2-1	11	<i>Bartonella</i> sp. No.05 (100%; 308/308*)	JF500511	<i>Miniopterus schreibersii</i> (台湾)
	2	bat23-1	6	<i>Bartonella</i> sp. No.07 (100%; 308/308*)	JF500513	
	3	bat8-3	7	<i>Bartonella</i> sp. No.07 (99.7%; 307/308*)	JF500513	
	4	bat43-1	9	<i>Bartonella</i> sp. No.07 (99.7%; 307/308*)	JF500513	
	5	bat24-1	3	<i>Bartonella</i> sp. NYC-1948-4 (88.1%; 297/337*)	KM266600	<i>Rattus norvegicus</i> 由来 <i>Xenopsylla cheopis</i> (アメリカ)
キタクビワコウモリ	6	EN2-1	33	<i>Bartonella</i> sp. 1157/3 (97.9%; 331/338)	KF003115	<i>Eptesicus nilssonii</i> (フィンランド)
				<i>Bartonella</i> sp. 1F40 (97.9%; 331/338)	MK140241	
	7	EN19-2	33	<i>Bartonella</i> sp. 1157/3 (97.9%; 331/338)	KF003115	<i>Eptesicus serotinus</i> 由来 <i>Ischnopsyllus variabilis</i> (オランダ)
				<i>Bartonella</i> sp. 1F40 (97.9%; 331/338)	MK140241	
8	EN36-1	30	<i>Bartonella</i> sp. B28303 (95.9%; 324/338)	KM233490	<i>Crocidura olivieri</i> (ケニア)	
モモジロコウモリ	9	F2-1	5	<i>Bartonella</i> sp. SD-74-2/2015 (99.4%; 336/338)	KX655808	<i>Myotis fimbriatus</i> (中国)
	10	F3-2	3	<i>Bartonella</i> sp. SD-78/2015 (100%; 338/338)	KX655839	<i>Myotis fimbriatus</i> (中国)
				<i>Bartonella</i> sp. SD-70/2015 (100% 338/338)	KX655829	<i>Myotis fimbriatus</i> (中国)
	11	F4-1	3	<i>Bartonella</i> sp. SD-74-2/2015 (99.1%; 335/338)	KX655808	<i>Myotis fimbriatus</i> (中国)
	12	F5-1	1	<i>Bartonella</i> sp. 44731 (98.8%; 334/338)	KX300140	<i>Myotis blythii</i> (ジョージア)
<i>Bartonella</i> sp. SD-123/2015 (98.8%; 334/338)				KX655815	<i>Myotis pequinius</i> (中国)	
キクガシラコウモリ	13	F1-1	3	<i>Bartonella</i> sp. strain B44547 (99.7%; 337/338)	MK140359	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (ジョージア)
				<i>Bartonella</i> sp. isolate 44591 (99.7%; 337/338)	KX300107	<i>Myotis blythii</i> (ジョージア)

* : NCBI に登録された塩基配列長が 338bp 未満であった株

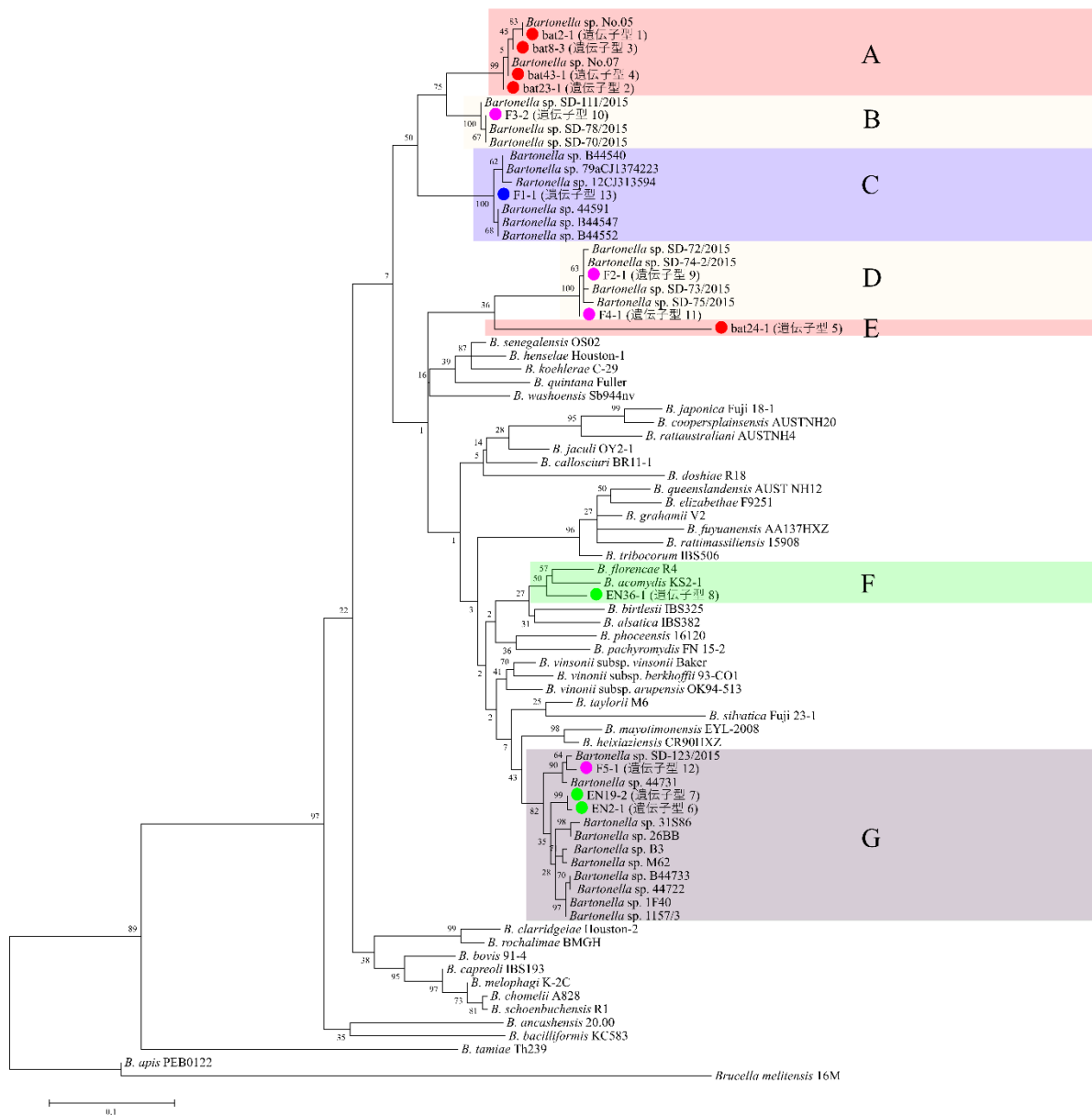


図 2.2 *gltA* 遺伝子領域に基づく系統樹

コウモリとその外部寄生虫由来 *Bartonella* 420 株、*Bartonella* の標準株 35 株、および本研究代表株 13 株を含めた系統樹を作成した後に、本研究の代表株と同一のクレードを形成した株を抽出し、解析した系統樹を記載した。本研究で検出された遺伝子型のうち、赤丸はユビナガコウモリ由来株を、ピンク丸はモモジロコウモリ由来株を、青丸はキクガシラコウモリ由来株を、および緑丸はキタクビワコウモリ由来株をそれぞれ示す。

表 2.5 図 2.2 における各系統を構成する株の宿主および由来国

系統	株名	宿主 (由来国)
A	bat2-1、bat23-1、bat8-3、bat43-1	ユビナガコウモリ (日本)
	No.05、No.07	<i>Miniopterus schreibersii</i> (台湾)
B	F3-2	モモジロコウモリ (日本)
	SD-111/2015、SD-18/2015、 SD-70/2015	<i>Myotis</i> 属コウモリ (中国)
	F1-1	キクガシラコウモリ (日本)
C	B44540、B44547、B44552	<i>Rhinolophus</i> 属コウモリ (ジョージア)
	B44591	<i>Myotis blythii</i> (ジョージア)
	79aCJ1374223、12CJ313594	<i>Rhinolophus</i> 属コウモリ由来 <i>Phthiridium biarticulatum</i> (ルーマニア)
	F2-1、F4-1	モモジロコウモリ (日本)
D	SD-72/2015、SD-74-2/2015、 SD-73/2015、SD-75/2015	<i>Myotis</i> 属コウモリ (中国)
	bat24-1	ユビナガコウモリ (日本)
F	EN36-1	キタクビワコウモリ (日本)
G	F5-1	モモジロコウモリ (日本)
	EN19-2、EN2-1	キタクビワコウモリ (日本)
	1157/3	キタクビワコウモリ (フィンランド)
	B44733	種不明のコウモリ (ジョージア)
	M62	<i>Myotis mystacinus</i> (英国)
	B3	<i>Myotis alcathoe</i> (英国)
	SD-1232015	<i>Myotis pequinius</i> (中国)
	26BB	<i>Myotis dasycneme</i> 由来 <i>Cimex pipistrelli</i> (オランダ)
	31S86	<i>Eptesicus serotinus</i> 由来 <i>Spinturnix kolenatii</i> (オランダ)
	1F40	<i>Ischnopsyllus variabilis</i> (オランダ)
	B44731	<i>Myotis blythii</i> (ジョージア)
	B44722	<i>Eptesicus serotinus</i> (ジョージア)

2.4 考察

本研究で検討したすべての種類のコウモリから *Bartonella* が分離された。コウモリ種別の陽性率は、ユビナガコウモリで 24% (12/50)、キタクビワコウモリで 26% (32/123)、キクガシラコウモリ (N=1)、およびモモジロコウモリ (N=4)では 100%であった。

国外の *Miniopterus* 属コウモリにおける *Bartonella* 陽性率は、ケニアで 56.3% (Kosoy et al., 2010)、ジョージアでは 88.9% (Urushadze et al., 2017)、台湾では 42.9% (Lin et al., 2012)であることが報告されており、本研究のユビナガコウモリの陽性率に比べ高い傾向にあった。本研究では、既報と同様の分離方法を用いており、また、コウモリの血液は採血直後にドライアイスを用いて冷凍し、分離時までは -70°C で保存していたことから、試料中の *Bartonella* の死滅による分離効率の低下は、最低限に抑えることができていると推測され、和歌山県周辺に生息しているユビナガコウモリにおける正確な陽性率を示していると考えられる。ユビナガコウモリはわが国に広く分布していることから、今後ほかの地域の個体についても比較検討することで、和歌山県の個体の陽性率が他国に比べて低かった原因を明らかにする必要があると思われる。

キタクビワコウモリを含む *Eptesicus* 属のコウモリの *Bartonella* 陽性率は、フィンランドで 33% (Veikkolainen et al., 2014)、ジョージアで 20% (Urushadze et al., 2017)であったと報告されている。一方で、中国 (Han et al., 2017)、フランス、スペイン (Stuckey et al., 2017b)の同属のコウモリから *Bartonella* は検出されていない。本研究において、北海道道南地方で捕獲したキタクビワコウモリの *Bartonella* 陽性率は 26%であったことから、*Eptesicus* 属のコウモリにおける *Bartonella* の分布は、地域差があると考えられた。

今回、モモジロコウモリの4検体すべてから *Bartonella* が分離された。モモジロコウモリが属する *Myotis* 属においては、フランス、スペイン、イギリス、フィンランド、ジョージア、中国、ペルー、コスタリカ、アメリカの個体から *Bartonella* が分離・検出されており、その陽性率は16.7~75%であった (Stuckey et al., 2017a)。このことから、広範な地域の *Myotis* 属のコウモリに *Bartonella* が高率に分布しているものと考えられた。

今回キクガシラコウモリの1検体からも *Bartonella* が分離されたが、検体数が1検体と少なく、今後、モモジロコウモリとともに検体数を増やし国外のそれぞれのコウモリとその陽性率を比較検討することで、わが国の同種のコウモリの *Bartonella* 保有状況を明らかにする必要があると思われた。

本研究において、わが国のコウモリ分離株は1~13の *gltA* 遺伝子型に分類された。検討したユビナガコウモリの1個体が遺伝子型1と3に、モモジロコウモリの1個体のコウモリが遺伝子型9と12の *Bartonella* に共感染していた。過去の研究では105頭の *Bartonella* 陽性コウモリのうち、16頭が異なる遺伝子型に共感染していたことが報告されている (Urushadze et al., 2017)。Urushadze らは、培地上に発育した *Bartonella* 様のコロニーのうち、形態的に異なるコロニーを全て解析することで共感染個体を検出している。今後コウモリにおける *Bartonella* の共感染を検討するうえで、各コウモリの生息密度や吸血性節足動物の寄生状況について比較検討するとともに陽性検体あたりの解析コロニー数を増やして解析する必要があると思われた。さらに、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスで、血液中の *Bartonella* DNA 断片を網羅的に検出するなど

の方法を検討する必要がある。

コウモリ由来株の *gltA* 遺伝子の塩基配列について BLAST 検索を行った結果、ユビナガコウモリ由来の遺伝子型 1~4 は、台湾の *Miniopterus* 属コウモリ由来株と 99.7~100% の高い相同性を示したが、遺伝子型 5 はドブネズミに寄生していたネズミノミ由来 *Bartonella* と 88.1% と低い相同性を示した。また、*gltA* 遺伝子に基づく系統解析では、遺伝子型 1~4 は台湾の *Miniopterus* 属由来株とともに系統 A に、遺伝子型 5 は単系統の系統 E に分類されたことから、わが国のユビナガコウモリは、近縁種が存在しない固有の株を保有していると考えられた。

キタクビワコウモリ由来の遺伝子型 6、7 は、BLAST 検索の結果、フィンランドのキタクビワコウモリ由来株と *Eptesicus* 属コウモリから採取されたコウモリノミ由来株と 97.9% の相同性を示した。遺伝子型 8 はケニアのジネズミ由来株と 95.9% の相同性を示した。系統解析では、遺伝子型 6、7 は *Vespertilionidae* 科コウモリとその吸血性節足動物由来 *Bartonella* とともに系統 G に属したことから、遺伝子型 6、7 は *Vespertilionidae* 科のコウモリに固有の *Bartonella* であると考えられた。また、遺伝子型 8 は近縁なコウモリ由来株は無く、ジネズミやげっ歯類由来 *Bartonella* に近縁な単系統となったことから、遺伝子型 8 はジネズミやげっ歯類由来 *Bartonella* に近縁なキタクビワコウモリに固有の *Bartonella* であると考えられた、

モモジロコウモリ由来の遺伝子型 9、10、11、12 は、それぞれ中国、ジョージアの *Myotis* 属由来株と 99.1~100% の相同性を示した。系統解析では、遺伝子型 9 と 11 は

中国の *Myotis* 属コウモリ由来株とともに系統 D を、遺伝子型 10 は中国の *Myotis* 属コウモリ由来株と系統 B を形成した。遺伝子型 12 が属した系統 G には、キタクビワコウモリ由来の遺伝子型 6、7 を含む *Vespertilionidae* 科コウモリとその吸血性節足動物由来 *Bartonella* の株が属したことから、系統 G は *Eptesicus* 属、*Myotis* 属を含む *Vespertilionidae* 科のコウモリに固有の系統であると考えられた。以上から、モモジロコウモリにはアジア圏の *Myotis* 属固有の *Bartonella* が 2 系統と、*Vespertilionidae* 科固有の *Bartonella* が分布していると考えられた。

キクガシラコウモリ由来の遺伝子型 13 は、ジョージアの *Myotis* 属および *Rhinolophus* 属由来株と 99.7% の相同性を示した。系統解析では遺伝子型 13 はジョージアの *Rhinolophus* 属由来の 3 株、*Myotis* 属由来の 1 株、およびルーマニアの *Rhinolophus* 属から採取されたクモバエ由来の 2 株とともに系統 C を形成した。Urushadze ら (2017) は、ジョージアの *Rhinolophus* 属コウモリと *Myotis* 属コウモリから系統 C の *Bartonella* を分離している。同じ系統の *Bartonella* が分離された 2 属のコウモリは、いずれも同一の洞窟で混群して生息していたことから、*Rhinolophus* 属コウモリと *Myotis* 属コウモリの間で *Bartonella* が伝播していた可能性がある。日本、ジョージア、ルーマニアと広範な地域の *Rhinolophus* 属コウモリに系統 C の *Bartonella* が分布している可能性が考えられる一方で、*Myotis* 属のコウモリの 1 例からのみ本系統の *Bartonella* が分離されている事実から、遺伝子型 13 の *Bartonella* は、*Rhinolophus* 属に固有の *Bartonella* であるとともに *Myotis* 属コウモリにもまれに感染することが可能な系統であると考えられた。

系統 G の *Bartonella* は静岡県のももじろコウモリ、北海道のキタクビワコウモリという国内の異なる地域の別種のコウモリから分離され、海外の *Myotis* 属、*Eptesicus* 属を含む *Vespertilionidae* 科のコウモリからも分離されていた。このことから、本系統の *Bartonella* は *Vespertilionidae* 科のコウモリの祖先にあたる哺乳類に感染し、宿主と共進化することで本科のコウモリに広く適応してきたものと推測された。

2.5 小括

国外のコウモリは、ニパウイルス、SARS コロナウイルス、狂犬病ウイルスなど、様々な病原ウイルスを保有していることから、コウモリにおける各種病原体の保有状況の解明が喫緊の課題である。また、コウモリは種々の食中毒菌や、*Leptospira*、*Borrelia*、*Bartonella* などの病原性細菌を保有しているとの報告があるものの、コウモリが保有する病原性細菌についての研究はウイルスに比べると極めて少ない。本章では、わが国の35種のコウモリのうち4種のコウモリを対象として、*Bartonella* 属菌の保菌状況を明らかにするとともに分離株の遺伝子性状を詳細に解析し、わが国のコウモリに分布する *Bartonella* の特性を明らかにした。

2013年3月から2019年8月にかけて、和歌山県田辺市でユビナガコウモリ50頭、北海道二海郡八雲町でキタクビワコウモリ123頭、静岡県富士宮市でキクガシラコウモリ1頭とモモジロコウモリ4頭を捕獲し、その血液から *Bartonella* 属菌の分離を試みた。分離株の *gltA* 遺伝子の塩基配列を用いてBLAST検索を行い、最も近縁な *Bartonella* 属菌と相同性解析を行った。さらに、分離株と既存のコウモリ由来株ならびに *Bartonella* 標準株の *gltA* 遺伝子領域を用いた系統解析によりその宿主特異性の解明を試みた。

和歌山県のユビナガコウモリの24% (12/50)、北海道のキタクビワコウモリの26% (32/123)、静岡県で捕獲したキクガシラコウモリ (N=1)、およびモモジロコウモリ (N=4)のすべての個体から *Bartonella* が分離された。

gltA 遺伝子領域のBLAST解析および系統解析の結果から、ユビナガコウモリ株

は *Miniopterus* 属固有の系統と、日本のユビナガコウモリに固有の系統の *Bartonella* であることが判明した。キタクビワコウモリ株は、げっ歯類およびジネズミ由来 *Bartonella* に近縁なわが国のキタクビワコウモリに固有な系統と、*Vespertilionidae* 科固有の系統の *Bartonella* であることが明らかになった。キクガシラコウモリ株は複数の科のコウモリに感染可能な広い宿主域を有する *Bartonella* であり、モモジロコウモリ株は *Vespertilionidae* 科と *Myotis* 属固有の *Bartonella* であることが明らかとなった。

今回検討したわが国の4種のコウモリは、高率に *Bartonella* を保菌していたことから、本菌の自然宿主であると考えられた。さらに、これらのコウモリは、宿主の科や属に固有の *Bartonella* だけではなく、わが国のコウモリに固有の系統の *Bartonella* を保有していることが明らかとなった。

2.6 第2章で使用した試薬類の組成

*1. *Bartonella* 属菌分離用 Medium 199 の組成

Medium199 (GIBCO 社)	79 ml
100mM MEM Sodium Pyruvate Solution (GIBCO 社)	1 ml
牛胎児血清 (GIBCO 社)	20 ml

上記を混和した後、250ml Filter System (CORNING 社) を用いて濾過滅菌した。

*2. 5% 兎血液加 Heart Infusion Agar (HIA) の組成

Heart Infusion Agar (HIA) (DIFCO 社)	40 g
再精製水	1,900 ml
兎脱繊維血液	100 ml

HIA と再精製水を混和し、加温溶解した後に 121°C で 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、55°C に保存した培地に、兎脱繊維血液 25ml を無菌的に加え、泡立てないように充分混和し、これをシャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*3. *Bartonella* 属菌保存用培地の組成

<i>Bartonella</i> 属菌分離用 Medium 199*1	90 ml
ジメチルスルホキシド	10 ml

上記を無菌的に混和した後、2ml 凍結保存チューブ (住友ベークライト社) に約 1ml ずつ分注した。

*4.エタノール沈殿溶液の組成

99.5%エタノール	31.25 μ l
3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)	1.5 μ l
再精製水	7.25 μ l

第3章

コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターの検討

3.1 はじめに

コウモリにはマダニ、ダニ、ノミ、トコジラミ、クモバエ、コウモリバエなどの多様な吸血性節足動物が寄生していることが知られている。特にクモバエとコウモリバエは、コウモリに固有の吸血性節足動物で、双翅目に属するハエの一種であり、コウモリを吸血して生活している。クモバエ約 280 種のうち 11 種が、コウモリバエ約 230 種のうち 4 種が、それぞれわが国で確認されている (Tadauchi et al., 2000)。また、コウモリを吸血する蚊やサシガメ、サシチョウバエ、クモバエ、ノミ、マダニなどの吸血性節足動物は、コウモリ間や、コウモリからヒトを含む他種の動物へ細菌やウイルス、原虫などの様々な病原体を媒介するベクターとなることが疑われている (Melaun et al., 2014)。

コウモリにおける *Bartonella* の疫学研究から、クモバエとコウモリバエがコウモリ間で *Bartonella* を媒介する主要なベクターであると考えられている (Stuckey et al., 2017a)。その一方で、コウモリに寄生しているトコジラミ、ノミやマダニなどからも *Bartonella* が検出されており、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターについては未だ不明な点も多い (Veikkolainen et al., 2014; Reeves et al., 2005)。

本章では、わが国のバルトネラ症の疫学解明の基礎研究として、ユビナガコウモリ、キタクビワコウモリ、モモジロコウモリに寄生する吸血性節足動物種を明らかにするとともに、それらの吸血性節足動物が各種コウモリ間で *Bartonella* 属菌を媒介するベクターであるかについて細菌学的、分子生物学的に検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 検査材料

2013年3月～2016年10月にユビナガコウモリからクモバエ 281 匹、2017年8月と2018年8月に捕獲したキタクビワコウモリからコウモリノミ 174 匹、およびトコジラミ 2 匹、2018年8月と2019年8月に捕獲したモモジロコウモリからクモバエ 16 匹およびコウモリダニ 4 匹を採取した。なお、第2章で対象としたキクガシラコウモリからは吸血性節足動物は採取されなかった。

3.2.2 コウモリの吸血性節足動物種の同定法

コウモリから採取した吸血性節足動物は実体顕微鏡 (SZX16、オリンパス社) 下でそれぞれの形態を観察し、クモバエは Maa らの報告 (1967) に、ノミは、Sakaguti らの報告 (1962) に、ダニは熊沢と谷地森らの報告 (2005) に、トコジラミは、Monograph of Cimicidae (Usinger, R., 1966) にそれぞれ記載された形態学的特徴に基づいて同定した。

形態学的に同定できなかった吸血性節足動物については、Cytochrome c oxidase subunit I (COI) 遺伝子に基づく分子生物学的同定を試みた (Folmer et al., 1994)。

3.2.3 吸血性節足動物からの Total DNA の抽出法

コウモリから採取した各虫体を 1.5ml 尖底プラスチックチューブに入れ、500 μ l 量の 1% イソジン加 70% エタノール^{*1} を加え 10 分間攪拌して虫体表面を消毒した。消毒

した各虫体を 0.5%牛胎児血清加 0.01M PBS^{*2}を 1ml 加えた尖底プラスチックチューブに移し、転倒混和して洗浄した。次にステンレスビーズ 1 個と 400 μ l 量の SPG^{*3} 溶液を入れた 2.0ml ループ付き凍結保存チューブ (アシスト社)に移し、 μ T-12 (Taitec 社)を用いて 3,000rpm、1 分間粉碎して乳剤化した。乳剤の 100 μ l から InstaGene Matrix kit (Bio Rad 社)を用いて DNA を抽出し、Nuclease-Free Water (以下、NFW)で 20ng/ μ l の濃度に調整した。

3.2.4 吸血性節足動物種の分子生物学的同定法

ユビナガコウモリ由来の *Nycteribia* 属を疑うクモバエは、その形態から種を同定できなかったことから、COI 領域に基づく種の推定を行った (Tortosa et al., 2013)。COI 領域を対象とした PCR は、0.2ml の滅菌した PCR 用マイクロチューブに 20ng/ μ l に調整した DNA 溶液を 1 μ l、10 μ M の各プライマー HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') と LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')を 1 μ l ずつ、Go-Taq Master Mix (Promega 社)を 10 μ l 加え、NFW で全量を 20 μ l に調整した。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ Cで 120 秒間の熱変性処理した後、94 $^{\circ}$ Cで 30 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ Cで 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ Cで 90 秒の伸長の工程を 1 サイクルとし、35 サイクル行った後に、72 $^{\circ}$ Cで 240 秒間の最終伸長反応を行った。なお、陰性対照として NFW を用い同様の条件で PCR を行った。クモバエの COI 領域の塩基配列は 2.2.5~2.2.7 の方法に準拠し、ダイレクトシーケンス法により決定した。

ユビナガコウモリ由来 *Nycteribia* 属のクモバエから得られた遺伝子配列は、国内外の *Nycteribia* 属、*Basilina* 属、*Penicilidia* 属のクモバエ 35 株とともに系統解析ソフトウェア MEGA7 を用いて、最尤法 (Maximum Likelihood method; ML 法) によって系統樹を作成した。

3.2.5 吸血性節足動物からの *Bartonella* DNA の検出法

a) realtime-PCR (インターカレーター法) による *Bartonella* DNA の検出法

吸血性節足動物からの *Bartonella* DNA の検出は、*Bartonella* 属菌の tmRNA (*ssrA*) 領域に特異的なプライマーを用いた realtime-PCR (インターカレーター法) により行った。

ユビナガコウモリ由来クモバエからの *Bartonella* DNA 検出においては 7500 Fast / Real-Time PCR System を用いて Applied Biosystems 社の推奨する方法に準拠した。0.2ml の滅菌した PCR 用マイクロチューブに 20ng/μl に調整した DNA 溶液を 1μl、10μM の各プライマー *ssrA*-F (5'-GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA-3') と *ssrA*-R (5'-GCTTCTGTTGCCAGGTG-3') を 1μl ずつ、Fast SYBR Green Master Mix (Promega 社) を 10μl 加え、NFW で全量を 20μl に調整した。PCR 条件は、95°C で 20 秒間の熱変性処理した後、95°C で 3 秒間の熱変性、60°C で 30 秒間のアニーリング/伸長の工程を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。なお、陽性対照はユビナガコウモリ由来株の *Bartonella* sp. bat2-1 (Nabeshima et al., 2020) から抽出した DNA 溶液を、陰性対照は NFW を用いて同様の条件で PCR を実施した。PCR 反応後に High Resolution Melt Software (Applied Biosystems 社)

を用いて融解曲線分析を行い、 $78\pm 1^{\circ}\text{C}$ で増幅産物の蛍光のピークが確認できたものを陽性とした。

キタクビワコウモリ、モモジロコウモリ由来吸血性節足動物からの *Bartonella* DNA の検出は、Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara Bio 社)を用いた。0.2ml の滅菌した PCR 用マイクロチューブに $20\text{ng}/\mu\text{l}$ に調整した DNA 溶液を $1\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{M}$ の各プライマー *ssrA-F* と *ssrA-R* を $1\mu\text{l}$ ずつ、TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio 社)を $10\mu\text{l}$ 加え、NFW で全量を $20\mu\text{l}$ に調整した。realtime-PCR の反応条件は、Takara Bio 社の推奨する方法に準拠した。すなわち、 95°C で 30 秒間の熱変性処理した後、 95°C で 5 秒間の熱変性、 60°C で 30 秒間のアニーリング/伸長の工程を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。陽性対照は、キタクビワコウモリ由来吸血性節足動物では *Bartonella* sp. EN2-1 株から抽出した DNA 溶液を、モモジロコウモリ由来吸血性節足動物では *Bartonella* sp. F2-1 株から抽出した DNA 溶液を、陰性対照として NFW を用いて同様の条件で PCR を実施した。PCR 反応後に Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio 社)を用いて融解曲線分析を行い、 $80\pm 1^{\circ}\text{C}$ で増幅産物の蛍光のピークが確認できたものを陽性とした。

b) PCR による *Bartonella* DNA の検出法

吸血性節足動物からの *Bartonella* DNA の検出は、*Bartonella* 属菌の *gltA* 領域に特異的なプライマーを用いた方法に PCR 法により行った (2.2.4、2.2.5 の方法に準拠)。

gltA 遺伝子領域の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法により決定した (2.2.6～

2.2.8 の方法に準拠)。また、得られたシーケンスデータを ATGC ソフトウェア (Genetyx 社)を用いて結合する際に、明瞭なダブルピークが確認された検体については、後述のベクターシーケンスを行った。

c) ベクターシーケンス法による *Bartonella* DNA の検出法

① ゲルからの DNA 抽出

3.2.5 b)で行った PCR 反応終了後、染色したゲルから UV 照射下で 380bp 付近の *gltA* 領域と思われる増幅バンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega 社)を用いて DNA を精製した。すなわち、1.5ml 尖底プラスチックチューブに切り出したゲル 10mg あたり 10 μ l 量の Membrane Binding Solution を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、60°Cで 10 分間処理した。次いで、ミニカラムを装着したコレクションチューブに DNA 溶液を移し、室温で 1 分間静置した後、遠心機 5415R (Eppendorf 社)を用いて 15,700 \times g (13,000rpm)、1 分間遠心した。濾液を除去後、ミニカラムに Membrane Wash Solution を 700 μ l 加えて 15,700 \times g (13,000rpm)で 1 分間遠心した。濾液を除去した後に、ミニカラムに Membrane Wash Solution を 500 μ l 加えて 15,700 \times g (13,000rpm)で 5 分間遠心した。ミニカラムを 1.5ml 尖底プラスチックチューブに装着し、NFW を 30 μ l 加えて室温で 1 分間静置した後、15,700 \times g (13,000rpm)で 1 分間遠心し、溶出された溶液を DNA 抽出液とした。

② ライゲーションおよびトランスフォーメーション

ライゲーション反応は、pGEM-T Easy Vector Systems (Promega 社)を用いて行った。PCR 用マイクロチューブ内に、ゲルから抽出した DNA 溶液を 3.5 μ l、Ligation buffer を 5 μ l、pGEM-T Easy Vector を 0.5 μ l、および 3u/ μ l Ligase を 1 μ l それぞれ加えた後、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。ライゲーション反応液 10 μ l とコンピテントセル (大腸菌 DH5 α 株)0.2ml を混和した後、氷上で 30 分間静置し、大腸菌をトランスフォーメーションした。続いて、42 $^{\circ}$ C で 50 秒~1 分間熱ショックを加えた後、氷上に 2 分間静置した。その後、SOC 培地*⁴ 1ml を加え、37 $^{\circ}$ C で 120~150 分間回復培養した。培養後、0.1ml 量の SOC 培地を取り出し、あらかじめ 2% X-Gal (Invitrogen 社)40 μ l および 200mM isopropyl thio- β -galactoside (IPTG、Invitrogen 社)40 μ l を塗付した Ampicillin 含有 Luria Bertani (LBamp)寒天培地*⁵ に塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間、好気培養した。

③ インサートチェック

培養後、LBamp 寒天培地上に発育した白色コロニーを最低 10 株釣菌し、菌体を PCR 反応液に加え、コロニーPCR によってインサートチェックを行った。なお、コロニーPCR には、*gltA* 領域の増幅に用いたプライマーを使用した。

④ プラスミドの増殖およびアルカリ SDS 法によるプラスミド精製

インサートチェックによって陽性と判定されたコロニーを 5 株選抜し、それぞ

れ LBamp 液体培地 3ml^{*6} に接種した後、37°Cで一晩激しく振とう培養した。培養した大腸菌からのプラスミド DNA の抽出は、PureYield Plasmid Miniprep System (Promega 社)を用いて行った。すなわち、遠心機 EX-136 (TOMY 社)を用いて、培養液を 1,930×g (3,000rpm)、10 分間遠心した後、上清を除去し、大腸菌の沈渣に Cell Lysis Solution を 100μl 加えて混和し、全量を 1.5ml 尖底プラスチックチューブに移した。続いて Neutralization Solution を 350μl 加えて転倒混和し、5415R (Eppendorf 社)で 15,700×g (13,000rpm)、3 分間遠心した。ミニカラムを装着したコレクションチューブに上清を移し、15,700×g (13,000rpm)で 1 分間遠心した。濾液を除去し、ミニカラムに Endotoxin Removal Wash を 200μl 加えて 15,700×g (13,000rpm)で 1 分間遠心した。さらに、濾液を除去し、ミニカラムに Column Wash Solution を 400μl 加えて 15,700×g (13,000rpm)で 1 分間遠心した。ミニカラムを 1.5ml 滅菌プラスチックチューブに装着し、NFW を 30μl 加えて室温で 1 分間静置した後、15,700×g (13,000rpm)で 1 分間遠心し、精製したプラスミド DNA 溶液を回収した。プラスミド DNA 溶液の吸光度を波長 260nm で測定し、DNA 濃度が 200ng/μl になるよう調整した。

⑤ インサート DNA の塩基配列の決定

PCR 用マイクロチューブにプラスミド DNA 溶液を 1μl、1.6μM のベクターシーケンス用プライマー (SP6 プライマー : 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'、あるいは、T7 プライマー : 5'-AATACGACTCACTATAGGG-3')を 1μl、NFW を 5.5μl、BigDye (Applied

Biosystems 社)を 1 μ l、Sequence buffer (Applied Biosystems 社)を 1.5 μ l 加えて充分混和した。サイクルシーケンス反応は、96°Cで 30 秒間の熱変性、50°Cで 15 秒間のアニーリング、および 60°Cで 4 分間の伸長反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。反応終了後、エタノール沈殿溶液 40 μ l を反応液に加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、室温で 15 分間静置した。遠心機 5415R (Eppendorf 社)を用いて 15,700 \times g (13,000rpm)、20 分間遠心した後、上清を除去して、70%エタノールを 250 μ l 加え、さらに 15,700 \times g (13,000rpm)で 5 分間遠心した。再度、上清を除去し、50°Cで 10 分間静置した後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 社)を 15 μ l 加え、2 分間煮沸した直後、チューブを氷上で 5 分間静置した。全量を DNA シーケンス用 96 穴プレートに移し、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem 社)を用いて各 PCR 産物の塩基配列を決定した。

3.2.6 吸血性節足動物からの *Bartonella* の分離培養法

1 検体につき、3.2.3 で調整した 100 μ l 量の乳剤を 2 枚の 5%兔血液加 Heart Infusion Agar (HIA)にそれぞれ塗抹し、35°C、5%CO₂ の気相で約 1 カ月間培養した。培養期間中、2~3 日おきに培地上のコロニーの発育を観察した。*Bartonella* 属菌を疑うコロニーが発育した各検体から無作為にコロニーを 3 個釣菌し、初代培養と同じ条件で純培養を行った。各分離株を *Bartonella* 属菌保存用培地に接種し、各種解析まで-70°Cのディープフリーザーに凍結保存した。

分離株の *gltA* および *rpoB* 領域の検出並びに塩基配列の決定は 2.2.4~2.2.8 の方

法に準拠して、ダイレクトシーケンス法により行った。

3.2.7 吸血性節足動物由来 *Bartonella* の遺伝子型別法

得られた塩基配列データをコウモリ分離株の塩基配列とともに Clustal W を用いてマルチプルアラインメントを行った。マルチプルアラインメントした *Bartonella* DNA は、Genetyx software (Genetyx 社)を用いて *gltA* 配列に基づく遺伝子型別を行い、各遺伝子型から代表株を選抜した。新規の遺伝子型が検出された場合、代表株の *gltA* 領域の塩基配列から BLAST 検索を行い、最も近縁な *Bartonella* 属菌株との相同性を検討した。

3.2.8 吸血性節足動物由来 *Bartonella* の系統解析法

本研究で分離された吸血性節足動物株の *gltA* 領域の塩基配列について、国外のコウモリおよびコウモリの吸血性節足動物由来 *Bartonella* の計 420 株、国内のコウモリ由来 13 株、および *Bartonella* 標準株 35 株の各 *gltA* 領域の塩基配列とともに系統解析を行った。系統樹は系統解析ソフトウェア MEGA7 を用いて、最尤法 (Maximum Likelihood method; ML 法)によって作成した。

3.3 成績

3.3.1 吸血性節足動物種の同定

ユビナガコウモリから採取したクモバエ 281 匹は、形態学的に *Nycteribia* spp. (N=236; 図 3.1-A)と *Penicillidia jenynsii* (N=45; 図 3.1-B)に同定された。形態学的に種の同定できなかった *Nycteribia* spp. を、COI 領域の塩基配列に基づいて遺伝子型別した結果、*Nycteribia* spp. は 33 の Haplotype に分類された。COI 領域の系統解析では、ユビナガコウモリ由来の *Nycteribia* spp. は *N. allotopa* クレードと既存種に該当しない *Nycteribia* sp. クレードに分類された (図 3.2)。これらの成績から、ユビナガコウモリ由来の *Nycteribia* spp. は、*Nycteribia allotopa* (N=157)と新種と考えられる *Nycteribia* sp. (N=79)に同定された。

キタクビワコウモリから採取した 174 匹のノミは、形態学的にコウモリノミ (*Ischnopsyllus needhami*; 図 3.1-C)、2 匹のトコジラミは *Cimex japonicus* (図 3.1-D)に同定された。

モモジロコウモリから採取した 16 匹のクモバエは、形態学的に *N. pygmaea* (N=16; 図 3.1-E)、4 匹のダニは *Spinturnix myoti* (N=4; 図 3.1-F)と同定された (表 3.1)。

表 3.1 コウモリから採取された吸血性節足動物種と個体数

宿主	吸血性節足動物の種類	個体数
ユビナガコウモリ	<i>Nycteribia allotopa</i>	157
	<i>Nycteribia</i> sp.	79
	<i>Penicillidia jenynsii</i>	45
キタクビワコウモリ	<i>Ischnopsyllus needhami</i>	174
	<i>Cimex japonicus</i>	2
モモジロコウモリ	<i>Nycteribia pygmaea</i>	16
	<i>Spinturnix myoti</i>	4

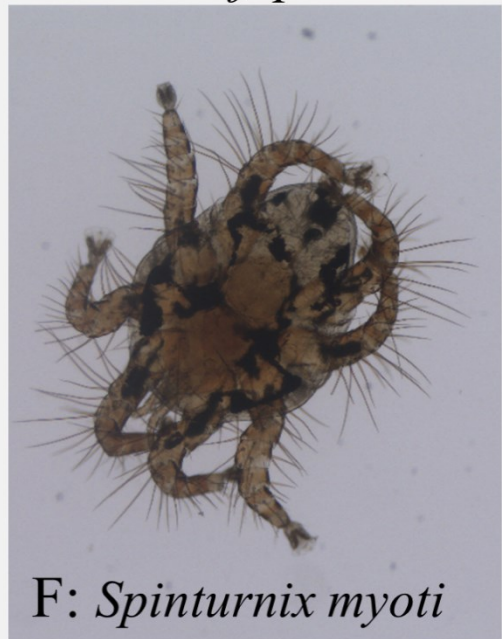


図 3.1 コウモリから採取された吸血性節足動物

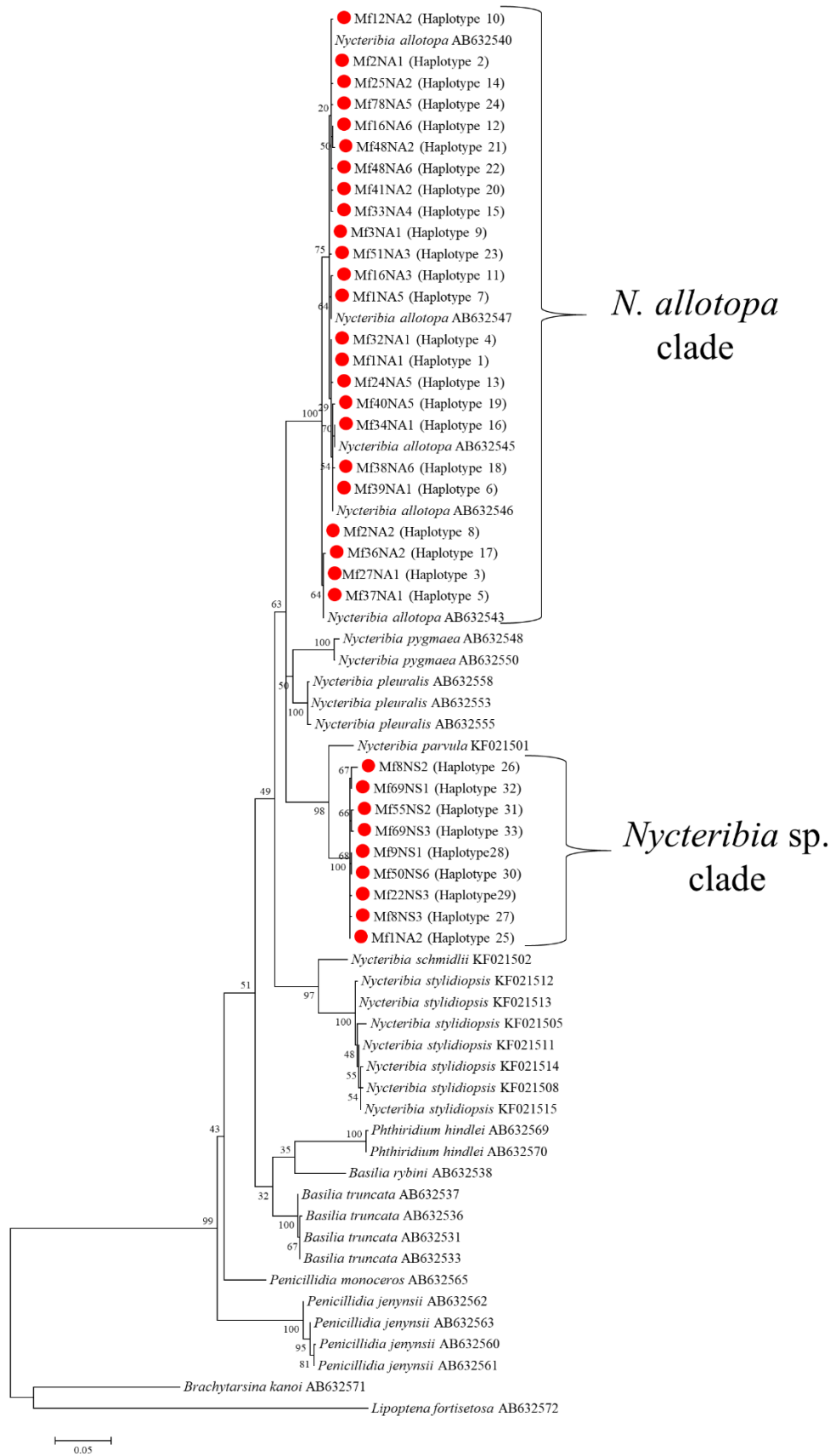


図 3.2 COI 遺伝子領域に基づく系統樹

ユビナガコウモリ由来 *Nycteribia* 属クモバエ 33 株、国内外の *Nycteribia* 属、*Basilis* 属、*Penicilidia* 属のクモバエ 35 株、およびアウトグループとして *Brachytarsina kanoi* および *Lipoptena fortisetosa* を含む。赤丸は本研究で得られた検体を示す。

3.3.2 吸血性節足動物からの *Bartonella* の検出状況

ユビナガコウモリから採取した *N. allotopa* の 47.1% (74/157)、*Nycteribia* sp. の 15.2% (12/79)、*P. jenynsii* の 6.7% (3/45)からそれぞれ *Bartonella* DNA が検出された。*N. allotopa* の *Bartonella* DNA 陽性率は他 2 種と比較して有意 ($p<0.01$)に高い値であった。また、*N. allotopa* 2 検体、*Nycteribia* sp. 1 検体からそれぞれ *Bartonella* 属菌が分離された。

キタクビワコウモリの吸血性節足動物 *I. needhami* の 46% (80/174)から *Bartonella* DNA が検出され、1 検体から *Bartonella* 属菌が分離された。*C. japonicus* からは *Bartonella* の検出、分離ともに陰性であった。

モモジロコウモリから採取した *N. pygmaea* では 43.8% (7/16)、*S. myoti* の 25% (1/4)から *Bartonella* DNA が検出されたが、両寄生虫から *Bartonella* 属菌は分離されなかった。

表 3.2 コウモリ由来吸血性節足動物からの *Bartonella* の保菌状況

吸血性節足動物の種類	個体数	<i>Bartonella</i> 陽性率 (陽性数)	
		DNA	分離
<i>N. allotopa</i>	157	47.1% (74)	1.3% (2)
<i>Nycteribia</i> sp.	79	15.2% (12)	1.2% (1)
<i>Penicillidia jenynsii</i>	45	6.7% (3)	0
<i>Ischnopsyllus needhami</i>	174	46% (80)	0.6% (1)
<i>Cimex japonicus</i>	2	0	0
<i>N. pygmaea</i>	16	43.8% (7)	0
<i>Spinturnix myoti</i>	4	25% (1)	0

3.3.3 吸血性節足動物由来 *Bartonella* の遺伝子型別

ユビナガコウモリ由来の *N. allotopa* からは、遺伝子型 1、2、3、4 と新規の遺伝子型 14、15、16、17、19、20、21、*Nycteribia* sp.からは遺伝子型 1、14、16、*P. jenynsii* からは遺伝子型 17、18 の *Bartonella* DNA がそれぞれ検出された。また、*N. allotopa* および *Nycteribia* sp. 分離株はいずれも遺伝子型 1 に分類された。

キタクビワコウモリの吸血性節足動物 *I. needhami* からは、遺伝子型 6、7、8 の *Bartonella* DNA が検出された。174 検体のうち 2 検体は遺伝子型 6 と 7 を、1 検体は遺伝子型 6 と 8 を、2 検体は遺伝子型 7 と 8 の *Bartonella* DNA を保有していた。*I. needhami* 分離株は遺伝子型 6 に分類された。

モモジロコウモリの吸血性節足動物 *N. pygmaea* からは、遺伝子型 10、22、23、24、*S. myoti* からは遺伝子型 9 の *Bartonella* DNA が検出された (表 3.3)。

BLAST 検索の結果、新規の遺伝子型 14、16、19、20、21 は日本のユビナガコウモリ分離株と、遺伝子型 15、18 はルーマニアのユビナガコウモリから採取された *Nycteibia* 属のクモバエ由来株と、遺伝子型 17 はドーベントンコウモリに寄生していた *Nycteibia* 属のクモバエ由来株とそれぞれ最も高い相同性を示した。また、遺伝子型 22、23、24 は、それぞれ異なる中国の *Myotis* 属コウモリ由来株と最も高い相同性を示した (表 3.4)。

表 3.3. 吸血性節足動物種別に見た *Bartonella* の遺伝子型とその検体数

遺伝子型	代表株	吸血性節足動物 の種類	検体数
1	bat2-1	<i>Nycteribia</i> sp.	10
		<i>N. allotopa</i>	41
2	bat23-1	<i>N. allotopa</i>	3
3	bat8-3	<i>N. allotopa</i>	2
4	bat43-1	<i>N. allotopa</i>	2
5	bat24-1	ND	0
6	EN2-1	<i>I. needhami</i>	43
7	EN19-2	<i>I. needhami</i>	21
8	EN36-1	<i>I. needhami</i>	10
6+7*		<i>I. needhami</i>	2
6+8*		<i>I. needhami</i>	1
7+8*		<i>I. needhami</i>	2
9	F2-1	<i>S. myoti</i>	0
10	F3-2	<i>N. pygmaea</i>	1
11	F4-1	ND	3
12	F5-1	ND	0
13	F1-1	ND	0
14	Mf9NS	<i>Nycteribia</i> sp.	9
		<i>N. allotopa</i>	1
15	Mf12NA	<i>N. allotopa</i>	1
16	Mf37NS3	<i>Nycteribia</i> sp.	11
		<i>N. allotopa</i>	1
17	Mf16PJ1	<i>N. allotopa</i>	1
		<i>P. jenynsii</i>	2
18	Mf26PJ3	<i>P. jenynsii</i>	1
19	Mf49NA3	<i>N. allotopa</i>	1
20	Mf51NA4	<i>N. allotopa</i>	1
21	Mf53NA3	<i>N. allotopa</i>	2
22	F2-e2	<i>N. pygmaea</i>	1
23	F4-e1	<i>N. pygmaea</i>	2
24	F4-e3	<i>N. pygmaea</i>	1

ND : Not detected * : 2つの遺伝子型の *Baratonella* を有していた個体

表 3.4. 新規遺伝子型の *Bartonella* の BLAST 検索による類縁菌との相同性

遺伝子型	代表株	BLAST 検索結果		
		株名 (相同性値 ; %)	Accession No.	宿主 (由来国名)
14	Mf9NS	<i>Bartonella</i> sp. bat2-1 (99.7)	LC483820	ユビナガコウモリ (日本)
15	Mf12NA	<i>Bartonella</i> sp. 34CJ563739 (98.22)	MK140329	<i>Miniopterus schreibersii</i> 由来 <i>N. schmidlii</i> (ルーマニア)
16	Mf37NS3	<i>Bartonella</i> sp. bat2-1 (99.7)	LC483820	ユビナガコウモリ (日本)
17	Mf16PJ1	<i>Bartonella</i> sp. 74CJ1294182 (96.75)	MK140270	<i>Myotis daubentonii</i> 由来 <i>N. kolenatii</i> (ルーマニア)
18	Mf26PJ3	<i>Bartonella</i> sp. 34CJ563739 (97.93)	MK140329	<i>Miniopterus schreibersii</i> 由来 <i>N. schmidlii</i> (ルーマニア)
19	Mf49NA3	<i>Bartonella</i> sp. bat2-1 (99.7)	LC483820	ユビナガコウモリ (日本)
20	Mf51NA4	<i>Bartonella</i> sp. bat43-1 (99.7)	LC483824	ユビナガコウモリ (日本)
21	Mf53NA3	<i>Bartonella</i> sp. bat23-1 (99.7)	LC483822	ユビナガコウモリ (日本)
22	F2-e2	<i>Bartonella</i> sp. SD-117/2015 (95.96)	KX655835	<i>Myotis pequinius</i> (中国)
23	F4-e1	<i>Bartonella</i> sp. SD-109/2015 (96.84)	KX655842	<i>Myotis pequinius</i> (中国)
24	F4-e3	<i>Bartonella</i> sp. SD-74-2/2015 (99.4)	KX655808	<i>Myotis fimbriatus</i> (中国)

3.3.4 吸血性節足動物由来 *Bartonella* の *gltA* 配列に基づく系統解析

新規の遺伝子型である遺伝子型 14、16、19、20、21 は日本のユビナガコウモリ由来株とともに系統 A に、遺伝子型 17 は日本のモモジロコウモリ由来株とともに系統 B に、遺伝子型 24 は日本のモモジロコウモリ由来株とともに系統 D に分類された。一方、遺伝子型 23 は *Myotis* 属由来株、*Myotis* 属コウモリに寄生していた *Nycteribia* 属のクモバエ由来株、並びに *Rhinolophus* 属由来株とともに新規の系統 H に、遺伝子型 22 は新規の系統 I に、遺伝子型 15、18 は *Miniopterus* 属、*Myotis* 属、*Pipistrellus* 属由来株と、*Myotis* 属に寄生していた *Nycteribia* 属のクモバエ由来株とともに、新規の系統 J に分類された (図 3.3)。

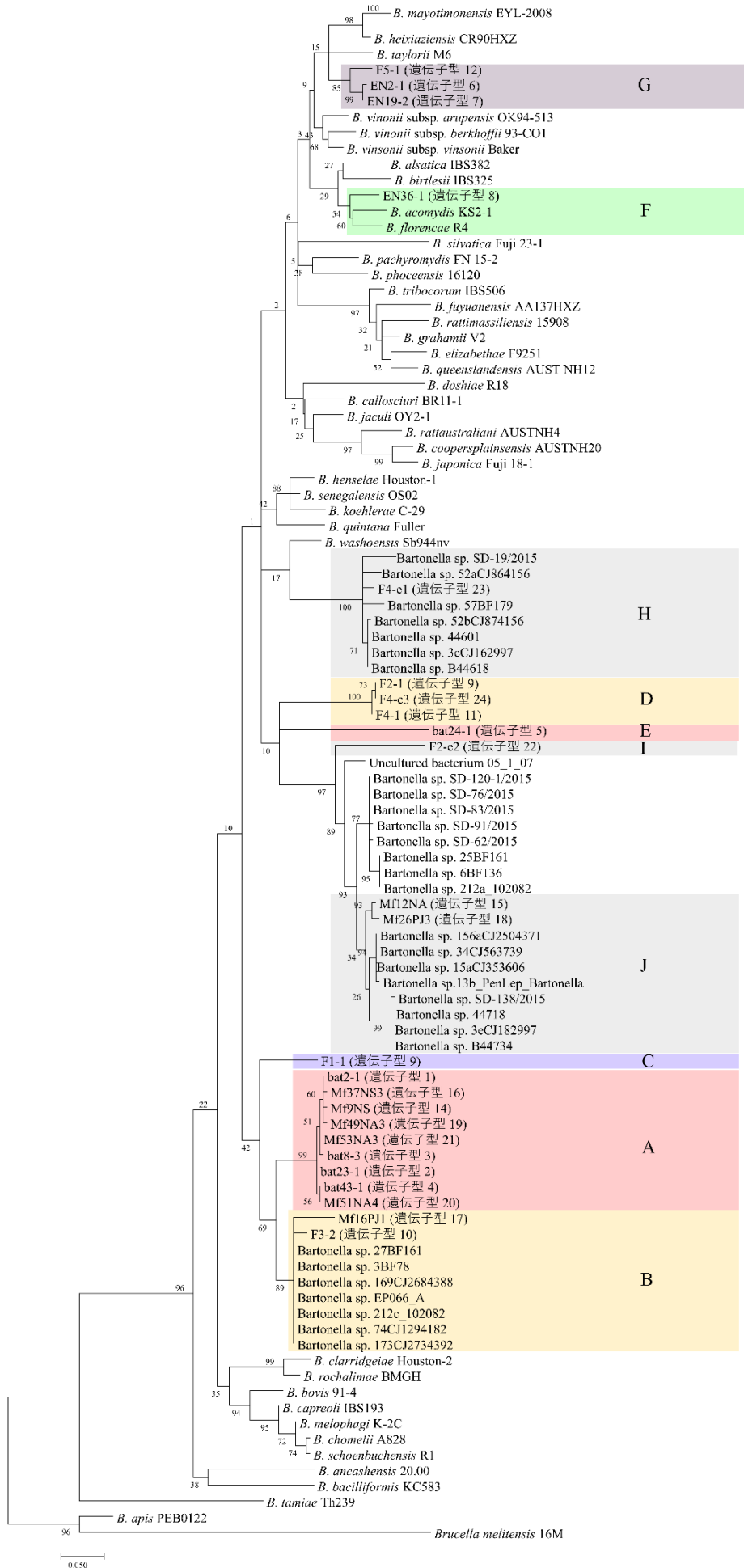


図 3.3 *gltA* 遺伝子領域に基づく系統樹

本図はコウモリとその吸血性節足動物由来 *Bartonella* 420 株、*Bartonella* の標準株 35 株、および本研究代表株 24 株 (遺伝子型 1~24)を含めた系統樹を作成した後に、本研究代表株と同一のクレードを形成した株を抽出し、再解析した系統樹を記載した。A~H は、それぞれ本研究で得られた株の属する系統を示す。

3.4 考察

過去の研究では、和歌山県田辺市のユビナガコウモリにはクモバエの *N. allotopa* と *P. jencyii* が寄生していたことが報告されている (Nikoh et al., 2011)。本研究では、和歌山県田辺市に生息していたユビナガコウモリには、*N. allotopa*、*P. jencyii* に加え、新種と思われる *Nycteribia* sp. が寄生していることが明らかとなった。今回、形態学的な同定だけでなく COI 領域に基づく系統解析を行ったことで、これまで同定されなかった *Nycteribia* sp. を新たに発見できた。

これまでわが国のキタクビワコウモリにおける吸血性節足動物について報告した研究は無い。今回、初めてわが国のキタクビワコウモリにコウモリノミ (*I. needhami*) とトコジラミ (*C. japonicus*) が寄生していたことが明らかとなった。特に、今回検討した道南部に生息するキタクビワコウモリでは、コウモリノミが主要な外部寄生虫であった。アメリカ、モンゴルの同種のコウモリではコウモリノミ (*Ischnopsyllus* spp. および *Myodopsylla borealis*)、トコジラミ (*Cimex* spp.)、ダニ (*Carios kelleyi*)、およびクモバエ (*Basilina forcipata*) が寄生していたことが報告されている (Orlova, 2011; Pearce and O'shea., 2007)。しかしながら、今回検討したキタクビワコウモリからダニやクモバエは採取されなかったことから、*Eptesicus* 属のコウモリの外部寄生虫相はその生息地域によって異なると考えられた。

これまでの研究では、北海道、三重県、および高知県のモモジロコウモリからクモバエの *N. pygmaea* とダニの *S. myoti* が採取されている (Nikoh et al., 2011; 熊沢ら.,

2005)。本研究では静岡県のコウモリから *N. pygmaea* と *S. myoti* が採取されたことから、国内のコウモリには *N. pygmaea* と *S. myoti* が広く分布しているものと思われた。

ユビナガコウモリでは *N. allotopa* の *Bartonella* DNA 陽性率 (47.1% ; 74/157) が *Nycteribia* sp. (15.2%; 12/79)、*P. jenynsii* (6.7%; 3/45) の値と比較して有意に高かった。さらに、*Nycteribia* sp. と *N. allotopa* は宿主のコウモリと同じ遺伝子型の *Bartonella* (遺伝子型 1、2、3、および 4) をそれぞれ保有していたが、*P. jenynsii* は宿主コウモリと共通の遺伝子型を保有していなかった。本来、*Bartonella* は哺乳類の血管内皮細胞や赤血球内に寄生し、増殖する細菌であるが、*Nycteribia* sp. の 1 検体と *N. allotopa* の 2 検体から遺伝子型 1 の *Bartonella* が分離されたことから、*Nycteribia* 属のクモバエの体内においても *Bartonella* は生存している可能性が考えられた。これらの本研究の結果から、初めてユビナガコウモリにおいては *Nycteribia* 属のクモバエが *Bartonella* を媒介するベクターであり、特に *N. allotopa* は主要なベクターである可能性が強く示唆された。

キタクビワコウモリでは、コウモリノミからのみ *Bartonella* DNA が検出され、その陽性率は 46% (80/174) であった。コウモリノミは宿主であるキタクビワコウモリと同じ遺伝子型 6、7、8 の *Bartonella* を保有しており、その他の遺伝子型の *Bartonella* は検出されなかった。また、5 匹のコウモリノミが複数の遺伝子型の *Bartonella* を保有していたこと、宿主であるキタクビワコウモリには複数の遺伝子型の *Bartonella* に共感染していた個体は確認されなかったことから、コウモリノミはキタクビワコウモリのコロ

ニーを構成していた複数の個体を吸血していたものと考えられた。本研究において、キタクビワコウモリからコウモリノミ、トコジラミ以外の吸血性節足動物が採取されなかったこと、*Bartonella* DNA の陽性率と保有する *Bartonella* の遺伝子型から、キタクビワコウモリ間で *Bartonella* を媒介する主要なベクターは、コウモリノミである可能性が初めて強く示唆された。

モモジロコウモリでは、コウモリダニの 25% (1/4) 、*N. pygmaea* の 43.8% (7/16) から *Bartonella* DNA が検出されたものの、両種から *Bartonella* は分離されなかった。コウモリダニと *N. pygmaea* は宿主であるモモジロコウモリと同じ遺伝子型 9 と 10 の *Bartonella* をそれぞれ保有していた。このことから、両種はモモジロコウモリにおける *Bartonella* のベクターである可能性が示された。しかしながら、モモジロコウモリ、*N. pygmaea*、コウモリダニの検体数はそれぞれ 4 頭、16 匹、4 匹と少なかった。今後はさらに検体数を増やし、これらの吸血性節足動物がモモジロコウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターであるかを詳細に検討をする必要がある。

遺伝子型 14 から 24 の *Bartonella* は、ユビナガコウモリとモモジロコウモリに寄生していた *Nycteribia* sp.、*N. allotopa*、*N. pygmaea*、*P. jenynsii* から検出されたのに対し、宿主のコウモリからは検出されなかった。Morse ら (2012) は、日本以外の 16 か国のクモバエが保有する *Bartonella* の多様性は宿主コウモリが保有する *Bartonella* の多様性と比べて高いこと、また、クモバエには宿主コウモリが保有していない遺伝子型の *Bartonella* が分布していたことを報告している。本研究でも Morse らの報告と同様に、ユビナガコ

ウモリとモモジロコウモリに寄生するクモバエから各コウモリが保有する遺伝子型以外の *Bartonella* が検出されたことから、クモバエには多様かつクモバエに特異的な *Bartonella* が分布していると考えられた。

系統解析では、遺伝子型 14、16、19、20、21 の *Bartonella* はユビナガコウモリ由来株 (遺伝子型 1~4)と同じ系統 A に属したことから、これらの遺伝子型に属する株はユビナガコウモリに固有の同種の *Bartonella* であると考えられた。また、遺伝子型 24 はモモジロコウモリ由来株 (遺伝子型 10、12)と同じ系統 D に属したことから、これらの株はモモジロコウモリに固有の *Bartonella* であると考えられた。ユビナガコウモリに寄生していた *P.jenynsii* から検出された遺伝子型 17 は、モモジロコウモリ由来株である遺伝子型 11 および海外の *Myotis* 属コウモリから採取された *Nycteribia* 属のクモバエ由来株とともに系統 B に分類された。Urushadze ら (2017)は、同じ場所で捕獲した複数種のコウモリが共通の種の *Bartonella* を保有していたことから、異種コウモリ間でクモバエなどの吸血性節足動物が *Bartonella* を媒介している可能性を報告している。このことから、系統 B の株はユビナガコウモリだけでなく、*Myotis* 属コウモリにも感染可能な広い宿主域を有する可能性が示された。遺伝子型 15、18 は新規の系統 J、遺伝子型 22 は新規の系統 I、遺伝子型 23 は新規の系統 H にそれぞれ分類された。系統 J にはユビナガコウモリに寄生していたクモバエの *N. allotopa*、*P. jenynsii* 由来株と国外の *Nycteribia*、*Penicilidia* 属のクモバエ由来株、および *Myotis* 属、*Pipistrellus* 属のコウモリ由来株が分類されていることから、本系統の株はコウモリやクモバエに広く分布している *Bartonella*

であると考えられた。一方、系統 I は、近縁な *Bartonella* が存在しない単系統を形成したことから、わが国の *N. pygmaea* に固有な系統の株であると考えられた。系統 H は主に *Myotis* 属コウモリとそれらのコウモリに寄生していたクモバエ由来株で構成されたことから、本系統の *Bartonella* は *Myotis* 属のコウモリに固有の系統であると思われる。しかしながら、本系統の株は日本のモモジロコウモリからは分離されなかった。本研究のモモジロコウモリの捕獲数は4頭と少なかったことから、今後さらに検体数を増やし、日本のモモジロコウモリにも分布している可能性を検討する必要がある。

3.5 小括

コウモリには、多様な吸血性節足動物が寄生しており、そのうちのいくつかは *Bartonella* を含む病原体を媒介するベクターとして機能していると考えられている。これまでの報告から、コウモリに特異的な外部寄生虫であるクモバエやコウモリダニ、コウモリノミなどがコウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターであると考えられているが、未だその詳細は明らかにされていない。本章では、第2章で研究対象としたユビナガコウモリ、キタクビワコウモリ、モモジロコウモリから採取した吸血性節足動物について、それぞれのコウモリ種間で *Bartonella* を媒介するベクターとしての可能性について細菌学的・分子生物学的な検討を行った。

ユビナガコウモリからは、クモバエが 281 匹採取され、形態学的・分子生物学的に *Nycteribia allotopa* (N=157)、*Nycteribia* sp. (N=79)、*Penicillidia jenynsii* (N=45) と同定された。また、*Nycteribia* sp. は *COI* 遺伝子の系統解析で、既存種とは異なる系統となったことから、新種のクモバエである可能性が示された。キタクビワコウモリからは、174 匹のノミと 2 匹のトコジラミが採取され、ノミは *Ischnopsyllus needhami*、トコジラミは *Cimex japonicus* と同定された。モモジロコウモリからは、16 匹のクモバエと 2 匹のダニが採取され、クモバエは *N. pygmaea* (N=16)、ダニは *Spinturnix myoti* (N=4) と同定された。以上の結果から、コウモリの種ごとに異なる外部寄生虫相が形成されていることが明らかとなった。

吸血性節足動物種ごとの *Bartonella* DNA の陽性率は、ユビナガコウモリ由来の

N. allotopa で 47.1% (74/157)、*Nycteribia* sp. で 15.2% (12/79)、*P. jenynsii* で 6.7% (3/45)で、*N. allotopa* の陽性率は *Nycteribia* sp. および *P. jenynsii* の値に比べて有意 ($p < 0.01$) に高かった。キタクビワコウモリ由来コウモリノミの *Bartonella* DNA 陽性率は 46% (80/174) であったが、トコジラミからは検出されなかった。モモジロコウモリ由来 *N. pygmaea* の *Bartonella* DNA 陽性率は 43.8% (7/16)、*S. myoti* では 25% (1/4) であった。

吸血性節足動物のうち、*N. allotopa* 2 匹、*Nycteribia* sp. 1 匹、コウモリノミ 1 匹から *Bartonella* が分離されたことから、これらの *Bartonella* は哺乳類の血管内皮や赤血球以外でも、*Nycteribia* 属のクモバエやコウモリノミの体内においても生存可能であることが示唆された。

吸血性節足動物由来 *Bartonella* DNA の *gltA* 領域の塩基配列を宿主のコウモリ由来株とともに相同性解析を行ったところ、*N. allotopa* は宿主のユビナガコウモリ由来株と同じ遺伝子型である遺伝子型 1、2、3、4 を、*Nycteribia* sp. は遺伝子型 1 を保有していた。*P. jenynsii* 由来株は既存の遺伝子型に分類されなかった。キタクビワコウモリに寄生していたコウモリノミ由来株の遺伝子型は 6、7、8 で、宿主コウモリ由来株と同じ遺伝子型の *Bartonella* を保有していた。*S. myoti* 由来株の遺伝子型は 9、*N. pygmaea* 由来株の遺伝子型は 10 で、いずれもモモジロコウモリ由来株と同じ遺伝子型の *Bartonella* であった。宿主コウモリから分離された遺伝子型の *Bartonella* と吸血性節足動物から検出された *Bartonella* DNA の陽性率と遺伝子型から、ユビナガコウモリにおいては *Nycteribia* 属のクモバエが、キタクビワコウモリにおいてはコウモリノミが主要な *Bartonella* のベク

ターであると考えられた。また、モモジロコウモリでは *N. pygmaea* と *S. myoti* の双方が *Bartonella* のベクターである可能性が考えられた。

3.6 第3章で使用した試薬類の組成

*1. 1%イソジン加 70%エタノール

99.5% エタノール	35 ml
滅菌再精製水	14.5 ml
イソジン	0.5 ml

*2. 0.5%牛胎児血清加 0.01M PBS

0.01M リン酸緩衝生理食塩水	49.75 ml
牛胎児血清 (GIBCO 社)	0.25 ml

*3. SPG (Sucrose Phosphate Glutamate)の組成

スクロース (和光純薬工業社)	37.5 g
リン酸二水素カリウム (和光純薬工業社)	0.26 g
リン酸水素二カリウム (和光純薬工業社)	0.61 g
グルタミン酸 (和光純薬工業社)	0.36 g

上記を 450ml 滅菌再精製水に溶解し、pH を 7.4~7.6 に調整した。溶解液を 500ml までメスアップした後、250ml Filter System (CORNING 社)を用いて濾過滅菌した。

*4. SOC 培地

Bacto Tryptone (DIFCO 社)	20 g
Bacto Yeast extract (DIFCO 社)	5 g
5M 塩化ナトリウム (和光純薬工業社)	2 ml
2M 塩化カリウム (和光純薬工業社)	1.25 ml

上記を全量 1,000ml になるように再精製水で溶解した。加温後、121°C で 15 分間滅菌した (SOB 培地)。使用前に、SOB 培地 1ml に対し、2M マグネシウム溶液を 10 μ l と 2M グルコースを 10 μ l それぞれ加えた。

*5. Ampicillin 含有 LB 寒天培地

LB AGAR (Invitrogen 社)	16 g
アンピシリン (50mg/ml)	0.5 ml

LB AGAR (Invitrogen 社)の 16g を再精製水で 500ml にメスアップして混和し、オートクレーブ滅菌後、55°C に保温した培地に 50mg/ml のアンピシリン溶液を 500 μ l 加え、滅菌シャーレに約 20ml ずつ分注し、静置して固めた。

*6. Ampicillin 含有 LB 液体培地

LB BROTH BASE (Invitrogen 社)	11 g
アンピシリン (50mg/ml)	0.5 ml

LB BROTH BASE (Invitrogen 社)の 11g を再精製水で 500ml にメスアップして混和し、オートクレーブ滅菌後、55°C に冷却した培地に 50mg/ml のアンピシリン溶液を 500 μ l 加え、冷蔵保存した。

第4章

コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析による病原因子と宿主における感染機序の解明

4.1 はじめに

Bartonella 属菌は宿主の血管内皮細胞と赤血球内に寄生する細菌であり、その病原性発現や持続感染を成立させるまでの機序は未知の部分が多い。*Bartonella* は昆虫の共生細菌から哺乳類に感染するように進化したと考えられており (Bisch et al., 2018)、進化の過程で、①宿主への感染因子である鞭毛、②宿主血管内皮細胞へエフェクタータンパクを注入する IV 型分泌機構 (T4SS; Type IV secretion system) として、Vbh T4SS、VirB/D4 T4SS、および③赤血球の接着に関与する Trw T4SS を獲得、もしくは欠失しながら進化してきたと考えられている (Wagner et al., 2019)。これまで、Harms ら (2017b) が行った 509 個のコアゲノムを用いた系統解析により、*Bartonella* 属菌は鞭毛を保有する *B. bacilliformis* と *B. ancashensis* を含む Lineage 1、鞭毛を持ち Vbh T4SS を保有する反芻獣由来 *Bartonella* によって構成される Lineage 2、鞭毛を保有し、Vbh T4SS を持たず VirB/D4 T4SS を保有する食肉目・げっ歯類由来 *Bartonella* によって構成される Lineage 3、鞭毛と Vbh T4SS を持たず VirB/D4 と Trw T4SS を保有する Lineage 4 に分類されることが報告されている。しかし、多くのコウモリから *Bartonella* が分離されているものの、コウモリ由来株がどの系統に属するかは、明らかとなっていない。

最も代表的な病原性 *Bartonella* である *B. henselae* は、以下の機序でネコに持続感染を成立すると考えられている。まず、ネコの体表において、ネコノミの糞便中に排出された *B. henselae* がグルーミングの際にノミの刺咬部位から、真皮中の樹状細胞に感染する。その後、感染した菌は樹状細胞から血管内皮細胞に移行し、そこで増殖する。次

いで、血管内皮細胞から血管内腔に遊離し、赤血球に接着・侵入することで菌血症を引き起こし、再びネコノミに吸血されることで繰り返し感染が成立する (Harms, A. and Dehio, C., 2012)。これらの各感染ステージでは、種々の病原因子が関与していることが明らかとなっている。*Bartonella* 属菌の主要な病原因子として、宿主血管内皮細胞へエフェクタータンパクを注入する機構である IV 型分泌機構 (T4SS) が知られている。このエフェクタータンパクとして、血管内皮細胞に作用しインバソーム構造の形成や抗アポトーシス作用を引き起こすことで菌体の血管内細胞への侵入および維持を補助している *Bartonella* effector proteins (Beps) が報告されている (Harms, A. and Dehio, C., 2012)。また、宿主の血管内皮細胞への接着には *badA* (Kaiser et al., 2008; Riess et al., 2007)、*omp43* (Burgess et al., 2000)、*omp89* (Dabo et al., 2006) が、マクロファージの貪食作用に対する抵抗性には *vapA* が、宿主赤血球中へムタンパクの取り込み・利用には *hbps* が、宿主赤血球への接着・侵入には *trw*、*ialB* の各遺伝子が作用し、宿主における *Bartonella* の持続感染を成立させていることが報告されている (Battisti et al., 2007; Deng et al., 2012, 2018; Coleman, S. A. and Minnick, M. F., 2001; Schmiederer et al., 2001)。従って、これらの遺伝子を解析することにより、宿主における *Bartonella* の病原性発現や、持続感染の機序を評価・推定することが可能であると考えられる (Tay et al., 2016)。第 1 章でも述べたように、*Eptesicus* 属および *Myotis* 属コウモリ由来の *B. mayotimonensis* は、ヒトに対して病原性を有することが示唆されている。しかしながら、わが国のコウモリ由来株を含むコウモリが保有する *Bartonella* の病原因子や病原関連遺伝子については全く検討されていない

い。

本章では、第2章で分離したコウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析を行うことにより、コウモリ由来株の病原関連遺伝子の保有状況を明らかにするとともに、猫ひっかき病の原因菌である *B. henselae* と比較検討することで、コウモリ由来 *Bartonella* の病原性ならびに持続感染の機序を推定・評価した。

4.2 材料および方法

4.2.1 検査材料

2.2.2 で保存していた菌株のうち、bat2-1、bat24-1、EN2-1、EN36-1、F1-1、F2-1、F3-2 を、5% 兔血液加 HIA 培地に塗抹し、35°C、5%CO₂ の気相で 10~21 日間培養をした (表 2.4 を参照)。

4.2.2 分離株からの DNA 抽出

培養した各分離株を、滅菌 PBS 1ml を加えた 1.5ml 尖底プラスチックチューブの中で混和し、OD₆₀₀=1 の濁度に調整した。ボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、14,400×g (12,000rpm) で 5 分間遠心洗浄し、上清を除去した後、DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen 社) の Buffer ATL を 180μl 添加した。充分混和した後に、Proteinase K 20 μl を添加し、56°C、30 分間加熱処理した。ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌した後、200 μl の Buffer AL をサンプルに添加して 10 秒間攪拌した後、200 μl の 99.5%エタノールを添加して 10 秒間攪拌した。混合液を、新しい 2 ml コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000×g (5,000rpm) で 1 分間遠心操作した後にろ液およびコレクションチューブを捨てた。DNeasy Mini Spin Column を新たな 2 ml コレクションチューブに移し、500 μl の Buffer AW1 を添加して 6,000×g (5,000rpm) で 1 分間遠心した。DNeasy Mini Spin Column を新たな 2 ml コレクションチューブに移し、500 μl の Buffer AW2 を添加した後に 6,000×g (5,000rpm) で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させた。

DNeasy Mini Spin Column を新たな 1.5 ml 尖底チューブに移し、200 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加して室温で 1 分間インキュベートした後、6,000 \times g (5,000rpm)で 1 分間遠心し、溶出して DNA 抽出原液とした。

DNA 抽出原液は Nanodrop を用いて波長 260nm における吸光度 (OD)から DNA 濃度、ならびに OD 260nm/280nm 比から DNA 純度を算出した。さらに、Qubit を用いて Double-stranded DNA (dsDNA)濃度を測定した。

4.2.3 Nanopore MinION によるシーケンシング

①ライブラリー調整

MinION (Nanopore 社)を用いたシーケンスランの実施は PCR barcoding kit のプロトコールに従った。すなわち、100ng/10 μ l の DNA を加えた PCR チューブに 7 μ l の Ultra II End-prep reaction buffer (NEB 社)と 3 μ l の Ultra II End-prep enzyme mix (NEB 社)を添加・混和した後、スピンドウンした。各試薬を添加したチューブを 20 $^{\circ}$ Cで 5 分間静置した後、65 $^{\circ}$ C、5 分間インキュベートした。AMPure XP (Beckman 社)を 60 μ l 添加して、ピペッティングした後、ロータリーミキサーを用いて室温で 5 分混和した。チューブ内の溶液をスピンドウンし、磁気スタンド上に静置して、AMPure XP 内の磁気ビーズと上清を分離し、上清を除去した。さらに、200 μ l の 70%エタノールを添加・除去する工程を 2 度行い、エタノールを除去後、室温で 15 分間乾燥させた。磁気ビーズのペレットを 16 μ l の Nuclease Free water (以下、NFW)で懸濁した後、磁気スタンド上で、磁気ビーズと上清

を分離し、上清を新たな PCR チューブに移し、End-prepped DNA とした。

End-prepped DNA の全量 (15 μ l)と 10 μ l の BCA、25 μ l の Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB 社)を混和し、PCR チューブ内でスピンドウンした。20 μ l の AMPure XP を PCR チューブに添加し、ピペッティングした後、ロータリーミキサーを用い室温で 5 分間混和した。チューブ内の溶液をスピンドウンした後、磁気スタンド上に静置し、AMPure XP 内の磁気ビーズを分離して上清を除去した。チューブ内でペレット化したビーズを崩さないように 200 μ l のエタノールを静かに添加・除去して洗浄した。さらに洗浄作業を繰り返して、エタノールを完全に除去した後に、ただちに磁気スタンドから外し、ペレット化したビーズを 21 μ l の NFW で懸濁した。2 分間静置した後に、磁気スタンドの上で内容物の全量を新たな尖底チューブに移した。これを Adapter ligated DNA とした。その dsDNA 濃度を Qubit を用いて測定した。表 4.1 に示した組成に従ってミクスチャーを製作し、表 4.2 に示した条件で PCR を行った。

PCR 産物に 30 μ l の AMPure XP を加えてピペッティングし、ロータリーミキサーを用いて室温で 5 分間混和した。PCR 産物をスピンドウンし、磁気スタンド上で AMPure XP 内の磁気ビーズを分離して、上清を除去した。200 μ l の 70%エタノールを添加・除去して洗浄した。さらに洗浄作業を繰り返した後、エタノールを完全に除去し、ペレット化したビーズを 10 μ l の 10 mM Tris HCl で懸濁し、2 分静置した。全サンプルを等量混和した後、混和物の 10 μ l と RAP の 1 μ l を混和して 5 分間静置し、これをライブラリーとした。

表 4.1 ミクスチャーの組成内容

Adapter ligated DNA	X* μ l
Nuclease-Free water	24-X* μ l
Barcode Primers	1 μ l
LongAmp Taq 2x Master Mix	25 μ l
計	50 μ l

*: Qubit を用いて Adapter ligated DNA 濃度を計測し、最終濃度 0.2ng/ μ l になるように X μ l を加えた。

表 4.2 Nanopore における PCR 条件

反応 (サイクル数)		温度 ($^{\circ}$ C)	時間 (秒)
初期熱変性 (\times 1)		95	180
	熱変性	95	15
増幅 (\times 14)	アニーリング	56	15
	伸長反応	65	250
最終伸長 (\times 1)		65	360

②シーケンスの実施

PCR barcoding kit に含まれている SQB、LB、FLT、FLB 各バッファーを解凍し、氷上に静置した。MinION の蓋を開け、プライミングポートが見えるよう上部の蓋を解放し、小泡の有無を確認した。FLT の 30 μ l を FLB のチューブに入れ、ピペッティングし、泡が入らないように混合液の 800 μ l をプライミングポートに添加した。34 μ l 量の SQB、25.5 μ l 量の LB、4.5 μ l 量の NFW と調整した 11 μ l 量の最終ライブラリーを PCR チューブ内で混和した。その後、MinION の SpotOn カバーを開け、追加で FLT と FLB の混合液 200 μ l をプライミングポートに添加し、十分にピペッティングしたライブラリー混合液を SpotOn ポートに滴下し、シーケンスを行った。

シーケンスデータのベースコールには MinKNOW (Nanopore 社)を用い、バーコーディングに基づくリードの振り分けは EPI2ME (Nanopore 社)を用いて行った。

4.2.4 MiSeq システムによるシーケンシング

①ライブラリー調整

MiSeq (Illumina 社)を用いたシーケンスランの実施は Nextera XT Library prep kit (Illumina 社)のプロトコールに従った。Nextera XT Library prep kit 中の TD バッファー、ATM、NT、NPM、および Nextera XT Index kit 中の Index を常温に戻し、静置した。NFW を用いて dsDNA 濃度を 1ng/ μ l に調整した。キットに含まれる TD バッファー の 10 μ l とゲノム DNA 5 μ l を PCR チューブに入れ、混和した。キットに含まれる ATM の 5 μ l を

各チューブに添加し、PCR チューブ用アダプターにセットして 280 ×g (200rpm)、20°Cで 1 分間遠心した。サーマルサイクラーで 55°C、5 分間処理した後に 10°Cまで冷却し、10°C になったら即座に取り出し、NT 5 μl を加え、280×g (200rpm)、20°Cで 1 分間遠心後、室温で 5 分静置した。PCR チューブに Nextera XT Library Index kit (Illumina 社)の Index 1 と Index 2 を 5μl ずつ添加し、15μl の NPM を加え、ピペッティングし、280×g (200rpm)、20°Cで 1 分間遠心した後、表 4.3 の条件で PCR を行った。

Nextera XT Library prep kit 中の RSB、LNA1、LNB1、LNW1、LNS1、および AMPure XP を常温に戻し、PCR 反応液に AMPure XP を 25μl 加え、10 回のピペッティングを 1 行い、1,800rpm で 2 分間振盪して 5 分間静置した。磁気スタンド上に 2 分間静置して、AMPure XP ビーズと上清を分離した後、上清を除去した。磁気スタンド上で 80%エタノールの 200μl を加えて、30 秒静置し、上清を捨てて洗浄した。さらに洗浄作業を繰り返した後、残ったエタノールをできる限り除去して、チューブを磁気スタンドから外して、52.5μl の RSB を加え 1,800rpm で 2 分間振盪した。2 分間静置した後に、磁気スタンドに 1 分間静置し、AMPure XP ビーズと上清を分離して新たな PCR チューブに DNA 上清の 20μl を移した。1 サンプル当たりキットに含まれる 44μl の LNA1 と 8μl の LNB1 を PCR チューブに加え、混和し、1,800rpm で 30 分間振盪した。PCR チューブを磁気スタンド上で 2 分以上静置して LNB1 ビーズと上清を分離して上清を除去した。45μl の LNW1 を添加して、1,800rpm で 5 分間振盪した。再度 PCR チューブを磁気スタンドの上で、LNB1 ビーズと上清を分離し、上清を除去した。さらに洗浄を繰り返した後、30μl の 0.1N

NaOH を各 PCR チューブに加え、1,800rpm で 5 分間振盪した。PCR チューブをタッピングした後、1,800rpm で 5 分間振盪し、1,000×g (800rpm)で 1 分間遠心した。PCR チューブを磁気スタンドの上に 2 分以上置き、LNB1 ビーズと上清を分離し、上清と LNS1 30 μl を新しい PCR チューブ内で混和したものをライブラリーとした。

表 4.3 MiSeq のライブラリー調整における PCR 条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)	
初期熱変性 (×1)	72	180	
熱変性	95	30	
熱変性	95	10	
増幅 (×14)	アニーリング	55	30
	伸長反応	72	30
最終伸長 (×1)	72	300	

②シーケンスの実施

ライブラリーが入った PCR チューブを 1,000×g、20°Cで 1 分間遠心した後、各ライブラリー溶液の 12μl を 1.7ml の尖底チューブに移して転倒混和した。MiSeq Reagent Nano kit v2 (500 cycle) (Illumina 社)に貼付されている HT-1 バッファー の 576μl を加え、充分混和後に 96°Cで 2 分間加熱処理した。5 分間氷冷した後に、Illumina 社の提供する方法で MiSeq Reagent Nano kit v2 (500 cycle)を用いてシーケンス反応を行った。

4.2.5 コウモリ由来株の参照配列の作成

4.2.4 で得られたコウモリ由来株 (*Bartonella* sp. bat2-1、bat24-1、EN2-1、EN36-1、F1-1、F2-1、F3-2)のシーケンスデータを用いた参照配列の作成は、国立遺伝学研究所の提供する Management and Analysis System for Enormous Reads (Maser)で提供されているシーケンスデータのアセンブルプログラム Canu を用いた。Garaxy (<https://usegalaxy.org/>)を用いてファイル形式を fastq から fasta に変換し、Maser 上にロングリードシーケンスデータをアップロードした。解析パラメーターはデフォルト、リードタイプは Nanopore を指定して推定塩基長は 2.5Mbp で解析した。

4.2.6 ドラフトゲノム配列の作成

ゲノム解析ソフトウェア CLC genomics workbench (フィルジェン社)にコウモリ由来株 (*Bartonella* sp. bat2-1、bat24-1、EN2-1、EN36-1、F1-1、F2-1、F3-2)の参照配列を入力した後、MiSeq システムから排出されたショートリードデータを参照配列にマッピングすることで、ドラフトゲノム配列を作成した。マッピング時のパラメーターは Mismatch cost を 3、Insertion cost および Deletion cost を 2 とし、それ以外のパラメーターはデフォルトで行った。

4.2.7 遺伝子のアノテーションおよび病原関連遺伝子の探索

ドラフトゲノム配列を FASTA 形式で出力し、オートアノテーションプログラム DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST ; DNA data bank of JAPAN)による遺伝子の注釈付け (アノテーション)を行った。

続いて、DFAST によるアノテーションを行った塩基配列について、The virulence factor database (VFDB; Institute of Pathogen Biology) を用いて病原関連遺伝子の保有状況を *B. henselae* と比較した。更に、DFAST によってアノテーションを付与された各遺伝子の塩基配列を基に、VirB/D4 T4SS と Trw T4SS をコードする遺伝子群の探索をした。

アノテーションの結果に基づいて、CDS 数および GC 含有量を算出した。また、ドラフトゲノム配列のゲノム長、Contig 数、平均 coverage、およびマッピングに用いられたリード数を全リード数で除した Mapped/all reads を算出した。

4.2.9 完全長ゲノム配列の決定

① 高分子 DNA の抽出

高分子 (High Molecular Weight; HMW) DNA を抽出するために、MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen 社)を用いて第 2 章で得られたキタクビワコウモリ由来 *Bartonella* EN2-1 株から DNA を抽出した。

1.5ml 尖底プラスチックチューブ内で純培養した各分離株と 1ml の滅菌 PBS を混和し、OD600=1 の濁度に調整した。ボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、

14,400×g (12,000rpm)で5分間遠心洗浄した。

上清を除去して、MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen 社)の Buffer ATL を 180 μ l 混和した後、Proteinase K 20 μ l を添加して、56°Cで30分間、900rpm で振盪しながら加熱処理した。4 μ l の RNAase をサンプルに添加し、室温で2分間静置した後、15 μ l の MagAttract suspension G と 280 μ l の Buffer MB をサンプルに添加し、パルスボルテックスでよく混合した。1,400rpm で3分間振盪し、サンプルを磁気スタンド上でビーズが完全に分離するまで静置してから上清を除去した。サンプルに 700 μ l の Buffer MW1 を加え、1,400rpm で1分間振盪した後、サンプルを磁気スタンド上で、ビーズの分離が完了するまで静置し、上清を除去して洗浄した。さらに Buffer MW1 による洗浄を繰り返した。サンプルに 700 μ l の Buffer PE を添加し、1,400rpm で1分間振盪した後にサンプルを磁気スタンド上に置き、ビーズの分離が完了するまで静置し、上清を除去して洗浄した。さらに Buffer PE による洗浄を繰り返した後、磁気スタンド上のビーズを 700 μ l の蒸留水ですすぎ、1,400rpm で1分間振盪した。再度サンプルを磁気スタンド上に静置し、ビーズの分離が完了してから、上清を除去した。さらに蒸留水によるビーズの洗浄を繰り返した後、Buffer AE を加えて 1,400rpm で3分間振盪し、サンプルチューブを磁気スタンド上でビーズが完全に分離するまで静置した。上清を新しいチューブに移し、これを HMW DNA とした。

HMW DNA は Nanodrop を用いて波長 260nm における吸光度 (OD)から DNA 濃度と OD 260nm/280nm 比から DNA 純度を算出した。さらに、Qubit を用いて dsDNA 濃

度を測定した。

② PacBio RS2 によるロングリードシーケンス

ロングリードシーケンスは HMW DNA をマクロジェン・ジャパン社 (<https://www.macrogen-japan.co.jp/>) に送付して PacBio RS2 (Pacific Biosciences 社) を用いて行った。

③ EN2-1 株の参照配列の作成

EN2-1 株の参照配列の作成は PacBio RS2 により得られたシーケンスデータを用いて Maser で提供されている Canu ソフトウェアにより行った。ロングリードシーケンスデータは fastq ファイル形式でアップロードし、解析パラメーターはデフォルト、リードタイプは PacBio を指定し、推定塩基長は 2.5Mbp で解析を行った。

④ 完全長ゲノム配列の決定および環状ゲノムマップの描出

マッピングは 4.2.6 の方法に準拠して行い、コンセンサス配列を作成した。

決定したゲノム配列が環状構造であることを確認するために、決定したゲノム配列の両端をサクラエディタ (<https://sakura-editor.github.io/>) を用いて比較し、重複したゲノム配列を削除することで完全長ゲノム配列を決定した。環状ゲノムマップの描出は CGview Server (<http://cgview.ca/>) を用いて行い、GC skew 解析ならびにゲノム上の病原関

連遺伝子の座位を確認した。

4.3 成績

4.3.1 ドラフトゲノム配列の評価

本研究で得られた7株のコウモリ由来 *Bartonella* のドラフトゲノム配列の Contig 数は8~20、推定ゲノムサイズは約 1.42M~1.95Mbp であった。各 Contig の平均カバレッジは最低で 80×以上、Mapped/all reads は 97.6%以上となった。GC 含有量は 36.8~38.8 であり、*B. henselae* の値 (38.2) と近似していた。CDS 数は 1,016~1,688 となり、CDS 数が最も少なかった株は bat24-1、最も多くの CDS が確認された株は F1-1 であった (表 4.4)。

表 4.4 本研究で解析したコウモリ由来株のゲノムアセンブリの成績

項目 \ 株名	bat2-1	bat24-1	EN2-1	EN36-1	F1-1	F2-1	F3-2
ゲノム長	1,669,122	1,421,638	1,878,605	1,877,446	1,946,539	1,569,696	1,690,225
Contig 数	8	5	12	11	20	11	9
平均 coverage (×)	157.84	124.27	80.25	117.66	121.4	124.27	109.18
Mapped/all reads (%)	97.6	98.84	99.67	99.67	99	99.42	99.31
GC 含有量 (%)	36.8	37.1	38.8	38.2	37.9	38.8	38.8
CDS 数	1,333	1,016	1,666	1,540	1,688	1,405	1,548

4.3.2 コウモリ由来株の病原関連遺伝子の保有状況

宿主の血管内皮細胞への接着に関与する *badA*、*omp43*、*omp89* の各遺伝子のうち、検討した 7 株全てが *omp89* を保有していた。また、EN36-1 以外の 6 株は *badA* を、F1-1 株以外の 6 株は *omp43* を保有していた。

今回検討したコウモリ由来の 7 株の全てが、宿主の赤血球中のヘムタンパクの取り込み・利用に関連する *hbps* 遺伝子、赤血球への接着侵入に関与する *trw* 遺伝子および *ialB* 遺伝子、病原性や宿主の血管内皮細胞内への侵入に関与する *virB/virD4/beps* 遺伝子を保有していた。

マクロファージの食食を阻害する分子をコードする *vapA* 遺伝子は、キタクビワコウモリ由来の 2 株 (EN2、EN36)、キクガシラコウモリ由来株 (F1)、モモジロコウモリ由来株の 1 株 (F3) が保有していた。また、全てのコウモリ由来株は、鞭毛遺伝子(*fla*)を保有していなかった (表 4.5)。

表 4.5 本研究で解析したコウモリ由来株の病原関連遺伝子の保有状況

宿主	ユビナガコウモリ		キタクビワコウモリ		キクガシラ コウモリ	モモジロコウモリ		
	株名	bat2-1	bat24-1	EN2-1	EN36-1	F1-1	F2-1	F3-2
病原関連遺伝子								
<i>badA</i>		+	+	+	-	+	+	+
<i>omp43</i>		+	+	+	+	-	+	+
<i>omp89</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>virB/virD4/beps</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>vapA</i>		-	-	+	+	+	-	+
<i>trw</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>ialB</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>hbps</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>fla</i>		-	-	-	-	-	-	-

4.3.3 EN2-1 株の完全長ゲノムの決定と T4SS 構造遺伝子の座位

EN2-1 株の参照配列は 10,153 本の PacBio リードを用いて作成され、平均カバレッジは 77.48×となった。EN2-1 株の参照配列に対して MiSeq リードのマッピングを行ったところ、628,601 本の MiSeq リードがマッピングされ、平均カバレッジは 69.25×となった。マッピングの結果と EN2-1 株の参照配列の間に相違がある部分 7 か所を目視にて確認し、補正した。GC skew 解析を行ったところ、GC 含量がゲノム配列の中央付近で入れ替わっていた (図 4.1)。

EN2-1 株の完全長ゲノム配列は全塩基長が 2,035,770bp、Contig 数は 1 となりプラスミドは確認されなかった。GC 含量は 38.9%、CDS 数は 1,866、rRNA 数は 6、tRNA 数は 42 であった。

EN2-1 株の病原関連遺伝子の座位を確認したところ、図 4.1.A の部分 (1,539,881bp～1,836,200bp)に Pathogenicity island (PAI)が存在し、*virB/D4* T4SS オペロンと *trw* T4SS オペロンが存在していた (図 4.2)。また、PAI 以外の領域である図 4.1.B の部分 (319,014bp～359,534bp)において、T4SS 様オペロン、ならびに Vbht T4SS をコードする *vbht-like* オペロン (図 4.3)が確認された。

EN2-1 株と *B. henselae* の *virB/D4* T4SS オペロンの各アミノ酸配列を比較したところ、EN2-1 株と *B. henselae* の *virB/D4* T4SS オペロンの各機能的ドメインは共通していた (図 4.4)。

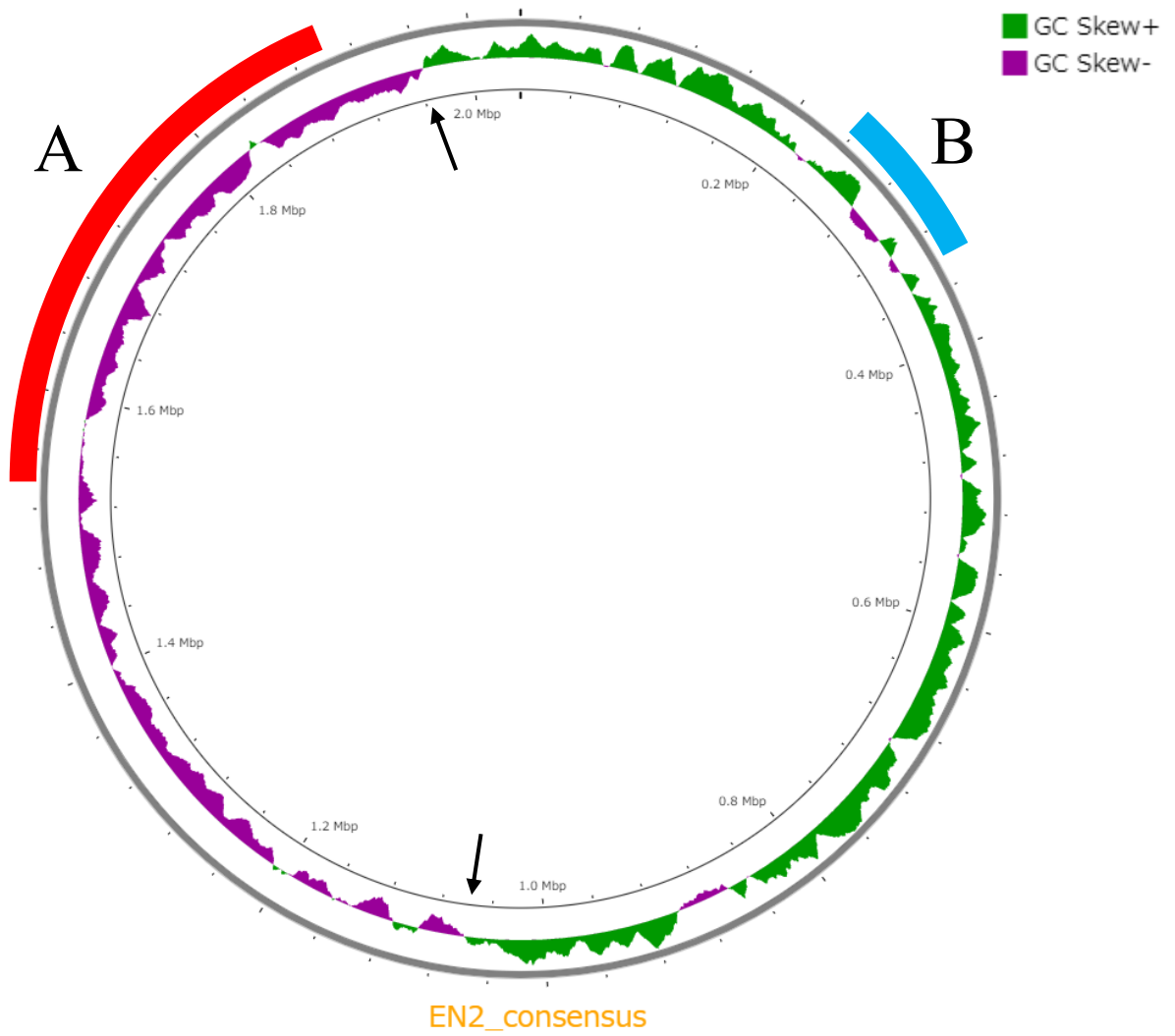
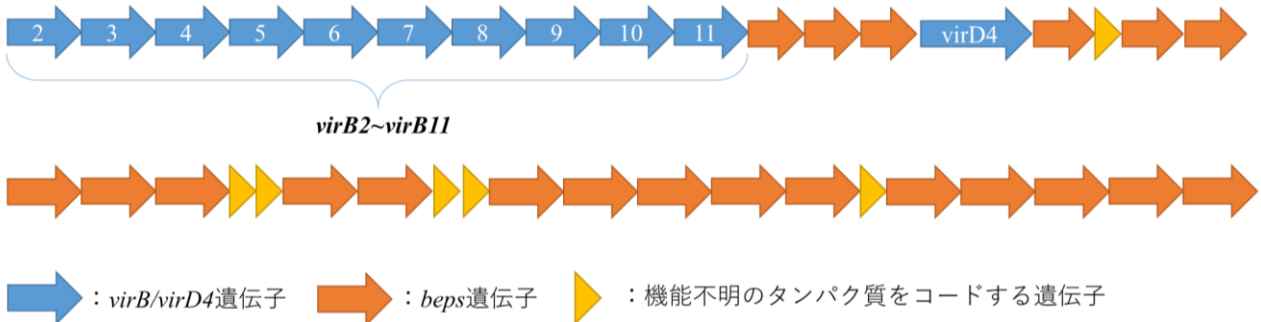


図 4.1. EN2-1 株の GC skew と PAI の位置 (A)、T4SS 様構造が確認された遺伝子座位 (B)、および GC 含量が入れ替わっている部分 (黒矢印)

Pathogenicity island上 (A) に存在した病原関連遺伝子の概略図

a: *virB/D4* T4SSオペロンの構造概略図



b: *trw* T4SSオペロンの構造概略図



図 4.2 図 4.1 の PAI (A) にコードされている *virB/D4* オペロンと *trw* T4SS オペロンの模式図

青矢印内の数字は *virB* の遺伝子名の略記 (*virB2*~*virB11*) を、緑矢印内のアルファベットは *trw* の遺伝子名の略記 (*trwD*~*trwL*) を示す。

Pathogenicity island 以外の領域 (B) に存在した T4SS 様構造物の遺伝子構造概略図

a: T4SS 様オペロンの構造概略図



b: *vbht*-like オペロンの構造概略図

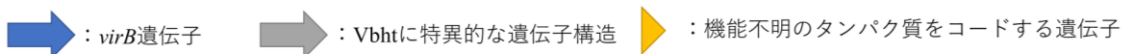


図 4.3 図 4.1 の B にコードされている T4SS 様オペロンと *vbht*-like オペロンの模式図

青矢印内の数字は *virB* の遺伝子名の略記 (*virB2*~*virB11*) を、灰矢印内のアルファベットは遺伝子名を示す。

VirB2

<i>B. henselae</i> VirB2	1	MTDTISRNIIFIIIMLLLLTALVVS	DP	SYAAAATGSASGLGNVDNVLQSI	VTMMTGTTAKL	60
EN2-1 VirB2	1	MTNTISENIMFIIIMLFLATIVVSN	PSYASSAT---	TSFGNLDTVLDQIVTMMTGGTARL		57
<i>B. henselae</i> VirB2	61	IATICVAAVGI	GWMYGFIDLR	KAAYCLIGIGIVFGASALVSKL	TSAS	107
EN2-1 VirB2	58	IATICVAAVGI	GWMYGFIDLR	KAAYCIIGIGIVFGAPALVVKI	TGTS	104

VirB3

<i>B. henselae</i> VirB3	1	MNEDPLFLACTR	PAMFAGVTME	AMAFNV	MATSILFILTSGFTMIGLGLHFVLR	EITKH	60	
EN2 VirB3	1	MNEDTLFLACTR	PAMFAGVTME	AMALNV	MATSVLFI	LTSGFTMIGLGVGMHFVLR	EVTKY	60
<i>B. henselae</i> VirB3	61	DHNQFRVLF	AWLNT	RGKQKNLNR	GGGSTSPLRLIRTYEELNR		103	
EN2 VirB3	61	DHNQFRVLF	AWLNT	RGKQKNLNR	GGGSTSPLRLIRTYEMRR		103	

VirB4

<i>B. henselae</i> VirB4	1	---MSMKRESLP	EDYIPYIRHINQHVIALNSR	CLMTVMVVEGVN	FDTADIDQLNSLHNQ	57			
EN2-1 VirB4	1	MIQTSTMKRESLP	EEYIPYRVYVNVQHVVALNSR	CLMTVIALEGVN	FDTVDIDQLNSLHNQ	60			
<i>B. henselae</i> VirB4	58	LNTLLKNIAD	ERVALYSHIIRRRETIY	PE	SQFFSSFAATLDEK	YKKMVSQELYRNDLFV	117		
EN2-1 VirB4	61	LNTLLKNIAD	ERVALYSHIIRREMLY	PE	GRFLSSFAATLDEK	YKKMVSQELYRNDLFV	120		
<i>B. henselae</i> VirB4	118	SLLWNPASDKTE	QLASFFQRLAKAKKTQSE	PDQEAIRKIEELS	QDLIEGLESYGARLLSV	177			
EN2-1 VirB4	121	SLLWNPASDKTE	QLASFFQRLAKAKKTQSE	PDMEAIRKIEELSR	DFIQDLEAYGARLLSI	180			
<i>B. henselae</i> VirB4	178	YAHGGILFSE	QSEFLHQLVGGRRERIP	LTFGTIASTIYS	DRVIFGKETIIEIRHESNERFA	237			
EN2-1 VirB4	181	YEHGGILFSE	QSEFLHQLVGGRRERIP	LTFGTIASTIYS	DRVIFGKEIIEIRHESHERFV	240			
<i>B. henselae</i> VirB4	238	GMFGWKEYP	SKTRPGMTDGLLTAP	FF	FILTSQSFVFKSKAAASVIMGRKQ	QMINAADRAS	297		
EN2-1 VirB4	241	GMFGWKEYP	SKTRPGMTDGLLTV	PF	FILTSQSFVFKSKAAASVIMSRKQ	QMINAADRAS	300		
<i>B. henselae</i> VirB4	298	SQIEALDEAL	DDLESNR	FVLGEHHL	SLAVFANHPKALAEYL	SKARAHLTNGGAVIAREDL	357		
EN2-1 VirB4	301	SQIEALDEAL	DDLESNR	FVLGEHHL	SLAVFADHPKILAENL	SKARSHLTNGGAVIAREDL	360		
<i>B. henselae</i> VirB4	358	GLEAAWQA	LPGNFSYRAR	SGAITSRN	FAALSPFHSFP	IGKLEGNVWGTAVAL	LKTQAGS	417	
EN2-1 VirB4	361	GLEATWQA	LPGNFSYRAR	SGAITSRN	FAALSPFHSFP	VGKLNNDNVWGS	SAVAL	LKTQAGS	420
<i>B. henselae</i> VirB4	418	PYYFNHYG	DLGNTFVCGP	SGSGKTVIVN	FLLAQLQKHNPTM	VFFDKDQGAEIFVRAGGG	477		
EN2-1 VirB4	421	PYYFNHYG	DLGNTFVCGP	SGSGKTVIVN	FLLAQLQKHNPTM	VFFDKDQGAEIFVRAGGG	480		
<i>B. henselae</i> VirB4	478	KYKPLKNGQ	PTGIAPLKGMEY	TEKNKVFLRN	NWVLLKLVTAEGQ	VTTEERQDIAKAIDALG	537		
EN2-1 VirB4	481	KYKPLKNGI	PTGIAPLKGMEY	TEKNKVFLRN	NWVLLKLVTAEGQ	VMTEERQDIAKAIDSLE	540		
<i>B. henselae</i> VirB4	538	NLPHAQRS	LSALQLFFDNTS	KEGIAIRLQR	WLKGNDLGWVFDND	QDDLNLDSQFIGYDMT	597		
EN2-1 VirB4	541	SLPHAQRS	LGALQLFFDNTS	KEGIAIRLQR	WIKGNALGWVFDND	QDDLNLNAQFIGYDMT	600		
<i>B. henselae</i> VirB4	598	DFLDNEE	IRRPLMMYLFNR	ILDLDIGRRI	IIIVDEFWKA	EDDSFKAFADRLKTIRKQN	657		
EN2-1 VirB4	601	DFLDNEE	IRRPLMMYLFNR	ILDLDIGRRI	IIIVDEFWKA	EDDSFKAFADRLKTIRKQN	660		
<i>B. henselae</i> VirB4	658	GMMLFATQ	SPKDALNSTIAHTIIE	QCPTQIFFPNQ	KANYKDYVEDFKLTERE	FELIQSEL	717		
EN2-1 VirB4	661	GMMLFATQ	SPKDALNSTIAHTIIE	QCPTQIFFPNQ	KANHHDYVEDFKLTERE	FELIQSEL	720		
<i>B. henselae</i> VirB4	718	SRESRRFLIK	QGQSSVVAELNLR	GMNDEIAVLSGTT	KNIELVNQIISEYGAD	PDIIWLPIF	777		
EN2-1 VirB4	721	SRESRRFLIK	QGQNSVVAELNLR	GMNDEIAVLSGTT	KNIELMNQIISEHGT	DPDKWLPIF	780		
<i>B. henselae</i> VirB4	778	HQRRENQ					784		
EN2-1 VirB4	781	HQRRENQ					787		

図 4.4 EN2-1 株と *B. henselae* の *virB/D4* T4SS オペロンの各アミノ酸配列の比較

VirB5

<i>B. henselae</i> VirB5	1	MKKYSLVTLTLLSFCISHAKAQTATLTDEYYKKALENTQKLDVAKSQTAEESIYESATQTAN	60
EN2-1 VirB5	1	MKKYFLVTLTLLSLSISHAVSQNTLDVDEYYKKALESTEELNTAKSETAETVYASTKTTTE	60
<i>B. henselae</i> VirB5	61	KIKDINNQLANLKAADTKTKPEQLQALQIELTLLQAQLQADTLKIQSLAMIQAKDTTKTEE	120
EN2-1 VirB5	61	KIKEISDKLTNAKSQEKPKPAELQALQIELAILHADLQVSALKLQSLAMMQAKDAKSKEE	120
<i>B. henselae</i> VirB5	121	LREEQTQKKHEDLQQLKEKLEKSDVRL	148
EN2-1 VirB5	121	IRREEIQKKHKDIEETLRKKIESSDVRL	148

VirB6

<i>B. henselae</i> VirB6	1	MSDFSFSPPFESISGYILOPLNNVMNTTVSGLSSAISAPLNLASIIFIFLYGYNVTGRVA	60
EN2-1 VirB6	1	MSDFSFSPPFESISGYILTPLNNAMNSIVSGLSSAIAAPLNLASIIFIFLYGYNVTGRVA	60
<i>B. henselae</i> VirB6	61	LSMNSLLNNVVKIVIVTMTATNADTFNTYVKNIFFGDLANAIGNALNSNPSSANVFDYIL	120
EN2-1 VirB6	61	LSTNSLLNNVVKIVVVTMTATNADTFNVYVKDIFFNDLANSIGNALNENPTNSNVDFIL	120
<i>B. henselae</i> VirB6	121	LKTSARYQEVLAANWFLEKIMVGLLGLSMLMAVIVFCIGGFIVQMFAQVALVMIIGLGPL	180
EN2-1 VirB6	121	LKASARYQEVLSRAWFFEKILVGLLGLSMLLAVIVFCIGGFIVQMFAQVALVMVIGLGPL	180
<i>B. henselae</i> VirB6	181	FISLYLFNATRKFDDAWITTLVNFTILQVLVIMLGTIMCKIILYVLDGTYESIYFLFPVP	240
EN2-1 VirB6	181	FISLYLFNATRKFDDAWITTLVNFTILQVLVIMLGTIMCKVIMSVLNGTYDSIYYLFPVP	240
<i>B. henselae</i> VirB6	241	VVISIVGAILFRALPGIASALSSGGPYFNAGISSGGQIFTMLSSGAKTGRNAKSAASTL	300
EN2-1 VirB6	241	VVISIVGAILFRALPGIASALSSGGPYFNAGISTGGQFFTMLSSGAQAGRNIARGAASKL	300
<i>B. henselae</i> VirB6	301	SGAAGTATKAAKIGGNRGRF	321
EN2-1 VirB6	301	SGAAS---AAKMGARGRGRF	318

VirB7*

<i>B. henselae</i> VirB7	1	MVHFVRCIQNKIPHALPMSSCVVFKSIYEFKMKQKITFVMILIIALTGCASLTGPKKPP	60
EN2-1 VirB7	1	-----MKQKIIFFMILT FALTGCASLGGSKKPP	28
<i>B. henselae</i> VirB7	61	RCNGKVTRALNRDKWDWN---KNLILQEKNVKPVRTPIILNTLENEKATATVTLKENS	117
EN2-1 VirB7	29	RCKGKHIRVLRDKWVYKGMKNINLEEKIVRPTTPTIVNTLESEKATADVKLNTTSL	88
<i>B. henselae</i> VirB7	118	NSITRETLPEMTEIAREN	136
EN2-1 VirB7	89	NPINHETLFDKTVEVSREK	107

VirB8

<i>B. henselae</i> VirB8	1	MKINEFNEYIKEARSFDIDRMHGMRQMRIAMALTVLFLGLMTIALALAVAALTPLKTVEP	60
EN2-1 VirB8	1	MKSDALEEYIKEARSFDIDRMHGMRVVMKIAIALTVLFLGLMTIVALALAVAALTPLKTVEP	60
<i>B. henselae</i> VirB8	61	FVIRVDNSTGIIETVSALKETPNDYDEAITRYFASKYVRAREGFQSEAEHNFRLVSLLS	120
EN2-1 VirB8	61	FVIRVDNSTGIVDVTVSALKEAPSNDYDEAITRYFASKYVRAREGFQSSEAEENFRLLSLLS	120
<i>B. henselae</i> VirB8	121	SPEEQSRFAKWYAGNNPESPQNIYQNMIAITVTKSISFSLSKDLIQVRYKTVRELNDKEN	180
EN2-1 VirB8	121	SPQEQNRFAKWYAGNNPESPQNIYRNMVATVTKSISFSLSKDLIQVRYKTVRETNGKEN	180
<i>B. henselae</i> VirB8	181	ISHWVSILNFSYINAQISTQDRLINPLGFQVSEYRSDEVIQ	222
EN2-1 VirB8	181	ISHWVSILNFSYINAQISTADRLINPLGFQVSEYRSDEVIQ	222

図 4.4 EN2-1 株と *B. henselae* の *virB/D4* T4SS オペロンの各アミノ酸配列の比較 (続き)

VirB9

<i>B. henselae</i> VirB9	1	-MRILKTLFLAFIAAISCYTTPSFAETAPVSARKDNRIRFVNYDPYNVTKIIGSIRSSVQ	59
EN2-1 VirB9	1	MIRFSKIIIFLALIVAIISCRITALSFAETAPVSARKDNRIRFVNYDPYNVTQIIGSIRSSVQ	60
<i>B. henselae</i> VirB9	60	LEFADDEEVTVYVGIGNSVAWQVAPAGHFVFLKPREVQPVNLQIVTSRQDGTKRSYQFEL	119
EN2-1 VirB9	61	LEFADDEEVTVYVGIGNSVAWQVAPAGHFVFLKPREVQPVNLQIVTSRQDGTKRSYQFEL	120
<i>B. henselae</i> VirB9	120	QVREGDVSAGNDTYFLVKFRYPPEDEALRKKLAEAAKAAQREENFVNDIFNTHEDFGPRNW	179
EN2-1 VirB9	121	KVREGDVSAGNETYFLVKFRYPPEDEALRKKLAEAAKAAQREENFVNDVLDIHEDFGPRNW	180
<i>B. henselae</i> VirB9	180	AYEAQGSPLIEPASVYDNGKTTTFTFLGNTEIPAIYLVSLDGQALVPKTIKGNKVIVHA	239
EN2-1 VirB9	181	AYEAQGSILIEPASVYDNGKTTTFTFLGNTEIPAIYLVSLDGQESLVPKSIKGNKVIVHA	240
<i>B. henselae</i> VirB9	240	TAAQFTLRRGNDVLCIFNRFRFVPAGVNPETGTTSPSVQRKVNIGNGYE	287
EN2-1 VirB9	241	TAAQFTLRRGNDVLCIFNRFRFLPEGINPETGTTSPSVKREVNIGNSHE	288

VirB10

<i>B. henselae</i> VirB10	1	MNDPMDENLLNDRDMIKDGHGKQRPNTSKAAALVILFGVCLYLAYSTLFTEKQPVEV	60
EN2-1 VirB10	1	MNDEMDEKD-ISDRDMIKDAYGKKQSNIGKAAALFVLFVGCAYLAYSTLVTEKKQSVEL	59
<i>B. henselae</i> VirB10	61	QKEGIIKQTELFRRPAPPKPVSLPTIEKNNVLLPKVELPTPPKTTNSDDSLLEAAQRAP	120
EN2-1 VirB10	60	PKEGIIQQTEIFRPAQPKPIPIE-TTEQNNALLPKVELPTPKVDQPKSDDKLMEEAQRSP	118
<i>B. henselae</i> VirB10	121	VLAYANTQKGGQSTENKNDISANQPEAKPDETAQRFNHLKPTTLEGIIRAAKLGNRNYII	180
EN2-1 VirB10	119	VLAFAANTHQDKANIMADKSFSLNQSESKPDETAQHFNHLKPTTLEGMRASTLGNRNYII	178
<i>B. henselae</i> VirB10	181	AMGASIPCILETAISSDQQGFASCIVSRDILSDNGRVVLLDKGTQIVGEYRAGLKKGQKR	240
EN2-1 VirB10	179	AMGASIPCILETAISSDQQGFTSCIIIRDILSDNGRVVLLDKGTQIVGEYRAGLKKGQNR	238
<i>B. henselae</i> VirB10	241	LFVLWNRRAKTPNGIIITLSPATDALGRSGMDGIDNHWLERIGSALLVSIVKDATNYVK	300
EN2-1 VirB10	239	LFVLWTRRAKTPNGIIIALSSPATDSLGRSGMDGIDNHWLERIGSALLVSIVKDASSYAK	298
<i>B. henselae</i> VirB10	301	GRLPKDQDKNNSETISSGQNIANIAVENYANIPPTLSKNQGEVMNVFVARDLDFSNVYKL	360
EN2-1 VirB10	299	GRLSQETDRSDTEVTSAGQNIANILVENYANIPPTLNKNQGEVMNVFVARDLDFSNVYKL	358
<i>B. henselae</i> VirB10	361	KVIENKKQIVNRALSARNFYKNSAVICNEPKLAHIER	396
EN2-1 VirB10	359	KVIENKRQITNRALSARNFYKNSAVTLK-----	385

VirB11

<i>B. henselae</i> VirB11	1	MNQNLHTLSDETVAVLTKLEPISTFLKDENLFEIVINRPYQVMTEGVEGWKTIETPALS	60
EN2-1 VirB11	1	MKQNLQNLHDETAIAVLTKLEPINAFKLDSSLFEIVINRPYQVMTEGIKGWKTIIEVPTLS	60
<i>B. henselae</i> VirB11	61	FNELMGIKVVASYSKQNISEKNPILSATLPGNERIQIVIPPAVEKNTISMTIRKPSRS	120
EN2-1 VirB11	61	FNELMGIKVIASYSKQNISDKNPILSATLPGNERIQIVIPPAVEKDTVSMTIRKPSQS	120
<i>B. henselae</i> VirB11	121	FSLEDLANKGLFSVCEQVSFTPLNNYLSHLSLKHIDHDLVRAYAKDFVFFLNQAVQCQ	180
EN2-1 VirB11	121	FSLEDLANKDLFSLCEQVSFTPLNEYQSRFNEKLTERRNLATAYCNKDFVSVFLNEAVKCCQ	180
<i>B. henselae</i> VirB11	181	KNILIAAGKTGSGKTTLKALIAKIPDDERIITIEDTPELVVPQPNYVSMIYSKDGQGLAS	240
EN2-1 VirB11	181	KNILISGKTGSGKTTLKALISKIPNDERIITIEDTQELVVSQPNHVSMIYSKDGQGLAS	240
<i>B. henselae</i> VirB11	241	VGPKELLESALRMRPDRILLQELRDGTAFYYIRNVNSGHPGSIITVHASTALAAFEQMTL	300
EN2-1 VirB11	241	VGPKELLESALRMRPDRILLQELRDGTAFYYIRNVNSGHPGSIITVHASTALAAFEQMTL	300
<i>B. henselae</i> VirB11	301	LVKESEGGDLERDDIRGLLISMDIIIQCKRLEGKFKVTEIYYDPFKQRNIFGGN	356
EN2-1 VirB11	301	LVKESEGGSDLERDDIRGLLISMDIIIQCKRLEGKFKVTEIYYDPFKQRNIFGGN	356

図 4.4 EN2-1 株と *B. henselae* の *virB/D4* T4SS オペロンの各アミノ酸配列の比較 (続き)

VirD4

<i>B. henselae</i> VirD4	1	MKYTKTQLALISMPIASGALTIFLVPHMLSFVINDLKTNQIYWYVVRSEPLLTLMLVAAVS	60
EN2-1 VirD4	1	MKYTKTQLALILMPIALGTLTIFLVPHLLSLITSELERDQIYWYLRKPLLALTLVASVS	60
<i>B. henselae</i> VirD4	61	LFYTLSQKLHLRKAITFVSTAFFCITALYIYIGSEIKRLNPNVYVGGQGITWGYALKFMDPMV	120
EN2-1 VirD4	61	LFYLSQKLHLRKAITLVSAIFFAITAFYHIFGEIKRLSPYVGGQGITWNYALQFMDPMV	120
<i>B. henselae</i> VirD4	121	VFGVILGFVLLAIQVVIITSPRTSNVKRAKKGIFGDASWMNLKEAARIFPSNGQIVIGERY	180
EN2-1 VirD4	121	IFGTIIGVALLVIQFVTTVPRTNKVKRAKKGVFGDASWMNLREAAKIFPANGQIVVGERY	180
<i>B. henselae</i> VirD4	181	RVDQDNVRNIPFAPGNKITWVGKGGTAPLLTFNLDFGSTHMIFFAGSGGYKTTSTVVPTCL	240
EN2-1 VirD4	181	RVDQDSVCKIPFAPGNKITWVGKGGKAPLLTFNLDFGSTHMIFFAGSGGYKTTSTVVPTCL	240
<i>B. henselae</i> VirD4	241	TYTGPIVCLDPSTEIAPMVKFARKKMGNRNVIILDPNSELLTKNFVLDWLLDENIPRTRR	300
EN2-1 VirD4	241	TYPGSIVCLDPSTEVAAPMVRFARKRMGNRNVIIVLDPNSILTKNFVLDWLLDSDVPRTQR	300
<i>B. henselae</i> VirD4	301	EANIVSFSKLLLEKKSSENSAEYFSTQAHNLLTALLAHVIFSDKYEDSERNLKTLRAIL	360
EN2-1 VirD4	301	EANIVGFSKLLITDKKSSENSAEYFSTQAHNLLTALLAHVVFSDKEYEDSERNLKTLRGIL	360
<i>B. henselae</i> VirD4	361	SQSETAVVNQLRMIQETTPSPFIREMVGIFTEMADQTFSGVYTTASKDTQWLSLSNYADL	420
EN2-1 VirD4	361	SQSETAVVNQLRMIQETTPSPFIREMVGIFTEMAEQTFSGVYTTASKDTQWLSLSNYADL	420
<i>B. henselae</i> VirD4	421	VCGNDFASSDIANGKTDVFLNLPASILNSYPAIGRVIIGAFNAMVTADGNYKKRVLFVL	480
EN2-1 VirD4	421	VCGDDFASSDITDGNLTDVFLNLPASILNSYPAIGRVIIGAFNAMVTADGNYKKRVLFVL	480
<i>B. henselae</i> VirD4	481	DEVDLLGYMNIILEEARDRGRKYGTSLMLFYQSSGQLVNHFGESGARSWFESCSFVSYAAI	540
EN2-1 VirD4	481	DEVDLLGYMNIILEEARDRGRKYGTSLMLFYQSSGQLVNHFGESGARSWFESCSFVSYAAI	540
<i>B. henselae</i> VirD4	541	KDLQTAKDISERCGQMTIEVTGTSKSRGLSLTKGSONINYQQRALILPHEIIQEMRQDEQ	600
EN2-1 VirD4	541	KDLQTAKDISERCGQMTIEVAGTNKSRGLSLGKSSYNINYQQRALILPHEIIQEMRQDEQ	600
<i>B. henselae</i> VirD4	601	IILMQGHPPLRCGRAIYFRKEMLAATEKNRFAPQAKKS	639
EN2-1 VirD4	601	IILMQGHPPLRCGRAIYFRKEMLAEEKNRFAPQAKKS	639

図 4.4 EN2-1 株と *B. henselae* の *virB/D4* T4SS オペロンの各アミノ酸配列の比較 (続き)

赤枠で囲われている部分は各領域で保存されている機能的ドメインを示す。

*: VirB7 には機能的ドメインが保存されていないため、ドメインの位置を示していない。

4.4 考察

本研究で全ゲノム解析を行ったコウモリ由来株のコンセンサス配列の Contig 数、平均カバレッジ、Mapped/all reads から、今回決定したコンセンサス配列の信頼性は高く、解析に適しているものと考えられた。また、コウモリ由来株の GC 含有量は 36.8~38.8 であり、*B. henselae* の値 (38.2) と近似しており、推定ゲノムサイズは約 1.42~1.95Mbp であることが明らかとなった。

病原関連遺伝子の保有状況を比較したところ、今回検討した全てのコウモリ由来株はその全てが *virB/virD4/beps* と *trw* 遺伝子を保有しており、鞭毛遺伝子(*fla*)は保有していなかった。*trw* 遺伝子は赤血球への接着・侵入に関与する Trw T4SS をコードする宿主特異性を決定している遺伝子の一つであり、*Bartonella* は Trw T4SS を獲得することで多様な哺乳類に適応できたと考えられている (Vayssier-Taussat et al., 2010)。また、*Bartonella* の進化の過程において、Trw T4SS は比較的最近に獲得された機構であると推測されている (Harms, A., and Dehio, C. 2012; Engel et al., 2011)。本研究でコウモリ由来 *Bartonella* が *fla* を保有せず、*trw* を保有することが明らかとなり、*Bartonella* のコウモリへの適応はその進化の過程において比較的後期に生じたことが推定された。

血管内皮細胞のフィブロネクチンと結合することで宿主の血管内皮細胞と菌体の接着成立に関与する *badA* (Kaiser et al., 2008; Riess et al., 2007)、*omp43* (Burgess et al., 2000)、*omp89* (Dabo et al., 2006)のうち、7株すべてが *omp89* を、6株が *badA* あるいは *omp43* を保有していた。すなわち、コウモリ由来の7株は、これら検討した3遺伝子の全てあるいは2つを保有していたことから、コウモリ由来株も他の *Bartonella* と同様の

機構で宿主の血管内皮細胞へ接着を成立させているものと考えられた。

キタクビワコウモリ由来株 (EN2、EN36)、キクガシラコウモリ由来株 (F1)、モモジロコウモリ由来株の 1 株 (F3)は *vapA* 遺伝子を保有していた。*vapA* 遺伝子は *Rhodococcus equi* において同定された遺伝子で、宿主マクロファージの貪食に抵抗性を示し、生体内で長期間の生存を可能にする機能を有している。*B. henselae* においても、*vapA* 遺伝子はマクロファージ内で菌体が生存するのに有利な影響を与えていることが示唆されている (Kyme et al., 2005)。従って、*vapA* 遺伝子を保有するコウモリ由来株は、コウモリの体内で宿主のマクロファージの貪食を阻害することにより、生体内で長期間の生存を可能にしていることが考えられた。

コウモリ由来の 7 株の全てが、宿主の赤血球中のヘムタンパクの取り込み・利用に関連する *hbps* 遺伝子 (Battisti et al., 2007)、赤血球への接着侵入に関与する *trw* 遺伝子 (Deng et al., 2012)および *ialB* 遺伝子 (Coleman, S. A., and Minnick, M. F.,2001)、宿主の血管内皮細胞内への侵入に関与する *virB/virD4/beps* 遺伝子 (Schmiederer et al., 2001)を保有していた。このことから、コウモリ由来株は、他の *Bartonella* と同様の機構で宿主血管内皮細胞へ感染し、宿主赤血球への接着・侵入し、ヘムタンパクを利用して持続感染を成立させていることが推定された。

以上の病原遺伝子の解析から、わが国のコウモリ由来 *Bartonella* は、*B. henselae* と同様にベクターの刺咬等により①皮下に侵入後、②皮下から血管内皮細胞に移行する (*badA*, *omp43*, *omp89*, *virB/D4/beps*)。その後、血管内皮細胞から血管内腔へ遊離し、③

一部の株ではマクロファージによる貪食に抵抗して (*vapA*)、④赤血球内に侵入することで (*trw*、*ialB*)、⑤宿主体内で持続感染を成立させている (*hbps*)と推定された (図 4.3)。

キタクビワコウモリ由来 EN2-1 株の完全長ゲノムの決定を試みた結果、Contig 数は 1、PacBio リードと MiSeq リードの平均カバレッジの合計は 146.73×となり、完全長ゲノムが高精度に決定されたと考えられた。病原関連遺伝子の座位を確認したところ、*B. henselae* と同様に、PAI 中 (図 4.1.A)に *virB/D4/beps* および *trw* 遺伝子が存在していた。EN2-1 株 *virB/D4* は、*B. henselae* の *virB/D4* と同じ機能的ドメインをコードしていた。このことから、EN2-1 株の VirB/D4 T4SS は他の *Bartonella* における VirB/D4 T4SS と類似の機能を有していると考えられた。EN2-1 株の Trw T4SS をコードする *trw* 遺伝子は *B. henselae* と類似の構造をとっていたことから、EN2-1 株の *trw* 遺伝子は、宿主赤血球への接着に関与している可能性が示唆された。今後、EN2-1 株がヒトへの病原性を評価する上で、本株の Trw T4SS がヒトの赤血球へ接着能を有するかを検討する必要があると思われる。

EN2-1 株の完全長ゲノム配列において、PAI 以外の部分 (図 4.1.B)に T4SS 様オペロンと *vbht-like* オペロンが存在した (図 4.3)。T4SS 様オペロン (図 4.3.d)の遺伝子構造を検討したところ、本オペロンに類似の T4SS 様構造は *B. henselae*、*B. tribocorum*、*B. elizabethae*、*B. quintana*、*B. bacilliformis* には確認されなかった。その一方で、図 4.3.b の *vbht-like* オペロンは反芻獣由来 *Bartonella* に特異的な Vbht T4SS をコードする *vbht* 遺伝子群にアノテーションされていた。これまでの報告では、げっ歯類を自然宿主とする *B.*

tribocorum, *B. elizabethae*, *B. rattimassiliensis* においても *vbht* は染色体上にコードされているものの、*traA*, *traG* が欠損していることにより偽遺伝子化していると考えられている (Harms et al.,2017a)。今回検出された EN2-1 株の *vbht*-like オペロンでは、*virB* 遺伝子群と Vbht T4SS に特異的な *yafQ*, *vbhT*, *vbhA*, *traA* 遺伝子は存在しており、その機能的ドメインは保存されていたものの、構造遺伝子である *traC*, *traD*, および *traG* の大部分は欠損していたことから、EN2-1 株の *vbht*-like オペロンは偽遺伝子化していると考えられた。*B. tribocorum*, *B. elizabethae*, *B. rattimassiliensis* では、染色体の PAI 上に *vbht* 遺伝子群がコードされていることが判明している (Harms et al., 2017a)。EN2-1 株では PAI 以外の部分に偽遺伝子化した *vbht*-like オペロンが存在していたことから、本株ではプラスミドから *vbht* 遺伝子群が染色体上に組み込まれた可能性が考えられた。

本研究により、初めてコウモリ由来 *Bartonella* である EN2-1 株の完全長ゲノムが決定された。さらに、EN2-1 株はこれまでに完全長ゲノムが決定された *Bartonella* と比べて PAI 以外の部分に *vbht* を有するという特徴的なゲノム構造を有することが明らかとなった

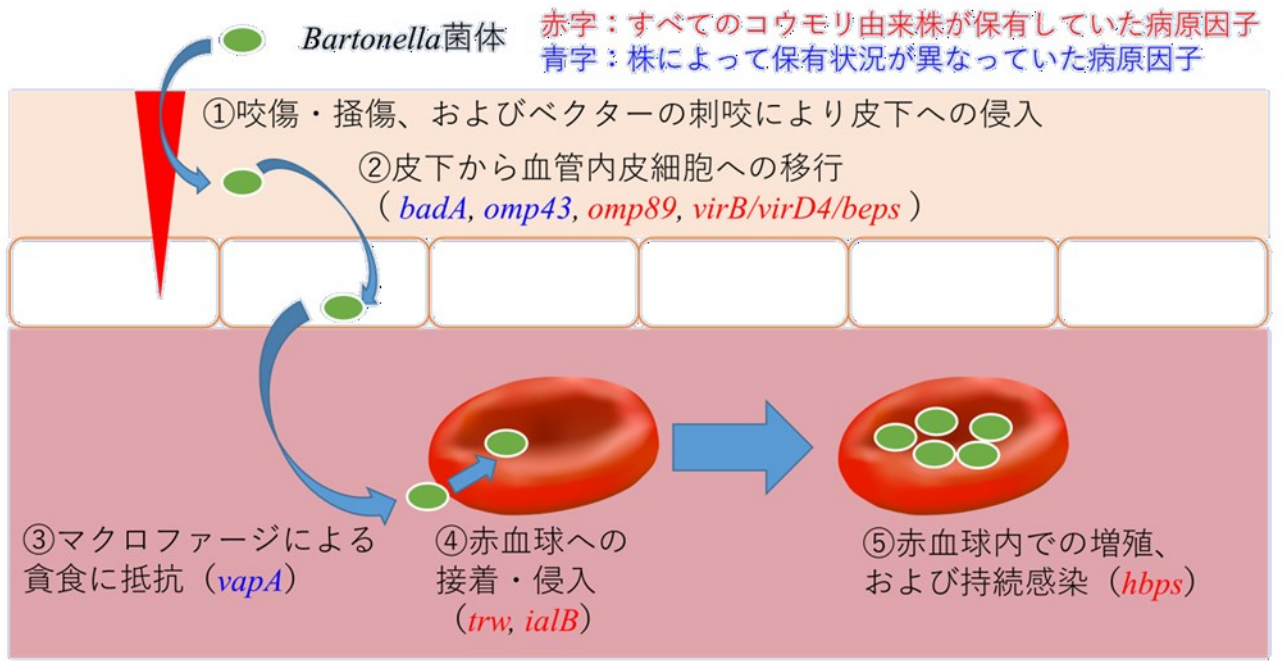


図 4.3 コウモリ由来 *Bartonella* の宿主への感染機序の模式図

本研究の成績から予想されるコウモリ由来 *Bartonella* の宿主への感染機序を示す。赤字で示された遺伝子は、本研究により全てのコウモリ由来株が保有していた病原関連遺伝子を、青字で示された遺伝子は株によって保有状況が異なっていた病原関連遺伝子をそれぞれ示す。

4.5 小括

猫ひっかき病の原因菌である *Bartonella henselae* では、8つの病原因子をコードする遺伝子が同定されている。本研究ではコウモリ由来 *Bartonella* の病原因子と宿主における感染機序の解明を目的として、次世代シーケンサーMiSeqとNanopore MinIONを用いて異なる7系統の *Bartonella* のドラフトゲノム配列を決定し、Virulence factor database (VFDB)を用い、病原関連遺伝子の保有状況を *B. henselae* と比較解析した。

検討したコウモリ由来7株において、宿主の血管内皮細胞への接着に関与する分子をコードする *badA*、*omp43*、*omp89* のうち7株全てが *omp89* を保有しており、6株は *badA*、*omp43* を保有していた。また、全ての株は、宿主血管内皮細胞へエフェクタータンパクを注入し、血管内皮細胞内への侵入に関与する分子をコードする *virB/virD4/beps*、宿主血管内皮細胞への接着および侵入に関与する分子をコードする *trw*、*ialB*、赤血球中での持続感染および増殖を成立させる分子をコードする *hbps* 遺伝子を保有していたことから、*B. henselae* と同様の機序で宿主の血管内皮細胞や赤血球へ感染する可能性が考えられた。一方、マクロファージの貪食を阻害する分子をコードする *vapA* 遺伝子は、キタクビワコウモリ由来の2株、キクガシラコウモリ由来の1株、モモジロコウモリ由来の1株が保有していたことから、これらの株は *vapA* の機序を用いて宿主のマクロファージによる貪食を阻害し、生体内で長期間生存する可能性が考えられた。以上から、わが国のコウモリ由来 *Bartonella* は、*B. henselae* と同様に、①ベクターの刺咬等により皮下に侵入後、皮下から血管内皮細胞に移行し、②その後、血管内皮細胞か

ら血管内腔へ遊離し、③一部の株ではマクロファージによる貪食に抵抗して、④赤血球内に侵入することで、宿主体内で持続感染を成立させていると推定された。また、コウモリ由来株はその全てが鞭毛遺伝子 (*fla*)を保有せず、*trw* を保有していたことから、*Bartonella* のコウモリへの適応はその進化の過程において比較的后期に生じたことが推定された。

キタクビワコウモリ由来株の EN2-1 株の完全長ゲノム配列を決定し、病原関連遺伝子の座位を確認した。その結果、*B. henselae* と同様に、Pathogenicity island (PAI)中に *virB/D4/beps* および *trw* 遺伝子が存在しており、さらに *virB/D4* 遺伝子と *B. henselae* と共通の機能的ドメインを保有していたこと *trw* 遺伝子は *B. henselae* と類似の構造であったことから、EN2-1 株の VirB/D4 T4SS と Trw T4SS は *B. henselae* のものと類似の機能を有していると考えられた。PAI 以外の部分に偽遺伝子化していると考えられる *vbht*-like オペロンが存在していた。本構造は *B. henselae*、*B. tribocorum*、*B. elizabethae*、*B. quintana*、*B. baciliformis* には確認されておらず、EN2-1 株に特有なものであると考えられた。

以上のことから、本研究では初めて、コウモリ由来 *Bartonella* である EN2-1 株の完全長ゲノムを決定し、さらに、EN2-1 株は PAI 以外の部分に *vbht* を有するという特徴的なゲノム構造を有することを明らかにすることができた。

第5章

総括

わが国に生息する 170 種の野生哺乳類のうち、翼手目 (コウモリ)は少なくとも 35 種が知られており、国内では最も多種の野生動物である。また、コウモリはヘンドラウイルス感染症、ニパウイルス感染症、狂犬病、SARS、エボラ出血熱などの病原性が極めて高いウイルスの病原巣あるいは媒介動物であることから、わが国のコウモリにおいても各種病原体の保有状況を解明することは重要な課題であると考えられる。

Bartonella 属菌はグラム陰性の短桿菌で、人を含む多くの哺乳類を自然宿主とし、宿主の血管内皮細胞や赤血球に持続感染することで長期間の菌血症を引き起こすことが知られている。また、本属菌の宿主動物間あるいはヒトへの伝播には、ノミやシラミ、サシチョウバエなどの節足動物が関与している。

これまで 30 の国や地域のコウモリ (37 属 88 種)から *Bartonella* が分離あるいはその DNA が検出されていることから、コウモリには *Bartonella* が広く分布していると考えられる。また、2014 年と 2017 年に、フィンランドとアメリカの *Myotis* 属および *Eptesicus* 属のコウモリから、ヒトの心内膜炎の起因菌である *Candidatus B. mayotimonensis* が分離・検出されたことから、*Myotis* 属や *Eptesicus* 属等のコウモリは、ヒトに感染性を有する *Bartonella* を保有していることが推定される。

以上のように、コウモリはバルトネラ症の新たな感染源となる可能性があることから、コウモリにおける *Bartonella* 属菌の生態を明らかにすることは、バルトネラ症の疫学を解明する上で極めて重要であるが、わが国のコウモリに関してはこれまで全く検討されていない。そこで、本学位論文では、日本に生息するコウモリにおける *Bartonella*

の生態、すなわち分布状況、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクター、ならびに感染機序を細菌学的・分子生物学的手法を用いて明らかにした。

1. わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の分布とその宿主特異性の検討

わが国に生息するコウモリにおける *Bartonella* の分布状況と保有する株の遺伝子性状の解明を目的として、2013 年から 2019 年の間に、北海道においてキタクビワコウモリ (*Eptesicus nilssonii*) を 123 頭、和歌山県においてユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) を 50 頭、静岡県においてモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*) を 4 頭とキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) を 1 頭捕獲し、*Bartonella* の分離を試みた。各個体から分離された *Bartonella* 様のコロニー 3 株から InstaGene Matrix を用いて DNA を抽出し、*Bartonella* 属に特異的なクエン酸合成酵素遺伝子 (*gltA*) および RNA ポリメラーゼ β サブユニット遺伝子 (*rpoB*) 領域を標的とした PCR 法により本属菌であることを確認した。さらに、*gltA* 遺伝子領域の塩基配列を決定し、海外のコウモリ由来株および *Bartonella* 標準株との遺伝子相同性解析ならびに系統解析を行った。

ユビナガコウモリの 24% (12/50)、キタクビワコウモリの 26% (32/123)、キクガシラコウモリとモモジロコウモリの全個体から *Bartonella* 属菌が分離された。分離株の *gltA* 領域の遺伝子型別では、13 の *gltA* 遺伝子型 (1~13) に分類された。ユビナガコウモリは遺伝子型 1~5、キタクビワコウモリは遺伝子型 6~8、モモジロコウモリは遺伝子型 10~12、キクガシラコウモリは遺伝子型 13 を保有していた。一方、コウモリの種間で共

通した遺伝子型の *Bartonella* は存在しなかった。さらに、*gltA*、*rpoB* 領域の相同性解析に基づく菌種同定では、今回コウモリから分離された株は、いずれの既存種にも該当しなかった。

gltA 領域に基づく系統解析では、コウモリ由来 13 株は大きく 7 つの系統 (A~G) に分類された。ユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) 由来の遺伝子型 1、2、3、4 は、台湾の *Miniopterus* 属コウモリ由来株とともに系統 A に、遺伝子型 5 は単系統の系統 E に分類された。キタクビワコウモリ (*Eptesicus nilssonii*) 由来の遺伝子型 6、7 は *Vespertilionidae* 科コウモリ由来株とともに系統 G に、遺伝子型 8 はげっ歯類由来株に近縁な単系統の系統 F に分類された。モモジロコウモリ由来 (*Myotis macrodactylus*) の遺伝子型 9、11 は系統 D に、遺伝子型 10 は系統 B に、それぞれ中国の *Myotis* 属コウモリ由来株とともに分類された、遺伝子型 12 は遺伝子型 6、7 と *Vespertilionidae* 科コウモリ由来株とともに系統 G に分類された。キクガシラコウモリ由来の遺伝子型 13 は、*Myotis* 属と *Rhinolophus* 属コウモリ由来株とともに系統 C に分類された。

本研究では、わが国の 4 種のコウモリ全てが *Bartonella* を保有していることを初めて明らかにした。分離株の遺伝子系統解析では、コウモリ由来株は A~G の 7 系統に分類され、系統 A、B、D、G はそれぞれ、*Miniopterus* 属、*Myotis* 属 (2 系統)、*Vespertilionidae* 科のコウモリにそれぞれ固有の新種であることが明らかとなった。また、系統 C の株は複数のコウモリ科から分離されていることから、コウモリの科を超えて感染可能な系統であると考えられた。さらに、系統 E と F に近縁な他国のコウモリ由来株あるいは近縁

種は存在しなかったことから、両系統の株は日本のユビナガコウモリとキタクビワコウモリにそれぞれ固有の新種の *Bartonella* であることが示唆された。

2. コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターの検討

Bartonella 属菌の中で、*B. henselae* はネコノミ、*B. quintana* はコロモジラミ、*B. baciliformis* はサンショウバエによって媒介されるが、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターについては解明されていない。本研究では、コウモリから採取した吸血性吸血性節足動物種を形態学的、チトクロム c オキシダーゼサブユニット 1 (COI) 遺伝子に基づく系統解析により同定するとともに、それらから *Bartonella* を分離・検出し、宿主コウモリの株と遺伝子相同解析することで各コウモリに寄生する吸血性節足動物相とそれらの *Bartonella* を媒介するベクターとしての役割について解析した。

ユビナガコウモリからは、クモバエが 281 匹採取され、*Nycteribia allotopa* (N=157)、*Nycteribia* sp. (N=79)、*Penicillidia jenyinsii* (N=45) に同定された。また、*Nycteribia* sp. は COI 遺伝子の系統解析で、既存種とは異なる系統となったことから、新種のクモバエである可能性が示された。キタクビワコウモリからは、174 匹のノミと 2 匹のトコジラミが採取され、ノミはコウモリノミ (*Ischnopsyllus needhami* ; N=174)、トコジラミは *Cimex japonicus* (N=2) と同定された。モモジロコウモリからは、16 匹のクモバエと 2 匹のダニが採取され、クモバエは *N. pygmaea* (N=16)、ダニは *Spinturnix myoti* (N=4) と同定された。以上の結果から、コウモリでは、種ごとに異なる吸血性節足動物相を形成していること

が明らかとなった。

吸血性節足動物のうち、*N. allotopa* 2 匹、*Nycteribia* sp. 1 匹、コウモリノミ 1 匹から *Bartonella* が分離されたことから、*Nycteribia* 属のクモバエとコウモリノミの体内で *Bartonella* は生存可能であることが示唆された。

寄生虫種ごとの *Bartonella* DNA の陽性率は、ユビナガコウモリ由来の *N. allotopa* で 47.1% (74/157)、*Nycteribia* sp. で 15.2% (12/79)、*P. jenynsii* で 6.7% (3/45) で、*N. allotopa* の陽性率は *Nycteribia* sp. および *P. jenynsii* の値に比べて有意 ($p < 0.01$) に高かった。キタクビワコウモリ由来のコウモリノミの *Bartonella* DNA 陽性率は 46% (80/174) であったが、トコジラミからは検出されなかった。モモジロコウモリ由来の *N. pygmaea* の *Bartonella* DNA 陽性率は 43.8% (7/16)、*S. myoti* では 25% (1/4) であった。

吸血性節足動物由来 *Bartonella* DNA の *gltA* 領域の塩基配列を宿主のコウモリ由来株とともに相同性解析を行ったところ、*N. allotopa* はユビナガコウモリ由来株と同じ遺伝子型である遺伝子型 1、2、3、4 を、*Nycteribia* sp. は遺伝子型 1 を保有していた。*P. jenynsii* 由来株は既存の遺伝子型に分類されなかった。コウモリノミ由来株の遺伝子型は 6、7、8 で、コウモリノミはキタクビワコウモリ由来株と同じ遺伝子型の *Bartonella* を保有していた。*S. myoti* 由来株の遺伝子型は 9、*N. pygmaea* 由来株の遺伝子型は 10 で、いずれもモモジロコウモリ由来株と同じ遺伝子型の *Bartonella* であった。

以上の結果から、ユビナガコウモリにおいては *Nycteribia* 属のクモバエが、キタクビワコウモリにおいてはコウモリノミが主要な *Bartonella* のベクターであると考えら

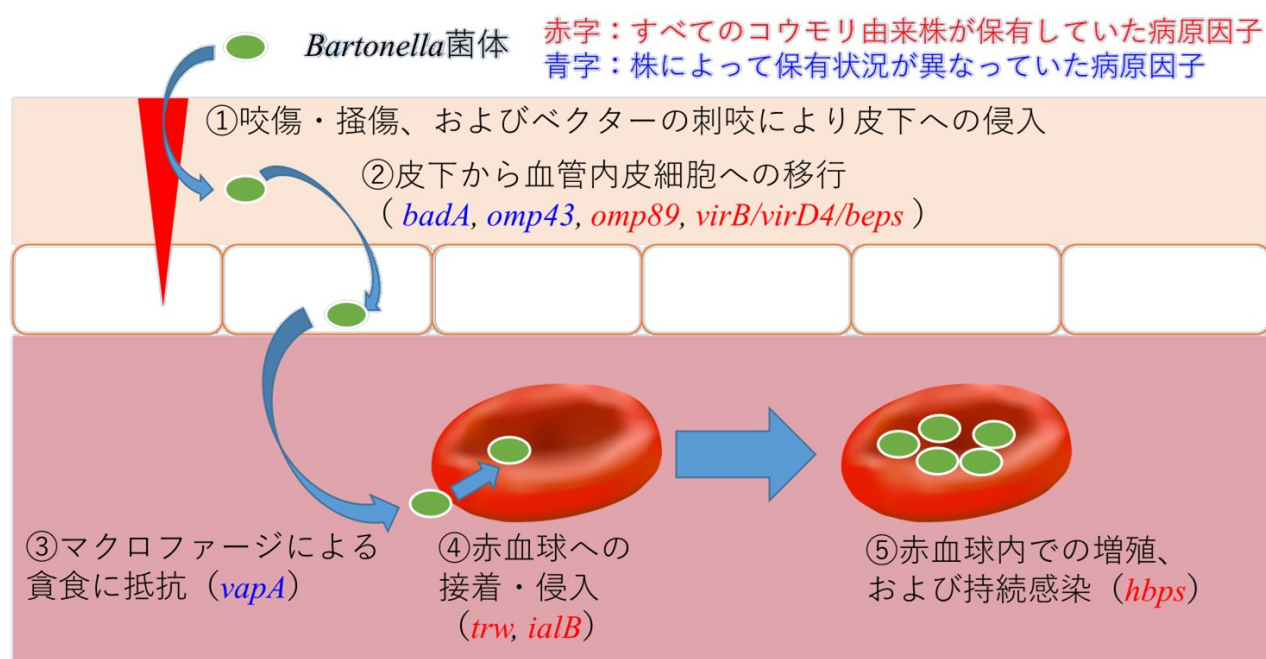
れた。また、モモジロコウモリでは *N. pygmaea* と *S. myoti* の両方が *Bartonella* のベクターである可能性が考えられた。

3. コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析による病原因子と宿主における感染機序の 解明

猫ひっかき病の原因菌である *Bartonella henselae* では、8つの病原因子をコードする遺伝子が同定されている。本研究ではコウモリ由来 *Bartonella* の病原因子と宿主における感染機序の解明を目的として、次世代シーケンサーMiSeqと Nanopore MinION を用いて異なる7系統の *Bartonella* のドラフトゲノム配列を決定し、Virulence factor database (VFDB)を用い、病原関連遺伝子の保有状況を *B. henselae* と比較解析した。

検討したコウモリ由来7株において、宿主の血管内皮細胞への接着に關与する分子をコードする *badA*、*omp43*、*omp89* のうち7株全てが *omp89* を保有しており、6株は *badA*、*omp43* を保有していた。また、全ての株は、宿主血管内皮細胞へエフェクタータンパクを注入し、血管内皮細胞内への侵入に關与する分子をコードする *virB/virD4/beps*、宿主血管内皮細胞への接着および侵入に關与する分子をコードする *trw*、*ialB*、赤血球中での持続感染および増殖を成立させる分子をコードする *hbps* 遺伝子を保有していたことから、*B. henselae* と同様の機序で宿主の血管内皮細胞や赤血球へ感染する可能性が考えられた。一方、マクロファージの貪食を阻害する分子をコードする *vapA* 遺伝子は、キタクビワコウモリ由来の2株、キクガシラコウモリ由来の1株、モモジロ

コウモリ由来の 1 株が保有していたことから、これらの株は *vapA* の機序を用いて宿主のマクロファージによる貪食を阻害し、生体内で長期間生存する可能性が考えられた。以上から、わが国のコウモリ由来 *Bartonella* は、*B. henselae* と同様に、①ベクターの刺咬等により皮下に侵入後、皮下から血管内皮細胞に移行し、②その後、血管内皮細胞から血管内腔へ遊離し、③一部の株ではマクロファージによる貪食に抵抗して、④赤血球内に侵入することで、宿主体内で持続感染を成立させていると推定された (下図)。



キタクビワコウモリ由来株の EN2-1 株の完全長ゲノム配列を決定し、病原関連遺伝子の座位を確認した。その結果、*B. henselae* と同様に、Pathogenicity island (PAI)中に *virB/D4/beps* および *trw* 遺伝子が存在しており、さらに *virB/D4* 遺伝子と *B. henselae* と共通の機能的ドメインを保有していたこと *trw* 遺伝子は *B. henselae* と類似の構造であったことから、EN2-1 株の *VirB/D4* T4SS と *Trw* T4SS は *B. henselae* と類似の機能を有していると考えられた。PAI 以外の部分に偽遺伝子化していると考えられる *vbht-like* オペロン

が存在していた。本構造は *B. henselae*、*B. tribocorum*、*B. elizabethae*、*B. quintana*、*B. baciliformis* には確認されておらず、EN2-1 株に特有であると考えられた。

以上のことから、本研究では初めて、コウモリ由来 *Bartonella* である EN2-1 株の完全長ゲノムを決定し、さらに、EN2-1 株は PAI 以外の部分に *vbht* を有するという特徴的なゲノム構造を有することを明らかにすることができた。

【総括】

本研究では、わが国の 4 種のコウモリは 7 種の異なる系統の *Bartonella* 属菌を保有しており、その系統はコウモリの科や属ごとに固有の新種であることを初めて明らかにした。特に、ユビナガコウモリ由来株、キタクビワコウモリ由来株の一部は、わが国に生息するこれらのコウモリに固有の新種であると考えられた。また、ユビナガコウモリでは *Nycteribia* 属のクモバエ、キタクビワコウモリではコウモリノミが、モモジロコウモリではコウモリダニと *N. pygmaea* が *Bartonella* を媒介するベクターである可能性を示すことができた。さらに、コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析では、コウモリ由来株は *B. henselae* と同様に、8 つないしは 7 つの病原因子を保有していたことから、類似の感染機序で宿主に持続感染していることが示唆された。

謝辞

本研究を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本大学大学院獣医学研究科 教授 丸山総一 博士に深甚なる謝意を表しますとともに、有益な御助言と心温まる励ましを賜りました同研究科 教授 壁谷英則 博士ならびに 専任講師 佐藤真伍 博士に心より感謝いたします。

本論文を提出するにあたり、副査をお願いしてご助言を賜りました本学獣医学研究科 教授 遠矢幸伸先生には有益なご指摘をいただきましたこと、篤く御礼申し上げます。

貴重な各野生動物種の試料を提供して頂きました 和歌山県田辺市ふるさと自然公園センター 鈴木和男 先生、国立感染症研究所 前田 健先生、山口大学 准教授 高野 愛先生、並びに下田 宙先生に篤く御礼申し上げます。

また、採材から各種実験の遂行に、終始ご協力頂いた獣医公衆衛生学研究室所属の学生諸氏に対し、篤く御礼申し上げます。

最後に、私に学問を修める機会と時間を与え、日々の研究生活を暖かく支え続けてくれた母、学問の道に進むことを応援してくれた父に心から感謝いたします。

引用文献

- Battisti, J. M., Smitherman, L. S., Sappington, K. N., Parrow, N. L., Raghavan, R., and Minnick, M. F. (2007). Transcriptional regulation of the heme binding protein gene family of *Bartonella quintana* is accomplished by a novel promoter element and iron response regulator. *Infect. Immun.*, 75 (9), 4373–4385. <https://doi.org/10.1128/IAI.00497-07>
- Becker, D. J., Bergner, L. M., Bentz, A. B., Orton, R. J., Altizer, S., and Streicker, D. G. (2018). Genetic diversity, infection prevalence, and possible transmission routes of *Bartonella* spp. in vampire bats. *PLoS Negl Trop Dis* 12 (9), e0006786.
- Bisch, G., Neuvonen, M. M., Pierce, N. E., Russell, J. A., Koga, R., Sanders, J. G., Lukasik, P., and Andersson, S. (2018). Genome evolution of Bartonellaceae symbionts of ants at the opposite ends of the trophic scale. *Genome Biol. Evol.*, 10 (7), 1687–1704. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy126>
- Breitschwerdt, E. B. (2014). Bartonellosis: one health perspectives for an emerging infectious disease. *ILAR journal*, 55 (1), 46-58.
- Burgess, A. W., Paquet, J. Y., Letesson, J. J., and Anderson, B. E. (2000). Isolation, sequencing and expression of *Bartonella henselae* omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. *Microb. Pathog.*, 29 (2), 73-80.
- Chomel, B. B., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., Gurfield, A. N., Abbott, R. C., Pedersen, N. C., and Koehler, J. E. (1996). Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.*, 34 (8), 1952-1956.

- Coleman, S. A., and Minnick, M. F. (2001). Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*IalB*) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect. Immun.*, 69 (7), 4373–4381. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4373-4381.2001>
- Concannon, R., Wynn-Owen, K., Simpson, V. R., and Birtles, R. J. (2005). Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. *Parasitology*, 131, 489–496. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008097>
- Dabo, S. M., Confer, A. W., Saliki, J. T., and Anderson, B. E. (2006). Binding of *Bartonella henselae* to extracellular molecules: identification of potential adhesins. *Microb. Pathog.*, 41 (1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.04.003>
- Deng, H. K., Le Rhun, D., Le Naour, E., Bonnet, S., and Vayssier-Taussat, M. (2012). Identification of *Bartonella* Trw host-specific receptor on erythrocytes. *PloS one*, 7 (7), e41447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041447>
- Deng, H., Pang, Q., Zhao, B., and Vayssier-Taussat, M. (2018). Molecular mechanisms of *Bartonella* and mammalian erythrocyte interactions: A Review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 8, 431. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00431>
- Engel, P., Salzburger, W., Liesch, M., Chang, C. C., Maruyama, S., Lanz, C., Calteau, A., Lajus, A., Médigue, C., Schuster, S. C., and Dehio, C. (2011). Parallel evolution of a type IV secretion system in radiating lineages of the host-restricted bacterial pathogen *Bartonella*. *PLoS Genet.*, 7 (2), e1001296. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001296>

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3 (5), 294–299.
- Fournier, P. E., Minnick, M. F., Lepidi, H., Salvo, E., and Raoult, D. (2001). Experimental model of human body louse infection using green fluorescent protein-expressing *Bartonella quintana*. *Infect. Immun.*, 69 (3), 1876–1879. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1876-1879.2001>
- Garcia-Quintanilla, M., Dichter, A. A., Guerra, H., and Kempf, V. A. (2019). Carrion’s disease: more than a neglected disease. *Parasites Vectors* 12 (1), 1-12.
- Han, H. J., Wen, H. L., Zhao, L., Liu, J. W., Luo, L. M., Zhou, C. M., Qin, X. R., Zhu, Y. L., Zheng, X. X., and Yu, X. J. (2017). Novel *Bartonella* species in insectivorous bats, northern China. *PloS one*, 12 (1), e0167915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167915>
- Harms, A., Liesch, M., Körner, J., Québatte, M., Engel, P., and Dehio, C. (2017a). A bacterial toxin-antitoxin module is the origin of inter-bacterial and inter-kingdom effectors of *Bartonella*. *PLoS Genet.*, 13 (10), e1007077.
- Harms, A., Segers, F. H., Québatte, M., Mistl, C., Manfredi, P., Körner, J., Chomel, B. B., Kosoy, M., Maruyama, S., Engel, P., and Dehio, C. (2017b). Evolutionary Dynamics of Pathoadaptation Revealed by Three independent acquisitions of the VirB/D4 type IV secretion system in *Bartonella*. *Genome Biol. Evol.*, 9 (3), 761–776. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx042>

- Harms, A., and Dehio, C. (2012). Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 25 (1), 42–78. <https://doi.org/10.1128/CMR.05009-11>
- Kaiser, P.O., Riess, T., Wagner, C.L., Linke, D., Lupas, A.N., Schwarz, H., Raddatz, G., Schäfer, A. and Kempf, V.A.J. (2008), The head of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*. *Cell. Microbiol.*, 10: 2223-2234. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01201.x>
- 熊沢秀雄・谷地森秀二.(2005). 高知県の野生哺乳類から得た外部寄生虫. *四国自然史科学研究*, 2:45-50
- Kyme, P.A., Haas, A., Schaller, M., Peschel, A., Iredell, J. and Kempf, V.A.J. (2005), Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae*-containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. *Cell. Microbiol.*, 7: 1019-1034. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00531.x>
- Letko, M., Seifert, S. N., Olival, K. J., Plowright, R. K., and Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1-11.
- Lilley, T. M., Wilson, C. A., Bernard, R. F., Willcox, E. V., Vesterinen, E. J., Webber, Q. M., Kurpiers, L., Prokkola, J. M., Ejotire, I., Kurta, A., Field, K. A., Reeder, D. M., and Pulliainen, A. T. (2017). Molecular Detection of *Candidatus Bartonella mayotimonensis* in North American Bats. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17 (4), 243–246. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2080>

- Lin, E. Y., Tsigrelis, C., Baddour, L. M., Lepidi, H., Rolain, J. M., Patel, R., and Raoult, D. (2010). *Candidatus* Bartonella mayotimonensis and endocarditis. *Emerging Infect. Dis.*, 16 (3), 500–503. <https://doi.org/10.3201/eid1603.081673>
- Lin, J. W., Hsu, Y. M., Chomel, B. B., Lin, L. K., Pei, J. C., Wu, S. H., and Chang, C. C. (2012). Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. *Vet. Microbiol.*, 156 (1-2), 119-126.
- 松江正彦・藤原宣夫・大塩俊雄・飯塚康雄・内山拓也.(2006). コウモリ類の調査の手引き. 国総研資料 第354号.
- Maa, T.C. A synopsis of Diptera Pupipara of Japan. *Pacific Insects*, 1967,pp. 727–760.
- McKee, C. D., Krawczyk, A. I., Sándor, A. D., Görföl, T., Földvári, M., Földvári, G., and Sprong, H. (2019). Host phylogeny, geographic overlap, and roost sharing shape parasite communities in European bats. *Front. Ecol. Evol.*, 7, 69.
- Melaun, C., Werblow, A., Busch, M. W., Liston, A., and Klimpel, S. (2014). Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In *Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites* (pp. 25-61). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Morse, S. F., Olival, K. J., Kosoy, M., Billeter, S., Patterson, B. D., Dick, C. W., and Dittmar, K. (2012). Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). *Infect. Genet. Evol.*, 12 (8), 1717-1723.
- Mühldorfer K. (2013). Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses Public Health*, 60 (1),

93–103. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x>

- Nabeshima, K., Sato, S., Kabeya, H., Kato, C., Suzuki, K., & Maruyama, S. (2020). Isolation and genetic properties of *Bartonella* in eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. *Infect. Genet. Evol.*, 83, 104354. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104354>
- Nikoh, N., Kondo, N., and Fukatsu, T. (2011). Phylogenetic comparison between nycteribiid bat flies and their host bats. *Medical Entomology and Zoology*, 62 (3), 185-194.
- Norman, A. F., Regnery, R., Jameson, P., Greene, C., and Krause, D. C. 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol*, 33:1797-803.
- Ohdachi, S. D., Ishibashi, Y., Iwasa, M. A., Saitoh, T., and Sellers, S. B. (Eds.). (2009). The wild mammals of Japan (p. 544). Kyoto, Japan: Shoukadoh Book Sellers.
- Okujava, R., Guye, P., Lu, Y. Y., Mistl, C., Polus, F., Vayssier-Taussat, M., Halin, C., Rolink, A. G., and Dehio, C. (2014). A translocated effector required for *Bartonella* dissemination from derma to blood safeguards migratory host cells from damage by co-translocated effectors. *PLoS pathogens*, 10 (6), e1004187. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004187>
- Orlova, M. V. (2011). Ectoparasite associations of bats from the Urals (Russia). *Hystrix*, 22 (1), 105-110.
- Pearce, R., and O'shea. (2007). Ectoparasites in an urban population of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) in Colorado. *J Parasitol.* 93:518-30.

- Plowright, R. K., Eby, P., Hudson, P. J., Smith, I. L., Westcott, D., Bryden, W. L., Middleton, D., Reid, P. A., McFarlane, R. A., Martin, G., Tabor, G. M., Skerratt, L. F., Anderson, D. L., Cramer, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L. F., Epstein, J. H., Marsh, G. A., Kung, Y., and McCallum, H. (2015). Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc. Biol. Sci.*, 282 (1798), 20142124. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2124>
- Reeves, W. K., Loftis, A. D., Gore, J. A., and Dasch, G. A. (2005). Molecular evidence for novel *Bartonella* species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, USA. *J. Vector Ecol.*, 30 (2), 339.
- Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D. 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol*, 39:430-7.
- Rhomberg, T. A., Truttmann, M. C., Guye, P., Ellner, Y and Dehio, C. (2009). A translocated protein of *Bartonella henselae* interferes with endocytic uptake of individual bacteria and triggers uptake of large bacterial aggregates via the invasome. *Cell. Microbiol.*, 11 (6), 927–945. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01302.x>
- Riess, T., Raddatz, G., Linke, D., Schäfer, A., and Kempf, V. A. (2007). Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect. Immun.*, 75 (1), 35–43. <https://doi.org/10.1128/IAI.00963-06>
- Sakaguti, K., Pacific Insects Monograph. 1962. HI: Bernice P. Bishop Mus.
- Schmid, M. C., Schulein, R., Dehio, M., Denecker, G., Carena, I., and Dehio, C. (2004). The

VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol. Microbiol.*, 52 (1), 81–92.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03964.x>

- Schmiederer, M., Arcenas, R., Widen, R., Valkov, N., and Anderson, B. (2001). Intracellular induction of the *Bartonella henselae* *virB* operon by human endothelial cells. *Infect. Immun.*, 69 (10), 6495–6502. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6495-6502.2001>
- Springer, M. S., Teeling, E. C., Madsen, O., Stanhope, M. J., and de Jong, W. W. (2001). Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98 (11), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551998>
- Stuckey, M. J., Chomel, B. B., de Fleurieu, E. C., Aguilar-Setién, A., Boulouis, H. J., and Chang, C. C. (2017a). *Bartonella*, bats and bugs: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 55, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.09.001>
- Stuckey, M. J., Boulouis, H. J., Cliquet, F., Picard-Meyer, E., Servat, A., Aréchiga-Ceballos, N., Echevarría, J. E., and Chomel, B. B. (2017b). Potentially zoonotic *Bartonella* in bats from France and Spain. *Emerging Infect. Dis.*, 23 (3), 539–541. <https://doi.org/10.3201/eid2303.160934>
- Sun, D. L., Gao, Y. Z., Ge, X. Y., Shi, Z. L., and Zhou, N. Y. (2020). Special features of bat microbiota differ from those of terrestrial mammals. *Front. Microbiol.*, 11, 1040. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01040>

- Szubert-Kruszyńska, A., Stańczak, J., Cieniuch, S., Podsiadły, E., Postawa, T., and Michalik, J. (2019). *Bartonella* and *Rickettsia* infections in haematophagous *Spinturnix myoti* mites (Acari: Mesostigmata) and their bat host, *Myotis myotis* (Yangochiroptera: Vespertilionidae), from Poland. *Microb. Ecol.*, 77 (3), 759-768.
- Tadauchi, O., and Inoue, H. (2000). On Mokuroku file based on" A check list of Japanese insects" on internet. *Esakia*, (40), 81-84.
- Tay, S. T., Kho, K. L., Wee, W. Y., and Choo, S. W. (2016). Whole-genome sequence analysis and exploration of the zoonotic potential of a rat-borne *Bartonella elizabethae*. *Acta Trop.*, 155, 25-33.
- Thomas H. Kunz, M. Brock Fenton. (2005). University of Chicago Press, Bat ecology
- Tortosa, P., Dsouli, N., Gomard, Y., Ramasindrazana, B., Dick, C. W., and Goodman, S. M. (2013). Evolutionary history of Indian Ocean nycteribiid bat flies mirroring the ecology of their hosts. *PloS one*, 8 (9), e75215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075215>
- Truttmann, M. C., Rhomberg, T. A and Dehio, C. (2011). Combined action of the type IV secretion effector proteins BepC and BepF promotes invasome formation of *Bartonella henselae* on endothelial and epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 13 (2), 284–299. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01535.x>
- Urushadze, L., Bai, Y., Osikowicz, L., McKee, C., Sidamonidze, K., Putkaradze, D., Imnadze, P., Kandaurov, A., Kuzmin, I. and Kosoy, M. (2017). Prevalence, diversity, and host

associations of *Bartonella* strains in bats from Georgia (Caucasus). *PLoS Negl Trop Dis*, 11: e0005428.

- Usinger, R., 1966. Monograph of Cimicidae (Hemiptera - Heteroptera). MD: Entomological Society of America.
- Vayssier-Taussat, M., Le Rhun, D., Deng, H. K., Biville, F., Cescau, S., Danchin, A., Marignac, G., Lenaour, E., Boulouis, H. J., Mavris, M., Arnaud, L., Yang, H., Wang, J., Quebatte, M., Engel, P., Saenz, H., and Dehio, C. (2010). The Trw type IV secretion system of *Bartonella* mediates host-specific adhesion to erythrocytes. *PLoS pathogens*, 6 (6), e1000946. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000946>
- Veikkolainen, V., Vesterinen, E.J., Lilley, T.M. and Pulliainen, A.T. (2014). Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg Infect Dis*, 20: 960-967.
- Wagner, A., and Dehio, C. (2019). Role of distinct type-IV-secretion systems and secreted effector sets in host adaptation by pathogenic *Bartonella* species. *Cell. Microbiol.*, 21 (3), e13004. <https://doi.org/10.1111/cmi.13004>
- Welch, D.F. (2015). Bartonellaceae . In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00163>

業績一覽

本論文に関わる研究業績は以下に示すとおりである。

1. **Kei Nabeshima**, Shingo Sato, Hidenori Kabeya, Chihiro Kato, Kazuo Suzuki and Soichi Maruyama. Isolation and genetic properties of *Bartonella* species in eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. **Infection, Genetics and Evolution**. 2020.
2. **Kei Nabeshima**, Shingo Sato, Hidenori Kabeya, Nazuki Komine, Rin Nanashima, Ai Takano, Hiroshi Shimoda, Ken Maeda, Suzuki Kazuo, and Soichi Maruyama. Detection and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from bat flies on eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**. 2020.
3. **Kei Nabeshima**, Shingo Sato, Hidenori Kabeya, and Soichi Maruyama. Seroepidemiological survey of *Brucella canis* infection in dogs in Japan. **Japanese Journal of Veterinary Research**. 2020
4. Masaya Mizukami, Shingo Sato, **Kei Nabeshima**, Hidenori Kabeya, Daijiro Ueda, Kazuo Suzuki, Soichi Maruyama. Molecular survey of *Bartonella rochalimae* in Japanese raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). **Journal of Wildlife Diseases**. 2020

受賞一覧

本論文に関わる受賞および表彰は以下に示すとおりである。

1. 日本大学 生物資源科学部特別研究生 (2020年7月)