

## 宿主真核細胞のタンパク質分解系を利用する人獣共通病原菌「レプトスピラ」の感染戦略

琉球大学大学院医学研究科 准教授

TOMA Claudia

### 要旨

レプトスピラは上皮バリアの維持に必須である Adherents Junction (AJ)を破壊しながら標的臓器に辿りつき、腎不全を引き起こすことが問題となっている。我々は、レプトスピラによる AJ の破壊機構を解析し、宿主細胞のタンパク質分解系「Ubiquitin Proteasome System, UPS」が関与していることを報告した。本研究では、UPS をハイジャックするレプトスピラの感染戦略を明らかにすることを目的とした。

沖縄県の臨床分離株の解析により、UPS 阻害剤で AJ の破壊を完全に阻止できる株 (Oki53 株) を発見した。また、レプトスピラは AJ とアクチン骨格のリンカータンパク質である Afadin を分解することを見出した。高病原性の Manilae 株は、UPS の利用が複数の経路で関与しており、これらを明らかにするために、感染細胞のユビキチン化タンパク質網羅的探索を行った。その結果、微小管の動態制御に関与する ARL2 を同定し、レプトスピラによる微小管/アクチン骨格のネットワークの破壊は UPS 阻害で阻止できることを明らかにした。腎上皮細胞の創傷治癒アッセイを用いた解析によって、レプトスピラは急性腎不全時における創傷治癒の遅延を引き起こすことが示唆された。感染細胞の集団移動が UPS 阻害剤で改善され、本研究の成果がレプトスピラによる腎臓障害、慢性腎不全などの新規治療開発の手がかりを与えるものと期待される。

### 背景・目的

レプトスピラ症は熱帯・亜熱帯地域に多く見られる人獣共通感染症の一つである。沖縄県での患者発生は他県に比べ多く、2023 年には西表島で河川が感染源となったレプトスピラ症の集団発生が報告された。また、地球温暖化によって、これまでにあまり報告がなかったヨーロッパ地域でも感染者の数が上昇傾向にあり、警戒が必要な感染症となっている(1)。

病原性レプトスピラは、宿主細胞の細胞間接着装置を構成する Adherens Junction(AJ)を破壊し、標的臓器に移行する。従って、この AJ 破壊分子機構を理解することはレプトスピラ症の重症化と本菌の標的臓器への移行を遮断するために重要である。申請者は、*in vitro* の腎近位尿管上皮細胞 (renal proximal tubular cells, RPTEC/TERT1) の実験系を立ち上げ、レプトスピラの細胞間隙移動を報告した。さらに、E-カドヘリンの裏打ちタンパク質である p0071 と p-120 カテニンの分解を誘導することによって、E-カドヘリンが細胞内に取り込まれることを明らかにした(2) (3)。また、レプトスピラは宿主細胞のタンパク質分解系を利用し、細胞骨格の維持に必要なタンパク質の分解が誘導されることが示唆された。真核細胞のタンパク質分解系は、タンパク質をバルクで分解するオートファジーと選択的に分解する UPS が知られている。UPS では分解すべき標的タンパク質は分解の目印になるユビキチンが

標的タンパク質上のリジンに共有結合される。しかし、レプトスピラの感染によってユビキチン化されるタンパク質は未同定だった (3)。

3次元電子顕微鏡 (Focused ion beam scanning electron microscopy, FIB/SEM) を用いた感染上皮細胞層のモデリングでは、感染 18 時間後には上皮バリアが破綻され多数のレプトスピラが細胞間隙に観察された (図 1B)。一方、UPS を阻害した感染細胞では、細胞構造と密度が維持された (図 1C)。これまでの研究結果からレプトスピラは宿主細胞のタンパク質分解系を利用する感染戦略を有することが示唆され、本研究では、この感染戦略の詳細を明らかにすることを目的とした。

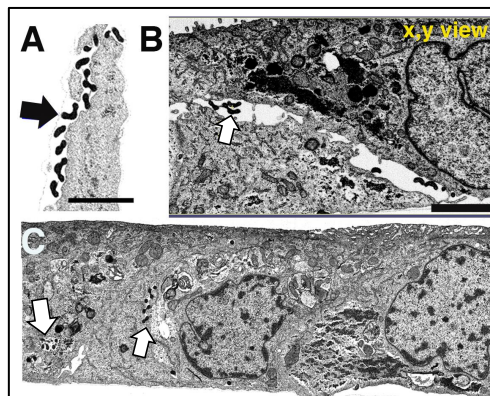


図1.感染細胞のFIB-SEM像。(A) RPTECに付着するレプトスピラ。(B) 細胞層が破壊され、レプトスピラが細胞間隙に存在する(矢印)。(C) UPSを阻害することによって細胞層の構造が維持される。Scale bars: AとBは2 μm, Cは5 μm。Tokumon et al., 2023より改編。

## 方法

- **菌株**: 高病原性株としては、*Leptospira interrogans* 血清型Manilae UP-MMC-NIID (Manilae株)、病原性を示さない株としては、*L. biflexa* Patoc1株を使用した。また、沖縄の臨床分離株として、2023年に八重山で患者から分離された11株を使用した。
- **細胞の培養と上皮バリアの評価**: ヒト腎近位尿細管上皮細胞RPTEC/TERT1 (ATCC CRL-4031)は Transwellにてサプリメントを含むDMEM/F12培地で培養し、極性を示す細胞として14日間分化させた。経上皮細胞抵抗値 (transepithelial electrical resistance, TEER) の測定にて上皮バリア機能を評価した。
- **細胞の感染実験**: 感染に用いるレプトスピラは3日間 EMJH 培地で培養し、MOI:100 になるように PBS で菌量を調整し、基底側から感染した。感染実験で次の阻害剤を用いた: 100 nM bafilomycin A1 (BF)、10 μM MG-132 (MG)、260 nM bortezomib (BZ)、20 μM benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK, VAD)。
- **ユビキチン化蛋白質のプロテオーム解析**: 感染細胞資料をトリプシン処理し、PTMScan Ubiquitin Remnant Motif キットを用いて MS 解析用の資料を準備した。次に、nanoLC-MS/MS 分析を行い、得られたデータについて Proteome Discoverer (PD) Ver2.5 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で Mascot 及び Sequest HT を検索エンジンとしてデータベース検索し、Scaffold Ver5.3.3 (プロテオームサイエンス) にエクスポートして定量比較解析を実施した。
- **ウエスタンブロット**: 感染細胞を RIPA バッファーで溶解し、mini-Protean TGX 4-15 % gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) でタンパク質の電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した。一次抗体として: SAE1 (CST#13585)、SAE2 (CST#8688)、COPS6 (CST69477)、afadin (BD Transduction Laboratories#610732)、Nectin-2 (CST#95333)、multi-ubiquitin clone FK2 (MBL#D058-3) および GAPDH (SC#32233) を用いた。反応した蛋白質は、Amersham ImageQuant 800 Imaging System (GE Healthcare) で観察した。

- ▶ **蛍光免疫染色**：感染細胞を 2% PFA で固定し、一次抗体として：anti-Piezo1 (Novusbio#NBP1-78446)、 $\alpha$ -tubulin (Proteintech#66240-1-Ig)、を用いた。また、F-アクチンは Rhodamine Phalloidin で、細胞の核は TO-PRO-3 で染色した。Leica TCS-SPE 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。
- ▶ **上皮バリアの修復の評価**：感染細胞の創傷治癒アッセイの系をIWAKIの6 ウェルプレートで最適化し、感染細胞と非感染細胞の集団運動と修復をBZ-X810 Keyence顕微鏡を用いて評価した。また、この創傷治癒アッセイでプロテアソーム阻害剤の影響を調べた。

## 結果

1. **SUMO 化タンパク質と COP9 シグナロソームの解析について**：ユビキチン様タンパク質 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) による修飾は基質の分解促進効果を抑える作用があり、SUMO 化修飾とユビキチン化修飾が連携・クロストークすることによって、細胞間の接着と細胞骨格が維持されている。我々のプロテオソーム解析で (3)、感染細胞で SUMO 活性化酵素 (SAE1 と SAE2) の減少と COP9 シグナロソーム複合体の CSN6 サブユニットの上昇を認めたため、これらのタンパク質が標的となり、

UPS がハイジャックされるという仮説をたてた。しかし、感染細胞の SUMO 化タンパク質、SAE1 と SAE2、および COP9 の変動を調べた結果、非感染細胞との明らかな違いを認めることが困難になり、この研究項目は途中で断念した。

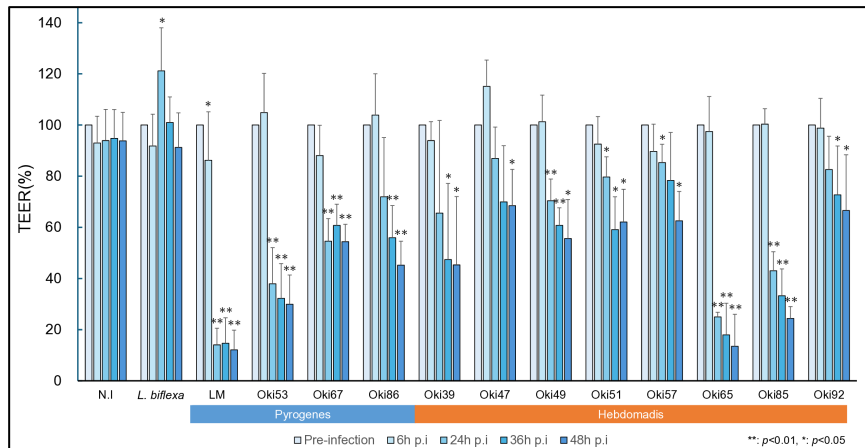


図2. 沖縄県の臨床分離株の上皮バリア破壊は多彩である。それぞれの菌株でRPTECの基底側から感染し、感染前と感染6、24、36、48時間後に経上皮細胞抵抗値 (TEER) を測定し上皮バリア機能を評価した。この実験を3回以上を行い、感染前のTEERを100%とし、各時間のTEERの平均を棒で表している。LM: Manilae株。Kakita et al., 2025より改編。

## 2. 沖縄県のレプトスピラ症臨床分離株の解析：Mangeol

らが2024年に発表した超解像イメージング研究により、従来考えられていた「E-カドヘリン/カテニン複合体」が主要なアクチン結合点である」という見方が覆された (4) (5)。成熟した接着結合では、ネクチン/Afadin 複合体が E-カドヘリン複合体とは独立した層を形成し、アクチン骨格との主要なリンカーとして機能するという新しいモデルが提唱された。

このことにより、我々が本研究開始前に提唱したモデルを見直す必要性が生じてしまい、レプトスピラの感染における Afadin の挙動、上皮バリア機能の低下と UPS の関係を解析した。沖縄県のレプトスピラ症患者から分離された 11 株につ

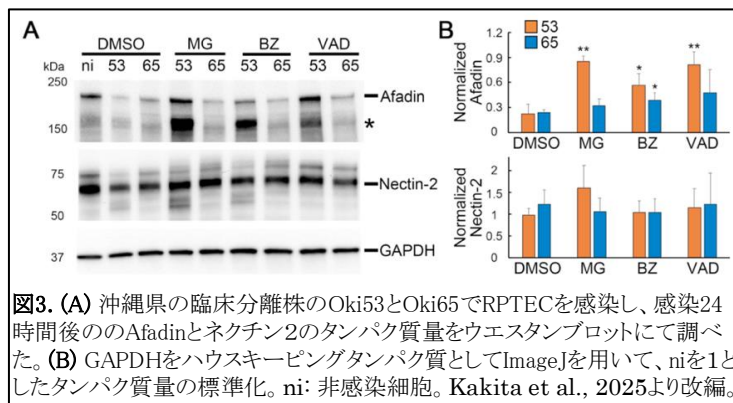


図3. (A) 沖縄県の臨床分離株のOki53とOki65でRPTECを感染し、感染24時間後のAfadinとネクチン2のタンパク質量をウエスタンブロットにて調べた。(B) GAPDHをハウスキーピングタンパク質としてImageJを用いて、niを1としたタンパク質量の標準化。ni: 非感染細胞。Kakita et al., 2025より改編。

いて、RPTEC の上皮バリアの破壊能を調べた結果、全ての株で感染 48 時間までには TEER の減少と

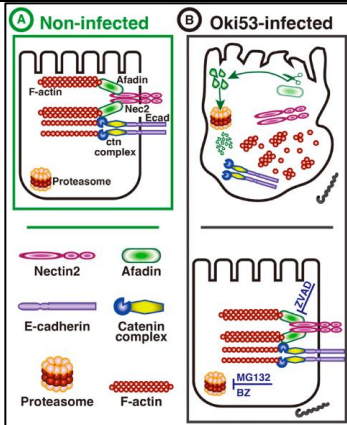


図4. (A) 非感染細胞の細胞間接着装置とアクチン骨格。(B) 本研究にて新たに発見した、レプトスピラOki53株によるAfadinのプロテオソーム依存的分解経路。Kakita et al., 2025より改編。

AJの破壊を認めた(図2)。さらに、レプトスピラの感染によってAfadinの分解が誘導されることを見出し、Afadinの分解経路は菌株で異なっていることを明らかにした(図3、図4)(6)。Oki53株においては、Afadinの分解と上皮バリアの破壊はUPSの阻害剤とパンカスパーゼ阻害剤で阻止された。

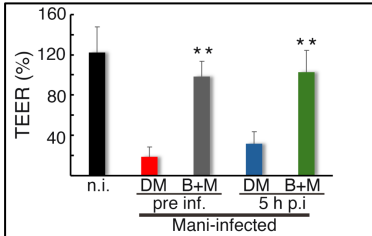


図5. 感染24時間後の経上皮細胞抵抗値(TEER)。阻害剤は感染前から(pre inf.)または、感染5時間後(5 h p.i.)に添加した。ni: 非感染細胞。DM: DMSO、B: bafilomycin A、M: MG132. \*\*  $p < 0.01$

\*\*2番の研究項目の結果は論文として発表した。

### 3. ユビキチン化タンパク質の上昇について: Manilae株によるAJの破壊を阻止するには、UPS阻害剤単独では無効だったが、リソソーム阻害剤であるBafilomycin Aと同時に添加すること

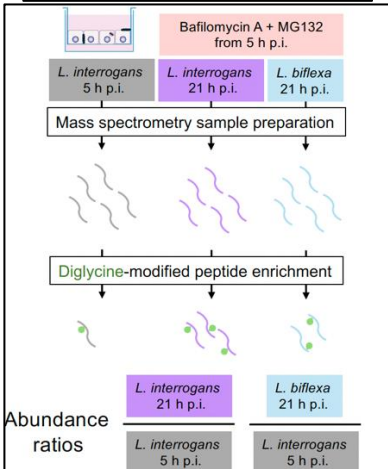


図6. Manilae感染細胞で特異的にユビキチン化されるタンパク質を同定するためのスキーム。

表1. 網羅的解析で同定したタンパク質。

Protein	Accession	Mani	L. biflexa
ADP-ribosylation factor-like protein 2	P36404	14.832	5.766
Cytohesin-interacting protein	O60759	11.809	5.492
Leukocyte elastase inhibitor	P30740	3.335	0.01
Rho guanine nucleotide exchange factor 33	A8MVX0	2.831	1.184
Ribosomal protein uL16-like	Q96L21	2.768	1.338
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	2.178	0.584

によって阻止効果が見られた(3)。また、阻害剤を感染5時間後に添加しても同等の阻止効果が得られることがわかった(図5)。そこで、感染実験のプロトコルを改善し、Manilae感染細胞で特異的にユビキチン化されるタンパク質の探索を網羅的に行った(図6)。その結果、感染21時間後にユビキチン化が上昇したタンパク質を113個同定した(表1で一部を示す)。その内、低分子GTP結合タンパク質ファミリーに属するADP-ribosylation factor-like protein 2 (ARL2)に着目し、ARL2抗体を用いた免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにて阻害剤の存在化で

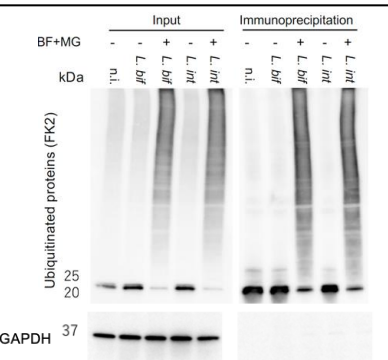


図7. ARL2免疫沈降。ユビキチン化タンパク質を検出するFK2抗体のウェスタンブロット。

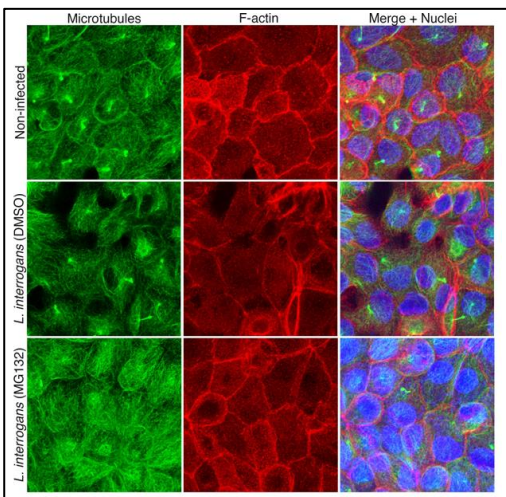


図8. 微小管(緑)/アクチン(赤)細胞骨格の染色。細胞の核は青で一番右に重ね像を示している。

は、高分子量のユビキチン化蛋白質が上昇することを確認した(図7)。ARL2は、TBCDとβ-チューブリンと共に複合体を形成し、微小管の構造維持に重要である(7)。感染細胞の微小管構造を蛍光免疫染色で精査した結果、異常を認めた(図8)。特に、アクチン重合核形成因子が機能するための細胞間の微小管の減少が認められ、レプトスピラ感染細胞では微小管/アクチン骨格のネットワークが攪乱されることが分かった。また、感染による細胞骨格構造の破壊はUPS阻害剤で阻止された(図8)。

#### 4. レプトスピラによる上皮バリア恒常性維持の攪乱について：

上皮バリア恒常性維持には細胞間接着装置と細胞骨格が不可欠である。これらの構造はメカノセンサーとして重要であるため、レプトスピラは「力覚応答を UPS 依存的に攪乱する」と考え、次に細胞膜メカノセンサーPiezo1に着目した(8)。Piezo1のアゴニストである Yoda1 で処理した上皮細胞では、Piezo1 が添加 4 時間後に細胞膜上の局在が減少し、AJ の破壊を誘導した。しかし、24 時間後には Piezo1 は細胞膜上に再局在化し、AJ 構造と上皮バリア機能が回復した。一方、レプトスピラで感染した上皮細胞では Piezo1 は感染 24 時間後でも細胞膜の局在が減少し、上皮バリア機能は回復しなかった。そこで、上皮バリアの修復を定量化するための創傷治癒アッセイを立ち上げ、解析を行なった。病原性レプトスピラで感染した細胞では、創傷治癒の遅延を認めたが(図 9)、UPS 阻害剤を添加することによって細胞の集団移動が改善された。

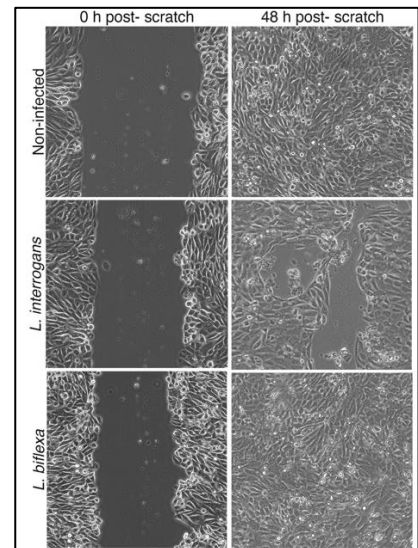


図9.創傷治癒アッセイ:*L. interrogans* (Manilae株)では創傷治癒の遅延を認めた。

\*\*3番と4番の研究項目の成果は、若手研究員が「九州微生物フォーラム 2025」で口頭発表し、論文の準備を進めている。

#### 5. 上皮バリア破壊に関与している細菌因子の解析について：

2025年にフランスのパスツール研究所の研究チームにより、レプトスピラが細胞骨格の破壊を誘導する病原因子として、細胞内カルシウム濃度を上昇させる VM 蛋白質(VMP)を報告した(9)。また、アメリカの研究グループは VMP が、3つのドメインを有する分泌タンパク質であることを報告した(図 10)。RBL ドメインを介して受容体に結合し、細胞内に取り込まれ、細胞死を伴う細胞骨格破壊を誘導することを報告した(10)(11)。これらの研究報告と我々が提唱する「レプトスピラによる UPS 依存的細胞骨格破壊機構」の相違点を明らかにするために、組換え VMP と、受容体結合ドメイン(RBL)と活性ドメイン(CTD)に対する特異的抗体を作成し、VMP の作用機構の解析を進めている。細胞骨格の破壊には、レプトスピラの細胞内取り込みが必須であり、組換え VMP 単独では上皮バリアが破壊されないことがわかった。また、UPS 阻害剤を用いた感染実験で、VMP の作用メカニズムの新たな知見を得ることができた。

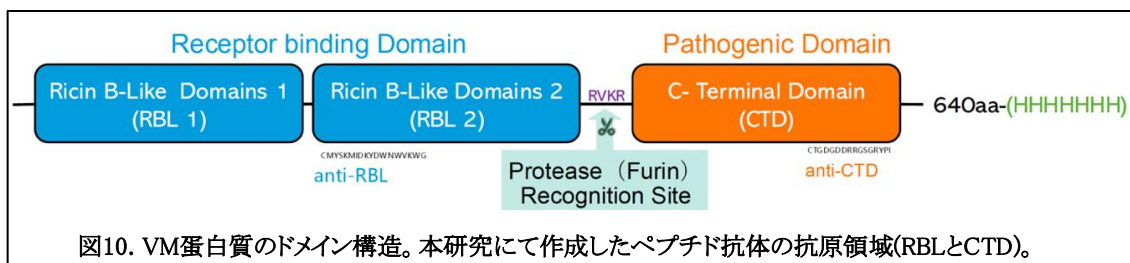


図10. VM蛋白質のドメイン構造。本研究にて作成したペプチド抗体の抗原領域(RBLとCTD)。

\*\*5番目の研究項目は、化血研究助成期間の終了後には「琉球大学の先端医学支援事業」の採択課題として、若手の外国人客員研究員が継続しており、2027年中に論文化を進める予定である。

## 考察

本研究の成果として、レプトスピラはAJの「ネクチン/Afadin複合体」を破壊し、菌株によっては、さらに細胞骨格のネットワークを破壊する戦略を有することが明らかになった。沖縄の臨床分離株Oki53株では、尿細管上皮細胞のAfadinの分解がUPS阻害剤で完全に阻止され、レプトスピラによる腎臓障害、慢性腎不全などの新規治療開発の手がかりが得られた。また、AJと微小管/アクチン骨格のネットワークが破壊されることによって、細胞の力覚応答が攪乱され、レプトスピラ症では上皮細胞の恒常性維持が困難になることが示唆された。レプトスピラはUPSを利用した多様な戦略を有しており、多くの臨床株のさらなる解析の重要性が示された。

レプトスピラ症の臨床症状は多彩であり、風邪のような軽症型と、多臓器不全を呈し、透析や人工呼吸管理などを要する重症型がある。今後は、臨床研究によって、患者の症状とそれぞれの菌株の特徴（細胞内侵入、VMP発現量など）との関連性を解析することによってレプトスピラ症が重症化する要素の理解が深まると期待できる。

## 共同研究者

柿田徹也（沖縄県衛生環境研究所、研究員）

## 引用論文

1. Beaute J, Innocenti F, Aristodimou A, et al. Epidemiology of reported cases of leptospirosis in the EU/EEA, 2010 to 2021. *Euro Surveill.* 2024;29(7).
2. Sebastian I, Okura N, Humbel BM, et al. Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of *Leptospira interrogans* across polarized renal proximal tubule epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2021;23(9):e13343.
3. Tokumon R, Sebastian I, Humbel BM, et al. Degradation of p0071 and p120-catenin during adherens junction disassembly by *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1228051.
4. Mangeol P, Massey-Harroche D, Sebbagh M, et al. The zonula adherens matura redefines the apical junction of intestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(9):e2316722121.
5. Jensen CC, Peifer M. Too old for hide-and-seek; cell maturation reveals hidden apical junctional organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(12):e2401735121.
6. Kakita T, Toma C, Sebastián I, et al. Distinct strategies of epithelial cell barrier disruption by *Leptospira interrogans* isolated from human patients in Okinawa, Japan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2025;19(11):e0013693.
7. Al-Bassam J. Revisiting the tubulin cofactors and Arl2 in the regulation of soluble alphabeta-tubulin pools and their effect on microtubule dynamics. *Mol Biol Cell.* 2017;28(3):359–63.
8. Wang J, Jiang J, Yang X, et al. Tethering Piezo channels to the actin cytoskeleton for

mechanogating via the cadherin-beta-catenin mechanotransduction complex. *Cell Rep.* 2022;38(6):110342.

9. Alexandre G-G, Georges H, Marc M, et al. 2025. *In Vivo* Dual RNA-Seq uncovers key toxin-like effectors of epithelial barrier disruption and tissue colonization by an extracellular bacterial pathogen. *bioRxiv*[Preprint]. 2025 bioRxiv 647190 [posted 2025 April 4; cited 2025 April 27]: Available from:<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.04.04.647190v1.article-info>.

10. Chaurasia R, Marroquin AS, Vinetz JM, et al. Pathogenic *Leptospira* Evolved a Unique Gene Family Comprised of Ricin B-Like Lectin Domain-Containing Cytotoxins. *Front Microbiol.* 2022;13:859680.

11. Chaurasia R, Vinetz JM. In silico prediction of molecular mechanisms of toxicity mediated by the leptospiral PF07598 gene family-encoded virulence-modifying proteins. *Front Mol Biosci.* 2022;9:1092197.

#### 助成研究に関連した発表論文

Kakita T\*, **Toma C\***, Sebastian I, et al. Distinct strategies of epithelial cell barrier disruption by *Leptospira interrogans* isolated from human patients in Okinawa, Japan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2025;19(11):e0013693. (**\*Corresponding authors**).