

総説

サルモネラ認識を低下させる豚 TLR5一塩基多型 (C1205T) に関する研究
— SNP の発見から、機能解析、遺伝子型別、頻度解析および実験感染による検証まで —

宗田吉広¹⁾、新井暢夫^{2),3)}、矢ヶ部陽子¹⁾、江口正浩²⁾、芝原友幸^{1),3)}、
佐久間晶子⁴⁾、新開浩樹⁵⁾、上西博英⁵⁾、廣瀬健右⁶⁾、秋庭正人^{2),3)}

¹⁾農研機構 動物衛生研究部門 病態研究領域、²⁾同 細菌・寄生虫研究領域、³⁾大阪府大院 生命環境、

⁴⁾宮城県畜産試験場、⁵⁾農研機構 生物機能利用研究部門 動物機能利用研究領域、

⁶⁾全農畜産サービス株式会社 東日本原種豚場)

Muneta Y., Arai N., Yakabe, Y., Eguchi M., Shibahara, T., Sakuma, A., Shinkai, H., Uenishi, H., Hirose K., and Akiba M. (2017). Studies on porcine TLR5 SNP (C1205T) which related with impaired recognition of *Salmonella*. SNP discovery, functional analysis, genotyping method, frequency distribution, and experimental infection. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 70, 25-31.

キーワード：豚サルモネラ症、*Salmonella* Chlraesuis、*Salmonella* Typhimurium、SNP、TLR5

はじめに

豚のサルモネラ症は、家畜伝染病予防法の届出伝染病であり、急性の敗血症あるいは下痢を伴う慢性腸炎として、主に離乳後の子豚から4か月齢前後の肥育豚において発見が見られる。家畜伝染病予防法の病原体として指定されている菌種としては、肥育豚に急性の敗血症を引き起こす *Salmonella* Choleraesuis (SC) と、離乳豚に下痢や腸炎を引き起こす *Salmonella* Typhimurium (ST) が挙げられる^{8,12)}。しばしば不顕性感染が成立し、症状は認められなくても排菌を継続する無症状キャリアー（保菌豚）となることから、サルモネラが農場に常在化して清浄化が困難となるばかりか、人獣共通感染症の原因菌として、食肉汚染を介して食中毒の原因ともなり得るため、公衆衛生上においても重要である¹⁾。さらに、治療や予防に抗生物質が大量に使用されることから、薬剤耐性サルモネラが広く出現していることも問題である²⁾。今後2020年までに薬剤耐性アクションプラン（厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf> に掲載）によって抗菌剤の使用や耐性菌の削減に数値目標が掲げられている中、薬剤に頼らない宿主側からのサルモネラに対する抗病性の向上が強く求められる。

一方で近年、豚のゲノム解析が完了したことから³⁾、ゲノム情報を活用して豚の病原体認識に重要な遺伝子

についての多様性の解析が可能となっている¹⁴⁾。次世代シーケンサーの普及により、一度に大量の塩基配列の情報が得られるようになり、その解析速度は以前に比べて飛躍的に向上している。我々は、豚の病原体認識の最前線の自然免疫応答に重要な役割を果たすパターン認識レセプター（PRR）の遺伝子の多様性を解析し、そのリガンドである病原体の構成成分の認識に影響を及ぼすいくつかの一塩基多型を見出している¹⁵⁾。

中でも、Toll-like receptor 5 (TLR5) は細菌のべん毛タンパク質 (flagellin) を認識するパターン認識受容体であり⁵⁾、腸管等の粘膜感染症の自然免疫応答や獲得免疫応答に重要な役割を果たす。細菌の flagellin は菌の運動や遊走に関わるばかりでなく、flagellin 抗原として自然免疫応答を引き起こすばかりか、抗体産生を誘導して感染防御免疫にも貢献する。また、flagellin 抗原はサルモネラや大腸菌の H 抗原による血清型の決定の基礎となる¹⁷⁾。これまでに我々は、豚のゲノム解析およびその後の機能解析によって、サルモネラの ST の flagellin 及び SC の死菌体の認識を低下させる豚 TLR5一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) (C1205T) を報告している¹¹⁾。

これまでの先行研究

これまでに、ヒトやマウスの TLR5 遺伝子の SNP と疾患感受性との関連について数多くの報告がある。例えば、マウスにおいて、TLR5 欠損マウスは flagellin 接種に対するサイトカイン応答や自然免疫応答が認められない¹³⁾。また、TLR5 欠損マウスは自然発症的に

腸炎を発症し、腸内細菌叢の制御が不十分となることと関連すると考えられている¹⁶⁾。

ヒトにおいては、TLR5 SNP (C1174T) により、TLR5の392番目のアミノ酸 (ヒト TLR5のアミノ酸配列全長は858個) がストップコドンに変わることが知られているが、この SNP とレジオネラ感染について、この T 型変異をヘテロに持つヒトではレジオネラに感染した際に臨床症状が発現する可能性が高くなることが報告されている⁴⁾。このように、TLR5による細菌の flagellin 認識と自然免疫応答は、腸管等の粘膜における病原体からの感染防御に重要な役割を果たしていると考えられており、総説も書かれている¹⁷⁾。

一方、豚の TLR にも多数のアミノ酸変異を伴う SNP があり、それらは病原体認識に直接関与する細胞外領域に集中していることが報告されている^{9),10)}。豚の TLR2 SNP (C406G) とマイコプラズマ肺炎については、TLR2_{406C} に対して TLR2_{406G} は、肺炎病変を有する個体の頻度が多くなることが報告されている¹⁴⁾。

我々が見出した豚の TLR5 SNP (C1205T) については、HEK293細胞を用いた *in vitro* での NF- κ B 活性依存性ルシフェラーゼレポーターアッセイによる解析で、ST 由来の flagellin や SC 死菌体の認識が顕著に低下するアミノ酸変異 (P402L) を伴う SNP であるということ¹¹⁾、また、この T 型 SNP は、我が国の主要な商用豚品種ではランドレース種のみ存在する SNP であるということがすでに報告されている^{6),9)}。さらに、最近の報告では、ヒトやマウスでは flagellin 認識の代替経路 (Alternative pathway) として知られている NLRC4-NAIP インフラマソームと呼ばれる分子群の遺伝子の一部が、豚では NLRC4 および NAIP の両方で欠損しており、mRNA の発現も認められず、豚ではこの系が機能していないことが報告された⁷⁾。このことは、豚における flagellin の認識における TLR5 の重要性を強める結果であると考えられる。

そこで、本総説では、これまで我々がやってきた、

サルモネラ認識を低下させる豚 TLR5 の SNP (C1205T) の発見から、その機能解析および簡易な遺伝子型の型別手法の開発、豚の主要品種における当該 SNP の頻度解析、および当該 SNP をヘテロやホモに有するランドレース種離乳豚に対する SC や ST の感染試験について概説し、これまでの一連の研究を振り返って見ることとしたい。

1-1 TLR5 (C1205T ; P402L) SNP の発見

新開らは、2006年の報告で、11品種96頭の豚の TLR のアミノ酸コード領域 (CDS) の塩基配列を全て決定して比較することにより、豚 TLR1、2、4、5 および 6 の CDS に多数の一塩基多型が存在することを明らかにした⁹⁾。中でも TLR5 については、図 1 に示すように、12箇所のアミノ酸配列の変化を伴う非同義置換の一塩基多型が存在することを示し、そのうち10箇所がリガンド認識に直接影響を及ぼすと考えられる細胞外領域 (Extracellular region) に集中して存在していることを報告した⁹⁾。我々はこのうち、TLR5 の CDS の1205番目のシトシン (C) がチミン (T) に変わること、402番目のアミノ酸がプロリン (P) からロイシン (L) に変化する一塩基多型に着目した。豚 TLR5 の三次元構造上402番目の P は TLR5 の細胞外領域のちょうど flagellin がはまり込むアームを形成する部分に位置しており、この部分でアミノ酸が P から構造の大きく異なる L に変化することで、flagellin の認識に大きな影響を及ぼすことが示唆された¹¹⁾。

1-2 TLR5 (C1205T ; P402L) の機能解析

実際に、新開らは、TLR5 (C1205T) の SNP の結果として、402番目のアミノ酸であるプロリンがロイシンに変化したことによるリガンド認識機能への影響を調べた。方法は HEK293細胞に12箇所それぞれの変異を導入した豚 TLR5 を遺伝子導入して強制発現させ、flagellin で刺激した際の *in vitro* での NF- κ B 活性依存性

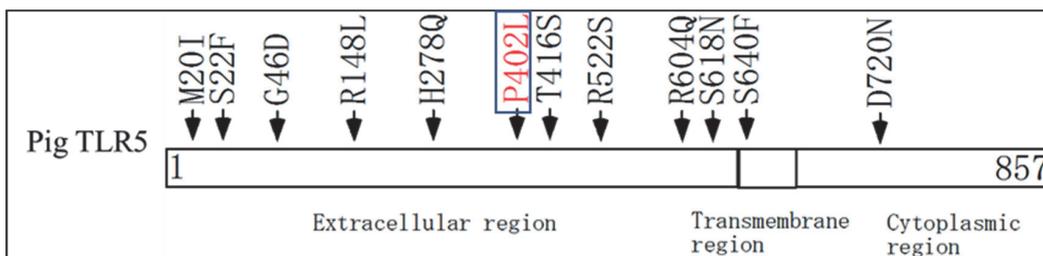


図 1 豚 TLR5 の CDS 内に見出された12箇所のアミノ酸変異を伴う一塩基多型
□内は我々が着目している C1205T の変異による P402L のアミノ酸置換部位。

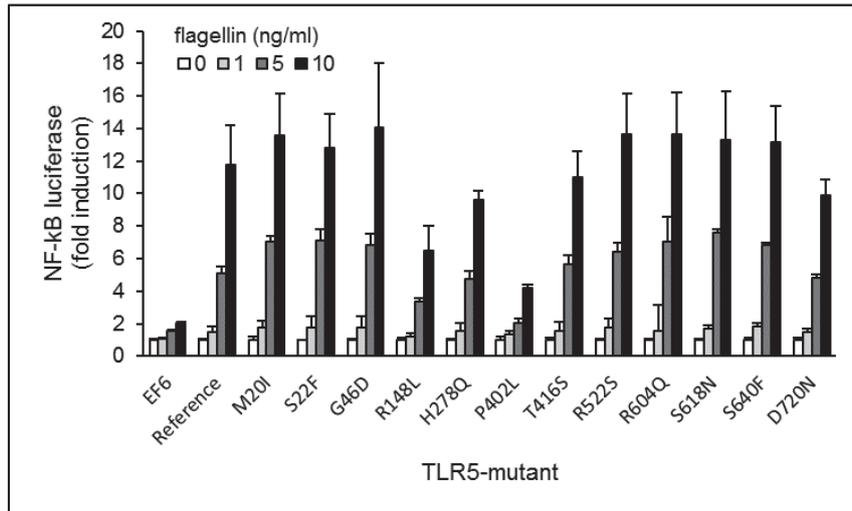


図2 野生型 (Reference) および12箇所のアミノ酸変異を有する豚 TLR5 を HEK293細胞に強制発現させ、flagellin 刺激した際の NF-κB 依存性ルシフェラーゼ活性

ルシフェラーゼレポーターアッセイによる解析を実施した。図2にその結果を示すが、Referenceである野生型の豚 TLR5 に対して、P402L に変異した TLR5 では flagellin 認識能が劇的に低下して、NF-κB 依存性のルシフェラーゼの活性が低下しており、その低下は12箇所のアミノ酸変異を伴う TLR5 の SNP のうち、最も強くリガンド認識機能に影響を及ぼしていることが示された¹¹⁾。

1-3 TLR5 (C1205T ; P402L) の遺伝子型別手法の開発

また、我々は、この重要な一塩基多型を簡便に検出するためのアリル型特異的プライマー PCR (ASP-PCR) 法を開発した⁶⁾。この手法は、上流側プライマーの3'末端から2塩基目に検出したい SNP を、その一

塩基前に鋳型 DNA と合致しないミスマッチ塩基を導入し、アニーリング温度を厳密にコントロールしながら PCR を行うことで、目的の SNP を特異的に検出する方法であり、豚 TLR5 の1205番目の塩基が対立する2本の相補遺伝子の両者で C の場合に CC 型ホモ、1本が C であり、1本が T である場合に CT 型ヘテロ、2本とも T に変異している場合が TT 型ホモとなる。図3にその電気泳動像を示すが、型別したい個体の鋳型 DNA が CT 型ヘテロの場合は C 特異プライマーと T 特異プライマーの両者で目的産物の増幅が見られるのに対し、CC 型ホモの場合は C 特異プライマーでのみ増幅が確認され、TT 型ホモの場合は T 特異プライマーでのみ増幅が確認されることにより遺伝子型の型別が可能となる。

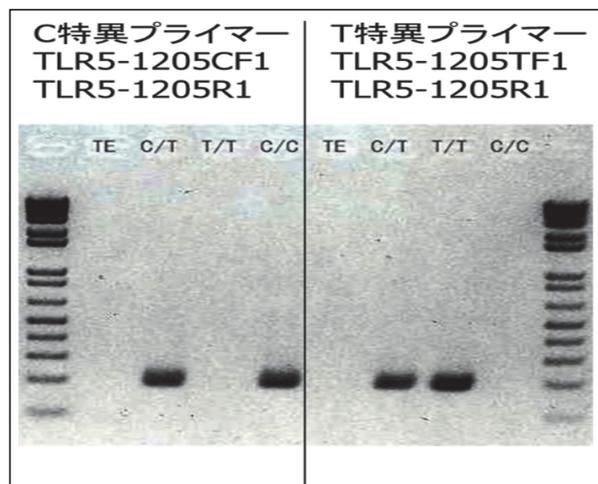


図3 豚 TLR5 の C1205T の遺伝子型別のための ASP-PCR の電気泳動像

1-4 TLR5 (C1205T ; P402L) の主要な豚品種における頻度解析

この遺伝子型の型別手法を用いて、国内およびチェコ共和国で入手した主要な豚品種の当該多型の遺伝子型別結果およびT型アレルの頻度解析結果について表1に示した。表1中□で囲ってあるが、日本国内の豚についてはランドレース種にのみ50%の頻度でT型アレルが存在していた⁹⁾。また、チェコ共和国の豚においても、ランドレース種で27.5%の頻度でT型アレルが存在し、ベルギーのマイナー品種であるピエトラン種でも30%の頻度でT型アレルの存在が確認された。しかしながら、食肉用豚の主要な品種である3元交雑種のLWD種の生産に広く用いられるラージホワイト種やデュロック種では全ての個体でCC型のみであり、サルモネラ認識を低下させる本一塩基多型は主要な商業用豚品種豚の中では、ランドレース種のみ

が変異型であるT型アレルをホモやヘテロで有していることが示された^{6),9)}。

1-5 豚における flagellin 認識の Alternative pathway の欠損

Flagellinの認識経路としては、マウスやヒトではAlternative pathwayとして、NLRC4-NAIP インフラマソームと呼ばれる分子群が機能していることが報告されている。しかしながら、興味深いことに、図4に示すように、豚のNLRC4およびNAIPの遺伝子構造をヒトのゲノム構造と比較すると、NLRC4で1箇所、NAIPで3箇所(図4の灰色部分)が豚では大きく欠損していることが最近報告された⁷⁾。さらに、豚のマクロファージにおいてNLRC4およびNAIPのmRNAの発現が全く確認できないことも示されている。このことは、豚においては、flagellin 認識の Alternative

表1 日本とチェコ共和国の主要な豚品種における TLR5(C1205T)の型別結果とT型アレルの頻度

Pig Breed	Genotyping results in Japan*	T allele frequency in Japan (%)	Genotyping results in Czech Republic	T allele frequency in Czech Republic (%)
Landrace	4 CC, 4 CT, 4 TT	50	10 CC, 9 CT, 1 TT	27.5
Large White	12 CC	0	22 CC	0
Middle Yorkshire	5 CC	0	N.E.	N.E.
Duroc	16 CC	0	20 CC	0
Berkshire	16 CC	0	N.E.	N.E.
Hampshire	12 CC	0	10 CC	0
Pietrain	N.E.	N.E.	6 CC, 2 CT, 2 TT	30
Jinhua	6 CC	0	N.E.	N.E.
Meishan	8 CC	0	N.E.	N.E.
Potbelly	3 CC	0	N.E.	N.E.
Clawn	1 CC	0	N.E.	N.E.
Japanese wild boar	5 CC	0	N.E.	N.E.
Minesota-derived miniature	N.E.	N.E.	17 CC	0
Prestice Black Pied	N.E.	N.E.	10 CC	0

N.E., not examined

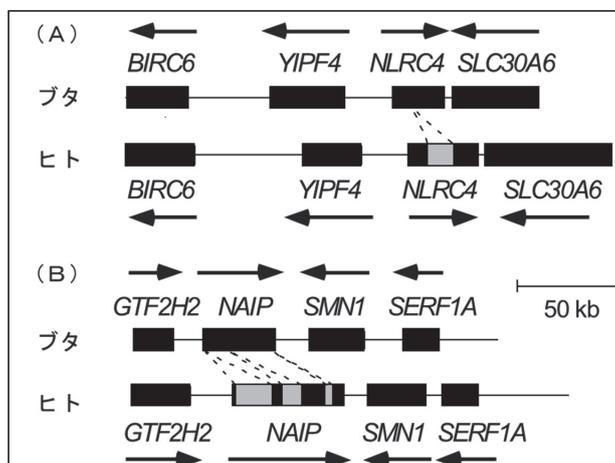


図4 豚およびヒトの (A) NLRC4および (B) NAIP 遺伝子近傍のゲノム構造の比較
NLRC4については1箇所、NAIPについては3箇所が豚では大きく欠損している。

pathway である NLRC4-NAIP インフラマソームが機能していないことを示しており、flagellin 認識において TLR5 を介する経路が唯一の重要な経路であることを示唆している。

1-6 離乳子豚に対する SC の感染試験

我々は、TLR5 (C1205T) の効果を *in vivo* の豚サルモネラ症における影響として評価するために、当該 SNP をホモおよびヘテロ (CC 型、CT 型および TT 型) に有するランドレース種の離乳子豚に対する SC (ATCC7001株) の実験感染による検証を行った (第156回日本獣医学会発表)。その結果、3 回の SC の経口感染後、試験豚は軽度の下痢を発症した個体もいたが、多くは無症状であった。しかしながら、図 5 に示すように、SC 感染 1 週間後の血液 (全血) を無刺激、flagellin (1 μg/ml)、SC 死菌体および大腸菌 LPS (10 μg/ml) で 72 時間刺激した際の培養上清中に含まれる自然免疫

応答サイトカインである IL-6 の産生量は、flagellin で刺激した場合、CC 型に比べて、TT 型で有意に低く ($p < 0.05$)、菌体刺激や大腸菌の LPS 刺激ではこの差は認められなかったことから、TLR5 依存的な自然免疫応答低下が、*in vitro* での成績と同様に *in vivo* 由来の血液材料でも再現されたと考えている。

また、3 回の経口感染後翌日の直腸スワブへの SC の排菌数を計測したところ、図 6 に示すように、CC 型および CT 型に比べて、TT 型の個体からは、有意差は認められなかったものの約 35 倍の排菌数を示した。このことは、TT 型豚においては、flagellin 認識が低く、自然免疫応答が低いことから、感染初期にサルモネラが取り込まれ殺菌される場である腸管の好中球あるいはマクロファージや樹状細胞において、その活性化の程度が弱いために、サルモネラに対する感染防御や殺菌作用が弱く、増殖を許してしまい、排菌量が増加したことにつながっていると考察された。実際に、

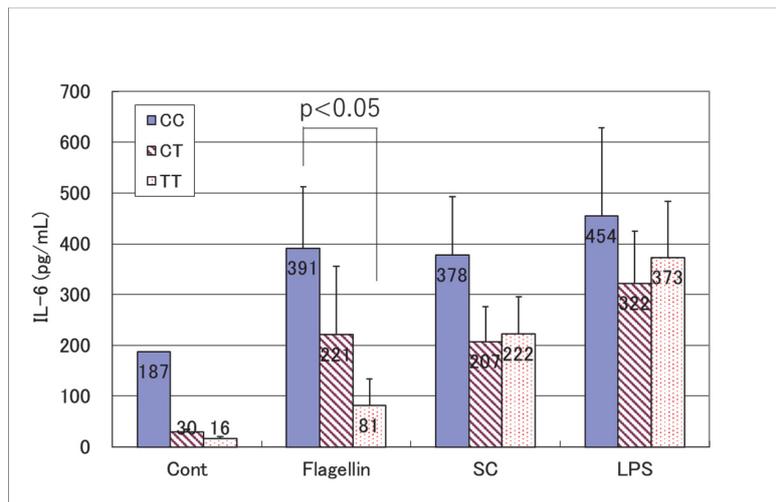


図 5 SC 感染 1 週間後の試験豚の血液 (全血) を各種刺激した際の培養上清中への IL-6 の産生 flagellin 刺激の際の TT 型の IL-6 産生は CC 型に比べて有意に低下 ($p < 0.05$)。

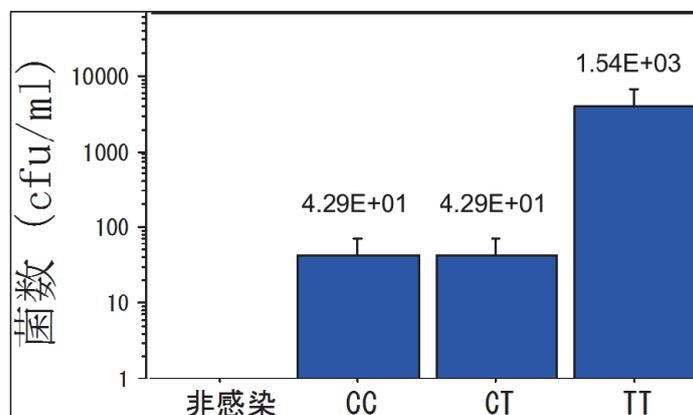


図 6 3 回の SC 経口感染後翌日の直腸スワブ中への SC の排菌数。

Vijay-Kumar M et al. は TLR5 欠損マウスにおいて、腸管上皮細胞における flagellin 認識が欠如すると、ケモカインである IL-8 の産生等が低下して、好中球の遊走が遅れて、病原体の排除も遅れ、増殖を許してしまうことを示唆している¹⁸⁾。

1-7 今後の展開

現在は、SC よりもより下痢原性の高い ST を用いた SPF ランドレースの離乳子豚に対する感染試験を行い、感染後の臨床症状（発熱や下痢）や直腸スワブ中への継続的な排菌数および増体成績の比較を行って、SNP の効果をより詳細に検討しており、T 型アリル保有豚では ST 感染による下痢発現時の排菌量や排菌の継続期間が増大することを確認している（第 1 回獣医微生物学フォーラム発表、論文投稿準備中）。また、下痢や発熱の極期となる感染後 3 日～7 日程度で、感染豚を解剖し、腸管局所の好中球浸潤等の細胞性免疫応答や病理組織学的検査および粘膜の抗体応答等を比較することによって多型の効果の差を生じるメカニズムの詳細な解明も期待される。

また今後は、実際に実験的にランドレースの母豚集団から CC 型、CT 型、TT 型豚の実験的家系集団を作出して、サルモネラの発生や生産指標に及ぼす影響を養豚の現場レベルで明らかにしていく必要があると考えている。さらに、食肉用豚品種として幅広く利用されている三元交雑豚（LWD）種においても、食肉衛生検査所等で T 型アリルの頻度を調査して、豚サルモネラ症との関連を解析して行く必要があると考えて調査を進めている。

おわりに

平成 28 年の農林水産省の統計による届出伝染病の発生状況 (http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansidensen/attach/pdf/kansi_densen-23.pdf) によれば、豚のサルモネラ症は 108 戸、348 頭で発生しており、牛や鶏よりも発生が多く推移している。また、同年の厚生労働省の統計によるサルモネラ属菌による食中毒の発生 (http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html) は 31 件、患者数は 704 名であり、獣医学的にも公衆衛生的にもサルモネラ症による被害を低減化することは望まれている。一方で、獣医療における抗生物質使用や飼料添加は今後の削減が喫緊の課題であり、このような状況下で、宿主側である豚の抗病性を向上して、サルモ

ネラの発生や排菌リスクを低減化する試みは重要であると考えられる。

これまでの研究結果から、以前の研究により、*in vitro* の系でサルモネラ flagellin や死菌に対する認識能が低下することが確認されていた TLR5 (C1205T) の T 型アリル保有豚は、サルモネラ感染による *in vivo* レベルの豚サルモネラ症に対する自然免疫応答も低下しており、サルモネラ感染に対する抵抗性が野生型 CC 型豚に比較して減弱していることが示唆される。

今後は、ランドレース豚に存在する TLR5 (C1205T) の T 型アリルをすでに開発した ASP-PCR 法⁶⁾ により検査して排除することによる、豚サルモネラ症に対する抗病性育種の実現が期待される。また CC 型豚は T 型アリル保有豚に比べて、排菌量が少ないことが示唆されることから、農場におけるサルモネラ感染リスクの低減、食肉におけるサルモネラ汚染リスクの低減、抗生物質の使用量削減による薬剤耐性サルモネラの出現リスク低減など、幅広い育種の効果が期待される。

謝辞

本研究の推進において、ご協力頂いた福島県中家畜保健衛生所・今井直人様、動物検疫所・小林芳史様、栃木県県央家畜保健衛生所・安西真奈美様、JICA 研修員・Tilusha Manchanayake 様に感謝いたします。

すべての著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Bonardi S. (2017) Salmonella in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect*, 145:1513-1526.
- 2) Esaki H, et al. (2004). Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J Antimicrob Chemother*, 53:266-270.
- 3) Groenen MA, et al. (2012) Analysis of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491:393-398.
- 4) Hawn TR, et al. (2003) A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*, 198:1563-1572.
- 5) Hayashi F, et al. (2001) The innate immune re-

- sponse to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410:1099-1103.
- 6) Muneta Y, et al. (2012) Allele-specific primer polymerase chain reaction for a single nucleotide polymorphism (C1205T) of swine Toll-like receptor 5 and comparison of the allelic frequency among several pig breeds in Japan and the Czech Republic. *Microbiol Immunol*, 56:385-391.
 - 7) Sakuma C, et al. (2017) Pig lacks functional NLRC4 and NAIP genes. *Immunogenetics*, 69:125-130.
 - 8) 鮫島俊哉 (2011) 豚のサルモネラ症. 見上彪監修 獣医微生物学 第3版, p72, 文永堂出版, 東京.
 - 9) Shinkai H, et al. (2006) Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics*, 58:324-330.
 - 10) 新開浩樹ら (2008) ブタ抗病性育種のための Toll 様受容体遺伝子研究の現状. 動物遺伝育種研究, 36:63-70.
 - 11) Shinkai H, et al. (2011) Porcine Toll-like receptors: Recognition of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis and influence of polymorphisms. *Mol Immunol*, 48:1114-1120.
 - 12) 末吉益雄 (2011) 豚のサルモネラ症. 明石博臣ら編 動物の感染症 第3版, p188-189, 近代出版, 東京.
 - 13) Uematsu S, et al. (2006) Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol*, 7:868-874.
 - 14) Uenishi H, et al. (2011) Polymorphisms in pattern recognition receptors and their relationship to infectious disease susceptibility in pigs. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 4):S27.
 - 15) Uenishi H, et al. (2012) Genomic survey of polymorphisms in pattern recognition receptors and their possible relationship to infections in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 148:69-73.
 - 16) Vijay-Kumar M, et al. (2007) Mice lacking TLR5 develop spontaneous colitis. *J Clin Invest*, 117:3909-3921.
 - 17) Vijay-Kumar M, et al. (2008) Toll like receptor-5: protecting the gut from enteric microbes. *Semin Immunopathol*, 30:11-21.
 - 18) Vijay-Kumar M and Gewitz AT. (2009) Flagellin: key target of mucosal innate immunity. *Mucosal Immunol*, 2:197-205.