

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380166

研究課題名(和文) オウム病クラミジア多型膜蛋白質による細胞内増殖機構の解明と宿主域相関

研究課題名(英文) The role of *Chlamydia psittaci* polymorphic membrane proteins (pmp) in its pathogenesis and in determination of host range.

研究代表者

大屋 賢司 (OHYA, Kenji)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50402219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：主要な人獣共通感染症の原因となる*Chlamydia psittaci*の、細胞内増殖性と多様な宿主域に関して、Pmpの多様性を通じて明らかにすることを目的とし以下の成果を得た。1)Pmpファミリーの比較ゲノミクス：クラミジア種間だけでなく、株間でも、pmpの多様性が確認された。2)Pmpファミリー発現プロファイル解析：恒常的に発現しているPmpファミリー分子の他、PmpG11のように感染中期以降に発現するファミリー分子が明らかとなった。3) *C. psittaci*特異的なPmpの機能解析：PmpG11について、病態形成への関与は不明であったものの、診断用抗原としての有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：*Chlamydia psittaci*, an obligate intracellular bacterium, is an etiological agent for human psittacosis. In this project, regarding chlamydial pathogenesis and diverse host range, we have focused on the role of the polymorphic membrane protein (pmp) family of *C. psittaci*. The representative results were as follows. 1) Comparative genomics of the pmp family: Diversity of the pmp family genes were observed in the genomes of intra-chlamydial strains as well as inter-chlamydial species. 2) Expression profile of the Pmp family during growth of *C. psittaci*: In addition to the constitutively expressed Pmp (e.g.: PmpD), some Pmp (such as PmpG11) were transcribed after the mid-stage of the chlamydial propagation in host cells. 3) Functional analysis of the *C. psittaci*-specific Pmp: Regarding to the *C. psittaci*-specific PmpG11, although its contribution to the chlamydial pathogenesis was unknown, the applicability of PmpG11 as a serodiagnostic antigen was revealed and evaluated.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：人獣共通感染症 細胞内寄生細菌 クラミジア オウム病 外膜蛋白質 病原性 疫学

## 1. 研究開始当初の背景

*C. psittaci* によるオウム病は、人の感染症法で4類感染症に指定されている全数届出疾患であり、鳥類から人へ感染する人獣共通感染症である。クラミジアは偏性細胞内寄生性を示し、代謝活性をもたない基本小体 (elementary body: EB) が宿主細胞に侵入後、封入体中で網様体 (reticulate body: RB) へと変換し分裂増殖するという独特の増殖環を有する。クラミジアの細胞内増殖機構 (いわゆる病原性) 解析は、性器クラミジア *C. trachomatis* や肺炎クラミジア *C. pneumoniae* を中心に行われているが、感染症としての重要性が認識されているにも関わらず、サルモネラ等他の病原細菌に比べて進展は遅れている。獣医領域において重要な *C. psittaci* に関しては世界的にも研究者が少なく特に顕著である。その理由として、遺伝子操作系が適応できないこと、及びバイオハザードの問題 (*C. psittaci*) が挙げられる。

クラミジアの外膜蛋白質 Pmp は、*C. trachomatis* において強い免疫原性を有する菌体表面抗原として同定された。ゲノム解析の結果、Pmp はゲノム上でファミリー (A から I) を構成しており、特に宿主を複数もつクラミジアではサブファミリーを含め 20 以上にも及び (ヒト特異的 *C. trachomatis* では 9) ことから、宿主域の多様性への関与が示唆されていたが、感染の場における生物学的な意義は不明であった。

## 2. 研究の目的

本課題では、*C. psittaci* の Pmp ファミリーに着目し、

(1) Pmp ファミリーのクラミジア種・株間における比較ゲノミクス

(2) クラミジア増殖ステージにおける Pmp ファミリー発現プロファイル解析

(3) *C. psittaci* 特異的な Pmp の機能解析を行う。以上により、オウム病クラミジアの細胞内増殖能と多様な宿主域に関して、Pmp の多様性を通じて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

各実施内容における主な研究方法は以下の通りである。

(1) Pmp ファミリーのクラミジア種・株間における比較ゲノミクス

オウム病国内集団発生時に分離された *C. psittaci* Mat116 株の DNA は、感染細胞の蔗糖密度勾配により精製した菌体から調製した。調製したゲノム DNA よりシーケンシングライブラリーを作製し、Illumina GAII 解析に供した。得られたリードを暫定ゲノムにマッピングし、フレームシフトやギャップの想定される領域を修正し完全配列とした。Pmp 領域の種・株間における比較は、Artemis Comparison Tool (ACT; <http://www.sanger.ac.uk/resources/softw>

[are/act/](#)) 等のオープンソースのソフトウェアを用いて行った。

(2) クラミジア増殖ステージにおける Pmp ファミリー発現プロファイル解析

ゲノム情報から得られた各 Pmp 遺伝子の配列に基づいてリアルタイム用プライマーを設計した。また、主要な Pmp については、合成ペプチドや大腸菌組換え蛋白質を抗原とした抗血清を作製した。発現プロファイルの網羅的解析を目的とした RNA-seq 解析は以下の様に行った。*C. psittaci* 精製 EB および感染細胞それぞれより、全 RNA を抽出後、oligo dT や真核生物 rRNA プロンプを用いて宿主由来 RNA を除去後、ライブラリーを作製し HiSeq2000 を用いた解析に供した。

(3) *C. psittaci* 特異的な Pmp の機能解析

*C. psittaci* 特異的な PmpG11 に関しては、(1) において比較ゲノム解析を行った。また、(2) において作製したプロンプを用いて感染細胞内における発現プロファイル解析、抗血清を用いた感染細胞内における局在解析を行った。PmpG11 に対する宿主側標的候補を探索する目的で HeLa 細胞ライブラリーをベイトとした yeast two-hybrid を行った。

## 4. 研究成果

(1) Pmp ファミリーのクラミジア種・株間における比較ゲノミクス

全ゲノム完全配列を決定した集団発生事例時分離 Mat116 株において、Pmp 領域を他種クラミジアと比較検討した (図 1)。

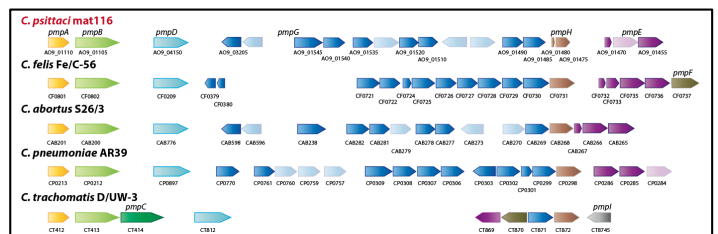


図 1: 各種クラミジアにおける Pmp 領域の模式図

その結果、*C. psittaci* Mat116 株の Pmp ファミリーは 20 であった。これは、*C. psittaci* と比較的近縁である (旧 *C. psittaci* 血清型) 他の動物由来クラミジアであるネコクラミジア *C. felis* (20)、羊流産クラミジア *C. abortus* (18) と、ヒト特異的 *C. trachomatis* (9) と比べ似通っていた。また、課題実施中にデータベース上に公開された *C. psittaci* 6BC 株では 22、RD1 株では 17 と *C. psittaci* 同一種間においても異なっていた。同一種間における Pmp ファミリー遺伝子数の相違は、現在解読進行中の *C. psittaci* 他株との比較においても認められている。すなわち、動物由来クラミジアの Pmp ファミリー構成遺伝子数は、似通っているものの、同一種間においても多様性が認められることが明らかとな

った。この Pmp 多様性と宿主域の相関性については、検体数を増やし、別プロジェクトにて更に詳細に解析予定である。本アプローチでは、Pmp ファミリー以外の遺伝子についても、各種クラミジア特異的遺伝子の同定を行うことができ、以下の(2)および(3)における実験を始めとした他の実験実施における貴重な情報となった。

### (2) クラミジア増殖ステージにおける Pmp ファミリー発現プロファイル解析

ゲノム解読の結果明らかとなった各 Pmp ファミリー遺伝子についてプライマーを作製し、幾つかの遺伝子については、リアルタイム PCR による定量系を樹立することができた。PmpD 等、主要な Pmp の中には増殖ステージを通じて恒常的に発現しているものもあったが、例えば後述する PmpG11 については、感染初期には発現しておらず、中期以降に発現していることが明らかとなった(誌上発表前のためデータ示さず)。すなわち、*C. psittaci* は、その増殖ステージにおいて Pmp ファミリーの発現を切り換えていることが示唆された。そこで、Pmp ファミリー以外の遺伝子との関係を解析する目的で、RNA-seq による網羅的転写解析を試みた。精製 EB および感染細胞から全 RNA を調製し、「研究方法」にて述べた方法により、宿主由来 RNA をできるだけ除去したかたちで解析に供した。得られたリードを Mat116 株ゲノムにマッピングしたところ、マッピングされたリードのうち 98% 以上は 16s および 23s rRNA にマッピングされ、解析に必要なリード数が充分得られなかった。そこで、感染細胞からの RB 調製法等サンプル調製法の改良を行い、解析に供するサンプルの品質向上を実現できた。現在は、RNA-seq に加えクラミジアカスタムアレイによる解析も含め、別プロジェクトにて網羅的転写解析を進めている。

### (3) *C. psittaci* 特異的な Pmp の機能解析

ゲノムライブラリースクリーニングの結果得られた *C. psittaci* 特異的 PmpG11 について詳細な機能解析を行った。

図 2 に示すように、PmpG 領域は、サブファミリーの拡張が起こっていることが明らかとなった。

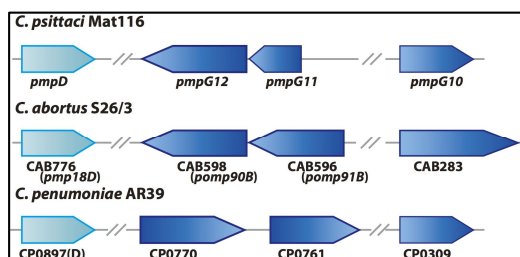


図 2: 各種クラミジアにおける PmpG 領域の拡大図

(2) において述べたとおり、pmpG11 遺伝子の転写は *C. psittaci* 増殖期間の中期以降

であった。抗血清を作製し、感染細胞内における局在を検討したところ、感染中期以降の菌体表明に局在していることが明らかとなった(誌上発表前のためデータ示さず)。PmpG11 の推定分子量は約 40 kDa と他の Pmp (90-150 kDa) と比較して小さく、他種クラミジアゲノム上のオルソログとは異なることから、*C. psittaci* 固有の機能を規定する因子であると想定し、宿主側の標的探索を yeast two-hybrid により行ったが、再現性のある標的候補は得られなかった。課題実施期間中には、*C. psittaci* の病原性における PmpG11 の役割を明らかにすることはできなかったが、大腸菌を用いて作製した組換え PmpG11 は、他種クラミジア免疫血清とは反応せず、オウム病クラミジア感染動物血清と良好に反応することから、*C. psittaci* 血清診断用抗原として有用であることを明らかにすることができた(誌上発表前のためデータ示さず)。

このように、PmpG11 を標的としたものを始めとして、幾つかの血清・遺伝子診断法の開発にも成功している。既存のおよび新規診断法を用いて、飼育鳥を始めとした各種動物におけるクラミジア保有状況を調査している。課題実施期間中の国内飼育鳥におけるクラミジア保有状況を示す(表 1)。陽性検体については、Pmp 領域を始めとした配列解析を行い、由来宿主と遺伝子型の関係性を考察するための貴重なデータとなっている。

表 1: 国内飼育鳥におけるクラミジア保有状況

年度	検体数	陽性数	陽性率(%)
2010	152	6	3.9
2011	133	14	10.5
2012	178	10	5.6
2013	271	9	3.3
計	734	39	5.3

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

福土秀人, 大屋賢司: オウム病, 小児科, 査読なし, 54: 57-63, 2013.

[http://www.kanehara-shuppan.co.jp/journal/detail.html?kubun=04751&code=047512013010&hakkou\\_nengetsu=201301](http://www.kanehara-shuppan.co.jp/journal/detail.html?kubun=04751&code=047512013010&hakkou_nengetsu=201301)

Ogawa H, Chahota R, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H: Relatedness between Host Species and Genotype of Beak and Feather Disease Virus Suggesting Possible Interspecies Cross Infection during Bird Trade., J. Vet. Med. Sci., 査読あり, 75: 503-507, 2013.

DOI: 10.1292/jvms.12-0367

Kasanga CJ, Yamaguchi T, Munang'andu HM, Ohya K, Fukushi H: Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated

segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A., Arch. Virol., 査読あり, 158: 685-689, 2013.  
DOI: 10.1007/s00705-012-1531-4

Fukushi H, Yamaguchi T, Yamada S: Complete genome sequence of equine herpesvirus type 9 (EHV-9)., J. Virol., 査読あり, 86: 13822, 2012.  
DOI: 10.1128/JVI.02607-12

Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H, Fukushi H: Detection of *Chlamydia psittaci* by Using SYBR Green Real-Time PCR., J. Vet. Med. Sci., 査読あり, 73:249-254, 2011.  
DOI: 10.1292/jvms.10-0222

大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, Garry MEYERS, 岸本寿男, 安藤秀二, 奥田秀子, 福土秀人: オウム病クラミジア集団発生事例分離株ゲノム配列決定とその意義, 獣医畜産新報, 査読なし, 64: 804-806, 2011.  
[https://bunaido-shuppan.com/?gloc\\_id=03001&bkcd=2011105001](https://bunaido-shuppan.com/?gloc_id=03001&bkcd=2011105001)

福土秀人, コクシエラ・クラミジア感染症, 最新医学, 査読なし, 66: 2703-2712, 2011.

<http://www.saishin-igaku.co.jp/backnum/2011/m6612.html>

Murao W, Wada K, Matsumoto A, Fujiwara M, Fukushi H, Kishimoto T, Monden K, Kariyama R, Kumon H: Epidemiology of *Chlamydia caviae*-like Chlamydia isolated from urethra and uterine cervix., Acta Med. Okayama, 査読あり, 64: 1-9, 2010.

<http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/amo/vol64/iss1>

Katoh H, Ogawa H, Ohya K, Fukushi H: A review of DNA viral infections in psittacine birds., J. Vet. Med. Sci., 査読あり, 72: 1099-1106, 2010.

DOI: 10.1292/jvms.10-0022  
Ohya K, Okuda H, Maeda S, Yamaguchi T, Fukushi H: Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydia felis*-infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats., Vet. Microbiol., 査読あり, 146: 366-370, 2010.  
DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.05.026

〔学会発表〕(計 8 件)

福土秀人, オウム病クラミジアとその感染症における現状と課題, 日本細菌学会, 2013年3月18日, 千葉

大屋賢司, オウム病の理解と制御に向けたとりくみ〜ゲノム情報を利用した診断法開発と実態調査, 戦略的研究基盤形成支援事業「人獣共通感染症の戦略的国際疫学研究の推進と若手研究者の実践的育成」平成 24 年度シンポジウム, 2012年12月8日, 藤沢

奥田秀子, ガーナ共和国における野鳥の *Chlamydia* 属菌保有状況調査, 日本獣医学会, 2012年9月15日, 盛岡

大屋賢司, 動物クラミジアを検出する LAMP 法の開発, 日本獣医学会, 2012年9月15日, 盛岡

原崎多代, クラミジア肺炎およびオウム病を鑑別するマルチプレックス PCR 法の開発, 日本獣医学会, 2012年9月15日, 盛岡

Ohya K, *Chlamydia psittaci* specific genes, which are identified by comparative genomic analysis, can be used for differential diagnosis of chlamydia species., International Union of Microbiological Societies Congress, Sep 8, 2011, Sapporo.

大屋賢司, オウム病クラミジアのゲノム解析: 鑑別診断法開発と病態解明を目指して, 日本獣医師会学術集会, 2011年2月12日, 岐阜

Ohya K, Genome sequence of the zoonotic pathogen, *Chlamydia psittaci*, Chlamydia basic society meeting, Mar 20, 2011, California.

〔図書〕(計 2 件)

大屋賢司, 福土秀人, 獣医微生物学 (第 3 版, 見上彪 監修, 文永堂)「リケッチア」, 128-132, 2011.

大屋賢司, 福土秀人, 獣医微生物学 (第 3 版, 見上彪 監修, 文永堂)「クラミジア」, 132-137, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大屋 賢司 (OHYA, Kenji)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 50402210

(2) 研究分担者

福土 秀人 (FUKUSHI, Hideto)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 10156763

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

奥田 秀子 (OKUDA, Hideko)

岐阜大学大学院・連合獣医学研究科・博士  
課程大学院生

原崎 多代 (HARASAKI Tayo)  
岐阜大学応用生物科学部・学部学生