

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590451
 研究課題名（和文） 我が国の難培養性アナプラズマ症起因細菌のゲノム部分構造解析と簡易探索ツールの開発
 研究課題名（英文） Partial genomic analysis of uncultured *Anaplasma phagocytophilum* in Japan and the development for a simple and rapid diagnostic tool
 研究代表者
 大橋 典男(OHASHI NORIO)
 静岡県立大学食品栄養科学部・教授
 研究者番号：10181645

研究成果の概要：本研究では、我が国の難培養性アナプラズマ症起因細菌について、媒介マダニの唾液腺中に存在するこの細菌のゲノム部分構造を明らかにすることを目的とし、アナプラズマ細菌に特異的な *p44/msp2* 主要外被膜蛋白遺伝子群の発現領域の解析を行った。その結果、3匹のマダニの唾液腺 DNA から *p44/msp2* 発現領域 (3-4 kb) の増幅に成功し、その遺伝子構造を明らかにすることに成功した。さらに、リアルタイム PCR による簡易検出法について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：遺伝子、感染症、ゲノム、細菌、微生物

1. 研究開始当初の背景

新興感染症「アナプラズマ症」は、マダニにより媒介される発熱性疾患で、その病原体は顆粒球に感染する偏性寄生性のグラム陰性桿菌、*Anaplasma phagocytophilum*（アナプラズマ細菌）である。本症は、1994年に米国で発見され、1996年にその起因細菌の *A. phagocytophilum* が分離報告された。我が国の *A. phagocytophilum* については、2005年までその存在がまったく不明であった。我々は、国内の *Ixodes* 属マダニから *A. phagocytophilum p44/msp2* 遺伝子群の検出に成功し、その成果を *Emerg. Infect. Dis.* (2005) に掲載した。これにより、日本国内にも *A.*

phagocytophilum が存在していることが初めて明らかとなり、世界的に認知された。*A. phagocytophilum* の分離は極めて困難である。米国で、アナプラズマ症患者血液から HL60 細胞を用いて分離に成功しているが、欧州やアジア地域での患者からの分離成功例はない。

A. phagocytophilum には、「*p44/msp2* multigene family」と呼ばれる特徴的な遺伝子群が存在する。これは、ゲノム上に散在する多数の *p44/msp2* 相同性遺伝子カセットが RecF pathway を介して *p44* 主要発現領域で組換えられ、生体内で *A. phagocytophilum* の

抗原変異を引き起こすものである。全ゲノム解析の結果によると、ゲノム中に存在する *p44/msp2* 相同性遺伝子の総数は、113 個であることが判明している。さらに最近、Barbet らは米国と欧州の *A. phagocytophilum* における *p44/msp2* 主要発現領域の相同性を比較し、双方がかなり異なっていることを見出し報告した(*Infect. Immun.* 74, 6429-6437 [2006])。しかし、日本を含むアジア地域の *A. phagocytophilum* については、そのゲノム構造に関する情報はまったく存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、上述のような我が国の難培養性 *A. phagocytophilum* の全ゲノム配列の解読を視野に入れ、現在の遺伝子解析技術を駆使して、自然界から得られた *A. phagocytophilum* のゲノムについて、その部分構造を明らかにすることを目的とした。具体的には、国内のマダニから調製した宿主 DNA 混じりの *A. phagocytophilum* DNA を用いて、*p44/msp2* 発現領域の増幅を試み、得られた配列と欧米のものと比較して、我が国における *A. phagocytophilum* のゲノム部分構造の分子遺伝学的特徴を明らかにすることである。

一方で、このような難培養・難検出性 *A. phagocytophilum* のゲノム確保のために、マダニから *A. phagocytophilum* 遺伝子を検出する技術改善を試み、信頼性の高い且つ簡便な検出方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 静岡県、山梨県（東海・関東地方）および青森県、岩手県（東北地方）において、旗ずり法によりマダニを採集し、その唾液腺を一匹ずつ摘出して DNA 抽出を行った。そして、得られたマダニ唾液腺 DNA から *A. phagocytophilum* の *p44/msp2* 遺伝子群を標的とした Nested PCR を行い、*A. phagocytophilum* 感染マダニの同定を行った。この検出は、*p44/msp2* 遺伝子群の N 末端と C 末端の保存された領域で primer を作製し約 400 bp の partial genes を増幅するもので、*p44/msp2* がゲノム上に多数存在するため、他の single copy の遺伝子よりも検出感度が極めて高いことが特徴である。これらの増幅産物を TA-cloning し、得られたクローンの塩基配列を決定して、系統樹解析を行

い、それを基に日本の *A. phagocytophilum* の性状について特徴付けを行った。

(2) 上述の Nested PCR 陽性を示したマダニ唾液腺 DNA 検体について、*A. phagocytophilum* ゲノムの解析に十分な DNA 量を確保するため、GenomiPhi V2 を用いて、宿主 DNA 混じりの全 DNA をまるごと増幅した。この GenomiPhi 増幅マダニ DNA から、*A. phagocytophilum* の *p44/msp2* 発現領域を増幅するため、Barbet らが報告した米国の患者分離株と欧州の動物分離株からの *p44/msp2* 発現領域の配列を基に、様々な primer を設計し PCR を行った。得られたそれぞれの PCR 増幅産物は、direct sequencing により塩基配列を解読するか、または TA-cloning を行った後、そのクローンの塩基配列を決定し、配列のアッセルにより、*p44/msp2* 発現領域内の遺伝子構造を明らかにした。そして、その発現領域の配列と欧米の *A. phagocytophilum* の配列を比較解析した。

(3) *A. phagocytophilum* の簡易検出法の検討については、*p44/msp2* の N 末端保存領域を標的としたリアルタイム TaqMan-PCR 法を検討した。

4. 研究成果

(1) 静岡県と山梨県で採集したマダニからの *A. phagocytophilum p44/msp2* 遺伝子群の特徴について

静岡県と山梨県では、合計 123 匹のシュルツェマダニとヤマトマダニを採集した。それらのうち、9 匹のマダニ個体と一つの 10 匹プールから *A. phagocytophilum p44/msp2* 遺伝子群の DNA 断片（約 400 bp）が Nested PCR により増幅された。これらを TA-cloning し、計 174 個の *p44/msp2* 大腸菌クローンを得た。そして、それらの塩基配列をすべて解読した結果、シュルツェマダニから得られた *A. phagocytophilum* の *p44/msp2* クローン群はそのアミノ酸配列において多様性を示したが、ヤマトマダニからのものは同一アミノ酸配列を持つ *p44/msp2* クローンが多数存在することが判明した。この結果は、ヤマトマダニの中で *A. phagocytophilum* の選択 (Selection) が起

こっている可能性があるものと考えている。

(2) マダニ唾液腺中に存在する *A. phagocytophilum* の *p44/msp2* 発現領域の解析
静岡県のシュルツェマダニから得られた *A. phagocytophilum p44/msp2* 発現領域について

静岡県と山梨県のマダニ 123 匹中 9 個体と 10 匹プールの一つから、*p44/msp2* 発現領域のゲノム構造解析を試みた。これまでの報告によると、欧米の *A. phagocytophilum* の *p44/msp2* 発現領域は、5'側から *tr1* 遺伝子 - *omp1X* 遺伝子 - *omp1N* 遺伝子 - *p44/msp2* 発現カセット - *recA* 偽遺伝子 - *valS* 遺伝子の 6 つの遺伝子(全長約 7 kb) から構成され、これらの遺伝子は *tr1* 遺伝子上流のプロモーターからポリシストロニックに 1 本の mRNA として転写されることが知られている。そして、*A. phagocytophilum* は生体防御機構を逃れるため、相同性組み換えにより、ゲノム上に散在する様々な *p44/msp2* 遺伝子種を *p44/msp2* 発現領域で入れ換え、菌体表面の抗原変異を引き起こす。ここでは、欧米の *p44/msp2* 発現領域の配列を基にして様々なプライマーを設計し PCR を行った。その結果、設計したほとんどのプライマーペアで良好な成果が得られなかったが、1 組のプライマーペアで、1 個体のシュルツェマダニから *p44/msp2* 発現カセット部分を増幅することができた。さらに、*p44/msp2* 発現カセットの 5' 側と 3' 側領域の増幅を試み、最終的に全長約 2.8 kb の配列を決定することに成功した。この静岡県の *A. phagocytophilum* の *p44/msp2* 発現領域においては、欧米の *A. phagocytophilum* の 3' 側領域に見られる *recA* 偽遺伝子が欠如しており、*p44/msp2* 発現カセットと *valS* 遺伝子が隣接していることが判明した。また、*p44/msp2* 発現領域内のカセットに組み込まれた *p44/msp2* 遺伝子種を調べた結果、(1)で見出した *p44/msp2* 遺伝子種のひとつと一致した。即ち、この *p44/msp2* 発現領域に組み込まれた *p44/msp2* 遺伝子種はシュルツェマダニ中の *A. phagocytophilum* の菌体表面に蛋白として実際に発現している可能性が高く、マダニの中で *A. phagocytophilum* が生存するために必須な主要外被膜蛋白種なのかもしれないと考えている。

東北地方(青森県および岩手県)のシュル

ツェマダニから得られた *A. phagocytophilum p44/msp2* 発現領域について

次に、東北地方で採集したマダニからの *A. phagocytophilum* について、*p44/msp2* 発現領域のゲノム構造解析を行った。採集した 130 匹のマダニのうち、6 匹のマダニが *A. phagocytophilum* を保有していることが Nested PCR 検出で明らかになった。その 6 匹中 2 匹のシュルツェマダニにおいて *p44/msp2* 発現領域内の *p44/msp2* 発現カセット部分の増幅に成功した。そして、この 2 匹の検体において、さらに設計した様々なプライマーペアにより、*p44/msp2* 発現カセットの上流と下流を増幅し、最終的に全長約 3.8 kb の配列を得ることに成功した。この東北地方の 2 匹のマダニからの *A. phagocytophilum p44/msp2* 発現領域は、いずれも、静岡県の場合とは異なり、*p44/msp2* 発現カセットの上流には *omp-1N* 遺伝子が、また下流には *recA* 偽遺伝子に続いて *valS* 遺伝子が存在しており、欧米の *p44/msp2* 発現領域と類似した構造であることが判明した。*omp-1N* のアミノ酸配列を他国のものと比較したところ、スウェーデンのイヌから分離された *A. phagocytophilum* のものと最も高い相同性(92%)を示した。また、*recA* 偽遺伝子のアミノ酸配列の比較では、東北地方の *A. phagocytophilum* は米国のヒト患者由来のものと同じの配列を持っていることが判明した。このように、東北地方の *A. phagocytophilum* は、*p44/msp2* 発現領域の類似性において、米国のものや欧州のものと share しているように思われた。また、日本国内には、東北地方の *A. phagocytophilum* のように欧米の *p44/msp2* 発現領域と類似の構造をゲノム上に保有するものと静岡県の *A. phagocytophilum* のように欧米のものと極めて異なる *p44/msp2* 発現領域のゲノム構造を保有するものの、両方が混在している可能性が推察された。ここで得られた成果の一部は、以下の雑誌に論文投稿中である(Wuritu, Y. Ozawa, Gaowa, F. Kawamori, T. Masuda, T. Masuzawa, H. Fujita, N. Ohashi. Structural analysis of a *p44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks inhabiting Japan. *J. Med. Microbiol.*, submitted.)

(3) 簡易探索ツールの開発について

A. phagocytophilum の簡易検出法につ

いて、*p44/msp2*のN末端保存領域を標的としたリアルタイムTaqMan-PCR法を検討した結果、感度・精度において、さらなる改良が必要なものの、*A. phagocytophilum*の検出には有効であることが判明した。

以上、本研究により、我が国における *A. phagocytophilum* のゲノム構造について、部分的ではあるが、明らかにすることに成功した。この成果は今後、日本のみならずアジア地域の *A. phagocytophilum* を解析する上で重要な知見となるものと考えらる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Wuritu, Goawa, F. Kawamori, M. Aochi, T. Masuda, and N. Ohashi: Characterization of *p44/msp2* multigene family of *Anaplasma phagocytophilum* from two different ticks species, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*, in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**, 142-145 (2009)、査読有

K. Inoue, S. Maruyama, H. Kabeya, N. Yamada, N. Ohashi, Y. Sato, M. Yukawa, T. Masuzawa, F. Kawamori, T. Kadosaka, N. Takada, H. Fujita, and H. Kawabata: Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5086-5092 (2008)、査読有

T. Oya-Ito, H. Naitou, S. Masuda, N. Kinae, N. Ohashi. Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 360-369 (2008)、査読有

T. Masuzawa, I.G. Kharitononkov, Y. Okamoto, T. Fukui and N. Ohashi: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver's Province (Russia) - a sympatric region for the two tick species. *J. Med. Microbiol.* **57**, 986-991 (2008)、査読有

F. Kawamori, M. Hiroi, T. Harada, K. Ohata, K. Sugiyama, T. Masuda, and N. Ohashi. Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *J. Med. Microbiol.* **57**, 58-63 (2008)、査読有

[学会発表](計11件)

大橋典男、国内初の新興感染症「アナプラズマ症」について、第82回日本細菌学会総会、2009年3月13日、名古屋

川森文彦、静岡県東部で採取されたマダニにおける紅斑熱群リケッチア検出状況、第82回日本細菌学会総会、2009年3月13日、名古屋

青地美南、紀伊半島のマダニから検出された紅斑熱群リケッチアDNAの解析、第82回日本細菌学会総会、2009年3月13日、名古屋

高娃、鹿児島県のマダニが保有するリケッチア関連細菌群について、平成20年度日本薬学会東海支部例会、2008年12月6日、静岡

大橋典男、マダニ唾液腺内に存在するアナプラズマ症起因細菌のゲノム部分構造解析へのアプローチ、第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会・合同研究発表会、2008年11月2日、岐阜

高娃、鹿児島県および長崎県五島列島のマダニが保有するアナプラズマ・エーリキア・リケッチアについて、第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会・合同研究発表会、2008年11月2日、岐阜

川森文彦、Multiplex real-time RT-PCRによるつつが虫病リケッチアおよび紅斑熱群リケッチアの検出、第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会・合同研究発表会、2008年11月2日、岐阜

大橋典男、新興感染症「アナプラズマ症」患者の発見、第26回日本クラミジア研究会・第15回リケッチア研究会・合同研究発表会、2008年11月2日、岐阜

N. Ohashi, Characterization of rickettsial DNA (spotted fever group) from ticks collected in Kagoshima prefecture, Japan, The International Crisis Management Symposium on CBRN and Emerging Infectious Diseases, Sep. 14 (2008), Choshi

大橋典男、鹿児島県のマダニから検出された紅斑熱群リケッチアの遺伝子解析、第25回日本クラミジア研究会・第14回リケッチア研究会・合同研究発表会、2007年10月27日、東京

大橋典男、第81回日本細菌学会、2008年3月26日、京都

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

大橋 典男 (OHASHI NORIO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10169039

(2)研究分担者

増澤 俊幸 (MASUZAWA TOSHIYUKI)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10181645