

平成22年 5月11日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780218  
 研究課題名 (和文) オウム病クラミジア封入体多型性と病原性に関する分子細胞生物学的研究  
 研究課題名 (英文) Molecular and cellular biological studies on diversity of inclusion bodies and pathogenesis of *Chlamydophila psittaci*.  
 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

## 研究成果の概要 (和文)：

クラミジアは、偏性細胞内寄生性を示し、封入体と呼ばれる膜構造中で分裂増殖する。本研究では、人獣共通感染症の原因となるオウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* 封入体形成機構と病原性との関連について明らかにすることを目標とした。クラミジアの病原性に重要な役割を果たす因子の候補として、多型膜蛋白質 Pmp の一つ (PmpX) を得て機能解析を行った。現在は、Pmp ファミリーと PmpX に着目し、その宿主特異性、封入体形成を含めた病原性への寄与についての検討を進行中である。

## 研究成果の概要 (英文)：

*Chlamydia* is obligate intracellular pathogen, which replicates within vacuole in host cell cytoplasm, called "inclusion body". In this study, aiming at understanding the relationship between biogenesis of inclusion bodies of *Chlamydophila psittaci*, a causative agent for a zoonotic psittacosis, and its pathogenesis. As a result of *C. psittaci* library screening by using *C. psittaci*-infection specific serum, the clone encoding one of the polymorphic membrane protein (pmp) genes was obtained (temporary named as PmpX), and functional analysis of PmpX was done. Currently, further investigation of the role of *C. psittaci* Pmp family proteins (especially PmpX) in biogenesis of chlamydial inclusion bodies and in pathogenesis are on going.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症

## 1. 研究開始当初の背景

クラミジア (*Chlamydia*) は、偏性細胞内寄生性細菌で多様な宿主域を示す。中でも、*Chlamydomphila psittaci* によるオウム病は愛玩鳥からヒトに感染する人獣共通感染症であり、肺炎から時に致死経過をたどることもある。そのため、感染症法では第4類の全数届出疾患に指定されており、年40例ほどの発生が報告されている。クラミジアは、代謝活性をもたない基本小体 (EB) が宿主細胞に侵入後、膜胞 (封入体) 中で網様体 (RB) へと変換し分裂増殖するという、独特の生活環を有する。封入体の形成はクラミジア属最大の特徴であり、本菌の細胞内増殖性に重要な役割を果たしている。クラミジア種・株間においては、封入体の形態に多様性があることが知られているが、病原性との関連等生物学的な意義は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、*C. psittaci* 封入体形成機構を、由来の異なる株間で比較することにより、多様な宿主域や自然界での存在様式との関連について明らかにすることを目標とした。

## 3. 研究の方法

下記の材料を用いて、*C. psittaci* ライブラリースクリーニングを行い、クローンにコードされる遺伝子の機能解析を行った。

(1) *C. psittaci* ゲノムライブラリーの構築  
国内鳥展示施設における人への集団発生事例時に分離された *C. psittaci* Mat116 株を供試株として用いた。*C. psittaci* ゲノム DNA は、感染細胞よりショ糖密度勾配遠心により分離精製した菌体を材料として行った。精製 *C. psittaci* ゲノム DNA は *EcoRI* を用いて限定分解し、lambda ZAPII ベクターに挿入しゲノムライブラリーとした。

(2) ライブラリースクリーニングに用いた血清の作製

ライブラリースクリーニングには、*C. psittaci* Mat116 感染マウス血清、及び *C. psittaci* 感染細胞封入体画分免疫ウサギ血清を用いた。感染マウス血清は、*C. psittaci* Mat116 を C57BL/6 マウスに経鼻感染させたものである。*C. psittaci* 感染細胞封入体画分は、感染 HeLa 細胞を 0.25 M ショ糖存在下で抽出、遠心作業を繰り返すことにより調製し免疫源とした。

(3) スクリーニングにより得られたクロー

ンの機能解析

スクリーニングにより得られたクローンは、定法に従い塩基配列を決定した。*C. psittaci* のゲノム配列は我々が決定したものを、公開されている他種クラミジアゲノム配列と比較解析した。大腸菌発現ベクターを用いて組換え PmpX 蛋白質を作製した。組換え PmpX を免疫源として、抗 PmpX 抗体を作製した。感染細胞内における PmpX の局在は、*C. psittaci* 感染細胞を固定した後、抗 PmpX 抗体、抗クラミジア LPS 抗体、その他細胞小器官マーカーを用いて蛍光抗体法 (IFA) により共焦点レーザー顕微鏡下で検討した。

(4) 血清診断用抗原としての有用性の評価  
本研究で得られた PmpX と、同じく封入体構成因子候補であるネコクラミジア *C. felis* CF0218 に関しては、血清診断用抗原としての有用性を評価した。いずれも大腸菌を用いて作製した組換え蛋白質を抗原として用いた ELISA により、血清中の抗体を検出する系を樹立した。CF0218 の評価には、ネコ血清 714 検体を用いた。PmpX の評価には、各種 *C. psittaci* 株免疫および感染マウス、ウサギ血清を用いた。

## 4. 研究成果

(1) クラミジア感染細胞特異抗原の探索  
クラミジアの感染細胞特異抗原および封入体構成抗原の探索を行った。3.(2)にて調製した *C. psittaci* 封入体画分を感染マウス血清を用いたウエスタンブロットに供したところ、多型膜蛋白質 (Pmp)、主要外膜蛋白質 (MOMP)、熱ショック蛋白質 (Hsp) と思われるバンドが検出された。この画分を免疫したウサギ血清および、感染マウス血清を用いて、3.(1)にて作製した *C. psittaci* Mat116 ライブラリーのスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、多型膜蛋白質 Pmp をコードするクローンを得ることができた。Pmp は、性器クラミジア *C. trachomatis* において、その発現量に比して強い免疫原性を有する菌体表面抗原として同定され、クラミジアの種により異なるが、ゲノム上には 9-20 におよぶファミリーを構成している。*C. psittaci* ゲノム上の Pmp は他の動物由来クラミジアと同様に 20 であった (表 1)。

本研究で得られた Pmp は、他種クラミジアとの比較解析の結果、ゲノム上の位置より PmpG に属することが推察された (現時点では PmpX と命名)。PmpX には、Pmp 蛋白質に特有の FXXN および GAIL モチーフが存在

するものの (図 1 参照)、他の Pmp と比べ分子量 (通常 90~150 kD)、等電点 (通常 pI は 7~8) 共に低いものであった (40 kD、pI=4.85)。

表 1: *C. psittaci* を始めとした各種クラミジアの遺伝子構造比較  
※赤字は Pmp ファミリー

	<i>Cp. psittaci</i> (Mat116)	<i>Cp. abortus</i> (S26/9)	<i>Cp. felis</i> (PaQ-56)	<i>Cp. caviae</i> (Q1P6)	<i>Cp. pneumoniae</i> (AR39)	<i>C. trachomatis</i> (D/UJW-3)
Genome size (kbp)	1,163	1,144	1,166	1,173	1,229	1,042
GC content (%)	39.1	39.9	39.4	39.2	40.6	41.3
# of CDS	999	961	1,005	1,009	1,130	894
# of Pmp proteins	20*	18	20	18	21	9
# of rRNA	38	38	38	38	38	37
# of rRNA operons	1	1	1	1	1	2

<i>C. psittaci</i> Pmp	1	MHPVWFLISSLSFASNGSFAEVEKTELPSNGYNGTSEFEVKEKTSAGATYCEG	
<i>C. abortus</i> Pmp166	1	.....L.....QVTNET..S.D....V..D..E....TS..AI..... (中略)	
<i>C. abortus</i> Pmp176	1	.....F.....NDQRTA..P..D....V..E..Q....SS..TT.....	
<i>C. psittaci</i> Pmp	188	LKIEHQMLVFSSENSSTSSGALYADKLTIVS66PTLFSHNSVSH-SSPKGGAIKVD56	238
<i>C. abortus</i> Pmp166	181	.....K.....REK.....N.....CI...D	249
<i>C. abortus</i> Pmp176	178	.....Q.....TSK.....G.....SI...5	237
<i>C. psittaci</i> Pmp	239	GECSLTADLGGITF00KIKTSS65STVRNSIDLGS6KFTLSAEGGFIFFYDPIA	298
<i>C. abortus</i> Pmp166	241	.....N.....T.MG...P.....S66.....N..E.....A	308
<i>C. abortus</i> Pmp176	238	.....D.....K.S6..S.....TG.....R..D.....T	296
<i>C. psittaci</i> Pmp	359	GGVLEARK-SR-KIQALLSHI* 379	
<i>C. abortus</i> Pmp166	368	...TLE..KIQTK65TVVPLDGLTLQTPSS6GETITLNLNDINIASLGG66GYCSQTR	419
<i>C. abortus</i> Pmp176	354	...SVT..QVTEAGSTVWDLGTLQTPSS6GETITLNLNDINIASLGG66GYSPAKLA	413
<i>C. abortus</i> Pmp166	428	NEYSKPSYKCR* 432	
<i>C. abortus</i> Pmp176	414	TNTASQATTINAVNLVDGADNAYEPIA (中略) QFGFELR6SSRTYVWDLGSKTQ* 839	

図 1: PmpX と他種クラミジア Pmp のアライメント  
赤字は FXXN および GAILI モチーフを示す。

Pmp の中には、従来の外膜蛋白質としてのみならず、菌体外へと放出され、クラミジアの封入体拡張に寄与しているものが *C. trachomatis* において報告されている。この Pmp-like secreted 分子の分子量は約 50 kD、等電点は pI=4.6 であり、本研究で得られた PmpX と同程度であった。そこで、PmpX の感染細胞内における局在を検討するために、PmpX に対する抗血清を作製した。結果、PmpX は、*C. psittaci* 感染細胞内において菌体周囲へ分泌されている可能性を示唆するデータを得ることができた (図 2)。

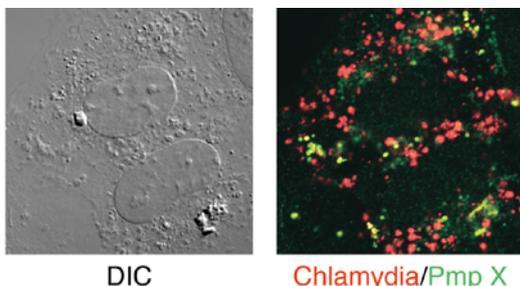


図 2: *C. psittaci* 感染細胞における PmpX の局在。  
Mat116 株感染 10 時間後の HeLa 細胞を、抗 PmpX ウサギ血清 (緑) 及び抗クラミジア LPS 単クローン抗体 (赤) を用いて、クラミジア感染細胞における PmpX の局在を検討した。PmpX は、菌体との共局在 (黄色) の他、菌体周囲へ分泌を示唆する像も観察される。左は同視野の微分干渉 (DIC) 像。

現在は、特に *C. psittaci* の Pmp ファミリー

ーと PmpX に着目し、その宿主特異性、封入体形成を含めた病原性への寄与についての検討を進行中である。

(2) クラミジア感染特異抗原の血清診断用抗原としての有用性

ネコクラミジア *C. felis* において、感染特異抗原として同定した CF0218 の血清診断用抗原としての有用性を評価した。CF0218 は、N 末端上に 2 峰性の疎水部位をもつ transmembrane head (TMH) ファミリーに属する分子であり、*C. felis* 感染細胞内において発現する、封入体構成成分候補でもある (Ohya ら、Clin. Vaccine Immunol., 2008)。組換え CF0218 を抗原とした ELISA の系 (CF0218-ELISA) を樹立し、国内飼育ネコ血清 714 検体を用いて、*C. felis* 抗体検出系としての有用性を評価した。結果、CF0218-ELISA は感度の点では従来の感染細胞を抗原として用いた IFA に多少劣るものの (IFA に対する感度は 78% ; 表 2)。ワクチン接種ネコ血清とは反応しないことが明らかとなった (表 3)。

表 3 ワクチン接種ネコ 44 検体における IFA および CF0218-ELISA の比較。() 内は % を示す。

	CF0218-ELISA		
	Positive	Negative	Total
IFA Positive	2 (4.5)	19 (43.2)	21 (47.7)
IFA Negative	1 (2.3)	22 (50.0)	23 (52.3)
Total	3 (6.8)	41 (93.2)	44 (100.0)

表 2 ワクチン未接種ネコ 670 検体における IFA および CF0218-ELISA の比較。() 内は % を示す。

	CF0218-ELISA		
	Positive	Negative	Total
IFA Positive	112 (16.7)	31 (4.6)	143 (21.3)
IFA Negative	50 (0.7)	522 (77.9)	572 (78.7)
Total	117 (17.5)	553 (82.5)	670 (100.0)

Sensitivity (95% CI), 78.3% (74.6-80.3%); Specificity (95% CI), 99.1% (98.0-99.6%)

Positive predictive value (95% CI), 95.7% (91.2-98.1%)

Negative predictive value (95% CI), 94.4% (93.4-94.9%)

すなわち、CF0218 を抗原として用いることにより、従来法では血清学的に鑑別不可能であったワクチン接種動物とクラミジア感染動物の鑑別が可能となることが明らかとなった。このような特性に加え、TMH ファミリーは動物由来クラミジア固有の分子であり、クラミジア種間における相同性も低いことから、他の動物由来クラミジア感染個体を検出する診断用抗原として有用であることが示唆された。本成果は現在論文投稿中である。

また、4.(1)において *C. psittaci* 感染細胞特

異抗原としてクローニングした PmpX についても血清診断用抗原としての有用性を検討している。ウエスタンブロットにおいて、各種 *C. psittaci* 免疫血清（複数株において検討）と反応させたところ、いずれの株の免疫血清においても反応することが明らかとなり、*C. psittaci* 血清診断用抗原としての有用性を示唆するデータを得ている。

#### 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 2 件）

① Ohya, K., Takahara, Y., Kuroda, E., Koyasu, S., Hagiwara, S., Sakamoto, M., Hisaka, M., Morizane, K., Ishiguro, S., Yamaguchi, T. and Fukushi H.: *Chlamydophila felis* CF0218 is a novel TMH-family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection. Clin. Vaccine Immunol.、査読有 15(10): 1606-1615, 2008.

② 杉浦尚子, 大屋賢司, 山口剛士, 福士秀人: 新たなオウム病診断用抗原の探索. 獣医畜産新報、査読無 61: 202-203, 2008.

〔学会発表〕（計 6 件）

① 大屋賢司、黒田誠、関塚剛史、Meyers Garry、岸本寿男、安藤秀二、福士秀人: オウム病クラミジア *C. psittaci* 日本分離株の全ゲノム配列決定、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 28 日（横浜）

② 奥田秀子、大屋賢司、杉浦尚子、山口剛士、福士秀人: *Chlamydophila psittaci* 外膜蛋白質 Pmp の診断用抗原としての有用性、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 27 日（鳥取）

③ 大屋賢司、奥田秀子、前田貞俊、山口剛士、福士秀人: ネコクラミジア感染特異抗原 CF0218 の診断用抗原としての有用性、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 3 日（宇都宮）

④ 大屋賢司、前田貞俊、山口剛士、福士秀人: “感染特異抗体検出による、ネコクラミジア *Chlamydophila felis* の血清疫学調査。”第 26 回日本クラミジア研究会、2008 年 11 月 2 日（岐阜）

⑤ 塩田幸弘、大屋賢司、福士秀人: “Real-time PCR 法によるオウム病クラミジア遺伝子検

出法の開発。”第 146 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 25 日（宮崎）。

⑥ 大屋賢司、福士秀人: “ネコクラミジア CF0218 の性状解析と感染診断用抗原としての有用性。”第 81 回日本細菌学会総会、2008 年 3 月 25 日（京都）。

〔図書〕（計 1 件）

① 大屋賢司、岸本寿男、福士秀人. オウム病. p. 121-122. In: ズーノーシスハンドブック. メディカルサイエンス社, 2009.

#### 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: 50402219