

201123015A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明

ー比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大屋 賢司

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告	1
動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査 —研究総括と実験担当	
大屋 賢司	
II. 分担研究報告	15
動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査 —PC を用いたゲノム情報の解析	
福士 秀人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	24

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）総括
研究報告書

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診
断法の開発と実態調査
—研究総括と実験担当

研究代表者：大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部 准教授

研究要旨： オウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* は、人獣共通感染症であるオ
ウム病の原因となり、全数把握の 4 類感染症に指定されている。また、オウム病を始め
とした動物由来クラミジアに関しては、動物における保有状況の把握が公衆衛生学上重
要となるが、不明の点が多いのが現状である。本課題では、異なる動物種由来クラミジ
アの比較ゲノム解析および種特異的な診断法開発と実態調査を行い、自然界における存
在様式を解明することを目的としている。今年度は、解読した *C. psittaci* ゲノム情報
を元に、各種クラミジア固有の遺伝子を抽出し、それらを標的とした鑑別診断法の樹立
を試みた。反芻獣に流産を引き起こす 3 種 (*C. psittaci*、*C. abortus*、*C. pecorum*) を
鑑別可能な multiplex PCR の系を樹立することができた。また、*C. psittaci* 固有遺伝
子を標的とした LAMP の系を樹立することができた。LAMP 法は、従来の PCR 法に
比べ、感度、特異性、所要時間、簡便性の点で、より実態調査に適している。近縁多種
株クラミジアのゲノム解読は、残念ながら研究期間中に終了することができなかった。
研究期間を通じて開発した動物クラミジア検出法を用いて、引き続き国内飼育鳥の疫学
調査を行った。研究期間を通じた陽性率は約 6% であり、2003 年に我々が行った結果(約
15%) よりも低下していた。これは国内飼育業者等に本感染症の認知度が向上したため
であると考えられ、我々の啓蒙活動もその一助を担っているのではないかと考えている。
また、研究期間を通じて得られたゲノム情報を元に、本菌の感染細胞内におけるトラン
スクリプトーム解析という、より基礎的な解析を行う基盤を構築することができた。

研究分担者：福士 秀人 岐阜大学応用
生物科学部 教授

研究協力者：

安藤 秀二 国立感染症研究所 ウイル
ス第一部 室長

黒田 誠 国立感染症研究所

病原体ゲノム解析センター 室長
関塚 剛史 国立感染症研究所
病原体ゲノム解析センター 研究員

A.研究目的

クラミジアは、多様な宿主域・病態を呈する。なかでも *Chlamydomphila psittaci* は人獣共通感染症であるオウム病の原因となり、病原性は一般的に他種クラミジアより強く、全数把握の4類感染症に指定されている。しかしながら、*C. psittaci* に関しては、検査室レベルで実施可能な検査法が確立されておらず、5類感染症に指定されている性器クラミジアおよび肺炎クラミジアとの鑑別が困難なことが行政上の支障となっている。また、オウム病を始めとした動物由来クラミジアに関しては、動物における保有状況の把握が公衆衛生学上重要となるが、不明の点が多いのが現状である。申請課題では、異なる動物種由来クラミジアの比較ゲノム解析および種特異的な診断法開発と実態調査を行い、自然界における存在様式を解明することを目的とする。

B.研究方法

1. ゲノム情報を利用した各種クラミジア特異的遺伝子検出法の開発

各種クラミジア固有の遺伝子は、GeneBank より得たゲノム配列 (*C. psittaci* に関しては本課題で解説した Mat116 株を使用) より ORF を抽出し、各種クラミジア間で総当たり BLAST 検

索を実施して抽出した。*C. psittaci* 固有であるとした A2940 遺伝子に関して、栄研化学の開発した LAMP 法用プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/>)を用いて、LAMP 法用のプライマーをデザインした。反芻獣に流産を起こすクラミジア3種 (*C. psittaci*、*C. abortus*、*C. pecorum*) の multiplex PCR に関しては、*C. psittaci* A2940 と同様に抽出した *C. abortus* CAB295、*C. pecorum* に関しては、既報 (BMC Microbiol. 9:130, 2009) にて使用された CPC gene を標的とし、定法に従いプライマーをデザインした。LAMP、multiplex PCR 法いずれの評価にも、それぞれの遺伝子をクローニングしたプラスミドおよび、各種クラミジア精製菌体 (EB) より抽出したゲノム DNA をテンプレートして感度、特異性を評価した。

2. 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

昨年度に引き続き、鳥類の保有する *C. psittaci* 実態調査として、全国の動物病院・動物園からの依頼検体、及び岐阜大学内で採取した野生ハトの糞便 133 検体を検査した。これまで研究室で行ってきた方法に準じ、糞便から抽出した DNA を鋳型として nested PCR (Chahota ら 2006) もしくはリアルタイム PCR (Okuda ら 2011) により *C. psittaci* 遺伝子検出を試みた。

3. *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析

蔗糖密度勾配法により精製した *C. psittaci* Mat116 株精製菌体 (EB) と HeLa 細胞に MOI = 40 で感染後 6 時間経過したものを用いて RNA 調製材料とした。精製 EB からは定法に従い全 RNA を調製した。感染 6 時間後の細胞からは、全 RNA を調製後、MicrobEnrich (Invitrogen) を用いて、宿主由来 mRNA と rRNA をできるだけ除去し、次世代シーケンサー (HiSeq 2000) に供した。

(倫理面への配慮)

クラミジアの取扱は、「クラミジア感染症の診断法開発および病態解析」として岐阜大学より組み換え DNA 実験として承認を得ている。個人情報の取扱等、人権の保護に関しては、今年度の実施項目では該当しない。申請者、研究分担者、いずれも岐阜大学大学院医学研究科が主催した「医学研究等倫理講習会」を修了しており、人患者血清の使用等必要が生じた際は岐阜大学の倫理委員会に諮ることのできる体制を整えている。

C. 研究結果

1. ゲノム情報を利用した各種クラミジア特異的遺伝子検出法の開発

解読したゲノム情報を元に、動物由来クラミジアを鑑別可能な遺伝子検査系の樹立を試みた。各種クラミジア間の全 ORF の総当たり BLAST 解析によって各

種クラミジア固有の ORF を抽出した。

C. psittaci に関しては、少なくとも 3 種の固有遺伝子候補が得られたが、そのうち A2940 (全長 762 bp) を標的候補とした。A2940 遺伝子は、肺炎クラミジア *C. pneumoniae*、性器クラミジア *C. trachomatis*、猫クラミジア *C. felis*、羊流産菌 *C. abortus* などの他種クラミジアゲノムには存在せず、Daruma 株を除いた *C. psittaci* ゲノム上に存在した (図 1a)。

BLAST 解析により検索した種固有遺伝子に関して、*C. psittaci* 以外では、羊流産菌 *C. abortus* CAB295 (全長 224 bp) に着目し、動物由来クラミジアを鑑別可能な multiplex PCR 法の樹立を試みた。*C. psittaci*、*C. abortus* に加え、これら 2 菌種と同様に反芻獣の流産の原因となる *C. pecorum* を鑑別対象とした。*C. pecorum* に関しては、既報の CPC gene を標的とした。これら 3 種の遺伝子を標的とした multiplex PCR の系を検討したところ、3 種のクラミジアを一反応で鑑別可能なことが示された (図 1b)。

multiplex PCR の系に加え、等温増幅法 (LAMP 法) の樹立を試みた。標的は *C. psittaci* A2940 を選択した。

PrimerExplorer を用いて A2940 に対する 4 種のプライマーをデザインした。これらのプライマーを用いて各種クラミジア遺伝子の増幅を検討したところ、*C. psittaci* でのみ目視可能な蛍光反応が認められた。LAMP 法による A2940 検出感度を検討したところ、1 反応あたり 10^2

コピーより、目視可能な蛍光反応、電気泳動により特徴的なラダーを観察することができた (図 2a)。尚、反応に要する時間は 50 分以内であった (図 2b)。

2. 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

これまでに開発した遺伝子検出法を用いて、今年度は全国の動物病院からの依頼検体を初めとした 133 検体について調査した。陽性率は 10.5%であった。

3. *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析

今年度は、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析を試みた。解析に供したのは、*C. psittaci* Mat116 精製 EB および、*C. psittaci* Mat116 感染 6 時間後の全 RNA である。1 ラン当たり、最低約 100 ng の全 RNA が必要となるため、精製 EB (培養液およそ 500 ml 分) からは約 33 μ g の全 RNA を抽出することができた。感染 6 時間後のサンプルからは、MicrobEnrich によりできる限り宿主細胞 RNA を除去するよう努めたものを解析に供した。

D. 考察

1. ゲノム情報を利用した各種クラミジア特異的遺伝子検出法の開発

今年度は、これまでに解読した *C. psittaci* ゲノム情報を元に、動物クラミジ

ア鑑別診断法の樹立を試みた。バイオインフォマティクス的手法を用いて代表的なクラミジア種それぞれに固有の遺伝子を抽出した。この中でも特に *C. psittaci* A2940 を標的として、multiplex PCR、LAMP それぞれの系を検討した。A2940 遺伝子は、他クラミジア種ゲノムには存在せず、レファレンスに用いた Mat116 株以外の *C. psittaci* ゲノム上に存在したことから、本遺伝子が鑑別診断系の標的として有用であることが強く示唆された。A2940 と同様に抽出した *C. abortus* CAB295 遺伝子、既報の *C. pecorum* CPC gene の 3 遺伝子を標的とした multiplex PCR の系を樹立することができた。しかしながら、検出感度においては、1 反応当たり $10^5 \sim 10^6$ コピーであり、我々がこれまでに開発した nested PCR (10^4 コピー) やリアルタイム PCR (10^2 コピー) にとる。感度に関しては、PCR 反応に用いる酵素の種類等の検討を行ってより実用化に資する系の樹立を試みている。家畜衛生の場においては、*C. abortus* による 緬羊・羊の流産は、家畜伝染病予防法で届け出伝染病に指定されており他のクラミジアによる流産との鑑別が必要である。従来の方法 (例えば我々の開発した nested PCR、リアルタイム PCR 法) では、産物の塩基配列解読をして初めて種の同定が可能であったが、本法を用いることにより、1 反応で種の同定が可能となれば、より迅速な行政対応が可能になると思われる。本課題で試みたアプローチ

法は、他のクラミジア種でも有用であり、現在は、感染症法において行政鑑別の必要な肺炎クラミジア、性器クラミジア、オウム病クラミジアの multiplex PCR 法を検討中である。

multiplex PCR に加え、今年度は LAMP 法の樹立も試みた。LAMP 法は、1 つの標的遺伝子の 6 つの領域に対してプライマーをデザインし等温で増幅させる方法である。従来の PCR 法に比べて、特異性に優れ、反応時間も短時間（1 時間以内）、産物の電気泳動が必要なく、蛍光や濁度などの目視により反応を確認できる、等の利点がある。*C. psittaci* A2940 に関して、LAMP 法を樹立することができた。達成した感度は、1 反応当たり 10 コピーであり、従来の検出系よりも大幅に向上した。また、反応時間も 1 時間以内（概ね 50 分程度）、産物の電気泳動が不要、なことから、より実態調査に適した簡便な系が樹立できたと考えている。

2. 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

我々の研究室にて実施した、鳥類における *C. psittaci* 保有状況について 2006 年度からのデータを表 1 にまとめた。本課題がスタートしてからの 3 年間における陽性率は 5.8% であった。2003 年におこなった調査時には 14.8% であったことを考えると、クラミジアの清浄化が進んでいると示唆される。更にこのデータを鳥種別に表 2 にまとめた。検体数が大き

く異なるものの、オカメインコ、セキセイインコ、コザクラインコといった主に国内で繁殖・生産される小型鳥は、ヨウム等主に海外から輸入される大型鳥に比べ陽性率は約 2% と低値であった。陽性例の遺伝子型を系統解析すると、ヨーロッパに多い C, D, F 型とは異なるグループに属するが、特定の遺伝子型に偏っているわけではないことが明らかとなった（図 3）。これらのデータは、販売業者等の認知度向上による清浄化（検疫の徹底等）が進んだためであると思われる。我々のグループでは販売業者からの検査依頼や衛生指導を積極的に受け付けており、他にも講演等により本病原体の認知度向上・清浄化に多少なりとも貢献できているのではないかと考えている。

3. *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析

考察は、共同研究者の項にて記載する。

E. 結論

今年度得られた成果の概要は以下の通りである。

・解読したゲノム配列情報を利用して以下の遺伝子検査系を樹立した。

・動物クラミジアを鑑別可能な

multiplex PCR

・*C. psittaci* 種特異的な LAMP 法

・開発した診断法を用いた実態調査を継続中である。

・本研究開始以前の調査よりも、国内繁殖

鳥の陽性率が低下していた。

・国内で検出される *C. psittaci* は特有の遺伝子型に偏っているわけではないことが明らかとなった。

・*C. psittaci* RNA-seq に供する RNA の調製を行った。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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、福士秀人

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 64:804-806, 2011.

Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H,

Fukushi H

Detection of *Chlamydophila psittaci* by Using SYBR Green Real-Time PCR.

J. Vet. Med. Sci. 73:249-254, 2011.

著書

福士秀人、大屋賢司

クラミジア

p. 132-137. In: 獣医微生物学 (第3版) . 文永堂, 2011.

※クラミジア以外の人獣共通感染症および鳥類の感染症に関する発表論文は研究分担報告書に記載した。

著書

なし

2. 学会発表

Ohya K, Ibrahim E, Kuroda, M, Sekizuka T, Okuda H, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, Fukushi H: *Chlamydia psittaci* specific genes, which are identified by comparative genomic analysis, can be used for differential diagnosis of chlamydia species. 2011 International Union of Microbiological Societies Congress, 2011 Sep 6-10, 2011 (Sapporo).

Ibrahim R, 大屋賢司、黒田誠、関塚剛史、安藤秀二、福士秀人: Rapid Multiplex PCR Assay for simultaneous Detection of *Chlamydophila* causing abortion in ruminants. 第152回日本獣医学会学術集会、H23.9.19-21 (大阪)

Ohya K, Okuda H, Kuroda M, Sekizuka T, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, Fukushi H: Complete genome sequence of *Chlamydophila psittaci* Mat116 strain isolated in Japan. 2011 Chlamydia basic research meeting, Mar. 18-21, 2011 CA

大屋賢司、福士秀人：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、平成 22 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（招待講演）、
H23.2.11（岐阜）

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

表 1 : 鳥類における *C. psittaci* 保有状況

	検査数 (羽)	陽性数 (羽)	陽性率 (%)
2006 年	996	16	1.6
2007 年	328	7	2.1
2008 年	353	2	0.6
2009 年	202	8	4.0
2010 年	152	6	3.9
2011 年	133	14	10.5
合計	2164	53	2.4

表2：鳥種別 *C. psittaci* 保有状況

鳥種	検査数 (羽)	陽性数 (羽)	陽性率 (%)
オカメインコ	282	6	2.1
セキセイインコ	97	1	1.0
コザクラインコ	39	1	2.6
ヨウム	24	1	4.2
コガネメキシコインコ	17	1	5.9
キガシラアオハシインコ	12	1	8.3
ショウジョウインコ	5	2	40.0
テンジクバタン	4	1	25.0
パナマボウシインコ	3	1	33.3
ソデシロインコ	2	1	50.0
ハツハナインコ	2	1	50.0
ギニアエボシドリ	7	1	14.3
アヒル	35	1	2.9
上記以外の鳥種	1421	10	0.7
鳥種不明	71	3	

※赤字:主に国内繁殖・生産されている小型鳥。青字:主に海外から輸入される大型鳥。



*: genetically intermediate between *C. psittaci* and *C. abortus*

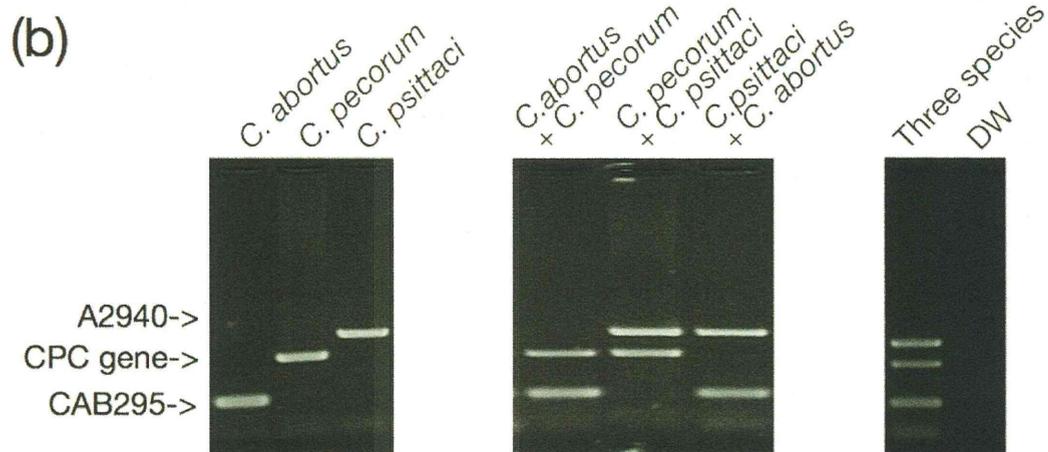


図1：ゲノム解析の結果選抜した各種クラミジア固有遺伝子を標的とした multiplex PCR の樹立。

(a)：抽出した遺伝子のクラミジア各菌種株ゲノムにおける存在。(b)：反芻獣に流産を起こすクラミジアの multiplex PCR。

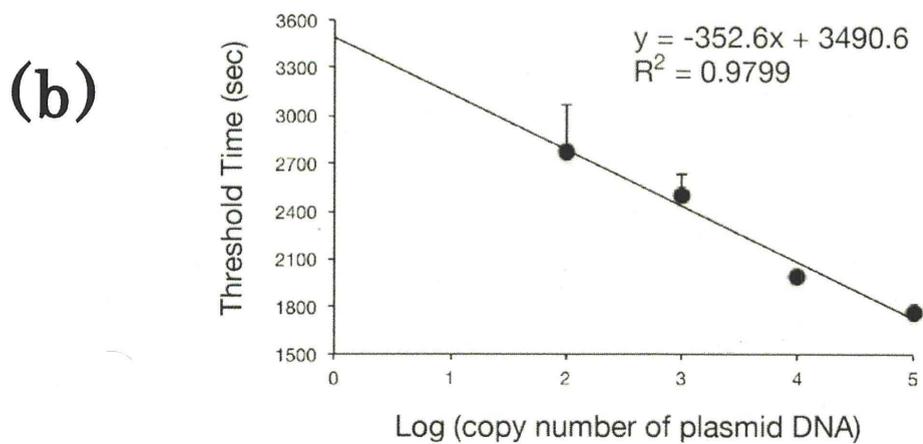
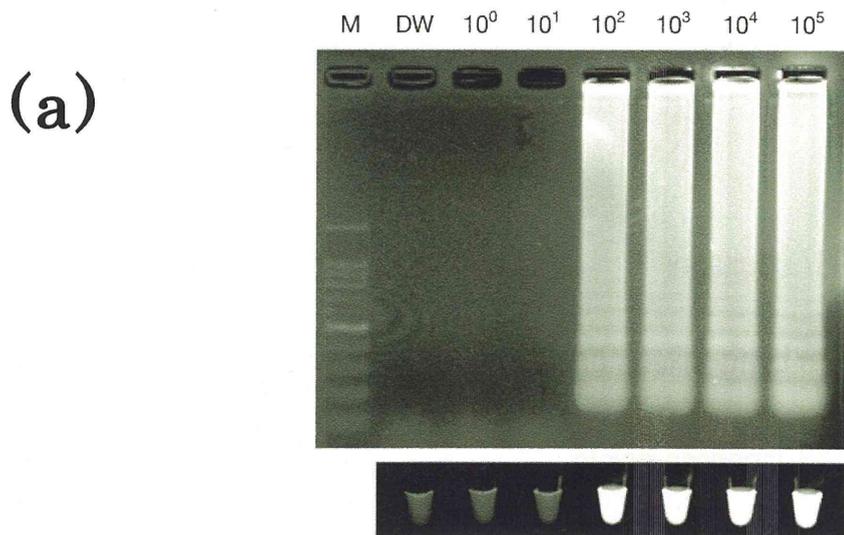


図2：オウム病クラミジア固有遺伝子を標的とした LAMP 法の樹立。
C. psittaci 固有遺伝子 (A2940) を標的とした。(a)：反応産物の電気泳動像。LAMP 産物特有のラダーが観察される。反応は目視観察することも可能である (下段)。レーン上の数字はコピー数を示す。(b)：コピー数と反応時間の相関。 10^2 コピーの場合も 50 分以内に反応が検出できることが分かる。

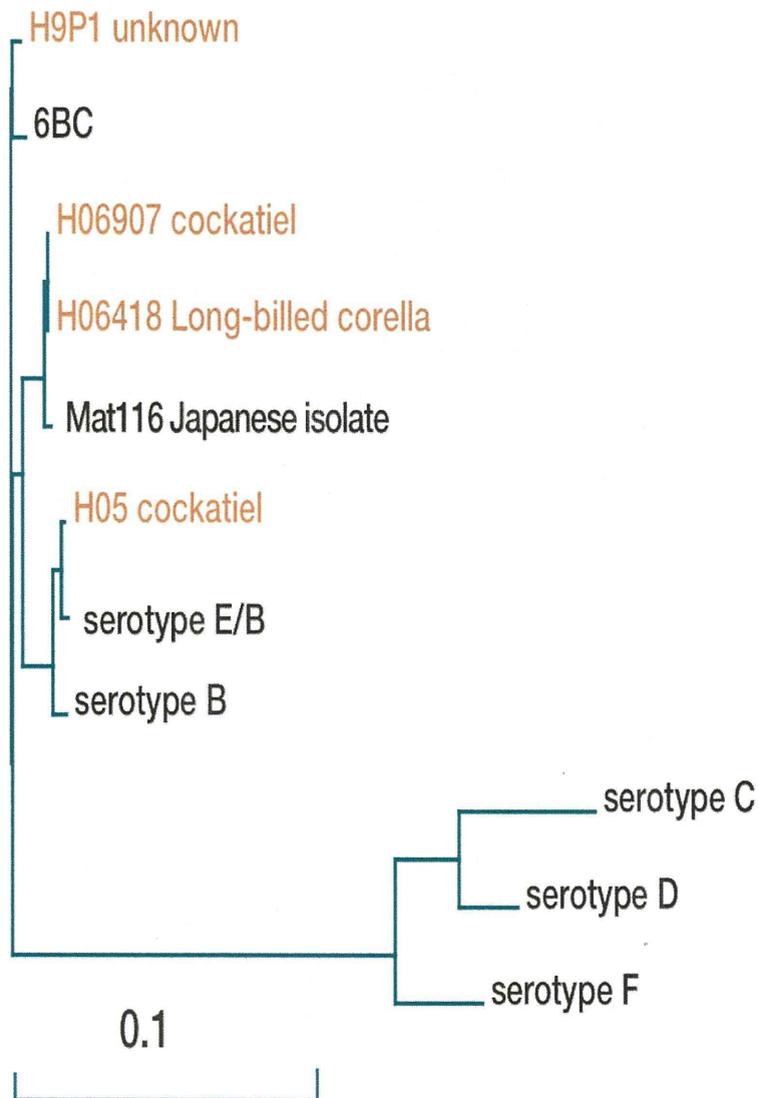


図3：検出されたクラミジアの系統樹

検出されたクラミジアのうち、*ompA* VD2 領域の塩基配列解読できたものを赤字で示した。黒字は、代表的な遺伝子型や株を示す。系統樹は NJ 法で作製した。バーは、遺伝子距離を示す。

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査
—PCを用いたゲノム情報の解析

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究協力者

安藤 秀二	国立感染症研究所	ウイルス第一部	室長
黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析センター	室長
関塚 剛史	同		研究員

研究要旨：*Chlamydophila psittaci*によるオウム病は四類感染症に指定され、国内でも集団発生を含む年間 40 例前後の発生が見られる人獣共通感染症である。クラミジアのゲノムに関しては、性器クラミジア *Chlamydia trachomatis* や肺炎クラミジア *C. pneumoniae* 等において公開されているが、研究開始時点で、人獣共通感染症の起因菌として重要な *C. psittaci* ゲノムに関して公開されているものはなかった。そこで、*C. psittaci* の病原性解析及び種鑑別診断系開発を、比較ゲノム解析の視点から行うために、*C. psittaci* 日本分離株 Mat116 株の全ゲノム配列決定を試みた。これまでに Roche454 GS20、Illumina GAII を用いて Mat116 株ゲノムの完全決定を行った。決定した配列は、レファレンス配列として、鑑別診断法開発や他菌種株配列決定のための貴重な情報となっている。昨年度より *C. psittaci* 近縁他種株のゲノム解読を開始した。対象としたのは、強毒株である *C. psittaci* Borg 株、羊流産クラミジア *C. abortus* との中間型である *C. psittaci* Daruma 株、*C. psittaci* から独立した種となった *C. pecorum* Maeda 株の 3 菌種株である。残念ながら現在ギャップクローズ中であり、研究期間中に完全決定することができなかったが、コアのデータを取り終え興味深い知見も明らかになりつつある。また、詳細なデータは現在解析中であるが、精製 EB、感染細胞内の *C. psittaci* RNA-seq を行った。

A. 研究目的

C. psittaci 感染により生じるオウム病は、年間 40 例程の発生が認められ、感染

症法にて 4 類感染症に指定されている全数把握疾患であり、その臨床上的重要性は明らかであるが、ゲノム配列に関して

公開されているものはなかった。そこで本分担課題では、オウム病クラミジアを始めとした動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明を、比較ゲノム解析の視点から行うために、*C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析を行う。これらから得られる知見から、我が国において発生したオウム病クラミジアの宿主特異性や病態発現機序の実像解明を目的とする。また、得られたゲノム情報を元に、属・種特異的抗原の探索による簡易・迅速診断法の開発のための基礎的情報とすることを目的とする。

B. 研究方法

昨年度までに Illumina Genome Analyser (GA) II を用いて解読した *C. psittaci* 近縁多種株 (3 種) の配列は、完全決定した Mat116 株の配列をレファレンスにアセンブルし、通常の PCR を用いて gap closing を行っている。

RNA-seq に供する RNA の取り扱いは以下の通り行った。総括研究報告書「3. *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析」にて調製した全 RNA の短鎖 RNA を絡む精製にて除去した後、断片化した RNA を鋳型として二本鎖 cDNA を合成、アダプターの連結、PCR による増幅を行い RNA-seq ライブラリーを構築した。この後、大量に存在するであろう宿主由来 rRNA を分解し、相対的に mRNA を濃縮する目的で、二本鎖 DNA 分解酵素 (duplex-specific nuclease: DSN) によ

るノーマライゼーションを行い、次世代シーケンサー HiSeq 2000 (Illumina) に供した。

菌体の調製、PCR、RNA の取り扱いは等は研究代表者である大屋が行い、材料の調達、データ解析には、国立感染症研究所の安藤秀二室長、黒田誠室長、関塚剛史研究員の協力を得て行っている。

(倫理面への配慮)

クラミジアの取扱は、「クラミジア感染症の診断法開発および病態解析」として岐阜大学より組み換え DNA 実験として承認を得ている。個人情報の取扱等、人権の保護に関しては、今年度の実施項目では該当しない。申請者、研究分担者、いずれも岐阜大学大学院医学研究科が主催した「医学研究等倫理講習会」を修了しており、人患者血清の使用等必要が生じた際は岐阜大学の倫理委員会に諮ることのできる体制を整えている。

C. 研究結果

1. *C. psittaci* ゲノムの比較解析

昨年度までに決定した Mat116 株ゲノム情報を用いて、*C. psittaci* 固有の遺伝子を同定し、鑑別診断法開発への基礎的情報とした (詳細は、総括研究報告書を参照)。

C. psittaci ゲノム配列の比較解析を行うために、*C. psittaci* 近縁他種株の配列解析を開始した。対象としたのは表 1 に

示す3菌種株、強毒株としての Borg 株、他種クラミジア (*C. abortus*) との中間型としての Daruma 株、*C. psittaci* より独立した *C. pecorum* Maeda 株である。昨年度、次世代シーケンサーGAII を用いて得られたデータについて、Mat116 株配列をレファレンスに並び直し (図 1)、現在は、ギャップクローズ作業中である。

2. 感染細胞内における *C. psittaci* RNA-seq 解析

C. psittaci 精製菌体、および感染 6 時間後の HeLa 細胞より全 RNA を抽出し、RNA-seq を試みた。特に感染 6 時間後のサンプルでは、宿主由来 RNA が殆どであったため、真核生物 mRNA や rRNA を吸着するマグネチックビーズ、rRNA を分解する DSN 処理等を行い、できる限りクラミジア由来 mRNA を濃縮し解析に供した。得られたリードは精製 EB では 27,554,746、感染 6 時間後のサンプルでは 61,069,109 であった。Mat116 株配列へのマッピング、発現量、新規発現領域の算出は現在進行中である。

D. 考察

1. *C. psittaci* ゲノムの比較解析

これまでに完全決定した Mat116 株配列情報を元に、各種クラミジアの特異性の高い鑑別診断系を樹立することができた (総括研究報告書参照)。

強毒株 (Borg)、中間型 (Daruma)、近縁他種株 (*C. pecorum*) 配列決定につ

いては、Mat116 株配列をレファレンスに、現在ギャップクローズ作業中であるが、現時点でも興味深い知見が得られつつある。例えば、*C. psittaci* と *C. abortus* の中間型とされる *C. psittaci* Daruma においては、総当たり BLAST により抽出した *C. psittaci* 固有の A2940 は存在せず、逆に *C. abortus* 固有の CAB295 遺伝子が存在する (総括研究報告書、図 1 参照)。また、Borg 株においては、Mat116 株には存在しないプラスミドが確認された (図 1)。研究期間内に達成できなかったことは悔やまれるが、コアのデータは取り終えており、これら近縁他種株の完全配列決定により、分類、病原性、宿主域に関する詳細な解析が可能となるであろう。

2. 感染細胞内における *C. psittaci* RNA-seq 解析

今回、新しい試みとして、RNA-seq による、クラミジアの感染細胞内における whole transcriptome を試みた。解析の材料としたのは、本来遺伝子転写が殆ど行われていないとされる基本小体 EB と、感染 6 時間後の細胞より調製した RNA である。感染 6 時間後は、細胞に侵入した EB が分裂型の RB へと転換する時期に相当する。すなわち、EB->RB への転換時に起こるイベントを網羅的に解析するために行った。予想されたことであるが、EB (元々転写量が少ない)、感染 6 時間後 (まだ分裂を開始していないため、宿

主細胞由来 RNA に比べクラミジア RNA の絶対量が少ない) とともに十分なリード数を得ることができなかった。データは現在解析中であるが、現在までに新規遺伝子転写領域は見つかっていない。

RNA-seq に関しては、現在、別プロジェクトにより今後の解析を進めていく予定である。今回の解析で明らかとなった技術上の問題を精査し、EB、感染 6 時間後に加え、十分に RB が 2 分裂増殖した感染 24 時間後のデータを加える予定である。RNA-seq の結果と、昨年度までに行ったアレイの結果をあわせ、感染細胞内におけるクラミジア遺伝子転写の全容を少しでも明らかにしたいと思っている。

E. 結論

今年度得られた成果の概要は以下の通りである。

- ・ *C. psittaci* Mat116 株ゲノム情報を元に鑑別診断法を樹立した。
- ・ 由来や病原性の異なる *C. psittaci* 近縁他種株 3 菌種株の配列を解読中である。
- ・ クラミジアの感染細胞内におけるイベントを解析するために、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を試みた。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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、福士秀人

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 64:804-806, 2011.

Katoh H, Yamada S, Hagino T, Ohya K, Sakai H, Yanai T, Masegi T, Yamaguchi T, Fukushi H
Molecular Genetic and Pathogenic Characterization of Psittacid Herpesvirus Type 1 Isolated from a Captive Galah (*Eolophus roseicapillus*) in Japan.
J. Vet. Med. Sci. 73: 1341-1345, 2011.

Ogawa K, Yamaguchi K, Suzuki M, Tsubota T, Ohya K, Fukushi H
Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in rural Japan.
J. Wildl. Dis. 47:261-271, 2011.

Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H, Fukushi H
Detection of *Chlamydophila psittaci* by Using SYBR Green Real-Time PCR.
J. Vet. Med. Sci. 73:249-254, 2011.

総説

福士秀人: コクシエラ・クラミディア感染

症. 最新医学 66: 2721-2725, 2011.

著書

福士秀人、大屋賢司

リケッチア

p. 128-132. In: 獣医微生物学 (第3版) .文永堂, 2011.

福士秀人、大屋賢司

クラミジア

p. 132-137. In: 獣医微生物学 (第3版) .文永堂, 2011.

2.学会発表

Ohya K, Ibrahim E, Kuroda, M, Sekizuka T, Okuda H, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, Fukushi H: *Chlamydia psittaci* specific genes, which are identified by comparative genomic analysis, can be used for differential diagnosis of chlamydia species. 2011 International Union of Microbiological Societies Congress, 2011 Sep 6-10, 2011 (Sapporo).

Ibrahim R, 大屋賢司, 黒田誠、関塚剛史、安藤秀二、福士秀人: Rapid Multiplex PCR Assay for simultaneous Detection

of *Chlamydia* causing abortion in ruminants. 第152回日本獣医学会学術集会、H23.9.19-21 (大阪)

Ohya K, Okuda H, Kuroda M, Sekizuka T, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, Fukushi H: Complete genome sequence of *Chlamydia psittaci* Mat116 strain isolated in Japan. 2011 Chlamydia basic research meeting, Mar. 18-21, 2011 CA

大屋賢司、福士秀人 : 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、平成22年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (招待講演)、H23.2.11 (岐阜)

3.講演会

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

表 1 : 本課題で配列解析の対象とした *Chlamydophila* spp.

種名	<i>C. psittaci</i>			<i>C. pecorum</i>
株名	Mat116	Borg	Daruma	Maeda
由来	アカハラヒメコ ンゴウインコ	ヒト	ダルマインコ	ウシ
疾患	オウム病	オウム病	オウム病	肺炎
参考文献	Matsui ら、 Epidemiol. Infect., 2007	Olsen ら、Pub. Health Rep., 1944	Fukushi ら、J. Bacteriol., 1989	Fukushi ら、Int. J. Syst. Bacteriol., 1992
備考	鳥展示施設にお ける集団発生事 例時に分離。	ヒトでの死亡 例・二次感染あ り。	DNA fingerprint 解析により <i>C.</i> <i>psittaci</i> と <i>C.</i> <i>abortus</i> の中間型 とされる。	遺伝学・血清学的 解析により、 <i>C.</i> <i>psittaci</i> から独立 した種となった。