

学 位 論 文 題 名

Genetic analysis of two genes from an avian strain of *Chlamydia psittaci*

(オウム病クラミジア鳥類由来株の2つの遺伝子の遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

クラミジア属 (genus *Chlamydia*) は細胞内偏性寄生性の病原微生物であって、現在 *C. psittaci* (*C. p.*), *C. trachomatis* (*C. t.*) と *C. pneumoniae* (*C. pn.*) の3つの種に分類されている。これらのうち *C. p.* は鳥類から罹患するヒトのオウム病の病原体として知られ、これまで感染、増殖、免疫や病原性などに関して多くの報告がなされている。しかし、クラミジアの遺伝学的研究は甚だ乏しく、クラミジアの構造や感染防御と密接に関連する多様な抗原蛋白とそれらをコードする遺伝子の関係には不明な点が多い。本研究ではこれらの問題点を解明する目的で、遺伝子工学的手法によりクラミジアの遺伝子をクローニングして検討を加えた。

本研究は3章より構成されるが、第1章では *C. p.* ドバト由来株のクラミジア蛋白をコードする2つの遺伝子フラグメントをクローニングして、これらの DNA フラグメントと発現蛋白の性状を解析した。第2章では、これらのうち、No.17と命名された DNA フラグメントの塩基配列を決定して、他の生物の DNA と相同性を調べるとともに抗原決定基をコードする DNA 塩基配列の位置を推定した。第3章ではNo.13と命名された DNA フラグメントの塩基配列を決定し、各種生物の DNA との相同性を比較した。成績は以下のごとくである。

1. クラミジアの抗原蛋白をコードする遺伝子を得るためにドバト由来の *C. p.* P-1041株の DNA をプラスミド pUC19を用いてクローニングし、発現蛋白をホモの抗クラミジア血清でスクリーニングしたところ、強陽性反応を示す2つのリコンビナントプラスミドが得られた。これらの DNA フラグメントの長さは約1,300base pair (bp) と1,700bp であり、それぞれをNo.13 およびNo.17と命名した。まず、他のクラミジア株 DNA との相同性を知るためにこれらのフラグメントをプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。*C. p.* の10株と *C. t.* の3株から抽出された DNA はいずれも両プローブと強くハイブリダイスすることが判明した。*C. p.* と *C. t.* の間の DNA 相同性は約10%と報告されていることから、これら2つのフラグメントはクラミジア属に広く保存され、クラミジアにとって基本的かつ重要な機能を担う蛋白を

コードする遺伝子であると推定された。

次に2つの DNA フラグメントによって発現された蛋白をウエスタンブロッティング法で調べたところ、No.13は約25kilodalton(KD)、またNo.17は約42KD の分子量の β -ガラクトシダーゼ融合蛋白を発現することが判明した。さらにこれらの蛋白の抗原性を詳細に解析するために *C. p.* の10株と *C. t.* の2株に対するそれぞれの抗血清を用いて dot-ELISA を行った。その結果、No.13の発現するクラミジア蛋白は、使用されたすべての抗血清と反応し、クラミジア属共通の抗原決定基を持つことが明らかになった。一方、No.17の発現する蛋白は *C. p.* のセキセイインコ由来 Izawa 株に対する抗血清と弱く反応したのみで他のヘテロの抗血清とは全く反応せず、株特異的な抗原決定基を持つと推定された。

2. フラグメントNo.17の塩基配列をダイデオキシ法により解析したところ、このフラグメントは約1,200bp の塩基からなり、この中に不完全な open reading frame (ORF) がコードされていることが判明した。遺伝子データベース検索システムを用いた検索では、この塩基配列がクラミジアの stress-response protein gene (*hyp* gene) と高い相同性を示していた。*hyp* gene はクラミジアの抗原性、特に過敏症に密接に関連した57KD の抗原をコードしていることが最近報告されたが、フラグメントNo.17はこれまでに報告された2つのクラミジア *hyp* gene とそれぞれ、塩基配列で80%以上、またアミノ酸配列では90%以上の相同性を示した。さらに、このフラグメントは大腸菌などの細菌や広く高等植物にも見いだされている chaperonin gene family とも高い相同性を示した。

この株特異的な抗原決定基をコードする DNA 領域を確定するために、制限酵素を用いてフラグメントを細分化し、各々の発現する蛋白の抗原性を検討した。その結果、ORF の5'末端から約800bp を含むフラグメントが抗原性を持つ蛋白を発現し、それより150bp を欠くフラグメントではもはや抗原蛋白を発現できなかった。すなわち、フラグメントNo.17では5'末端から800bp までの塩基配列がクラミジアの株特異的な抗原蛋白を発現するのに必要なコード領域であると判断された。また、この領域を詳しく解析するために、このフラグメントとすでに報告されている他の2種類のクラミジア株の *hyp* gene とのアミノ酸配列を比較した。これら3つの遺伝子間ではアミノ酸配列も非常に良く保存されていたが、アミノ酸残基の集中的に変化している領域も2カ所観察された。これらの可変領域のうちの1つは抗原蛋白を発現しない DNA フラグメントの欠失した部分であったことから、この領域には株特異的な抗原決定基、あるいは抗原蛋白の高次構造を形成するために必要な部分がコードされていると推定された。

3. 次にフラグメントNo.13の発現するクラミジア抗原蛋白をより詳細に解析するために、このフ

ラグメントの塩基配列を決定したところ、ここには2つの不完全な ORF が含まれていることが判明した。これら2つの ORF 間の non-coding region は約130bp であり、終止コドンの下流に予想される termination structure や2番目の ORF に先行して存在すると推定されるプロモーター部位が見られなかった。従って、これらの ORF はオペロンとして機能していると推定された。さらにフラグメントNo.13をそれぞれの ORF が含まれるように制限酵素で切断し、クラミジア蛋白の発現を試みたところ、この発現蛋白は2番目 ORF にコードされていることが判明した。そこでこの抗原蛋白をコードする塩基配列を他の生物の DNA と比較したところ、これに相同性を持つ遺伝子は全く見られなかった。すなわち、この DNA フラグメントNo.13はこれまでに報告されたクラミジア属特異的な抗原物質である MOMP, LPS あるいは57KD *hyp* などをコードする遺伝子とは全く相同性を示さなかった。

以上のごとく、本研究により鳥類由来クラミジア株の2つの遺伝子の塩基配列が解析され、さらにこれらの遺伝子によって発現された抗原蛋白の性状が明らかとなった。その結果、DNA フラグメントNo.17はクラミジアの *hyp* gene の一部であると判断された。しかし、その発現蛋白はこれまで報告されているクラミジアの *hyp* や chaperonin protien とも異なっていて属特異的な抗原性の代わりに株特異的な抗原決定基を含んでいた。また、DNA フラグメントNo.13は、供試した全ての抗クラミジア血清と反応することからこれは属特異的な抗原を担う遺伝子のひとつであると考えられた。これらの成果はクラミジアの研究に遺伝子レベルの情報を提供するばかりでなく、クラミジア属菌の分類やクラミジア感染症の診断などへの応用を可能にするものと思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	橋本信夫
副査	教授	清水悠紀臣
副査	教授	小沼操
副査	助教授	高島郁夫

Chlamydia psittaci (C. p.) は鳥類から罹患するヒトのオウム病の病原体として知られ、これまで感染、増殖、構造や抗原性などに関して多くの報告がなされている。しかし、その遺伝学的研究は甚だ乏しく、クラミジアの構造や感染と密接に関連する多様な抗原蛋白とそれらを

コードする遺伝子の関係には不明な点が多い。本論文はこれらの問題点を解明する目的で、遺伝子工学的にクラミジアの遺伝子をクローニングして遺伝学的検討を加えたものであって、英文63頁からなり参考論文6編を付している。

申請者はクラミジアの抗原蛋白をコードする遺伝子を得るためにドバト由来の *C. p.* P-1041 株の DNA をクローニングし、発現蛋白をホモの抗クラミジア血清でスクリーニングしたところ、強陽性反応を示す2つのリコンビナントプラスミドを得た。これらの DNA の長さは約1,300 base pair (bp) と1,700bp であり、それぞれをNo.13およびNo.17と命名した。この2つの DNA クローンを探るに用い、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、用いた13種類のヘテロのクラミジア DNA 全てが両プローブと強くハイブリダイズした。クラミジア種間の DNA 相同性は約10%と報告されていることから、これら2つの DNA クローンはクラミジア属に広く保存され、クラミジアにとって基本的かつ重要な機能を担う蛋白をコードする遺伝子であると推定された。さらにこれらの蛋白の抗原性を詳細に解析するために11種類のヘテロの抗クラミジア血清を用いて dot-ELISA を行った。その結果、No.13の発現する25kilodalton (KD) のクラミジア蛋白は、使用したすべての抗血清と反応し、クラミジア属共通の抗原決定基を持つことが明らかになった。一方、No.17の発現する42KD の蛋白はホモの抗 P-1041 血清とのみ反応し、株特異的な抗原決定基を持つと推定された。

次に、DNA クローンNo.17の塩基配列をダイデオキシ法により決定し、遺伝子データベース検索システムを用いて検索したところ、この塩基配列はクラミジアの感染による過敏症に密接に関連した57KD の抗原蛋白をコードしている stress-response protein gene (*hyp* gene) と高い相同性を示していた。そこで、制限酵素を用いてこの DNA を切断し、各々の断片の発現する蛋白の抗原性を検討したところ、No.17では5'末端から約800bp までの塩基配列がクラミジアの抗原蛋白を発現した。また、この DNA クローンとすでに公表されている他の2種類のクラミジア株の *hyp* gene のアミノ酸配列を比較したところ、これら3つの遺伝子間にはアミノ酸残基の集中的に変化している領域が2カ所観察された。これらの可変領域のうちの1つは抗原蛋白を発現しない DNA 断片の欠失した部分であったことから、この領域には株特異的な抗原決定基、あるいは抗原蛋白の高次構造を形成するために必要な部分がコードされていると推定された。

さらに、DNA フラグメントNo.13の塩基配列を決定したところ、2つの不完全な open reading frame (ORF) が含まれていることが判明した。この non-coding region には終末構造やプロモーター部位が見られず、これらの ORF はオペロンとして機能しているものと推定された。さらに DNA クローンNo.13を制限酵素で切断し、クラミジア蛋白の発現を試みたところ、抗原

蛋白は2番目の ORF にコードされていることが判明した。そこでこの抗原蛋白をコードする塩基配列を検索したところ、これまでに報告されたクラミジア属特異的な抗原物質である LPS や 57KDhyp などコードする遺伝子、あるいは他の生物のいかなる DNA とも相同性を示さなかった。

以上のごとく、本研究では鳥類由来クラミジア株からクローン化された2つの遺伝子（No.17と No.13）の塩基配列を解析するとともに、これらの遺伝子によって発現された抗原蛋白の性状を検討した。その結果、DNA クローンNo.17はクラミジアの *hyp* gene の一部であると判断された。しかし、その発現蛋白はこれまでの報告と異なり、属特異的な抗原性の代わりに株特異的な抗原決定基を含んでいた。また、DNA クローンNo.13の発現する蛋白は供試したすべての抗クラミジア血清と反応することからこれは属特異的な抗原を担う遺伝子のひとつであると考えられた。これらの成果はクラミジアの研究に遺伝子レベルの情報を提供するばかりでなく、クラミジア属菌の分類やクラミジア感染症の診断などへの応用を可能にするものと思われる。

よって審査員一同は、申請者佐藤千秋氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。