

学位論文題名

Molecular genetic studies on *Ehrlichia ruminantium*
for the development of effective prevention strategies
against heartwater(心水症に対する効果的予防戦略確立に向けた*Ehrlichia ruminantium*の
分子遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

心水症はリケッチアの一種*Ehrlichia ruminantium*によって引き起こされるマダニ媒介性感染症で、アフリカ諸国で甚大な経済的損失をもたらしている。本菌は*in vitro*の継代培養で弱毒化し、生菌ワクチンとして有効であることが報告されているが、その弱毒化機序は不明である。また、野外でのワクチネーション試験では地域によって効果的なワクチン株が異なることやワクチンブレイクが報告されており、免疫原性の異なる野外株の混在が示唆され、流行地における野外株の遺伝子型別が求められている。さらに、開発途上国で実施可能な早期診断法の開発が急務とされている。そこで本研究では、分子遺伝学的手法を活用しこれらの問題を克服することで、アフリカの流行地における心水症の効果的予防戦略の確立に寄与する基礎的知見を得ることを目的とした。

第一章では、ヤギに強毒性を示す野外分離株であるGardel株と、それを親株として*in vitro*で200回以上継代培養を繰り返すことで弱毒化した弱毒Gardel株を材料に、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の解読と比較解析を行った。2株間のゲノム比較により、1箇所869 bpの欠損、5箇所一塩基置換、さらに10箇所一塩基挿入/欠損の合計16箇所のゲノム差異が弱毒化に関連するゲノム変化として検出された。今後、発現遺伝子ならびに翻訳蛋白質の解析により、宿主への病原性を担う遺伝子の特定が可能となり、遺伝子ノックアウト技術を応用することで様々な野外株に対するワクチンの開発につながることを期待される。

第二章では、複数の遺伝子領域の塩基配列に基づく遺伝子型別法であるMulti-locus sequence typing (MLST)法を用いて、アフリカ各地に由来する分離株とウガンダの媒介マダニから検出されたリケッチアの多型解析を行った。供試した22株で、それぞれ8領域の塩基配列が決定され、様々な地域に由来する分離株の遺伝子多型情報が得られた。次に、多型情報を用いて系統学的解析を行った結果、菌株の分離地と遺伝子型との相関は乏しいことが明らかとなっ

た。その要因として、広範囲にわたる家畜や野生動物あるいはベクターの移動等に伴う本菌の大陸内流動が考えられた。また、異なる株間での遺伝子組換えが検出され、本菌が遺伝的多様性を獲得する上で重要なゲノム改編メカニズムの一つであることが示唆された。

第三章では、遺伝子多型を解析する方法としてゲノム上に点在する繰り返し配列を指標とするMultiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)法を新たに開発した。*In silico*解析による探索と分離株間での塩基配列の比較により、遺伝子型別に有用な12個のマーカーを特定した。さらに、型別能力の高い8個のマーカーを対象に、マルチプレックスPCRによる増幅とキャピラリー電気泳動によるフラグメント解析を行うことで、迅速かつ簡便に多型解析を実施することが可能となった。本法をウガンダのリケッチア陽性マダニの解析に応用した結果、既存の型別法である*map1* PCR-restriction fragment length polymorphism法より高い多型識別能力が確認できた。さらに、系統学的解析により流行地における優勢遺伝子型群の特定も可能であり、ワクチン株を選定する上で有用な遺伝子型別法であることが示された。

第四章では、リケッチア遺伝子の特異的に検出する等温遺伝子増幅系であるLoop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を開発した。分離株間で高い保存性を示す*sodB*遺伝子をターゲットとしてLAMPプライマーを設計した。検出限界は一反応当たり5コピーの遺伝子であり、60分以内に陽性判定が可能であることから、高感度で迅速な遺伝子検出法であることが示された。心水症流行地で採集された野外材料（家畜血液・媒介マダニ）を用いた実用性の評価でも、既存のPCR法に比べ高い検出率を得た。従って、本法は設備の乏しい開発途上国でも実施可能な心水症診断法として普及が期待される。

これらの研究成果は、ワクチネーションを基軸とした心水症の効果的予防法の確立に活用できることが期待できる。また、病原性の異なる株間でのゲノム比較により、本菌の病原性を規定する遺伝的背景の解明が進むことが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 千 尋
副 査 教 授 大 橋 和 彦
副 査 教 授 片 倉 賢
副 査 教 授 鈴 木 定 彦

学位論文題名

Molecular genetic studies on *Ehrlichia ruminantium* for the development of effective prevention strategies against heartwater

(心水症に対する効果的予防戦略確立に向けた*Ehrlichia ruminantium*の
分子遺伝学的研究)

心水症はリケッチアの一種 *Ehrlichia ruminantium* によって引き起こされるマダニ媒介性感染症で、アフリカ諸国で甚大な経済的損失をもたらしている。本菌は *in vitro* の継代培養で弱毒化し、生菌ワクチンとして有効であることが報告されているが、その弱毒化機序は不明である。また、野外でのワクチネーション試験では地域によって効果的なワクチン株が異なることやワクチンブレイクが報告されており、免疫原性の異なる野外株の混在が示唆され、流行地における野外株の遺伝子型別が求められている。さらに、開発途上国で実施可能な早期診断法の開発が急務とされている。そこで本研究では、分子遺伝学的手法を活用しこれらの問題を克服することで、アフリカの流行地における心水症の効果的予防戦略の確立に寄与する基礎的知見を得ることを目的とした。

第一章では、ヤギに強毒性を示す野外分離株である Gardel 株と、それを親株として *in vitro* で200回以上継代培養を繰り返すことで弱毒化した弱毒 Gardel 株を材料に、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の解読と比較解析を行った。2株間のゲノム比較により、1箇所869 bp の欠損、5箇所一塩基置換、さらに10箇所一塩基挿入/欠損の合計16箇所のゲノム差異が弱毒化に関連するゲノム変化として検出された。今後、発現遺伝子ならびに翻訳蛋白質の解析により、宿主への病原性を担う遺伝子の特定が可能となり、遺伝子ノックアウト技術を応用することで様々な野外株に対するワクチンの開発につながることを期待される。

第二章では、複数の遺伝子領域の塩基配列に基づく遺伝子型別法である Multi-locus sequence typing法を用いて、アフリカ各地に由来する分離株とウガンダの媒介マダニから検出されたリケッチアの多型解析を行った。供試した22株で、それぞれ8領域の塩基配列が決定され、様々な地域に由来する分離株の遺伝子多型情報が得られた。次に、多型情報を用いて系統学的解析を行った結果、菌株の分離地と遺伝子型との相関は乏しいことが明らかとなった。その要因として、広範囲にわたる家畜や野生動物あるいはベクターの移動等に伴う本菌の大陸内流動が考えられた。また、異なる株間での遺伝子組換えが検出され、本菌が遺伝的多様性を獲得する上で重要なゲノム改編メカニズムの一つであることが示

峻された。

第三章では、遺伝子多型を解析する方法としてゲノム上に点在する繰り返し配列を指標とするMultiple-locus variable-number tandem-repeat analysis法を新たに開発した。*In silico*解析による探索と分離株間での塩基配列の比較により、遺伝子型別に有用な12個のマーカーを特定した。さらに、型別能力の高い8個のマーカーを対象に、マルチプレックスPCRによる増幅とキャピラリー電気泳動によるフラグメント解析を行うことで、迅速かつ簡便に多型解析を実施することが可能となった。本法をウガンダの*E. ruminantium*陽性マダニの解析に応用した結果、既存の型別法である*map1* PCR-Restriction fragment length polymorphism法より高い多型識別能力が確認できた。さらに、系統学的解析により流行地における優勢遺伝子型群の特定も可能であり、ワクチン株を選定する上で有用な遺伝子型別法であることが示された。

第四章では、リケッチア遺伝子の特異的に検出する等温遺伝子増幅系であるLoop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を開発した。分離株間で高い保存性を示す*sodB*遺伝子をターゲットとしてLAMPプライマーを設計した。検出限界は一反応当り5コピーの遺伝子であり、60分以内に陽性判定が可能であることから、高感度で迅速な遺伝子検出法であることが示された。心水症流行地で採集された野外材料(家畜血液・媒介マダニ)を用いた実用性の評価でも、既存のPCR法に比べ高い検出率を得た。従って、本法は設備の乏しい開発途上国でも実施可能な心水症診断法として普及が期待される。

以上の一連の研究は最新のゲノム解析手法を駆使して、*E. ruminantium*の比較ゲノム解析、分子疫学解析を実施し、さらに新規の遺伝子診断技術を開発したものであり、本リケッチア感染症の制圧に寄与するものと考えられる。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者中尾亮君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。