研究紹介

平成18年度学位取得者の論文要旨

*Actinobacillus pleuropneumoniae*の感染防御抗原である外膜リポタンパク質の遺伝的多様性を利用した新しい型別法の開発

伊藤博哉

Development of new typing methods of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the genetic diversity of the protective outer membrane lipoprotein

Hiroya Ito

1. はじめに

豚胸膜肺炎菌*Actinobacillus pleuropneumoniae*は，線維素性出血性肺炎を主徴とする豚の胸膜肺炎の原因菌である。本菌の血清型は，主に莢膜多糖及びリポ多糖の抗原性で規定されていると考えられており，現在までに15の血清型が報告されている。豚の胸膜肺炎は世界各国で多発し，養豚産業に甚大な被害を与えているが，国，地域及び農場によって流行している*A. pleuropneumoniae*の血清型は異なる。日本では血清型2が高頻度に分離され，次いで血清型1が多く，その他の血清型も少数ながら分離されているが，血清型4，10や世界的にも報告例の少ない血清型13～15の分離報告はない。

現在，血清型別の検査には全菌体を免疫して作製したポリクローナルな抗血清が主に使用されている。しかし，全ての型別用の特異抗血清を所有している検査機関は少ない。さらに検査法によっては，いくつかの血清型間で交差反応がしばしば認められ，正確な型別ができない場合がある。その原因は，使用する免疫血清が*A. pleuropneumoniae*に共通する様々な抗原に対する抗体を含有するためと考えられる。そのために，共通抗原の影響を受けない予防対策に有効な新しい型別法の開発が望まれる。従って，ある特定の単一の抗原及びその遺伝子を利用した抗原型別法を開発すれば，共通抗原等の影響を受けずに従来の血清型別法よりも正確な型別が可能であると考えられる。

さらに型別用抗原が発病を制御する抗原であれば，新しく開発した抗原型別法によって，豚の胸膜肺炎の疫学解析とワクチン利用による発病制御を進めていく上で直接有用な知見を得ることができる。そこで，*A. pleuropneumoniae*の防御抗原である特定のタンパク質及びその遺伝子を利用した新しい抗原型別法の開発を目的として，一連の研究を行なった。

2. Outer membrane lipoprotein（OmlA）の遺伝子のクローニング及び解析

*A. pleuropneumoniae*に感染した豚の血清中には防御抗原に対する抗体が存在すると考え，まず本菌の野外株（NG-8株，血清型5a）実験感染豚から得られた抗血清と反応するNG-8株のタンパク質の遺伝子のクローニングを試みた。その結果，クローニングした遺伝子は，その性状解析結果から，分子質量約43,000Daの外膜リポタンパク質（outer membrane lipoprotein）をコードする事が判明し，そのタンパク質をOmlA，また遺伝子を***omlA***と名付けた。

組換えOmlAをマウスに免疫し，防御試験を行った結果，有意な死亡阻止効果が認められたので，OmlAを防御抗原と同定した。OmlA及び***omlA***が本菌の抗原型別法に利用可能な抗原及び遺伝子であるためには，これらが*A. pleuropneumoniae*に広く保存されていることが必要である。そこで，まずNG-8株の***omlA***をプローブに用いて，

穏やかな条件下でSouthern blottingを実施し，NG-8株の*omlA*と相同な配列を持つDNA領域の血清型1 ～ 12の参考株における分布について検討した。その結果，プローブは血清型1 ～ 12の参考株全てと反応し，血清型1 ～ 12の参考株全てが*omlA*を保有すると考えられた。一方，厳しい条件下でSouthern blottingを実施したところ，血清型5a，5b及び10の参考株とのみ反応し，全ての血清型の参考株の*omlA*がNG-8株の*omlA*と高い相同性を持つわけではなく，*omlA*には多様性があることが示唆された。

3．*omlA*及びOmlAの遺伝的多様性

*omlA*の多様性を明らかにするために血清型1 ～ 12の参考株が保有する*omlA*の塩基配列を決定した。即ち，NG-8株（血清型5a）の*omlA*の上流及び下流領域の塩基配列を参考にして，*omlA*の完全長のopen reading frame（ORF）を含むDNA領域を増幅可能なプライマーを設計してPCRを実施し，増幅したDNAの塩基配列の決定及び解析を行った。その結果，血清型1 ～ 12の参考株全てからNG-8株の*omlA*と相同なORFが検出された。*A. pleuropneumoniae*血清型1 ～ 12の参考株の*omlA*の分子系統樹を作成すると，血清型1 ～ 12の参考株及びNG-8株は，4グループに分けられることが判明した。同一グループに属する*omlA*の塩基配列の同一性は，95.4 ～ 100％と高かったが，異なるグループに属する*omlA*の塩基配列の同一性は，63.0 ～ 79.1％であり，OmlAには遺伝的多様性が認められることが明らかとなった。

4．*omlA*の塩基配列の多様性を利用した型別法の開発

上述の成績を基に，OmlAの遺伝的多様性を利用した型別法の開発を試みた。即ち，まず血清型1 ～ 12の参考株の*omlA*の塩基配列を比較し，保存領域を検索した。保存領域の塩基配列を基に，PCR用プライマーを新たに設計してPCRを実施した結果，約970塩基長のDNAが血清型1 ～ 12の参考株全てから増幅された。さらに，PCRで増幅したDNAを切断可能ないくつかの制限酵素で切断し，アガロースゲル電気泳動法で解析した。その結果，制限酵素*Vsp*Iで切断して得られたPCR-restriction fragment length polymorphism（RFLP）によって，血清型1 ～ 12の参考株を，5種類のPCR-RFLP型に型別することができ，後述のWestern blotting法で型別できなかった血清型3及び12の参考株についても型別することができた。また日本及びカナダで分離された血清型1，2，3，5，7及び10の野外株（計42株）の*omlA*のPCR-RFLP型は，それぞれの血清型参考株の型と同一であり，本法は野外株の型別にも利用可能であった。

5．OmlAの抗原性の多様性を利用した型別法の開発

血清型1 ～ 12の参考株におけるOmlA発現の有無を明らかにするため，血清型5aの野外株（NG-8株），血清型1及び7の参考株のOmlAに対する特異抗血清を用いたWestern blottingを実施した。その結果，血清型3及び12の参考株以外の血清型参考株は，OmlAを発現しており，Western blotting法での反応性の違いに基づき，*A. pleuropneumoniae*のOmlAは3つの抗原型に分けられた。このように血清型3及び12の血清型参考株を除き，OmlAの抗原性に基づいた型別が可能であった。また，Western blotting法での結果は，PCR-RFLP法での型別の結果と強い相関関係があった。

6．おわりに

本研究で開発した防御抗原OmlAの抗原性及び遺伝子の多様性に基づく型別法は，従来の血清型別法とは異なり，発病制御に関わる特定の単一タンパク質及びその遺伝子を利用した新しい*A. pleuropneumoniae*の型別法である。豚の胸膜肺炎の予防対策上，防御抗原の型別が使用ワクチンの選定に重要であり，本研究で開発した型別法は本病のワクチン利用による予防対策の実施に直接利用可能な方法であると言える。

なお，論文は英語で執筆されている。