

第29回麻布環境科学研究会 一般演題4

Campylobacter 症の発症に関わる 病原遺伝子候補の比較分子解析

岩本 祥緒, 松村 香菜, 目黒 清可, 平山 純一, 村山真由子,
関塚 剛史, 小野里淳之介, 高久 千秋, 田積 晃浩, 臺あさみ,
遠藤 文乃, 小野田素大, 瀬田こころ, 根来みず乃, 原 靖,
村山 洋, Moore J E¹, Millar B C¹, 松田 基夫

麻布大・環境保健・遺伝子生物学,

¹Belfast City Hosp・N Ireland Public Health Lab, Belfast, UK

1. はじめに

Campylobacter 属菌は1913年に流産したウシから初めて分離され (Moore and Matsuda 2002), わが国では食中毒原因物質別発生で1位を占めており, 人畜共通感染症の重要な一つであると考えられている。*Campylobacter* 属の中でも高温性細菌である *C. jejuni*, *C. coli* 及び *C. lari* が下痢症の起原菌として理解されているが, 食中毒患者から分離されているのは *C. jejuni* と *C. coli* 種がほとんどであり, *C. lari* は主にカモメ等の野鳥及び家畜から分離されている。*C. lari* に関しては, 我々の研究グループの文献上の精査によりヒト臨床事例から分離された株は100数株程度とされている (結果の一部を日本カンピロバクター研究会誌 Vol 2, 2009 上で公表)。一方, *C. lari* の variant あるいは biovar とされている urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) (Matsuda and Moore 2004) は自然環境中から数百株分離されているが, ヒトからの分離はフランスでわずか4例である。現在ヒト *Campylobacter* 症の発症のメカニズムは依然として不明のままであるが, 2000年に *C. jejuni* NCTC11168 の全ゲノム配列の解析が報告され, また2008年に *C. lari* RM2100 株の全ゲノム解析が報告された事で *Campylobacter* 症の病原遺伝子候補の比較解析が可能となった。

我々は, *Campylobacter* 症の発症の分子メカニズム

を解明する上で「UPTC を含む *C. lari* は高温性 *Campylobacter* の有効な比較対照細菌種となり得る」との仮説の下に解析を行っている。今回は我々が想定する *Campylobacter* 症の発症のための病原遺伝子候補のうち, 外毒素 (細胞致死膨張化因子) cytolethal distending toxin (*cdt*), 接着・侵入因子 *Campylobacter* adhesion to Fibronectin (*cadF*), 運動性・走化性因子 *flaA*, クオラムセンシングに関わる AI-2 の産生に関与する因子 *luxS* 及び侵入因子 *Campylobacter* invasion antigen B (*ciaB*) を対象に比較分子解析を行った。

2. 結果及び考察

2.1 (CDT) : CDT はある種の細菌に見られる外毒素で CDTA, B 及び C の3つからなるサブユニットで構成されており, 毒素成分である CDTB (DNase I 様) を運搬役の CDTA と C が標的細胞へ送り込む事で細胞周期を阻害し, 細胞を膨張化し死に至らしめるとされている。*C. lari* では *C. jejuni* と同様に *cdtB* の DNase I 様活性に重要な部位は保存されており, また CDTA, B 及び C 遺伝子がポリシストロニックに転写され, 細胞致死膨張化毒素として機能している可能性が示唆された [Shigematsu *et al.* 2006; Matsuda *et al.* 2008; Nakanishi *et al.*, Hirayama *et al.* (投稿中)]。

2.2 (CadF) : CadF は宿主の細胞外マトリックスである Fn を介して接着を行っている非線毛性付着素

と考えられ、*C. jejuni*の*cadF*欠失変異株では侵入能力が約50%減少するとされている。また宿主のFnへの接着を行うのに、CadFのFn結合ドメイン(FRLS)が重要であると報告されている。我々が解析を行った*C. lari*では、その結合ドメインがFALGであり、*C. jejuni*のそれと50%の配列の類似性であった。更に、*C. coli*のいくつかの株ではこの結合ドメインの近傍の変異領域が*C. jejuni*よりも長いために接着能力が低いと報告されているが、*C. lari*株では*C. jejuni*より9アミノ酸残基分長いことが明らかとなった。これらの結果から*C. lari*株のCadFのFnへの接着能が*C. jejuni*のものよりも低くなることが予想された(Hirayama *et al.* 2009)。

2.3 (FlaA) : 細菌の鞭毛は運動性、走化性そして宿主細胞への付着に関与しているとされる。また*C. jejuni*及び*C. coli*の*flaA*遺伝子では遺伝子内のlarge variable region (外側の骨格形成に関与)がglycosylationされている。我々の研究で、「生体由来のUPTC株」を含む*C. lari*株の*flaA*遺伝子は*C. jejuni*及び*C. coli*と同じく約1.7 kbpであるのに対して、「自然環境由来のUPTC株」は1.45 kbpで短くlarge variable regionが欠損していることが明らかとなっている。更に、日本で分離された環境由来(河川水)のUPTC2株(CF89-12, -14)の*flaA*は偽遺伝子であった。UNC. *lari*及びカモメから分離されたUPTC株のフラジェリンのSDS-PAGEの結果は*C. jejuni*及び*C. coli*と同じ分子量を示す一方で、自然環境由来株では*C. jejuni*、*C. coli*及び「生体由来のUPTC」と比較しても小さいフラジェリタンパク質である事が明らかとなった。「自然環境由来のUPTC4株」(CF89-12/-14, NCTC12893/12894)はSDS-PAGE及び電子顕微鏡を用いた解析により、フラジェリタンパク質及び鞭毛を欠いていることが

明らかとなった(Sekizuka *et al.* 2002, 2004a, 2004b, 2005, 2007; Gondo *et al.* 2006)。それ故に、鞭毛とフラジェリン遺伝子のlarge variable regionの存在の有無がそれぞれの由来と相関する事が明らかとなり、更に宿主への感染に大きく影響を及ぼすであろうことが示唆される。

2.4 (LuxS) : 細菌はautoinducer (AI) 分子を介して細胞間で情報伝達を行い、AI分子は細胞密度依存性遺伝子発現機構(クオラムセンシング)を制御している。そして、*luxS*遺伝子はAI-2分子の産生に関与するタンパク質をコードしている。*C. jejuni*においては、AI-2は病原遺伝子である*cdt*及び*flaA*の発現を調節し、更にバイオフィーム形成にも関与している事が報告されている。我々の解析の結果から、*C. lari*種は*C. jejuni*を含む他の種には強く保存されている*luxS*遺伝子を欠損しており、それ故にAI-2の産生能を欠いている事が明らかとなった[(Tazumi *et al.* (投稿中)]。

2.5 (CiaB) : Ciaタンパク質は*C. jejuni*では宿主への細胞侵入に関与すると報告されており、宿主細胞と共培養を行うと分泌されるタンパク質群(A-H)である。*C. lari*種でも*ciaB*遺伝子は存在し、かつ他のいくつかの病原遺伝子候補のように*C. jejuni*との間で明らかな差異は認められなかった(Onozato *et al.* 2009)。

上述した様な*Campylobacter*の感染過程のそれぞれのプロセスに関わる病原性遺伝子候補を*C. lari*で解析し、*C. jejuni*及び*C. coli*のそれらと比較分子解析するこの様な研究手法は、今後の「*C. lari*生物学」の進展にとって重要であると共に*Campylobacter*症発症の分子機構を解明する上で意義ある手法となるであろう。

(参考文献)

Moore J E and Matsuda M Irish Vet J 2002, 55, 495-
日本カンピロバクター研究会誌 2009, Vol2, 50-
Matsuda M and Moore J E Appl Environ Microbiol 2004, 70 4415-
Shigematsu M *et al.* Br J Biomed Sci 2006 63, 179-
Matsuda M *et al.* Br J Biomed Sci 2008 65, 195-
Nakanishi S *et al.* Br J Biomed Sci (submitted)
Hirayama J *et al.* BMC Microbiol (submitted)
Hirayama J *et al.* BMC Microbiol 2009, 8, 192

Sekizuka T *et al.* Lett Appl Microbiol 2002, 35, 185-
Sekizuka T *et al.* Res Microbiol 2004a, 155, 185-
Sekizuka T *et al.* Br J Biomed Sci 2004b, 61, 186-
Sekizuka T *et al.* Antonie van Leeuwen 2005, 88, 113-
Gondo T *et al.* Folia Microbiol 2006, 51, 183-
Sekizuka T *et al.* J Basic Microbiol 2007, 47, 63-
Tazumi *et al.* BMC Microbiol (submitted)
Onozato J *et al.* J Basic Microbiol 2009, 49, 342-