

第29回麻布環境科学研究会 一般演題5

Campylobacter lari の細胞侵入性病原因子 *flaC* 遺伝子全長の分子解析とその性状

村山真由子, 関塚 剛, 田積 晃浩, 村山 洋,
John E. Moore¹, B. Cherie Millar¹, 松田 基夫

麻布大学院 環境 遺伝子生物学, ¹N. Ireland Public Health Lab Belfast UK

1. はじめに

我々の研究グループはこの間、細菌の運動性や走化性、そして宿主細胞への付着等に重要な役割を果していることが知られている、細菌のべん毛及びその構成タンパク質であるフラジェリンの研究を行ってきた (Sekizuka *et al.* 2002; Sekizuka *et al.* 2004a; Sekizuka *et al.* 2004b; Sekizuka *et al.* 2005; Gondo *et al.* 2006; Sekizuka *et al.* 2007)。

一方、フラジェリンをコードする遺伝子 *flaA* 及び *flaB* の N 末端及び C 末端領域と高い配列の類似性を示すが、べん毛の形成や細菌の運動性に関わらない遺伝子である *flaC* の存在が近年明らかになってきた。その *flaC* は、べん毛装置を通して、細菌の上皮細胞への結合や細胞への侵入に機能している細胞侵入性病原因子であるとされている。しかし、*Campylobacter* 属の *flaC* に関しては *C. jejuni* を対象として一部報告があるだけでほとんど解析がされていない。

そこで本研究では、まず *C. lari* 株 16 株 (n = 4 UN *C. lari*, n = 12 UPTC) を対象に *flaC* 遺伝子全長の配列を決定し *C. jejuni*, *C. coli* 及び *C. upsaliensis* と *C. lari* の *flaC* 遺伝子との比較分子解析を行い、さらに、転写開始点の決定及び転写レベルでの発現の確認を行って、*C. lari* の *flaC* 遺伝子の分子性状について明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

C. lari 株 16 株を対象として、我々が *in silico* にデザインした PCR プライマーを用いて、*flaC* 遺伝子の全長を PCR で増幅し、TA cloning 後シーケンシ

ングを行った。その後、*flaC* 遺伝子の転写レベルでの発現を確認するために、UN *C. lari* 株と UPTC 株を用いて、reverse transcription-PCR analysis (RT-PCR) 及び northern blot hybridization を行い、また転写開始部位を決定するために primer extension を行った。

3. 結果および考察

上述した方法に基づいて *C. lari* の *flaC* 遺伝子を解析した結果、UN *C. lari* 株と UPTC 株の 16 株すべてにおいて、*flaC* が 747 bp から成る open reading frame (ORF) を構成していることが明らかとなった。

また、*flaC* のヌクレオチド配列は *C. lari* 株間で良く保存され、UN *C. lari* RM2100 株 (GenBank Accession number NZ_AAFK01000003) を含む *C. lari* 17 株間 (UN *C. lari* 株と UPTC 株間) では 89.7-100 % の配列の類似性を示した。

さらに、*C. lari* 17 株と *C. jejuni* 株間では 69.3-71.1 % の類似性であった。

次いで、*flaC* の配列情報を基に Neighbor-joining (NJ) 法で phylogenetic な解析を行ったところ、*C. lari* 株は、他の *Campylobacter* とは離れ 1 つのクラスターを形成し、さらに *C. lari* 株内で、UPTC 株と UN *C. lari* 株から成る明らかに識別可能な小さな 2 つのクラスターを形成した。

想定される *flaC* の ORF のヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列の解析を行ったところ、Song らにより報告されている *C. jejuni* TGH9011 株の N-結合型グリコシル化モチーフが UN *C. lari* 株及び UPTC 株で、4 箇所と同様に存在していた。さらに、カモ

メ由来の UPTC 株 A1 及び A2 では、そのモチーフは 5 箇所であり、同一種内でモチーフの数に差異の存在する事が明らかとなった。

また、分泌タンパク質でよく見られるこのモチーフの存在から、*flaC* が *C. lari* 細胞内で、分泌タンパクとして機能していることが予測された。

そして、primer extension により転写開始点を決定し、推定されるプロモーター配列の存在を確認した。さらに、RT-PCR 及び northern blot hybridization により *flaC* の *C. lari* 種における転写レベルでの発現を確認した。以上の結果より、*C. lari* の *flaC* は、モノシ

ストロニックなオペロンであることが示唆された。

(参考文献)

- Sekizuka T *et al.* Lett Appl Microbiol 2002, 35, 185-
Matsuda M, Moore J E. Appl Environ Microbiol 2004; 70:
4415-
Sekizuka T *et al.* Res Microbiol 2004a, 155, 185-
Sekizuka T *et al.* Br J Biomed Sci 2004b, 61, 186-
Song Y C *et al.* Mol Microbiol 2004; 53: 541-53.
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-