

Contagious equine metritis (ウマ伝染性子宮炎)  
起因菌 Taylorella equigenitalis の日本及び世界の  
分離株を用いた分子生物学的研究

麻布大学大学院・環境保健学研究科

環境保健科学専攻・分子生物学

DE0021 加川志津子

**Contagious equine metritis (ウマ伝染性子宮炎)**  
起因菌 **Taylorella equigenitalis** の日本及び世界の  
分離株を用いた分子生物学的研究

麻布大学大学院・環境保健学研究科

環境保健科学専攻・分子生物学

**DE0021** 加川志津子

**Molecular biological studies on the isolates of Taylorella equigenitalis, as an important pathogen for contagious equine metritis (CEM), isolated in Japan and in the world**

**DE0021 Shizuko Kagawa  
Laboratory of Molecular Biology  
The Graduate School of  
Environmental Health Sciences,  
Azabu University**

## 目 次

要旨	
英文要旨	
序文	P. 1
材料及び方法	P. 4
1. 菌株と培養法	P. 4
2. アガロースブロック法による DNA インサートの調製	P. 4
3. 制限酵素によるゲノム DNA の消化反応	P. 5
4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法によるゲノム DNA 消化断片の 分離分画	P. 5
5. <u>T. equigenitalis</u> 株の PCR 法による DNA 分子レベルでの同定	P. 6
6. DNA 分子レベルでの同定のための PCR 法に用いる鋳型 DNA の調製法	P. 6
7. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 解析	P. 7
8. RAPD 産物の電気泳動による解析	P. 7
9. Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)	P. 7
10. 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR)増幅のための プライマー	P. 8
11. 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR 増幅のための PCR 反応	P. 8
12. PCR 反応によるほぼ全長に渡る 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR 増幅 DNA 断片の確認と目的の DNA 断片の抽出	P. 8
13. PCR 産物とベクターのライゲーション	P. 9
14. トランスフォーメーション	P. 9
15. 組換え体の選択	P. 9
16. サイクルシーケンシング、電気泳動及び塩基配列決定	P. 10
17. シーケンスデータの解析	P. 10
結果	P. 10
1. 日本及び世界の <u>T. equigenitalis</u> 分離株より調製されたゲノム DNA の <u>Apa I</u> 及び <u>Not I</u> 消化後の PFGE 法によるジェノタイプング	P. 12
2. <u>T. equigenitalis</u> 株特異的プライマーを用いた PCR による日本及び 世界で分離された <u>T. equigenitalis</u> 分離株の分子同定	P. 15

3. CFGE 法と RAPD 法及び ARDRA 法による <u>T. equigenitalis</u> 株の株間の 分子識別能の比較	P. 15
4. <u>T. equigenitalis</u> の 16S rRNA 遺伝子の PCR による増幅とクローニング、 シーケンシング	P. 16
5. <u>T. equigenitalis</u> の 16S rDNA ほぼ全長に渡る配列情報を基にした 進化系統樹の作成	P. 17
6. <u>T. equigenitalis</u> の 16S-23S rDNA ISR の PCR による増幅と クローニング、シーケンシング	P. 17
考察	P. 19
謝辞	P. 23
参考文献	P. 24

## 要旨

本研究においてはまず最初に、当研究室からの以前の宮澤らの報告 (Miyazawa *et al.*, 1995) の後、即ち 1994 年～1996 年に日本で分離されたウマ伝染性子宮炎起因菌である Taylorella equigenitalis の「新しい日本の分離株」21 株について“ジェノタイプ J”に属するか否かを明らかに関する解析を行った。その結果、これら新しい日本の T. equigenitalis 分離株 21 株のそれぞれの Apa I と Not I で消化後の pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) のプロファイルは、日本の分離株である EQ59 のそれと全く同一であることが明らかとなった。また、これらは NCTC11184<sup>T</sup> 及び Kentucky 188 の CFGE プロファイルとは明らかに異なっていた。それ故に、これら 21 株と EQ59 は同一の“ジェノタイプ J”に属することが明らかである。この様に、“ジェノタイプ J”は 1980 年～1996 年に日本で分離された T. equigenitalis 株の共通した唯一のジェノタイプであることが明らかとなった。

次に世界の、ヨーロッパ 7 ヶ国と、オーストラリアで分離された CEM の原因菌である T. equigenitalis 株 74 株を Apa I と Not I で消化後、PFGE の手法を用いて DNA ジェノタイプ解析を行った。

まず、外国株であるベルギー、イギリス、フィンランド、ノルウェー、フランス、スウェーデン、スイスそしてオーストラリアのウマから採取された T. equigenitalis の分離株 61 株は、PFGE によって 20 のジェノタイプにサブタイピングされることが明らかとなった。即ち、ベルギーのウマから採取された株では、2 つの分離株は 2 つのジェノタイプに、イギリスでは 15 の分離株は 9 つのジェノタイプに、フィンランドでは 2 つの分離株は 2 つのジェノタイプに、ノルウェーでは 8 つの分離株が 1 つのジェノタイプに、フランスでは 10 の分離株が 2 つのジェノタイプに、スウェーデンでは 5 つの分離株が 3 つのジェノタイプに、スイスでは 12 の分離株が 3 つのジェノタイプに、そしてオーストラリアでは 7 つの分離株が 3 つのジェノタイプにそれぞれサブタイピングされた。

2 つのイギリスの分離株 (Eng 6 と Eng 9) と 4 つのフランスの分離株 (Fr-4、Fr-6、Fr-9、Fr-10) はアメリカのプロトタイプ株である Kentucky188 の CFGE プロファイルと同一であると判断された。この様に国を超えて存在する共通のジェノタイプに関しては、ベルギーとイングランドの間の 5 つの分離株 (Bel266-5923、Eng 1、Eng 2、Eng 3、N217-79)、そしてフランスとスイスの間の 10 の分離株 (Fr-1、Fr-2、Fr-3、

Fr-5、Fr-7、Fr-8、Swi-1、Swi-2、Swi-3、Swi-6)でもそれぞれその存在が明らかとなった。

更に今回はじめて、フランス、スウェーデンそしてスイスの3ヶ国の雄ウマより分離された *T. equigenitalis* 株 12 株について PFGE 解析を行ったが、CEM の雌ウマより分離された *T. equigenitalis* 株の場合の同様の解析と同等の有効性を示す結果が得られることが明らかとなった。又、スウェーデン及びスイスで分離された streptomycin (SM) 感受性の 11 株のゲノム DNA について、CFGE を用いた解析を行ったところ、これら 2ヶ国の合計 17 株の 6 つのジェノタイプそれぞれは SM 耐性か SM 感受性のどちらかの単一の表現型を示すことが明らかとなった。

なお、今回の研究で用いられた *T. equigenitalis* 株は、*T. equigenitalis* の 16S rDNA に特異的なプライマー対 (Miserez et al., 1996) を用いた PCR によって DNA レベルで *T. equigenitalis* であることが同定されたものである。

さて、PFGE 法以外でも、いくつかのジェノタイプングの手法が病原細菌の株間の識別を行う上で有効であることが報告されている。そこで次に、今回の解析に用いた PFGE 法が、*T. equigenitalis* の株間を識別する際に、他の異なる 2 つの代表的なジェノタイプング法、即ち random amplified polymorphic DNA (RAPD) と amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) に比べてより大きな識別能力を有するか否かを明らかにすることを初めて試みた。

ゲノム DNA を *Apa* I および *Not* I を用いてそれぞれ消化後、PFGE によって 8 つのジェノタイプにサブタイプされることが今回の研究で明らかとなった *T. equigenitalis* 株の 8 株 (NCTC11184<sup>T</sup>、Kentucky 188、EQ59、Aus 1、Eng 10、Fr-1、Swi-5、N-187) を選んで、次の研究を行った。まず、これら 8 株は、何種類かの異なるプライマーを用いて、RAPD によって、6~7 つのサブタイプに分けられた。一方、PCR で増幅された、1,500 bp 断片を *Alu* I と *Mbo* I を含む 5 種類の制限酵素をそれぞれ用いたの制限消化後の ARDRA では、これら *T. equigenitalis* 8 株のゲノム DNA レベルでの差異を識別することは出来なかった。

この様に *Apa* I と *Not* I そして PFGE を用いた方法は *T. equigenitalis* の株間のサブタイプングの手法としては、RAPD 法よりもすぐれていることが初めて明らかとなった。又、ARDRA 法は *T. equigenitalis* 分離株間のゲノム DNA レベルでの差異を識別する能力を有していないことが示唆された。

次に、T. equigenitalis の rrn オペロンの構造を明らかにし、これらの配列情報が、T. equigenitalis の分子同定、分子識別及び系統分類学に有効であるか否かを明らかにするためにまず 16S rDNA について解析した。

その結果、日本、アメリカ、イギリス、オーストラリアそしてフランスで分離された T. equigenitalis 20 株での、ほぼ全長に渡る 16S rDNA の決定された配列の差異はわずか 8 ヶ所であることが初めて明らかとなった。更に、現在までに他の研究グループによってデータベース上に公開されている 3 例を加えて 23 例の配列においてもその差異は 12 ヶ所 (99.5%以上) であった。この様な事実は T. equigenitalis の 16S rDNA は極めて高い配列の類似性を特徴としていることを強く示唆している。

又、近年の細菌種の分子同定の基準の 1 つである、16S rDNA の配列の 3 %以上の差異という境界値は Taylorella 属の 2 つの種内及び種間では相当せず、最近報告された Campylobacter 種のいくつかに次ぐ 1 つの事例であることが示唆された。更に、これら T. equigenitalis の 16S rDNA の配列は情報を基に T. equigenitalis、T. asinigenitalis を始め、 $\beta$ -proteobacteria に属するこれらの近縁種との間での進化的距離を求め系統樹を作成した。その結果、T. equigenitalis と T. asinigenitalis に最も近縁な細菌種は、Pelistega europaea 及び Brackiella oedipodis であることが明らかとなった。

一方、NCTC11184<sup>T</sup>、Kentucky 188 そして EQ59 株をはじめ 13 株の T. equigenitalis 株の 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) 領域を PCR で増幅し、クローニング、シーケンシングしたところ、いずれの株においても約 920 塩基対の ISR-A と約 830 塩基対の ISR-B の 2 種類の ISR が検出された。ISR 内には、ISR-A、及び ISR-B とともに、いずれの株においても 29 塩基対をはさんで tRNA<sup>Ile</sup> 遺伝子と tRNA<sup>Ala</sup> 遺伝子がこの順番に並んでいることが明らかとなった。更に、ISR-A 及び ISR-B とともに、配列の株間での配列類似性を調べた所、ISR-A では 98.5-99.7%であり、ISR-B では 98.9-99.9%であった。この様な ISR の配列に関する結果は、T. equigenitalis の ISR-A 及び ISR-B の決定された塩基配列情報が T. equigenitalis 株間の分子識別に有効であることを強く示唆している。



## Summary

At present, the molecular biological studies were carried out on the isolates of Taylorella equigenitalis as an important pathogen for contagious equine metritis isolated in Japan and in the world.

The study was first carried out in order to examine whether “the identical Genotype J” could be detected among the newly collected 21 isolates of T. equigenitalis isolated between 1994 and 1996 in Japan, as same as the previous study using more than one hundred isolates isolated from 1980 to 1993 reported from our laboratory (Miyazawa et al., 1995) or not. The respective pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of the 21 new Japanese isolates, as well as those of a Japanese prototype strain of EQ 59 used as a reference strain after separate digestion with the two restriction enzymes, Apa I and Not I, were essentially identical but differed from those of T. equigenitalis NCTC11184<sup>T</sup> and Kentucky 188. Therefore, the 21 isolates and EQ59 appeared to have a common “Genotype J”. Consequently, no isolates of T. equigenitalis with any genotype other than “Genotype J” may have reached Japan from 1980 to 1996 and the isolates with the “Genotype J” have survived in Japan since the first entry of contagious equine metritis into Japan.

In Belgium, two genotypes were detected between two isolates, in England nine genotypes among 15 isolates, in Finland two genotypes between two isolates, in Norway one genotype among eight isolates, in France two genotypes among 10 isolates, in Sweden three genotypes among five isolates, in Switzerland three genotypes among 12 isolates and in Australia three genotypes among seven isolates.

Two English isolates (Eng 6 and 9) and four French isolates (Fr-4, -6, -9 and -10) gave identical PFGE profiles to those of the American strain, Kentucky 188. A common genotype was also demonstrated in five isolates (Bel266-5923, Eng1, Eng2, Eng3 and N217-79) between Belgium and England, as well as a common genotype in 10 isolates (Fr-1, -2, -3, -5, -7, -8, Swi-1, -2, -3 and -6) between France and Switzerland, respectively.

Twelve isolates obtained from male horses in France, Sweden and Switzerland demonstrated the equal availability for PFGE analysis of genomic DNA to that of isolates from female horses. Genomic DNA from eleven streptomycin (SM)-susceptible isolates obtained in Sweden and Switzerland were classified as four genotypes by PFGE. Each of the six

genotypes determined among the 11 isolates from the both countries had a single phenotype of resistance or susceptibility to SM.

The strains used in the present study were identified as T. equigenitalis by polymerase chain reaction (PCR) using a primer pair specific for the 16S rDNA of T. equigenitalis.

The eight strains that were classified into eight genotypes by the PFGE were chosen for the further investigations. The eight strains were classified into six to seven types by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) by using different kinds of arbitrary primers. Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) after separate digestion with five restriction enzymes, including Alu I and Mbo I, of the 1,500 bp fragment of nearly-full length rDNA amplified by PCR did not discriminate the genomic variabilities among the eight strains of T. equigenitalis.

Consequently, PFGE was demonstrated to be more discriminatory than RAPD and ARDRA being proven to be unavailable, subtyping T. equigenitalis in the present study.

Then, cloning, sequencing and characterization of nearly-full length 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) from isolates of T. equigenitalis were carried out in order to clarify the structure of ribosomal RNA(rrn)operon of T. equigenitalis and if these sequence informations could be applicable for molecular identification, molecular discrimination and taxonomic analysis. First, nucleotide sequencing and analysis of nearly-full length 16S rDNA from the three strains of T. equigenitalis, namely a British type strain (NCTC11184<sup>T</sup>), an American prototype strain (Kentucky 188) and a Japanese isolate (EQ59) following PCR amplification were performed. The primer set for 16S rDNA amplified an amplicon of about 1,500 bp in length for the all strains, respectively. Sequence differences of the nearly-full length 16S rDNA among the strains occurred at only a few nucleotide positions (nps) and therefore, an extremely high sequence similarity of the 16S rDNA was demonstrated among these three strains.

Furthermore, the isolates of T. equigenitalis which had been isolated in Japan (n=6), Australia (n=7) and France (n=4) were subject to clone, sequence and characterize the nearly-full length 16S rDNA. The nucleotide sequence differences were demonstrated at the five loci in nearly-full length 16S rDNA among 17 isolates (EQ70~Fr-10) isolated in Japan, Australia and France, Moreover, 12 polymorphic sites occurred among 23 sequences of 16S

rDNA including the three sequences examined above and the three reference sequences (X68645, AF29712, AF29713).

Consequently, in the present study, a highly sequence similarity (99.5% or more) with the nine polymorphic sites of the 12 being from the no 138 to the total 23 sequences of 16S rDNA of T. equigenitalis.

When a phylogenetic analysis was performed based on the sequence informations of the nearly full-length 16S rDNA of T. equigenitalis, as well as the referenced 16S rDNA sequence from some other related organisms, a close phylogenetic relationship between T. equigenitalis and T. asinigenitalis was demonstrated. Moreover, Pelistega europaea isolates newly isolated from infected respiratory tracts of pegions and Brackiella oedipodis that cause endocarditis of cotton-topped tamarin (Saguinus oedipus) were demonstrated to belong the  $\beta$ -subclass as the closest neighbour of T. equigenitalis by the 16S rDNA sequence.

In addition, the primer set for 16S-23S rDNA ISR amplified two amplicons of about 1,300 bp and 1,200 bp in length for each strain. When the two amplicons were cloned, sequenced, and compared, respectively, the ISRs were estimated to be about 920 bp in length for large ISR-A and about 830 bp for small ISR-B, in different sizes. Thus, T. equigenitalis was suggested to carry at least two rrn operons in the genome.

Moreover, only minor sequence differences were demonstrated between the ISR-A and ISR-B from the strains of NCTC11184<sup>T</sup>, Kentucky 188 and EQ59, respectively. A typical order of the intercistronic tRNAs with the 28 nucleotide spacer of 5'-16S rDNA-tRNA<sup>Ile</sup>-tRNA<sup>Ala</sup>-23S rDNA-3' was first demonstrated in the all ISRs.

Furthermore, a similar sequence and characteristic feature of the 16S-23S rDNA ISRs from the 10 isolates of T. equigenitalis isolated in Australia (n=2), England (n=1), France (n=1), Norway (n=1) and Japan (n=5) were obtained as those of the three starains described above.

The present results may possibly suggest that the ISRs could be similarly useful for the discrimination amongst the isolates of T. equigenitalis to the PFGE procedure, if the sequencing is employed.

## 序文

ウマ伝染性子宮炎 (contagious equine metritis ; CEM) は、Taylorella equigenitalis を起因菌として発症するウマの細菌性生殖器感染症の1つである。CEM は膣からの多量の浸出液の排出を主な特徴とし、交配によって、伝播する極めて伝染性の強い生殖器感染症である。CEM は 1977 年に Crowhurst によって、英国で初めて報告 (Crowhurst, 1997) され、その原因となるのは、Haemophilus equigenitalis であると、1978 年に Taylor らによって最初に記述された (Taylor et al., 1978)。それ以来、わずか 3 年の間にこのウマの『性病』は欧州各国 (Carter, 1979; Mumme and Ahlswed, 1979; Powell et al., 1981)、アメリカ合衆国 (Swerczek, 1978)、オーストラリア (Hughes et al., 1978) やブラジル (Brewer, 1983) などの世界の主要なウマ産出国で相次いでその発症が確認された。その後、世界各国で本起因菌の清浄化の取り組みが進んで来たが、1990 年代の後半になってトルコ (Ozgun et al., 2001) で、2002 年になってイギリス (Anonymous, 2002a; Anonymous 2002b; Jackson et al., 2002; Moore et al., 2003) で、それぞれ CEM とその起因菌の発生が確認されている。この様に、CEM は依然として散発的に発生していることは明らかであり、それ故に本疾病はウマの繁殖とその産業上、潜在的な驚異となり続けている。

なお、H. equigenitalis は、1983 年に Sugimoto らによって Taylorella equigenitalis への変更が提案され (Sugimoto et al., 1980)、承認され (Sugimoto et al., 1983) 今日に至っている。

日本では、1980 年のウマ繁殖シーズンに北海道日高地方の軽種馬の間で初めてその発症が確認された (Sugimoto et al., 1980)。それ以後、CEM は繁殖馬の間に常在化し、その結果、日本では競走馬サラブレッドの生産に被害をもたらした。また、本疾病とその原因菌 T. equigenitalis は、多くの国々のサラブレッド以外の血統のウマでも検出されている (Ter Laak et al., 1989)。

本菌の血清学的型別に関する報告はなく、世界各地で分離され、調べられた株の血清学的性状は、均一とされている (Croxtton-Smith et al., 1978; Taylor et al., 1978; Benson et al., 1979; Fernie et al., 1979)。この様に、CEM とその起因菌である T. equigenitalis は、特に競走馬サラブレッドでの発生、伝播が顕著で注目されているが、従来、本菌種の分子生物学的性状に関する報告は少なく、また、本生物種の血清学的あるいは生物学的タイピング等に関する報告はなかった。それ故に、本菌

種の分子生物学的性状の解析と共に適切な手法を用いたタイピング法の確立が、本菌及び CEM の発生と伝播の機構を科学的に解明するためには急務となっていた。

この点に関しては、1990 年の Bleumink-Pluym (Bleumink-Pluym *et al.*, 1990) らの報告と当遺伝子生物学研究室及び分子生物学分野のこれまでの報告 (Matsuda *et al.*, 1994; Miyazawa *et al.*, 1995) で、適当な制限酵素と field inversion gel electrophoresis (FIGE) または、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) を用いたゲノム DNA レベルでの解析が *T. equigenitalis* の株間の識別に有効である可能性が示唆されている。

そこで、筆者は本菌 *T. equigenitalis* のゲノム DNA レベルでのゲノム解析、DNA 分子ジェノタイピング、そしてそれに基づく分子疫学の基礎的解析に関わる研究を行うことを目的として本研究を開始した。本研究においては日本、ヨーロッパの各国、そして、オーストラリアで分離された *T. equigenitalis* 株を用いて得られた PFGE レベルでのゲノム解析とそれらを用いた分子ジェノタイピングの結果についてまず報告する。

なお、CEM とその起因菌である *T. equigenitalis* は 1977 年に英国で初めて報告され、その後、臨床上異常を示さない保菌馬であるサラブレッドの繁殖用雄馬の人為的な世界的輸送による種付けに起因して、わずか数年の間に世界中のサラブレッド馬にまん延したと考えられる。それ故に、1977 年を起点としてその後の 20 数年間の世界を舞台とした CEM と *T. equigenitalis* の発生と伝播の機構の解明は『疫学の基礎的研究』のモデルとなり得るものと筆者は考えた。

*T. equigenitalis* の同定のための手法については、従来の伝統的な細菌学的手法に加えて近年、ゲノム DNA レベルでの迅速で確実な分子生物学的手法がいくつか開発された (Miserez *et al.*, 1996; Anzai *et al.*, 1999; 安斉 *et al.* 2001)。そこで筆者は次に、16S rDNA を標的とした *T. equigenitalis* 特異的プライマーを用いて今回用いたすべての菌株が *T. equigenitalis* であるか否かを分子生物学的に同定することを試みた。

いくつかのジェノタイピングの手法が病原性細菌の株間識別を行う上で有効であることがすでに報告されている (Gomez-Lus *et al.*, 1997; Rafferty *et al.*, 1998; Savor *et al.*, 1998; Van Der Zee *et al.*, 1999)。特に、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)、random amplified polymorphic DNA (RAPD)、そして、amplified rDNA

restriction analysis (ARDRA) などは、病原細菌の株間の分子識別を行う上で大変効果的であると報告されている (Gomez-Lus et al., 1993; Wada et al., 1994; Liebisch and Schwarz, 1996; Chetoui et al., 1997; Rafferty et al., 1998; Savor et al., 1998; Van Der Zee et al., 1999)。しかし、T. equigenitalis については、PFGE 及び FIGE 以外の手法を用いたゲノム DNA レベルでの株間識別に関する報告はなかった。そこで本研究では、次に、今回初めて、上述したいくつかの手法を用いて得られた解析結果を、PFGE 法のそれと比較検討することを試みた。

16S rDNA をはじめとしたリボゾーム RNA (rrn) オペロンの塩基配列情報は細菌種間の識別即ち同定、株間の分子識別と共に系統分類学的研究にも有効である事例が近年報告されている (Weisburg et al., 1991; Bleumink-Pluym et al., 1993; Gurtler and Stanisich et al., 1996; Garcia-Martinez et al., 1999)。そこで、筆者は次に T. equigenitalis の分子生物学的性状を明らかにする目的の 1 つとして T. equigenitalis の rrn オペロンに着目して、その DNA レベルでの構造の解析を行うことを試みた。筆者が本研究を開始するまでには、T. equigenitalis の rrn オペロンに関しては、Bleumink-Pluym (1993) らの NCTC11184<sup>T</sup>、N480/82、N610/88 株の 16S rDNA の塩基配列が決定されており、そして、これら 3 株の配列はすべて同一であるとされていた。また、T. equigenitalis の 16S-23S rDNA ISR の解析に関する報告は全くなかった。そこで、筆者は T. equigenitalis 株の 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR に着目して、これらをクローン化し、そして塩基配列を決定しその構造を明らかにすると共にそれらが、T. equigenitalis の分子同定、分子識別更には系統分類学に有効であるか否かを明らかにすることを目的として研究を行った。

## 材料及び方法

### 1. 菌株と培養法

今回の研究に用いた、世界で分離された *T. equigenitalis* 株は Table 1 に示されている。なお、本菌の基準株は *T. equigenitalis* NCTC11184<sup>T</sup> 株である (Taylor et al., 1978)。Kentucky 188 株はアメリカ合衆国ケンタッキー州で 1978 年の 2 月下旬から 3 月上旬の間に、初めて CEM が発生した際 (Swerczek, 1978a; Swerczek, 1978b) に分離された株のひとつで、現在に至るまでアメリカ合衆国での分離株のプロトタイプとして広く用いられているものである (Bryans and Hendricks, 1979)。Kentucky 188 株は 1978 年 6 月に University of Kentucky の Dr. T. Swerczek から日本の Dr. Koh Kawamata, Equine Health Laboratory, Japan Racing Association, に分与されたものである。また、日本での分離株である EQ59 株は、杉本らによって 1980 年の 5 月に分離され、既に細菌株の脂肪酸組成、生化学的性状および核酸相同性試験などの結果から *T. equigenitalis* に分類された株 (Sugimoto et al., 1980; Sugimoto et al., 1983) のひとつで、本研究ではこの EQ59 株を日本でのプロトタイプとして用いた。なお、今回の研究に用いた「1994 年～1996 年の間に新たに分離された新しい日本の分離株」21 株のすべてを Table 1 に示した。

細菌細胞の培養は、5%の割合に馬脱繊維素血液を加えて作出したユーゴンアガー (11230 BBL, Eugonagar) を用いて微好氣的条件下、チョコレート寒天培地上で、37°Cで3日間行った。

### 2. アガロースブロック法による DNA インサートの調製

アガロースブロック法は細胞をアガロース中に包埋することで、物理的な DNA の断片化を最小限に抑え、無傷 (intact) の状態のままに染色体ゲノム DNA 標品を抽出・精製することができる方法 (Schwartz and Cantor, 1984) である。まず、平板培地上に生育したコロニーから 2 白金耳量分の細菌細胞を集菌し、それを Pett IV (10 mM Tris - HCl, pH 7.5, 1 M NaCl) 溶液 5 ml に懸濁した。それを 4°C、10,000 rpm で 10 分間遠心した後に、上清を捨て、沈査に再び PettIV を加え再懸濁し、この洗浄操作を 3 回行なった。その後、洗浄された沈査に 4 ml の PettIV を加え懸濁した。この懸濁液と低融点アガロース (Incert agarose [FMC] USA; 最終濃度を 1% に調製) を 5 : 8 の割合に分取・混和し、混合液をインサートモールド (ファルマシア社製; 100  $\mu$ l) 中にすばやく分注した。これを -20°C で 5 分間静置した

後に、4°Cで1時間静置して固形化した。次に、ブロック内に包埋された細菌細胞をスエロプラスト化するために、EC lysis (6 mM Tris - HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.2%デオキシコール酸ナトリウム 0.5% ザルコシル NL30)を0.25 ml、lysozyme (100 mg/ml)を2.5 ml、そして RNase (10 mg/ml)を0.5  $\mu$ l取り、それぞれを15 mlのチューブに注入し、ついでインサートモールドから取り出したアガロースブロックを入れ、よく混合した後37°Cで一晩反応させた。反応終了後、チューブ内の溶液を捨てた後に、ESP (0.5 M EDTA, pH 9.0, 1% N-Lauroyl Sarcosine, 1 mg/mlの proteinase K) 溶液を加え、さらに50°Cで二日間反応させることでブロック内の DNA 以外のすべての細胞由来の物質を分解させた。ついで、制限酵素反応の阻害になるチューブ内の proteinase K を不活性化させるために proteinase K の阻害剤である phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)を最終濃度200  $\mu$ g/mlとなる様に加えた TE (10 mM Tris - HCl pH 8.3, 1 mM EDTA) 溶液を1ブロックにつき1 mlを用いて、2時間おきに3回ブロックを洗浄した。次に、PMSFの除去のためにTE溶液のみでさらに2時間おきに3回ブロックを洗浄し、調製を完了したアガロースブロックをTE溶液中で4°Cで保存した。

### 3. 制限酵素によるゲノム DNA の消化反応

今回の PFGE 法のためのゲノム DNA の消化反応に用いた制限酵素 (宝酒造 (株) 滋賀; 東洋紡績 (株) 大阪) とその認識配列は Table 2 に示されている。酵素反応はエッペンドルフチューブ内に、通常は25  $\mu$ lのアガロースブロック (1/4ブロック) と10~15ユニットの制限酵素を含む反応溶液 (100  $\mu$ l) を加えて4時間行なった。なお、反応溶液や反応温度などの条件に関しては酵素の販売元の指示に従って設定した。

### 4. PFGE 法によるゲノム DNA 消化断片の分離分画

従来のアガロースゲル電気泳動では数十 Kbp までの DNA 断片の分離は可能であったが、それ以上のサイズの DNA ではアガロースゲルの網目構造中での分子ふるい効果がなくなり、不可能であった。ところが、複数の電極を用いて交互に電気泳動を行えば、ゲル中の巨大 DNA 断片は、泳動中垂直方向に新たな電場がかかり、自身の負電荷によりその電場の向きを変えようとする。巨大な DNA ほど網目構造中での方向転換に要する時間が長くかかるので相対的に次の移動に使える時間が短くなり、その結果分子量に従って分離することが可能となる。これが新たに開発



された PFGE 法の原理である (Schwartz and Cantor, 1984)。PFGE 法には field-inversion gel electrophoresis (FIGE) 法、rotary gel electrophoresis などいくつかの変法がある (Southern and Elder, 1995)。

本研究では、制限酵素反応後のゲノム DNA の消化断片の分離分画には ATTO 社製の pulsed-field gel 電気泳動 (PFGE) 装置を用いて行った。この装置は円形な回転式ゲルシステムを採用していることを特徴としている。まず、水平なガラストレー上に作成された 1.5% アガロースゲルのウェル内に 1/4 ブロックの DNA 試料を挿入し別のアガロースで空間をシールした。その後、180 V の定電圧に設定し、0.5 × TBE (44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM Boric acid, 1.25 mM EDTA, pH 8.3) の緩衝液を加え温度を 12~13°C に保持して、電気泳動時間を 23 時間、パルスタイムを 20~30 秒の条件下で電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは ethidium bromide (1 μg/ml) 中で染色し、UV トランスイルミネーターで紫外線を照射して観察し、必要に応じて写真撮影を行った。制限消化断片のサイズの算出は、同時に電気泳動された Yeast 染色体 DNA、λ ラダー DNA および λ DNA *Hind*III digest の 3 種類の DNA サイズマーカーの移動度と比較することで算出した。

##### 5. *T. equigenitalis* 株の PCR 法による DNA 分子レベルでの同定

Miserez らによって、16S rDNA を標的とした *T. equigenitalis* の分子生物学的同定のために構築されたプライマー (Miserez *et al.*, 1996) (Fig. 1) を用いて PCR を行い、*T. equigenitalis* 株から抽出されたゲノム DNA を鋳型として *T. equigenitalis* 株の分子同定を行った。PCR 溶液中には、以下の成分が含まれ、滅菌蒸留水 (D. W.) を加え全量を 50 μl とした。即ち、10 mM Tris - HCl、pH 8.3、50 mM KCl、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、400 μM deoxyribonucleoside triphosphate、各々 1 μM のプライマー、1 U の EXTaq DNA polymerase (宝酒造 (株)) である。PCR 反応は、92°C で 2 分間の変性、55°C で 1 分間の会合、72°C で 2 分間の伸長を 25 回繰り返して行い、最後に 72°C で 7 分間の後処理操作を行った。この PCR 産物を 1.5% アガロースゲル中で、室温で 100 V、0.5 × TBE 緩衝液を用い、サブマリン型電気泳動装置 ((株) マリソル、東京) を用いて、電気泳動を行った。

##### 6. DNA 分子レベルでの同定のための PCR 法に用いる鋳型 DNA の調製法

あらかじめ作成されたアガロースブロックに滅菌 D. W. を加えブロックを加熱溶解させた後、すばやく 2.5 倍量の 99.5% のエタノールを加え、-20°C に一晩静置

した。次に、10,000 rpm、4°Cで 20 分間の遠心操作を行い、上清を捨てた後、風乾させ得られた DNA 試料を TE 溶液に溶かし、鋳型 DNA とした。DNA の濃度は 260 nm の吸光度より算出した。

#### 7. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 解析

RAPD 法は 10 mer 前後の短い arbitrary に (任意に) 設計された 1 つのプライマーを用いて、鋳型とするゲノム DNA 上の多くのプライマーに相補的な部位からの PCR 反応を弛緩した条件で開始し、増幅された多くの PCR 産物の電気泳動パターンに基づいて生物種間、株間の識別を行おうとするものである。そこで今回の RAPD 解析には、Table 3 に示されているプライマー1281、プライマー1283、プライマーcj92、プライマーBG2、プライマー ERIC IR-1 そしてプライマーERIC IR-2 の 6 種類を用いた (Table 3)。RAPD のための PCR 反応には、反応溶液 (10 mM Tris-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dNTPs) に 20 pM のプライマー、600 ng の鋳型 DNA、1 U の Taq DNA polymerase を加えた。PCR 反応は、PERKIN ELMER (プネウム (株)、埼玉、日本) 社の GeneAmp PCR System 2400 を用いて行った。まず第 1 段階として、94°Cで 5 分間の変性、36°Cで 5 分間の会合、72°Cで 5 分間の伸長反応を 4 回繰り返して鋳型 DNA 分子を増やす操作を行った。次に、第 2 段階として、94°Cで 1 分間の変性、36°Cで 1 分間会合、72°Cで 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとして、その操作を 30 回繰り返して行い、最後に 72°Cで 10 分間の後処理を行った。

#### 8. RAPD 産物の電気泳動による解析

PCR による RAPD 産物の電気泳動による解析のために、100 V の定電圧下で、0.5 × TBE の緩衝液を用い、2%アガロースゲル中で、サブマリン型電気泳動装置 ((株) マリソル) を用いて、約 2 時間の電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを ethidium bromide (1 μg/ml) で染色後、UV トランスイルミネーター下で紫外線を照射して観察し、写真撮影を行った。

#### 9. Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)

ARDRA 法は、16S rRNA 遺伝子増幅用の 1 対の PCR プライマーを用いて 16S rDNA を増幅後、適当な制限酵素を用いてその 16S rDNA 増幅産物の消化反応を行った後に、電気泳動を行いそのパターンの差異を比較するものである。本法では、あらかじめ 16S rDNA の塩基配列をアライメントし、配列上の差異を適切に識別し

うる制限酵素の選択が必要となる。ARDRA 法を用いた *T. equigenitalis* 株の 16S rDNA の約 1500 bp の断片を増幅するように構築されたプライマー対は、Weisburg (Weisburg et al., 1991) らによって構築されたものである (Fig. 1)。PCR 後に増幅産物を制限酵素 Alu I、Hae III、Hha I、Mbo I そして Taq I を用いてそれぞれ消化反応した。反応は販売元のプロトコールに明記された詳細な条件に従って行った。制限消化された DNA を、7% ポリアクリルアミドゲルを用いて 0.5 × TBE 中で 75 V で 4~5 時間電気泳動した。

#### 10. 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR 増幅のためのプライマー

ほぼ全長に渡る 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR を増幅するために用いられた PCR プライマー及びその塩基配列を Fig. 1 に示した。

#### 11. 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR 増幅のための PCR 反応

PCR 反応液は鋳型 DNA 0.3  $\mu$ g、0.1 mM dNTP mixture、PCR 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、プライマー各 20 pmol、EXTag DNA polymerase 0.5 U (宝酒造 (株)) 及び滅菌 D. W. を加えて全体を 25  $\mu$ l とした。PCR は、94°C で 5 分間の前熱変性処理を行った後に、鋳型 DNA の熱変性を 94°C で 2 分間、プライマー会合を 55°C で 1 分間、プライマー伸長反応を 72°C で 2 分間からなる 3 ステップを 30 サイクル繰り返し、最後に再び伸長反応を 72°C で 10 分間行った。

#### 12. PCR 反応によるほぼ全長に渡る 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR 増幅 DNA 断片の確認と目的の DNA 断片の抽出

PCR 反応終了後、その反応液のうちそれぞれ 2  $\mu$ l を 100 V の定電圧下で 0.5 × TBE 緩衝液を用いて 1.5 % アガロースゲル (agarose L03; 宝酒造 (株)) 中で、ミニサブマリン電気泳動装置 ((株) マリソル) を用いて電気泳動を行った。16S rDNA のためのプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動の際、16S rDNA に相当するバンド以外の非特異的なバンドが検出されなかった。そこで目的とするバンドをゲルからの切り出した後に、QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) で増幅産物を精製した。16S-23S rDNA ISR のためのプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動では 2 本の DNA 断片がいずれの株を用いた場合も検出されたので、用いた残りの PCR 反応産物全体を、泳動用緩衝液として 1 × TAE を用いて電気泳動した。その後、EtBr で染色し、UV トランスイルミネーター下で目的の DNA のバンドを確認

し他の近接した DNA バンドが混入しない様注意深く切り出し、GENECLEAN II KIT (BIO 101, Inc LA Jolla, CA, USA) を用いた精製を行った。

### 13. PCR 産物とベクターのライゲーション

ライゲーション反応は pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (プロメガ (株)、東京、日本) を用いて行った。pGEM-T Vector (50 ng)、インサート DNA (150 ng)、T4 DNA リガーゼ (3 U)、ライゲーション緩衝液 (30 mM Tris-HCl pH 7.8、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、1 mM ATP) 及びミリ Q を加えて 10  $\mu$ l とし、12°C で約 16 時間インキュベートし、ライゲーション反応を行った後に、ミリ Q を 290  $\mu$ l 加えエタノール沈殿し風乾後、沈殿物を TE 溶液 10  $\mu$ l に溶解した。

### 14. トランスフォーメーション

Escherichia coli JM109 コンピテント細胞を氷中で融解させ、それにライゲーション反応後のベクターを加え、氷中で 20 分間インキュベートした後、42°C で 50 秒間インキュベートした。最後に氷中で 2 分間インキュベートし、それを 950  $\mu$ l の SOC 液体培地 (Bacto tryptone 20 g/L、Bacto yeast extract 5 g/L、NaCl 0.5 g/L、20 mM glucose、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MgSO<sub>4</sub>) と混合し 37°C で 30 分間振盪培養した。その後、X-gal [5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (最終濃度 40  $\mu$ l/ml)] と IPTG [isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside (最終濃度 0.1 mM)] そしてアンピシリン (最終濃度 50  $\mu$ l/ml) を含む LB 寒天培地 (ブルー・ホワイトカラー選択培地、X-gal 培地) にそれぞれ、400  $\mu$ l、200  $\mu$ l (2 枚)、100  $\mu$ l (2 枚) を播種し、37°C で 16 時間振盪培養した。

### 15. 組換え体の選択

ブルー・ホワイトカラー選択培地の白いコロニーを滅菌した楊枝の先でつつき、マスタープレート [アンピシリン [最終濃度 50  $\mu$ l/ml] を含む LB 寒天培地 (LA 寒天培地) のシャーレの底に適当な数の区画と番号を書き込んだもの] の番号の区画に触れ、その楊枝を同じ番号をつけたアンピシリン (最終濃度 50  $\mu$ l/ml) を含む LB 液体培地 (LA 液体培地) 3 ml に入れ、37°C で 16 時間、静置培養及び振盪培養を行った。組換えプラスミドの抽出は、アルカリミニプレップ法を用いて行った。即ち、1.5 mM エッペンドルフチューブに培養後の LA 液体培地を 1.5 ml ずつ入れ、15,000 rpm で 4°C で 1 分間の遠心操作を行った。次に上清を捨て、100  $\mu$ l の氷冷した Solution I (50 mM glucose、25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA

pH 8.0)、を加えよく混合し、200  $\mu$ l の Solution II (0.2 N NaOH、1% SDS) を加え、2、3 回転倒混和し、さらに 150  $\mu$ l の氷上で 5 分間の放置した後、15,000 rpm で 4°C、5 分間の遠心操作を行った。その後、上清を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、RNase A (10 mg/ml) を 2  $\mu$ l 加え、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベートされたものをフェノール抽出、エタノール沈殿し風乾後、20  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解した。次に、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、目的の組換えプラスミドを確認した。なお Taq ポリメラーゼを用いた PCR の産物の TA クローニング後の fidelity を考慮して 1 試料につき少なくとも 3 個のクローンをシーケンズをした。

#### 16. サイクルシーケンシング、電気泳動及び塩基配列決定

Texas Red で標識されたシーケンシング用 M13 Forward プライマーと同様の M13 Reverse プライマー及び Thermo sequenase pre-mixed cycle sequencing kit を用い、まず、94°C で 5 分間の前熱変性処理を行った。次いで、熱変性が 94°C で 0.5 分間、アニーリング後反応及び伸長反応が 60°C で 0.5 分間からなる 2 ステップを 25 サイクル繰り返した、反応生成物をエタノール沈殿、及び更に風乾し、2  $\mu$ l の Loading dye に溶解した。最終ゲル溶液組成が 7 M urea、4.5% Long Ranger、1.2  $\times$  TBE のゲル溶液 50 ml を脱気後、10% APS (過硫酸アンモニウム) 250  $\mu$ l と TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) 25  $\mu$ l を加え攪拌後、速やかに電気泳動板に注入し、水平に約 60 分静置して、アクリルアミドを重合させゲル化させた。その後、HITACHI SQ-5500EL 及び SQ-5500L DNA 自動シーケンサーを用い、1 時間の予備泳動後、サイクルシーケンシング後のサンプル 2  $\mu$ l ずつを、それぞれアプライし、20 時間電気泳動を行った。塩基配列の決定には、SQ-5500EL 及び SQ-5500L 用解析ソフトウェア ver. 1.02 を用いた。

#### 17. シーケンズデータの解析

シーケンズデータの解析には、GENETYX-MAC Ver 9.0 (Software Development Co., Ltd. Tokyo) を用いて行った。ついで、*T. equigenitalis* 株の 16S rDNA の塩基配列に基づく *T. equigenitalis* 株と他の近縁種間との進化系統樹の作成を行った。unweighted pair group method with the arithmetic means (UPGMA) 法は系統樹作成法であり、最も近縁の配列の枝長を計算することから始まり、平均化された距離を用いて次の配列クラスターを作り、全ての配列は木に取り込まれるまでこの手順が続

けられ、最後にその系統樹の根の位置が推定される方法である。

まず、今回の研究で配列決定された *T. equigenitalis* 20 株のほぼ全長に渡る 16S rDNA の配列を DDBJ 中の CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) 1.7 program を用いてアライメントした。系統樹は GENETYX-MAC program (ver.9.0)(Soft-ware Development Co., Ltd, Tokyo, Japan)中の UPGMA を用いて作成した。

## 結果

### 1. 日本及び世界の *T. equigenitalis* 分離株より調製されたゲノム DNA の Apa I 及び Not I 消化後の PFGE 法によるジェノタイプング

日本における、CEM の起因菌である *T. equigenitalis* のジェノタイプングに関する研究では、これまでの当大学院分子生物学分野の Miyazawa らの報告で、1980 年～1993 年までの間のウマの繁殖シーズンに北海道で競走馬サラブレッドの CEM のウマから分離された *T. equigenitalis* 分離株 104 株のゲノム DNA は、Apa I、Not I 及び CFGE 法を用いた解析から、すべて同一のジェノタイプ “ Genotype J ” に属することが明らかとなっている (Miyazawa et al., 1995)。そこで筆者は今回初めて、1994 年～1996 年の間に、新たに分離された日本の分離株 21 株について同様な方法を用いて解析した。解析した 21 株中 5 株の結果については、Fig. 2 に示されている。Fig. 2A と 1B から明らかな様に Apa I で消化した場合 (Fig. 2A のレーン 4～8) も、Not I で消化した場合 (Fig. 2B のレーン 4～8) も、それぞれレーン 1 の 1980 年に分離された日本の分離株 EQ59 と全く同一の PFGE のプロファイルを示すことが明らかである。しかし一方これらの PFGE プロファイルはいずれもイギリスの NCTC11184<sup>T</sup> 株 (レーン 2) 及びアメリカの Kentucky188 株 (レーン 3)) のものとは異なっていた。結果は省略するが 21 株中の残りの 16 株についても全く同様の結果が得られた。

以上の今回の 1994 年から 1996 年の間に分離された *T. equigenitalis* の日本株に関する結果、及び Miyazawa らの報告 (Miyazawa et al., 1995) から、1980 年～1996 年の間に日本で競走馬サラブレッドから分離された百数十株の *T. equigenitalis* のゲノム DNA のジェノタイプは同一のジェノタイプ “ Genotype J ” に属すると判断される。

本研究においては次に、ベルギー、イギリス、フィンランド、ノルウェー、フランス、スウェーデン、スイス、そしてオーストラリアで分離された CEM の起因菌 *T. equigenitalis* 株 60 株と、対照株としてイギリスの基準株 NCTC11184<sup>T</sup> 株、アメリカ合衆国のプロトタイプ株 Kentucky 188 株、日本のプロトタイプ株の 1 つ EQ59 株を用いて Apa I と Not I 及び PFGE 法を駆使してゲノム DNA レベルでのジェノタイプングを行った。

ベルギーの *T. equigenitalis* 株 2 株とイギリスの NCTC11184<sup>T</sup> 株、アメリカ合衆

国の Kentucky188 株、そして、日本株の EQ59 株からそれぞれ調製されたゲノム DNA を Apa I と Not I でそれぞれ消化した後の PFGE プロファイルが Fig. 3 に示されている。Apa I を用いた消化では、ベルギーの 2 つの分離株が、約 20 kb から 450 kb の間の大きさをゲノム解析に適した数の断片に切断され、2 つのジェノタイプに分けられることが明らかになった (Fig. 3A)。また、Not I を用いた消化では、これら 2 株のゲノム DNA を約 15 Kb から 550 Kb の間の大きさのゲノム解析に適した断片に切断され、Apa I の場合と同様にこれら 2 つの分離株を 2 つのジェノタイプに識別することが明らかである。(Fig. 3B)。Fig. 3 は又、ベルギー株の Bel266-5923 株 (Fig. 3A、B のレーン 6) とイギリス株の N217-79 株 (Fig. 3A、B のレーン 5) の Apa I と Not I で消化後のプロファイルが全く同一で、これらが同じジェノタイプに属することを示している。

Fig. 4A には、イギリスの T. equigenitalis 分離株 5 株と、対照として用いた NCTC11184<sup>T</sup> 株、Kentucky 188 株そして EQ59 株からそれぞれ調製されたゲノム DNA を Apa I と Not I でそれぞれ消化した後の PFGE プロファイルが示されている。そして、Apa I はこれらイギリスの分離株 5 株を 2 つのジェノタイプに分けることを示している (Fig. 4A)。これら 2 つのジェノタイプに属する分離株は、1 つは、Eng 1、Eng 2、Eng 3、そして N217-79 (Fig 4A のレーン 4-7) であり、もう 1 つは、N480-182 (Fig. 4A のレーン 8) である。Fig. 4B の Not I では、これら 5 株のゲノム DNA を、約 15 kb から 550 kb の大きさのゲノム解析に適した断片に切断し、Apa I の場合と同様にこれら 5 つの分離株を 2 つのジェノタイプに識別することを示している。次いで、Fig. 5 に示されている様に、これら 5 株以外のイギリスの分離株 9 株 (Eng 4-12) についても同様の解析を行ったが、これらは 7 つのジェノタイプに識別されることが明らかとなった。Fig. 5 はまた、Eng 6 と Eng 9 株 (Fig. 5A、B のレーン 3 とレーン 6) の Apa I と Not I による消化後の PFGE プロファイルが Kentucky 188 の Apa I と Not I による消化後のプロファイルと同一であることを示している (Fig. 5)。

Fig. 6 に示されている様に Apa I と Not I は 2 つのフィンランド株のゲノム DNA を 2 つのジェノタイプに型別した。

ノルウェーの分離株は、トロッターからの 7 株とポニーからの 1 株で合計 8 株であるが、これらの Apa I 及び Not I 消化後の PFGE 解析による結果はそれぞれ全く



同一のプロファイルを示すというものであった。(Fig. 7)。それら 8 株のうち 5 株について Fig. 7 に示した (Fig. 7A、B のレーン 4~8)。また、これら 8 株の PFGE プロファイルは NCTC11184<sup>†</sup> 及び Kentucky 188 のプロファイルとは明らかに異なっていたが、日本株のそれとは比較的類似していた。

フランスの分離株 10 株に関しては、Apa I は、これらを 2 つのジェノタイプに分けることができた (Fig. 8)。そのうちの 1 つのジェノタイプは Fr-4、Fr-6、Fr-9 と Fr-10 (Fig. 8A のレーン 7、9、12、13) であり、もう 1 つのジェノタイプは Fr-1、Fr-2、Fr-3、Fr-5、Fr-6、Fr-7 と Fr-8 (Fig. 8A のレーン 4~6、レーン 8、レーン 10、11) であった。Fig. 8A から明らかな様に、この 2 つのジェノタイプのうちの 1 つ、すなわち、Fr-4、Fr-6、Fr-9 そして Fr-10 は、Kentucky 188 と同じ Apa I の PFGE プロファイルを示した。Fig. 8B は、Apa I の場合と同様に、Not I もこれらフランスの分離株 10 株を 2 つのジェノタイプに分けることを示している。

同様の方法を用いた、スウェーデンの 5 株の分離株の、Apa I 及び Not I 消化後の PFGE プロファイルは、Fig. 9 に示されている様に、3 つのジェノタイプに分けられることが明らかである (Fig. 9)。

更に、スイスの分離株 12 株は 3 つのジェノタイプから構成されていることが明らかとなった (Fig. 10)。なおこのスイスの分離株 12 株のうち 8 株が Streptomycin (STM) 感受性で残りの 4 株が抵抗性であったが、これら 3 つのジェノタイプのおのおの STM に対する抵抗性、感受性に対してそれぞれ単一の表現型を示した。

Fig. 11A に示されている様に、Apa I はオーストラリアの分離株 7 株を 3 つの異なるジェノタイプに識別した。それら 3 つのジェノタイプは、Aus 1 (Fig. 11A のレーン 4)、Aus 2 と Aus 3 (同じくレーン 5 と 6) および、Aus 4、Aus 5、Aus 6、Aus 7 (同じくレーン、7、8、9、10) であった。Not I も Apa I の場合と同様にこれらオーストラリアの分離株 7 株を 3 つのジェノタイプに識別した。(Fig. 11B)。更に、Fig. 11 は、オーストラリアの 3 つのジェノタイプのうち 1 つ (Aus 4、5、6、7) は Kentucky 188 のジェノタイプと同一であることを示している。

これら Fig. 2 から Fig. 11 に示されている CFGE 法を用いた T. equigenitalis のジェノタイピングの結果を Fig. 12 にまとめた。更に、今回の本研究で得られた T. equigenitalis のジェノタイピングの結果にこれまで当研究室で報告されて

きたジェノタイピングの結果を加えると世界の T. equigenitalis 株 200 株以上が PFGE 法によって合計 26 のジェノタイプにサブタイプされることとなるが、それらについて Fig. 13 にまとめた。

以上の様に、本研究においては、まず、Apa I と Not I そして CFGE 法を用いて日本及び世界で分離された T. equigenitalis 株の株間識別に関する解析を行った。

## 2. T. equigenitalis 株特異的プライマーを用いた PCR による日本及び世界で分離された T. equigenitalis 分離株の分子同定

次に T. equigenitalis の 16S rRNA 遺伝子を増幅するために構築された特異的プライマー (Miserez et al., 1996) を用いた PCR によって、今回の解析を行った T. equigenitalis 株が分子生物学的に全て T. equigenitalis に分類されるのかどうかの確認を行った。その結果、すべての株で、T. equigenitalis に特異的な約 410 塩基対の DNA 断片が増幅され、研究に用いた株すべてが分子生物学的に、T. equigenitalis であることが同定された。Fig. 14 にはそれらのうち、以下の解析に用いる 8 株の PCR プロファイルを示した。

## 3. CFGE 法と RAPD 法及び ARDRA 法による T. equigenitalis 株の株間の分子識別能の比較

さて、今回用いた PFGE 法の他にも、従来 RAPD 法あるいは ARDRA 法などが病原細菌のゲノム DNA レベルでの株間の分子識別に有効であると報告されている (Gomez-Lus et al., 1997; Rafferty et al., 1998; Savor et al., 1998; Van Der Zee et al., 1999)。そこで、これらの手法と CFGE 法のどちらの手法が、T. equigenitalis のより高い株間識別能を有しているかを明らかにするために、以下の解析を行った。

なお、これら 8 株は従来の我々の Apa I と Not I そして CFGE を用いた解析で、お互いにそれぞれ異なるジェノタイプに属することが既に明らかとなっている株の中から、任意に選んだもので、それらは、Fig. 12 に示した通りである。Fig. 15 に示されているように、7 つの国で分離されたこれら T. equigenitalis 株 8 株のゲノム DNA の Apa I 及び Not I を用いた制限消化後の PFGE プロファイルは、識別可能な 8 つの異なるプロファイルから成ることを示している (Fig. 15)。

次に 6 種類の異なるプライマーを用いて、これから T. equigenitalis 株 8 株からそれぞれ調製されたゲノム DNA を鋳型として、RAPD 法を行い、その後アガロー

スゲル電気泳動法で解析した。Fig. 16 に、それらのうちの3種類のプライマーを用いた結果について示した。Fig. 16 のA~Cから明らかな様に、RAPD法によって、これら8株は6つから7つのジェノタイプに識別可能である。なお、データは示さないが他の3種類のプライマーを用いたRAPD法で得られた結果はFig. 16A~Cに示されている株間識別能よりも低いものであった。

Fig. 17には、ARDRA法を用いた解析結果が示されている。すなわち、8株から調製されたゲノムDNAを鋳型として、FD1とrD1 (Weisburg *et al.*, 1991;)をプライマーとして用いたPCR法によって、*T. equigenitalis* 株のrDNAの約1,500bpの領域を増幅し、ついで、制限酵素 Alu I、Hae III、Hha I、Mbo Iそして Taq I (Table 2)を用いた消化反応の後、7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果、どの酵素を用いた場合にも8株間でそれぞれ全く同一の電気泳動プロファイルが得られた。Fig. 17には、それらのうち Alu I (Fig. 17A) と Mbo I (Fig. 17B)の結果が示されている。

以上の結果は、これら8株はPFGE法では Apa I と Not Iを用いた場合に、8つのジェノタイプに識別可能であるが、RAPD法は、PFGE法よりもやや株間識別能が低く、ARDRA法では、これら8株間の識別ができないことを示している。即ち、これら3つのゲノムDNAレベルでの株間識別の手法の中では、Apa I と Not I及びPFGE法を用いた方法がもっともすぐれた *T. equigenitalis* の株間識別能を有する手法であることを示している。

#### 4. *T. equigenitalis* の16S rRNA遺伝子のPCRによる増幅とクローニング、シーケンシング

*T. equigenitalis* のゲノムDNAを鋳型として、16S rDNA増幅用のプライマーFD1とrTelを用いたPCRで、約1,500塩基対の1つのDNA断片がまず、NCTC11184<sup>T</sup>、Kentucky188及びEQ59のいずれの株においても増幅された (Fig 18)。

更に、TAクローニングとシーケンシングの結果、約1,500塩基対の領域で配列決定されそして解析された結果、研究に用いた3株 (イギリス株 NCTC11184<sup>T</sup>、アメリカ株 Kentucky188、日本株 EQ59) の間での配列の差異は多くて2ヵ所、即ち増幅断片のヌクレオチドポジション (np) 369と494であることが明らかとなった (Fig 19)。また、この領域で rrn オペロンに共通した配列情報がいくつか認められた。まず、増幅断片の np 240-243 に抗生物質コリシン E3 により切断される配列 AAGG

が、np 391-393 にカスガマイシンにより切断される配列 GAA が検出された。上述した *T. equigenitalis* の 3 株のほぼ全長に渡る 16S rDNA の塩基配列決定された結果は、これら 3 株の間での約 1500 塩基対での塩基配列の差異は 2 ヶ所であることを示した。そこで、この様に認められた 3 株間での 16S rDNA の配列の高い相同性が *T. equigenitalis* の 16S rDNA の一般的な特徴であるのか否かを明らかにするために、更に、日本、オーストラリア、フランスの 3 ヶ国で分離された *T. equigenitalis* 株 17 株を対象として同様に PCR 増幅後クローニングとシーケンシングを行った。その配列決定後にマルチアライメントされた結果を Fig. 20 に示した。Fig. 20 は、これら 17 株のほぼ全長に渡る 16S rDNA 塩基配列の差異は 6 ヶ所であることを示している。この様に今回 *T. equigenitalis* 20 株での 16S rDNA は大変高い配列の類似性を特徴としていることが初めて明らかとなった。

#### 5. *T. equigenitalis* の 16S rDNA ほぼ全長に渡る配列情報を基にした進化系統樹の作成

UPGMA 法を用いて *T. equigenitalis*、及び *Taylorella* 属第 2 番目の種である *T. asinigenitalis* を始め  $\beta$ -Proteobacteria に属する近縁種の 16S rDNA の配列情報を基に作成された進化系統樹を Fig. 21 に示した。Fig. 21 は明らかに、*T. equigenitalis* は *T. asinigenitalis* と同じクラスターを形成し、これらに最も近縁な細菌種はベルギーとドイツで呼吸症のハトから分離された *Pelistega europaea* (Vandamme et al., 1998) 及びドイツで cotton-topped tamarin の心臓から近年分離された *Pelistega europaea* (Vandamme et al., 1998) *Brackiell oedipodis* (Willems et al., 2002) であることを示している。

#### 6. *T. equigenitalis* の 16S-23S rDNA ISR の PCR による増幅とクローニング、シーケンシング

16S-23S rDNA ISR の PCR においては、PCR 反応後のアガロースゲル電気泳動像で *T. equigenitalis* NCTC11184<sup>T</sup>、Kentucky188 そして EQ59 の 3 株とも約 1200 (小) と 1300 (大) 塩基対に相当する 2 つの DNA 断片が検出された。この場合も TA クローニングの後に塩基配列の決定を行った。そして、約 1300 bp の増幅断片を ISR-A、約 1200 bp の断片を ISR-B とした。解析後にこれら 3 株の 16S-23S rDNA の配列をマルチアライメントした結果を Fig. 22 に示した。Fig. 22 では、6 つの ISR の増幅産物の塩基配列の 5' 末端側数百塩基配列部分が Fig. 20 の同一の 16S rDNA の配列

部分と重複するので削除した。Fig. 22 から明らかな様に 16S rDNA の 3' 末端近傍に特有に存在し、mRNA 上のリボソーム結合部位である Shine-Dalgarno 配列に相補的な CCUCCU 配列が検出された。それ故に、Fig. 22 の ISR のヌクレオチドポジション 67 かその数塩基下流 (CCTCCT 配列の下流にある TTAAGAG 配列の 5' 末端が np 67) が T. equigenitalis の ISR の 5' 末端であると予想される。一方、ISR の 3' 末端部位を推定するために、いくつかの細菌の 23S rDNA の 5' 末端の配列を Fig. 23 にマルチアライメントした。Fig. 23 に示されている配列から、Fig. 22 の NISR-A の np 990 が T. equigenitalis の 23S rRNA 遺伝子の可能な 5' 末端であると推定される。以上の様な結果から、ISR-A の長さは、約 920 塩基対で、ISR-B の長さは約 830 塩基対であると計算された。

更に、これら ISR-A 及び ISR-B には、いずれも 29 塩基対を挟んで tRNA<sup>Ile</sup> 遺伝子と tRNA<sup>Ala</sup> 遺伝子が、この順番に並んでいることが初めて明らかとなった (Fig. 22)。これは従来いくつかの多くのグラム陰性菌の ISR 中に見出されている tRNA の並びと一致していた。ここで得られた tRNA<sup>Ile</sup> と tRNA<sup>Ala</sup> の予測される 2 次構造を Fig. 24 に示した。

次に、オーストラリア、イングランド、フランス、ノルウェー、スイスそして日本で分離された T. equigenitalis 株 10 株の ISR についても同様に PCR 増幅後、クローニング、シーケンシングを行い、その配列決定を行った。そして、解析後マルチアライメントした結果を Fig. 25 に示した。これら 10 株の T. equigenitalis についてもその ISR の数、長さ、そして、ISR 内の 2 つの tRNA 遺伝子についての結果は上述した NCTC11184<sup>†</sup>、Kentucky188 そして EQ59 の 3 株のそれらと同様であった。更に上述した 3 株を含むこれら T. equigenitalis 株 13 株の ISR 配列についてその類似性を調べた所、ISR-A では、98.5-99.7% そして ISR-B では、98.9-99.9% であった。この様な ISR の配列に関する結果は、T. equigenitalis の ISR-A 及び ISR-B の塩基配列情報が T. equigenitalis 株間の識別に有効であることを示唆している。

## 考察

オランダの Bleumink-Pluym 女史らは先に、ヨーロッパ、特にオランダで分離された *T. equigenitalis* 株 20 株を始めとした 32 株のゲノム DNA を、制限酵素を Apa I と FIGE 法を用いて解析し、それらが 5 つのグループに分けられると報告した (Bleumink-Pluym et al., 1990)。今回の筆者の研究では、彼女らの論文の共著者である Van Der Zeijst 博士から、研究で用いられた 32 株の *T. equigenitalis* 株のうち彼らが同じ FIGE のグループに属するとした。N217/79 株と N480-82 株の分与を受け NCTC11184<sup>T</sup> 株を含めて解析の追試を試みた。

その結果、彼らが同一のグループに属するとしたこれら 3 株は、制限酵素 Apa I と Not I そして PFGE 法を用いた解析では、全く異なる PFGE パターンを示した。以上の様な追試の結果は、これら 3 株はそれぞれ異なるジェノタイプに属することを明らかに示している。このことは、彼らの研究で用いられた FIGE による解析よりも、今回の本研究で用いた PFGE 解析の方がより詳細で正確なそしてジェノタイプには有用なデータを得ることができることを強く示唆している。

本研究においては、雄ウマから分離された *T. equigenitalis* のフランス株 3 株、スウェーデン株 4 株、スイス株 5 株及び日本株 3 株のゲノム DNA の解析を行い、従来の雌ウマから分離された株からのゲノム DNA レベルでの解析と同様に PFGE 法が雄ウマから分離された株間の解析にも有効であることが示された。筆者の知る限りでは、雄ウマから分離された *T. equigenitalis* のヨーロッパ株の PFGE 法による解析は初めてである。

Taylor らによって、*T. equigenitalis* は lincomycin、clindamycin、sulphamethoxazole そして trimethoprim に対して、ある程度耐性であることが報告された (Taylor et al., 1977)。一方、従来 *T. equigenitalis* は SM に対して高度に耐性であるとされてきた。また、杉本らは NCTC11184<sup>T</sup> と Kentucky 188 と同様に日本株 10 株が SM に高い耐性を示すことを報告している (Sugimoto et al., 1983)。更に、世界で分離された *T. equigenitalis* 株の多くは、SM に対して、耐性であるとされてきた (Bleumink-Pluym et al., 1990)。今回の研究で、スイスで分離された 12 株の *T. equigenitalis* 株のうち 8 株の STM 感受性株からのゲノム DNA を初めて解析した。その結果、これら 12 株の 3 つのジェノタイプのおのおのは SM に対する抵抗性、感受性に対してそれぞれ、単一の表現形質を示すことが明らかとなった。

杉本らは 1980 年の 5 月に、日本で初めて北海道での CEM の発生を報告した (Sugimoto *et al.*, 1980) がこれらの罹患馬から分離された *T. equigenitalis* 株のうちの 1 つが EQ59 である。筆者の所属する当研究室のこれまでの報告 (Miyazawa *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2000) では、1980 年～1993 年までの間に、そのほとんどが北海道の日高地方であるが、日本の様々な地域の競走馬サラブレッドから分離された EQ59 株を含む百株以上の分離株が、制限酵素 *Apa* I と *Not* I を用いた制限酵素消化後の CFGE 法を用いたジェノタイピングプロファイルに関して、1 つの共通したジェノタイプ “Genotype J” に属することが明らかとなっている。更に、今回筆者の解析した 1994 年～1996 年の日本の分離株 21 株についても同様に “Genotype J” が検出された。このことは、これら日本で分離された約 130 株は、1 つの共通した感染源に由来していることを強く示唆している。今回の研究で Kentucky 188 ジェノタイプがイングランド、フランスそして、オーストラリアで 10 株発見された。これまでの報告 (Matsuda *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2000) と今回の筆者の結果を合わせると、Kentucky 188 ジェノタイプに属する *T. equigenitalis* 株は現時点では、世界 5 ヶ国中で 28 株検出されたこととなる。この結果は、これら 28 株は、1 つの共通した感染源に由来していることを強く示唆している。

本研究においては、ヨーロッパ 7 ヶ国及びオーストラリアそして日本で分離された *T. equigenitalis* 分離株約 80 株のゲノム DNA を制限酵素 *Apa* I 及び *Not* I で消化後 PFGE 解析によって得られたプロファイルから、これらの株は 17 のジェノタイプに識別されることが明らかとなった。本研究室においては既に、アイルランドとアメリカ合衆国からの *T. equigenitalis* 株 17 株が 7 つの異なるジェノタイプに識別されることを報告している。(Matsuda *et al.*, 1998) これらを合わせると、現在までに、日本を含む世界各国で分離された *T. equigenitalis* 200 株以上から、26 ジェノタイプが検出されたこととなる。

以上の結果は、『CEM の起因菌である *T. equigenitalis* のヘテロロジーニアスなジェノタイプ』の世界における存在を強く示唆している。また、今回の研究では、*T. equigenitalis* の株間識別のために用いた *Apa* I 及び *Not* I によって制限消化されないゲノム DNA をもつ株は一株も存在しなかった。

次いで、今回の T. equigenitalis のゲノム DNA レベルでの解析で、株間識別の手法としてどの手法の識別能が最も高いのかを明らかにするための比較検討を行った。その結果、CFGE 法、RAPD 法、ARDRA 法を用いた解析では、後者 2 つの方法よりも PFGE 法の株間識別能が高いことが明らかとなった。Akopyanz らは Helicobacter pylori のそれぞれ独立した 60 の分離株の各々はプライマー-1281 を用いた場合、各々ユニークな RAPD フィンガープリントを生じることを報告 (Akopyanz et al., 1992; Gomez et al., 1993; Wada et al., 1994; Liebis and Schwarz, 1996; Chetoui et al., 1997; Old et al., 1999) しており、また、他のいくつかの研究グループは、今回筆者が用いたプライマー-ERIC IR-1、プライマー-ERIC IR-2 が病原細菌間の分離株の株間識別に有用であることを報告している (Gomez-Lus et al., 1997; Rafferty et al., 1998; Savor et al., 1998; Van Der Zee et al., 1999)。しかし、これらの報告とは異なり、これらの primer は T. equigenitalis の株間識別には有効ではないことが今回明らかとなった。

今回用いたいくつかの primer による RAPD 法では、CFGE 法で 8 つに識別された 8 株に関して、6-7 つに識別出来ることが明らかになったので RAPD 法は適当な primer を用いれば、T. equigenitalis の場合、CFGE 法に次いでその株間識別の手法としては有効であることは明らかである。

しかし、ARDRA 法では T. equigenitalis 8 株の株間識別は出来なかった。これは T. equigenitalis の 16S rDNA レベルの塩基配列の株間における保存性の高さを示唆しているのかもしれない。

今回の日本、アメリカ、イギリス、オーストラリア、そして、フランスで分離された T. equigenitalis 株 20 株での、ほぼ全長に渡る 16S rDNA の決定された配列の差異はわずか 8 ヶ所であった。更に、現在までに、他の研究グループから DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている 3 例 (X68645、AF297712、AF297713) を加えた 23 例の 16S rDNA は配列においてもその配列の差異は 12 ヶ所である。これは、T. equigenitalis の 16S rDNA の高い配列の類似性 (99.5%以上) を示している。又、この 12 ヶ所の 16S rDNA の多型部位のうち 9 ヶ所が T. equigenitalis の 16S rDNA のヌクレオチドポジション 138-501 に集中していることは興味あることである (Table 4)。最近、Jang らは、1997 年と 1998 年にアメリカでオスのロバから新たに分離された Taylorella 属の第 2 の種 T. asinigenitalis (Katz et al., 2000) と



T. equigenitalis の 16S rDNA との配列の類似性は 97.6% であるとした (Jang et al., 2001)。近年の細菌種の分子同定の基準の 1 つについて言及すれば、16S rDNA の塩基配列の 3% 以上の配列の差異が異なる細菌種を示す境界値であるとされている (Fox et al., 1992, Stackebrandt and Goebel, 1994; Clayton et al., 1995; Kolbert and Presing, 1999)。しかし、最近これらの境界値に相当しない 16S rDNA の値が低い配列の類似性を種間で示す事例がいくつかの Campylobacter 種で見出された (Gorkiewicz et al., 2003 ; Mitsuhashi et al., 2005)。また、前述した T. equigenitalis の 16S rDNA の塩基配列 3 例及び 15 株 (アメリカの分離株 11 株、オランダの分離株 2 株、イギリスと日本の分離株それぞれ 1 株) の配列がすべて同一である (Jang et al., 2001) とされているので、T. equigenitalis の 16S rDNA の異なる配列に関する報告は今回の筆者のものが初めてである。

3 つのリファレンス配列を含む T. equigenitalis の 23 例の 16S rDNA の配列情報及び T. asinigenitalis そして他のいくつかの細菌種の配列情報を基にした UPGMA 法を用いた進化系統樹の作成では大変興味ある結果が得られた。即ち、結果は明らかに、T. equigenitalis は同じ属に属する T. asinigenitalis と 1 つのクラスターを形成し、更にベルギーとドイツで呼吸症のハトから分離された Pelistega europaea (Vandamme et al., 1998) 及び最近ドイツで、cotton-topped tamarin (Saguinus oedipus) の心臓から分離された Brackiella oedipodis (Willems et al., 2002) と 1 つの大きなクラストを形成しており、最も近縁であった。

従来、T. equigenitalis の 16S-23S rDNA ISR に関する研究は全く報告されておらず、今回の筆者のものが初めてである。今回の ISR-A、ISR-B と T. equigenitalis にはその長さや配列が異なる 2 つの ISR が存在するという事実は T. equigenitalis におけるすくなくとも 2 つ以上の *rrn* オペロンの存在を強く示唆している。また、ISR-A 及び ISR-B の中で発見された 2 つの tRNA 遺伝子の並びは従来いくつかグラム陰性菌の ISR の中で見い出されている並びと一致しているが、当研究室のこれまでの Campylobacter lali に関する研究で明らかとなっている結果とは逆であった。更にこの様な ISR に関する事実には、これら ISR の塩基配列情報が T. equigenitalis の株間の分子識別における有効性を強く示唆している。

## 謝辞

始終懇篤なご指導を賜りました麻布大学大学院環境保健学研究科分子生物学松田基夫教授に心から感謝いたします。本博士論文に対して懇篤な御校閲御校正を賜りました福山正文教授及び佐俣哲郎教授に心から感謝いたします。また、本研究の材料である菌株を分与いただきました日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所安斉了先生、北海道日高家畜保健所及び農林水産省家畜衛生試験場の皆様に感謝致します。更に、ベルギーの分離株を分与いただいた Unversiteit Gent, Merelbeke の Dr. L. Deveriese、イングランドの分離株を分与いただいた Animal Health Trust の Dr. Neil Chanter、フランスの分離株を分与していただいた Laboratoire Departemental de L'Orne の Dr. F. Klein、スウェーデンの分離株を分与いただいた Laboratory of Bacteriology, National Veterinary Institute の Dr. E. Olsson、スイスの分離株を分与いただいた Institut fur Veterinarbakteriologie der Universtat Zurich の Dr. L. Corboz、オーストラリアの分離株を分与いただいた Department of Primary Industries, South Australia の Dr. Mary D. Barton の皆様に深く感謝致します。最後にいろいろと協力してくださいました大学院環境保健学研究科分子生物学分野並びに環境保健学部遺伝子生物学研究室の皆様に心から御礼申し上げます。

また、ひとえに、挫けず負けずここまで貫けたのは、父、母、弟、母の叔母の暖かい応援があったからと心より感謝致します。今後とも今よりも更なる自分に成長できるように努力し続けたいと思います。本当にありがとうございました。

今後とも、若輩な私ですが見守ってくださることを宜しくお願い申し上げます。

## 参考文献

- Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., Kresovich, S. and Berg, D. E. (1992). DNA diversity among clinical isolates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20, 5137-5142.
- Anonymous (2002a). CEM confirmed in UK stallion. *Vet. Rec.* 151, 589.
- Anonymous (2002b). <http://www.hblb.org.uk>
- Anzai, T., Eguchi, M., Sekizaki, T., Kamada, M., Yamamoto, K., Okuda, T., (1999). Development of a PCR test for rapid diagnosis of contagious equine metritis. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 1287-1292.
- 安斉 了、江口正志、衛藤真理子、奥田敏男、青木仁久、澤田拓士、松田基夫 (2001) : 馬伝染性子宮炎 PCR 診断法の確立と評価。日獣会誌 54, p. 345 - 348
- Benjamin, L. (2000). *Genes VII*. Oxford University Press Inc. New York.
- Benson, J. A., Dawson, F.L.M., Durrant, D. S., Edwards, P. T., Powell, D. G., (1978). Serological response in mares affected by contagious equine metritis. *Vet. Rec.* 102, 277-280.
- Bleumink-Pluym N., Ter Laak, E. A. and Van Der Zeijst, B. A. M., (1990). Epidemiologic study of Taylorella equigenitalis strains by field inversion gel electrophoresis of genomic restriction endonuclease fragments. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2012-2016.
- Bleumink-Pluym, N. M. C., van Vliet, A. H. M., van der Giessen, J. W.b., van der Zeijst, B. A. M. (1993). Phylogenetic position of Taylorella equigenitalis determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 618-621.
- Brewer, R. A., 1983. Contagious equine metritis: a review/summary. *Vet. Bull.* 53, 881-891.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. and Noller, H. F. (1985). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 148; 107-127.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P. J. and Noller, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 4801-4805.
- Bryans JT, Hendricks JB. (1979). Epidemiological observations on contagious equine

metritis in Kentucky, 1978. J. Reprod. Suppl. 27, 343-349.

Carter G. C. (1979); Contagious equine metritis. An Quarant; 6: 1-5.

Chetoui, H., Melin, P., Struelens, M. J., Delhalle, E., Nigo, M. M., Ryck, R. and De Mol, P., (1997). Comparison of biotyping, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for investigation of a common-source outbreak of *Burkholderia picketti* bacteremia. J. Clin. Microbiol. 35, 1398-1403.

Clayton, R. A., Sutton, G. Hinkle, Jr., P.S., Bult, C. and Field. C. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. Int. J.Syst. Bcateriol. 45; 595-599.

Croxton-Smith, P., Benson, J. A., Dawson, F. L. M., Powell, D. G., (1978). A complement fixation test for antibody to the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 103, 275-278.

Crowhurst, R. C., (1977). Genital infection in mares. Vet. Rec. 100, 476.

Fernie, D. S., Cayzer, I., Chalmers, S. R., (1979). A passive haemagglutination test for the detection of antibodies to the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 104, 260-262.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. and Jurtshuk, Jr. P. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42; 166-170.

Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI, Rodriguez-Valera F. (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J. Microbiol. Methods. 36:55-64.

Gomez-Lus, P., Fields, B. S., Benson, R. F., Martin, W. T., O'Connor, S. P. and Black, C. M., (1993). Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup I. J. Clin. Microbiol. 31, 1940-1942.

Goebel BM, Stackebrandt E. (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1614-21.

Gomez-Lus ML, Aguilar L, Martin M, Gimenez MJ, Martinez P, Prieto J. (1997). Intracellular and extracellular killing of a penicillin-resistant, serotype-9 strain of

*Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leucocytes in the presence of sub-inhibitory concentrations of clavulanic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 142-4.

Gorkiewicz, G., Feierl, G., Schober, C., Dieber, F., Kofler, J., Zechner, R. and Zechner, E. L. (2003). Species-specific identification of *Campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 41; 2537-2546.

Gurtler and Stanisich (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142: 3-16.

Hughes, K. L., Bryden, J. D. and Macdonald, F., (1978). Equine contagious metritis. *Aus. Vet. J.*, 54, 101.

Jackson, G., Carson, T., Heath, P., Cooke, G., (2002). CEMO in a UK stallion. *Vet. Rec.* 151, 582.

Jang, S. S., Donahue, J. M., Arata, A. B., Goris, J., Hansen, L. M., Earley, D. L., Vandamme, P. A. R., Timoney, P. J., Hirsh, D. C., (2001). *Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 971-976.

Katz, J. B., Evans, L. E., Hutto, D. L., Schroeder-Tucker, L. C., Carew, A. M., Donahue, J. M., Hirsh, D. C., (2000). Clinical, bacteriologic, serologic, and pathologic features of infections with atypical *Taylorella equigenitalis* in mares. *J. Am. Vet. Assoc.* 216, 1945-1948.

Kolbert and Presing (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 299-305.

Liebisch B. and Schwarz S. (1996). Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *dublin*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 641-646.

Matsuda, M., Kagawa, S., Sakamoto, Y., Miyajima, M., Barton, M. and Moore, J.E., (2000). Detection of heterogeneous genotypes among Australian strains of *Taylorella equigenitalis*. *Aus. Vet. J.* 78, 56-57.

Matsuda, M., Miyazawa, T. and Anzai, T., (1999). Detection of a common genotype among strains *Taylorella equigenitalis* isolated from thoroughbred horses in Japan between 1994 and 1996. *J. Basic. Microbiol.* 39, 127-130.

- Matsuda, M., Miyazawa, T., Moore, J. E., Buckley, T. C. and Thomas, L. A., (1998). Molecular genotyping by pulsed-field gel electrophoresis of restricted genomic DNA of strains of Taylorella equigenitalis isolated in Ireland and in the United States. *Vet. Commun.* 22, 217-224.
- Matsuda, M., Miyazawa, T., Ishida, Y and Moore, J. E. (1997). Profiles of fragments after pulsed-field gel electrophoresis of cleaved genomic DNA from strains of Taylorella equigenitalis isolated from horses in Norway. *Microbiol. Res.* 152, 217-220.
- Miserez, R., Frey, J., Krawinkler, M. and Nicolet, J. (1996). Identifikation und diagnostik von Taylorella equigenitalis mittels einer DNA-amplifikationsmethode (PCR). *Schweizer. Archiv. Tierheilkunde.* 138, 115-120.
- Mitsubishi, N., Matsuda, M., Murayama, O., Millar, B. C. and Moore, J. E. (2005). Sequencing and analysis of the 16S rDNA of thermophilic Campylobacter lari and their reliability for molecular discrimination, *Brit. J. Biom. Sci.* 62(1), 34-7.
- Miyazawa, T., Matsuda, M., Isayama, Y., Samata, T., Ishida, Y., Ogawa, S., Takei, K., Honda, M. and Kamada, M., (1995). Genotyping of isolates of Taylorella equigenitalis from thoroughbred brood mares in Japan. *Vet. Res. Commun.* 19, 265-271.
- Moore JE, Millar BC, Matsuda M, Anzai T, Buckley T. (2003). Molecular detection and characterisation of Taylorella equigenitalis. *Vet. Rec.* 26; 152: 543-4
- Mumme, J., Ahlswede, L., (1979). Isolated von Haemophilus equigenitalis from the cervical swab of a halfbred mare. *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.* 86, 257-259.
- Old, D. C., Rankin, S. C. and Crichton, P. B., (1999). Assessment of strain relatedness among Salmonella serotypes Salinatis, Duisburg, Sandiego by biotyping, ribotyping, IS200 fingerprinting, and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1687-1692.
- Ozgun, N. Y., Ikiz, S., Carioglu, B., Kilicarslan, R., Yilmaz, H., Akay, O., Ligaz, A., (2001). Contagious equine metritis in Turkey: first isolation of Taylorella equigenitalis from mares. *Vet. Rec.* 149, 120-122.
- Powell, D. G., David, J. S. E., Frank, C. J., (1978). Contagious equine metritis: the present situation reviewed and a revised code of practice for its control. *Vet. Rec.* 103, 339-402.
- Rafferty, M. E., Baltch, A. L., Smith, R. P., Bopp, L. H., Rheal, C., Tenover, F. C., Killgore, G. E., Lysterly, D. M., Wilkins, T. D., Schoonmaker, D. J., Hannett, G. E. and Shayegani, M.

(1998). Comparison of restriction enzyme analysis, arbitrarily primed PCR, and protein profile analysis typing for epidemiologic investigation of an ongoing Clostridium difficile outbreak. J. Clin. Microbiol. 36, 2957-2963.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Savor, C., Pfaller, M. A., Kruszynski, J. A., Hollis, R. J., Noskin, G. A. and Peterson, L. R., (1998). Comparison of genomic methods for differentiating strains of Enterococcus faecium: assessment using clinical epidemiologic data. J. Clin. Microbiol. 36, 3327-3331.

Schwartz, D. C. and Cantor, C. R., (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. Cell. 37, 67-75.

Southern, E. M. and Elder, J. K., (1995). Theories of gel electrophoresis of high molecular weight DNA. In: Monaco (Ed.), Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Approach. IRL Press, New York, pp. 1-18.

Simpson, D. J. and Eaton-Evans, W., (1978). Sites of CEM infection. Vet Rec, 102, 488.

Sugimoto, C., Isayama, Y., Kashiwazaki, M., Fujikura, T. and Mitani, K., (1980). Detection of Haemophilus equigenitalis, the causal agent of contagious metritis, in Japan. Natl. Inst. Anim. Health. Q. (Jpn.), 20, 118-119.

Sugimoto, C., Isayama, Y., Sakazaki, R. and Kuramochi, S., (1983). Transfer of Haemophilus equigenitalis Taylor et al., 1978 to the genus Taylorella gen. nov. as Taylorella equigenitalis comb. nov. Current. Microbiol. 9, 155-162.

Swerczek TW. (1978a). Contagious equine metritis in USA. Vet. Rec. 102, 512-513.

Swerczek TW. (1978b). Inhibition of the CEM organism by the normal flora of the reproductive tract. Vet. Rec. 102, 125.

Taylor, C. E. D., Rosenthal, R. O., Brown, D. F. J., Lapage, S. P., Hill, L. R. and Legros, R. M., (1978). The causative organism of contagious equine metritis 1977: proposal for a new species to be know as Haemophilus equigenitalis. Equine. Vet. J. 10, 136-144.

Ter Laak. E. A., Fennema, G. and Jaartsveld, F. H. J., (1989). Contagious equine metritis in the Netherlands. Tijdschrift. voor. Diergeneeskunde. 114, 189-201.

Timoney, P. J. and Povell, D. G., (1982). Isolation of the contagious equine metritis organism from colts and fillies in the United Kingdom and Ireland. Vet. Rec. 111, 478-482.

- Timoney, P. J., Ward, J. and Kelly, P., (1977). A contagious genital infection of mares. *Vet. Rec.* 101, 103.
- Timoney, P. J. and Strickland, K. L., (1982). CEM in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 111, 400-401.
- Vandamme, P., Segers, P., Ryll, M., Hommez, J., Vancanneyt, M., Coopman, R., De Baere, R., Van De Peer, Y., Kersters, K., De Wachter, R., Hinz, K. H., (1998). *Pelistega eqropaea* gen. nov., sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons: taxonomic structure and phylogenetic allocation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 431-440.
- Van Belkum, A., Bax, R., Peerbooms, P., Goessens, W. H. F., Vav Leeuwen, N. and Quint, W. G. V., 1993. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 31, 798-803.
- Van Der Zee, A., Verbakel, H., Van Zon J-C., Frenay, I., Van Belkum, A., Peeters, M., Buiting, A. and Bergmans, A., 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J. Clin. Microbiol.* 37, 342-349.
- Willems A, Gilhaus H, Beer W, Mietke H, Gelderblom HR, Burghardt B, Voigt W, Reissbrodt R. (2002). *Brackiella oedipodis* gen. nov., sp. nov., gram-negative, oxidase-positive rods that cause endocarditis of cotton-topped tamarin (*Saguinus oedipus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 179-86.
- Wada, S., Matsuda, M., Kikuchi, M., Kodama, T., Takei, I., Ogawa, S., Takahashi, S., Shingaki, M and Itoh, T., (1994). Genome DNA analysis and genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Cytobios.* 80, 109-116.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J., (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.



Table 1. The strains of *T. equigenitalis* analyzed in the present study

Strain no.	Breed	Streptomycin susceptibility	Horse sex	Country isolated
Bel266-5923	Northoroughbred	NA	NA	Belgium
Bel266-6959	Northoroughbred	NA	NA	Belgium
Eng1	NA	NA	NA	England
Eng2	NA	NA	NA	England
Eng3	NA	NA	NA	England
Eng4	NA	NA	NA	England
Eng5	NA	NA	NA	England
Eng6	NA	NA	NA	England
Eng7	NA	NA	NA	England
Eng8	NA	NA	NA	England
Eng9	NA	NA	NA	England
Eng10	NA	NA	NA	England
Eng11	NA	NA	NA	England
Eng12	NA	NA	NA	England
Fin583	NA	NA	NA	Finland
Fin1698	NA	NA	NA	Finland
Fr-1	NA	NA	NA	France
Fr-2	NA	NA	NA	France
Fr-3	NA	NA	NA	France
Fr-4	NA	NA	NA	France
Fr-5	NA	NA	NA	France
Fr-6	French Trotter	Resistant <sup>4)</sup>	Female	France
Fr-7	French Trotter	Resistant <sup>4)</sup>	Male	France
Fr-8 <sup>2)</sup>	French Trotter	Resistant <sup>4)</sup>	Male	France
Fr-9	French Trotter	Resistant <sup>4)</sup>	Male	France
Fr-10	French Trotter	Resistant <sup>4)</sup>	Female	France
J4-1	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Male	Japan
J4-2	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-3	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-4	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-5	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-6	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-7	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-8	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J4-9	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Male	Japan
J5-1	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Male	Japan
J6-1	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-2	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-3	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-4	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-5	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-6	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-7	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-8	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-9	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-10	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
J6-11	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan

Table 1. (continued)

Strain no.	Breed	Streptomycin susceptibility	Horse sex	Country of isolated
NCTC11184 <sup>T1)</sup>	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	England
N217-79	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	NA	England
N480-182	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	NA	England
N187	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
N204	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
N224	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
N300	Norwegian Pony	NA	NA	Norway
N806	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
N807	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
N809	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
N832	Norwegian Trotter	NA	NA	Norway
Swe-1	Trotter	Resistant <sup>5)</sup>	Female	Sweden
Swe-2	Cold-blooded Trotter	Resistant <sup>5)</sup>	Male <sup>5)</sup>	Sweden
Swe-3	Fiord Horse	Resistant <sup>5)</sup>	Male <sup>5)</sup>	Sweden
Swe-4	Ardeness	Resistant <sup>5)</sup>	Male <sup>5)</sup>	Sweden
Swe-5	Fiord Horse	Resistant <sup>5)</sup>	Male <sup>5)</sup>	Sweden
Swi-1	Cold-blooded	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Switzerland
Swi-2	Cold-blooded	Resistant <sup>4)</sup>	Male <sup>5)</sup>	Switzerland
Swi-3	Cold-blooded	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Switzerland
Swi-4	Thoroughbred	Susceptible	Male <sup>5)</sup>	Switzerland
Swi-5	Thoroughbred	Susceptible	Female	Switzerland
Swi-6	Cold-blooded	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Switzerland
Swi-7	Thoroughbred	Susceptible	Female	Switzerland
Swi-8	Thoroughbred	Susceptible	Female	Switzerland
Swi-9	Thoroughbred	Susceptible	Male <sup>5)</sup>	Switzerland
Swi-10	Warm-blooded	Susceptible	Female	Switzerland
Swi-11	Thoroughbred	Susceptible	Male <sup>5)</sup>	Switzerland
Swi-12	Thoroughbred	Susceptible	Male <sup>5)</sup>	Switzerland
Kentucky 188	NA	Resistant <sup>4)</sup>	Female	the U.S.A
EQ59	Thoroughbred	Resistant <sup>4)</sup>	Female	Japan
Aus-1	NA	NA	NA	Australia
Aus-2	NA	NA	NA	Australia
Aus-3	NA	NA	NA	Australia
Aus-4	NA	NA	NA	Australia
Aus-5	NA	NA	NA	Australia
Aus-6	NA	NA	NA	Australia
Aus-7	NA	NA	NA	Australia

NA, not available, 1) Type strain, 2) an isolate from the same horse as Fr-7, but collected 1 week later, 3) Swi-7 and Swi-8, isolates from different localization of the same horse, 4) MICs for SM-resistant strains, from 128 to > 512 µg/ml, 5) Resistance to SM was judged by the ability to grow on agar-plates containing SM (0.2 g in 1,000 ml), No MICs for the resistant strains were estimated. 6) Four different horses of a circus.

Table 2. Restriction enzymes used in this study

---

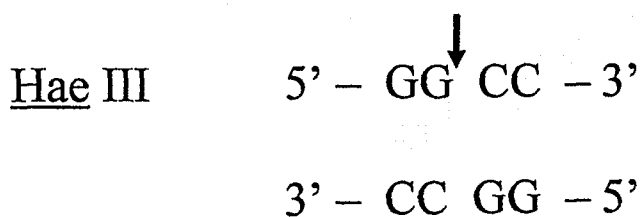
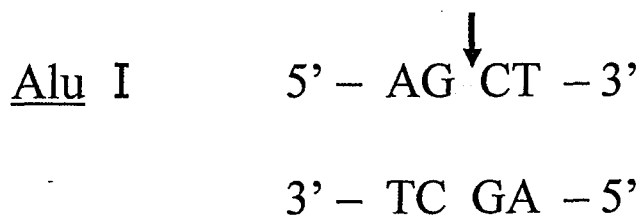
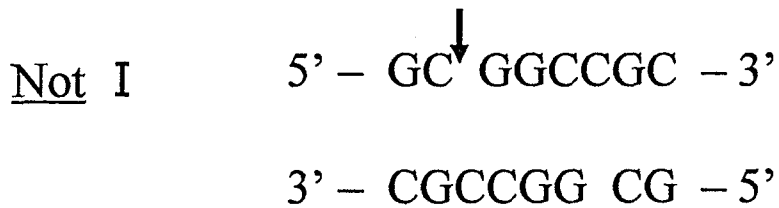
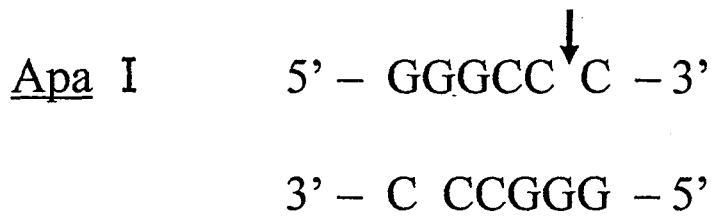


Table 2. (continued)

---

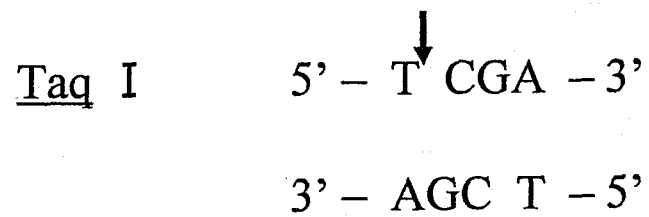
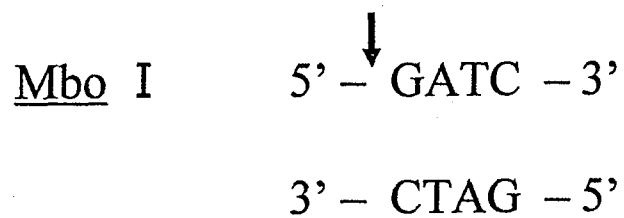
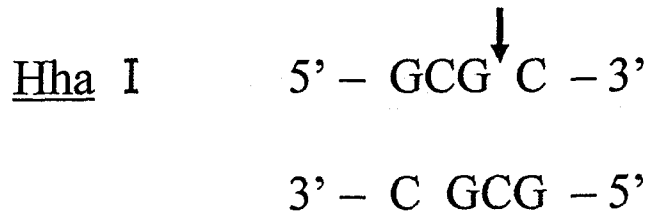


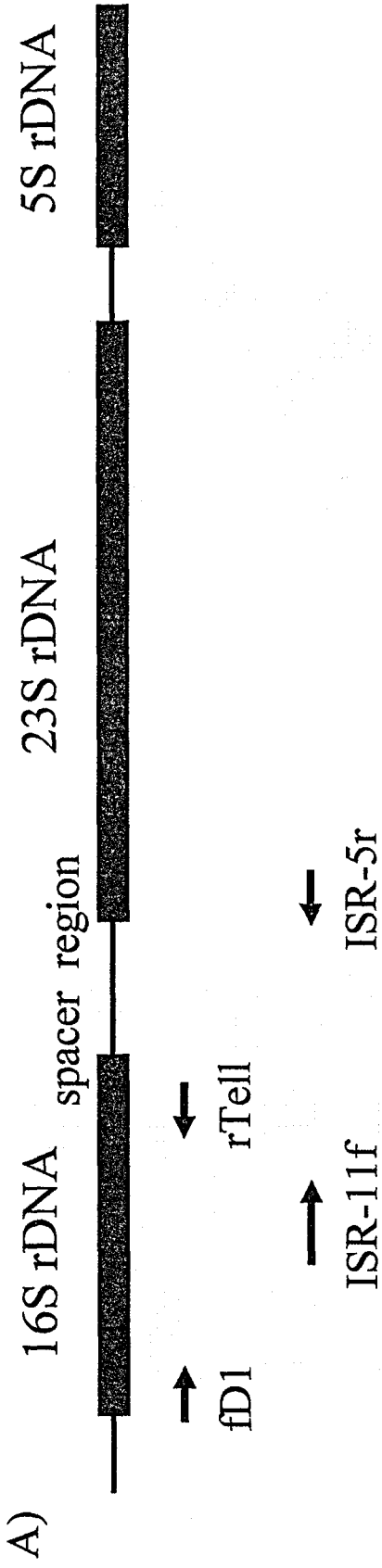
Table 3. Arbitrary primer used in this study

Primer	Sequence
1281	5' – AACGCGCAAC – 3'
1283	5' – GCGATCCCCA – 3'
Cj92	5' – ACAACTGCTC – 3'
BG2	5' – TACATTCGAGGACCCCTAAGTG – 3'
ERIC IR - 1	5' – ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC – 3'
ERIC IR - 2	5' – AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3'

Table 4. Position of polymorphic sites and nucleic acid sequence at these sites among 16S rDNA of *I. equigenitalis* isolates

Position of <i>I. equigenitalis</i> polymorphic site	NCTC11184 <sup>†</sup>	Kentucky188	EQ59	EQ70	SS28	HH139	CEMO12	CEMO13	CEMO14	Aus1	Aus2	Aus3	Aus4	Aus5	Aus6	Aus7	Fr-1	Fr-2	Fr-9	Fr-10	X68645	AF297172	AF297173
138	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	G	G	G
139	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	C	C	C
145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	-	-	-
173	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A	G	G	G
226	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
239	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
369	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
400	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
494	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
501	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
907	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	C	C	C
1055	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1223	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1486	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A
1492	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G

Notes : \*position in relation to the isolate of *I. equigenitalis* Aus1



B)

Primer	Sequence (5' to 3')	Reference
fD1	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> , J. Bacteriol. 173, 697-, 1991
rTell	GGCTACCTTGTTACGACTT	DDBJ/EMBL/Genbank, accession no. J01695
ISR-11f	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	Widjoatmodjo <i>et al.</i> , J. Clin. 32. 3002-, 1994
ISR-5r	GCCAAGGCATCCACC	Gurtler and Stanisich. Microbiol. 142, 3-, 1996

Figure 1 Schematic representation of a bacterial rRNA operon (A). Arrows indicate primer site for PCR amplification of 16S rDNA and 16S-23S internal spacer region (ISR). Sequences of oligonucleotides were used as primers for amplification of 16S rDNA and 16S-23S ISR in the present study (B).

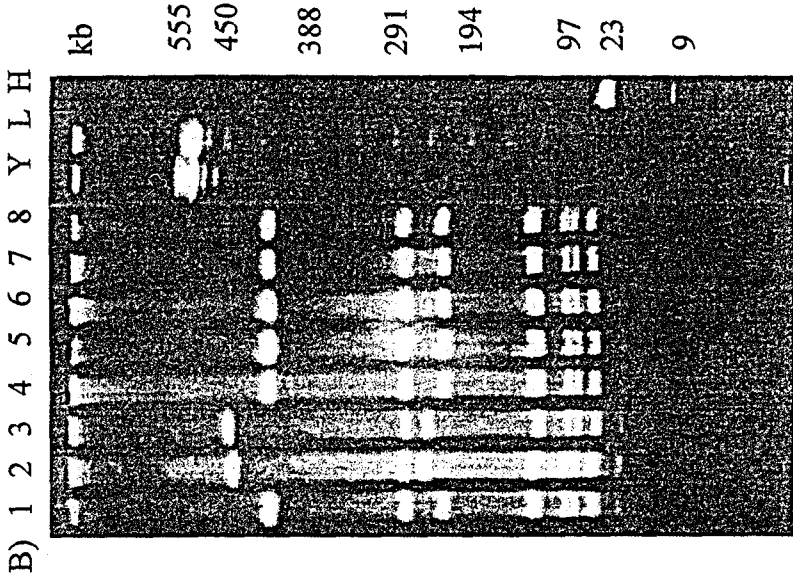
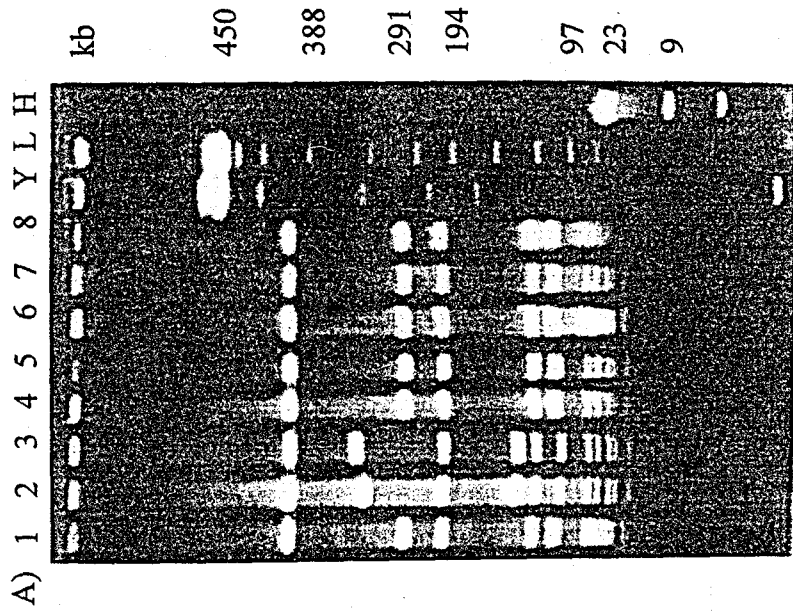


Figure 2 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from of T. equigenitalis after digestion with Apa I (A) and Not I (B). Lane Y, chromosomal DNA from Saccharomyces cerevisiae YNN295. Lane L, lambda concatemeric DNA. Lane H, HindIII digest of Lambda DNA. Lane 1, type strain EQ 59; lane 2, NCTC11184<sup>T</sup>; lane 3, Kentucky188; lane 4, J4-1; lane 5, J4-2; lane 6, J4-9; lane 7, J6-1; and lane 8, J6-2.



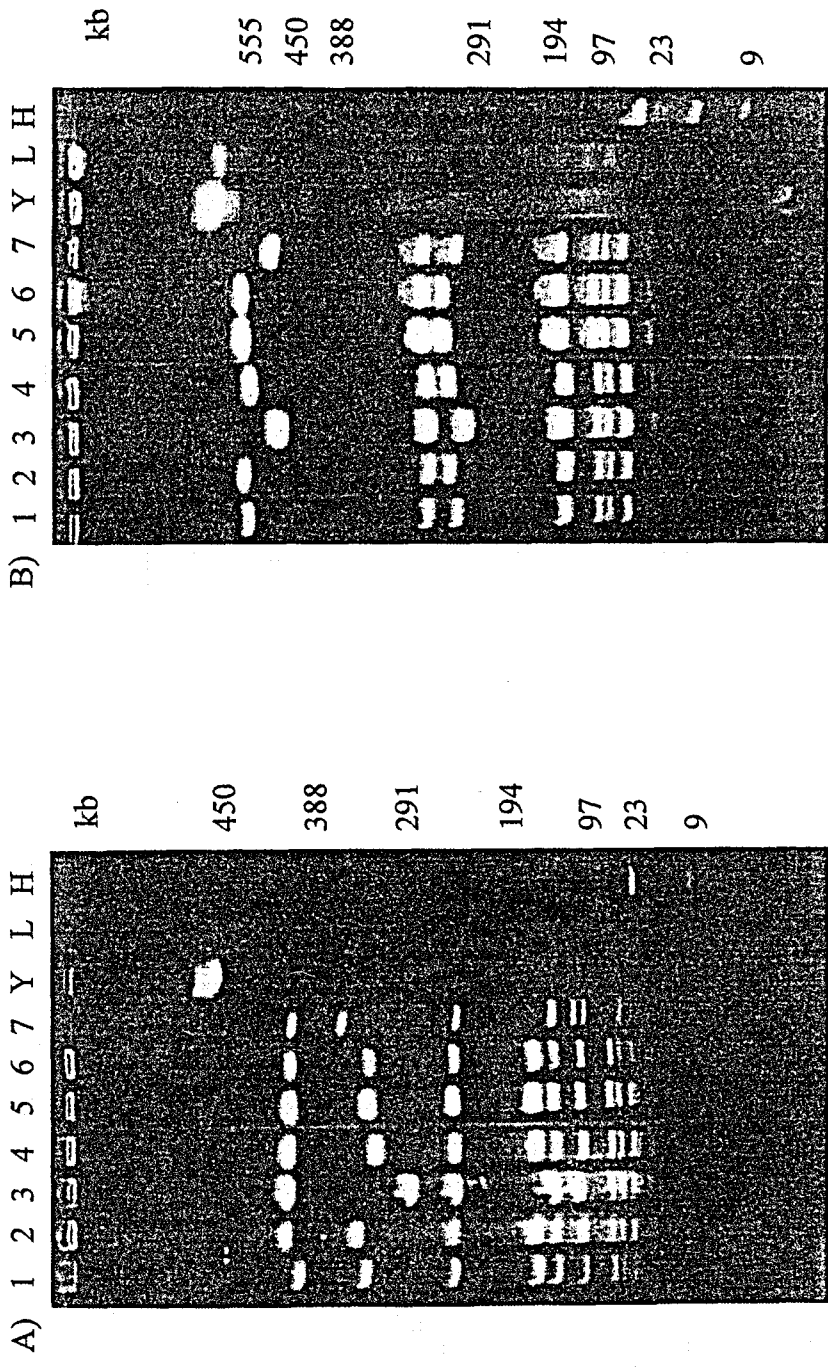


Figure 3 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from of *T. equigenitalis* after digestion with Apa I (A) and Not I (B). For lanes Y, L and H, refer to the legend to Figure 2. Lane 1, type strain NCTC1184T; lane 2, Kentucky188; lane 3, EQ 59; lane 4, N-1; lane 5, N-2; lane 6, Bel-1; and lane 7, Bel-2.

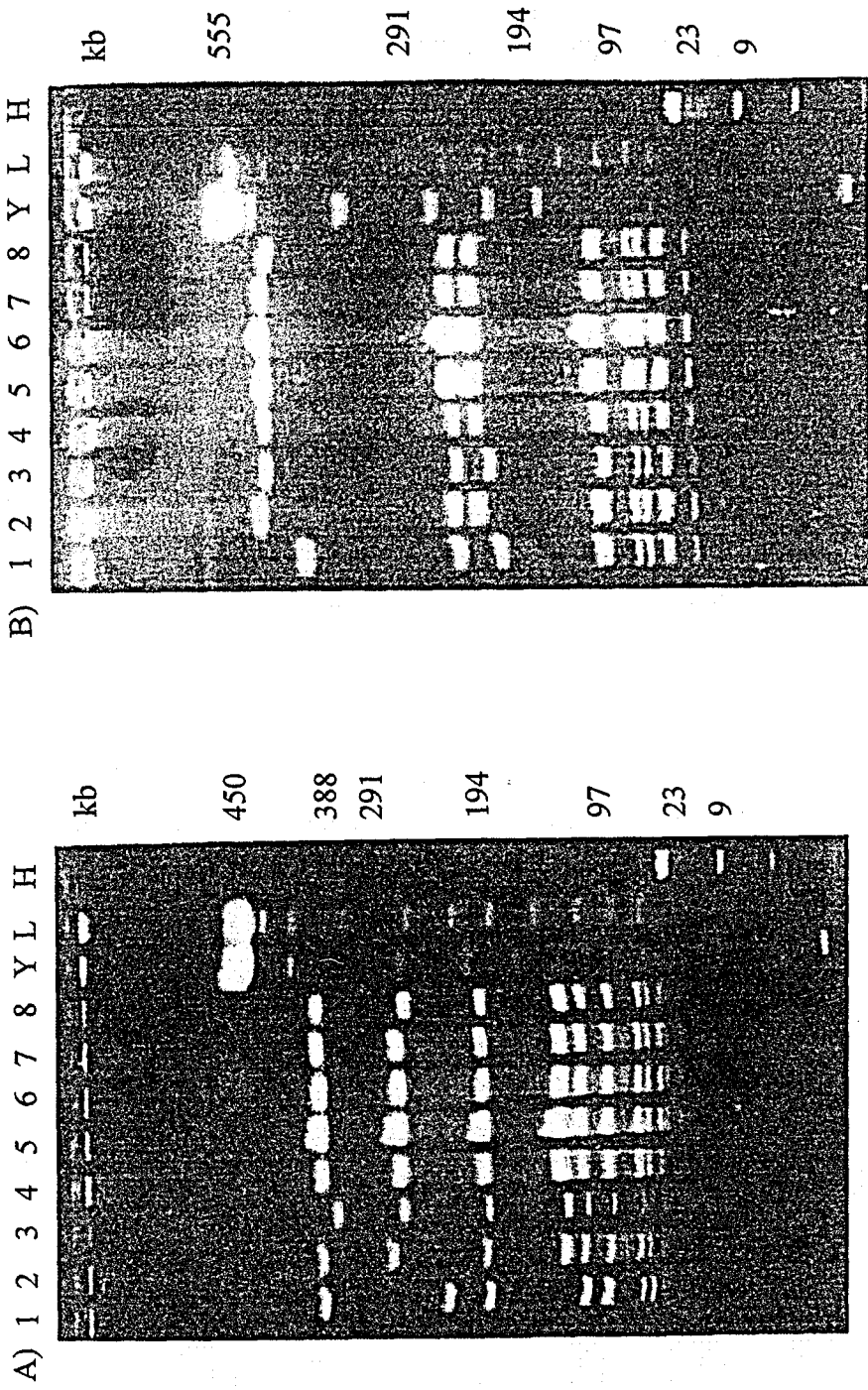


Figure 4 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from of *T. equigenitalis* after digestion with Apa I (A) and Not I (B). For lane Y, L and H, refer to the legend to Figure 2. Lane 1, type strain EQ59; lane 2, Kentucky188 ; lane 3, NCTC11184<sup>T</sup>; lane 4, Eng1; lane 5, Eng2; lane 6, Eng3; lane 7, N-2; and lane 8, N-1.

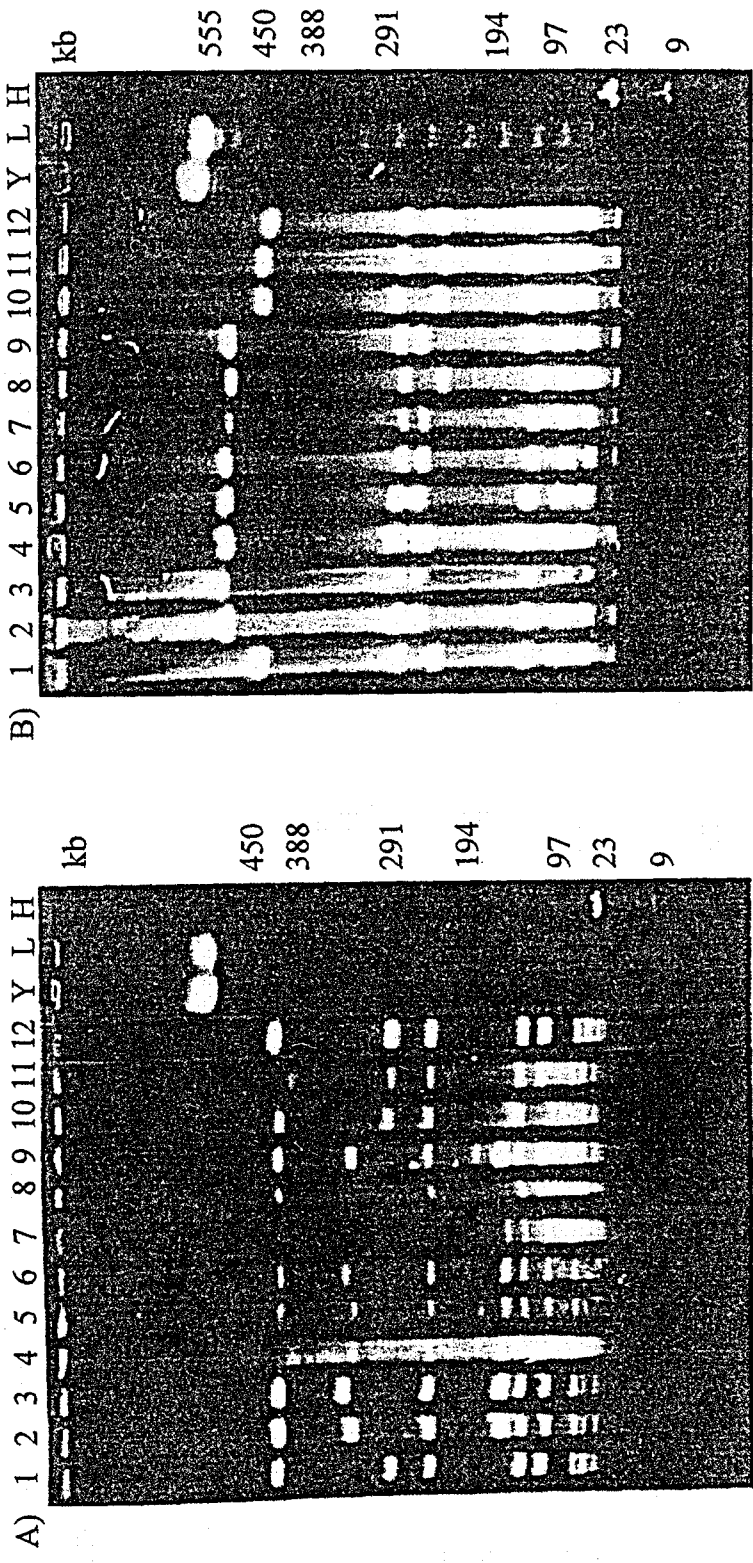


Figure 5 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from of T. equigenitalis after digestion with Apa I (A) and Not I (B). For lane Y, L and H, refer to the legend to Figure 2. Lane 1, type strain NCTC1184<sup>T</sup>; lane 2, Kentucky188; lane 3, EQ59 ; lane 4, Eng4; lane 5, Eng5; lane 6, Eng6; lane 7, Eng7; lane 8, Eng8 ; lane 9, Eng9; lane 10, Eng10; lane 11, Eng11; and lane 12, Eng12.

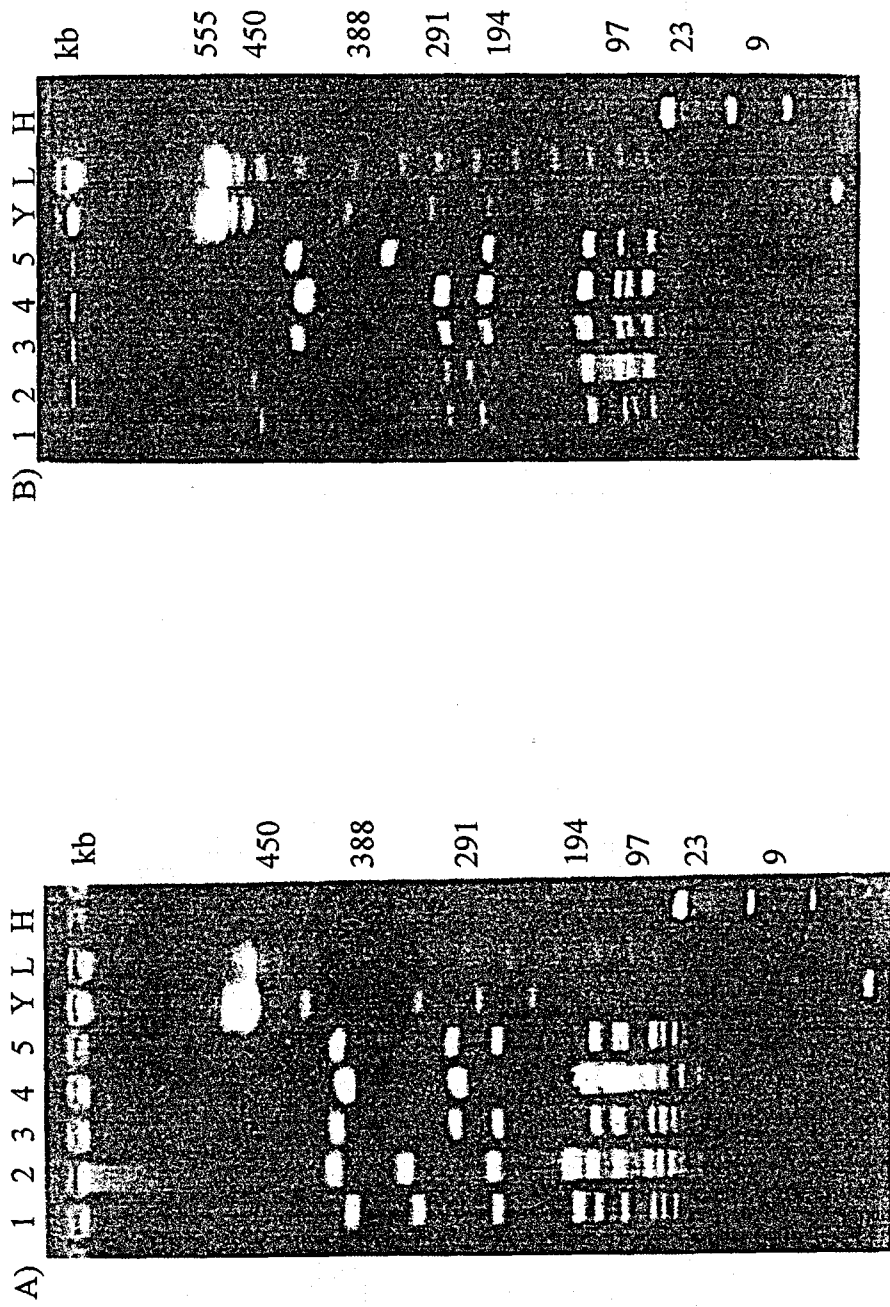


Figure 6 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from of I. equigenitalis after digestion with Apa I (A) and Not I (B). For lanes Y, L and H, refer to the legend to Figure 2. Lane 1, type strain NCTC11184<sup>T</sup>; lane 2, Kentucky188; lane 3, EQ 59; lane 4, Fin1; and lane 5, Fin2.

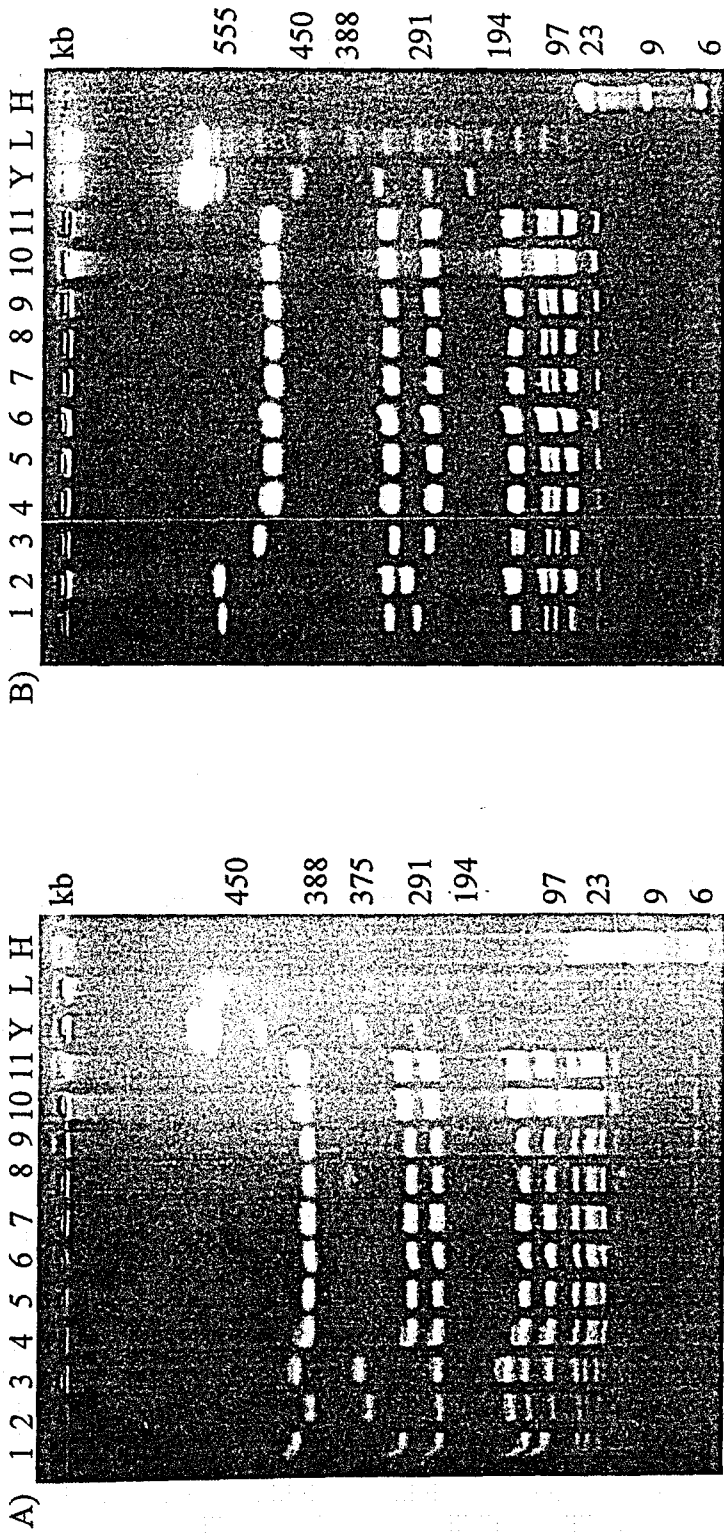


Figure 7 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from of *T. equigenitalis* after digestion with Apa I (A) and Not I (B). Lane Y, chromosomal DNA from *Saccharomyces cerevisiae* YNN295. Lane L, lambda concatemeric DNA. Lane H, HindIII digest of Lambda DNA. Lane 1, type strain NCTC11184<sup>T</sup>; lane 2, Kentucky188; lane 3, EQ59; lane 4, strain 184; lane 5 strain 204; strain 807; lane 10 lane 6, strain 224; lane7, strain 300 lane 8, strain 806; lane 9, strain 807; ; lane 10, strain 809; and lane 11 strain 832-20084.

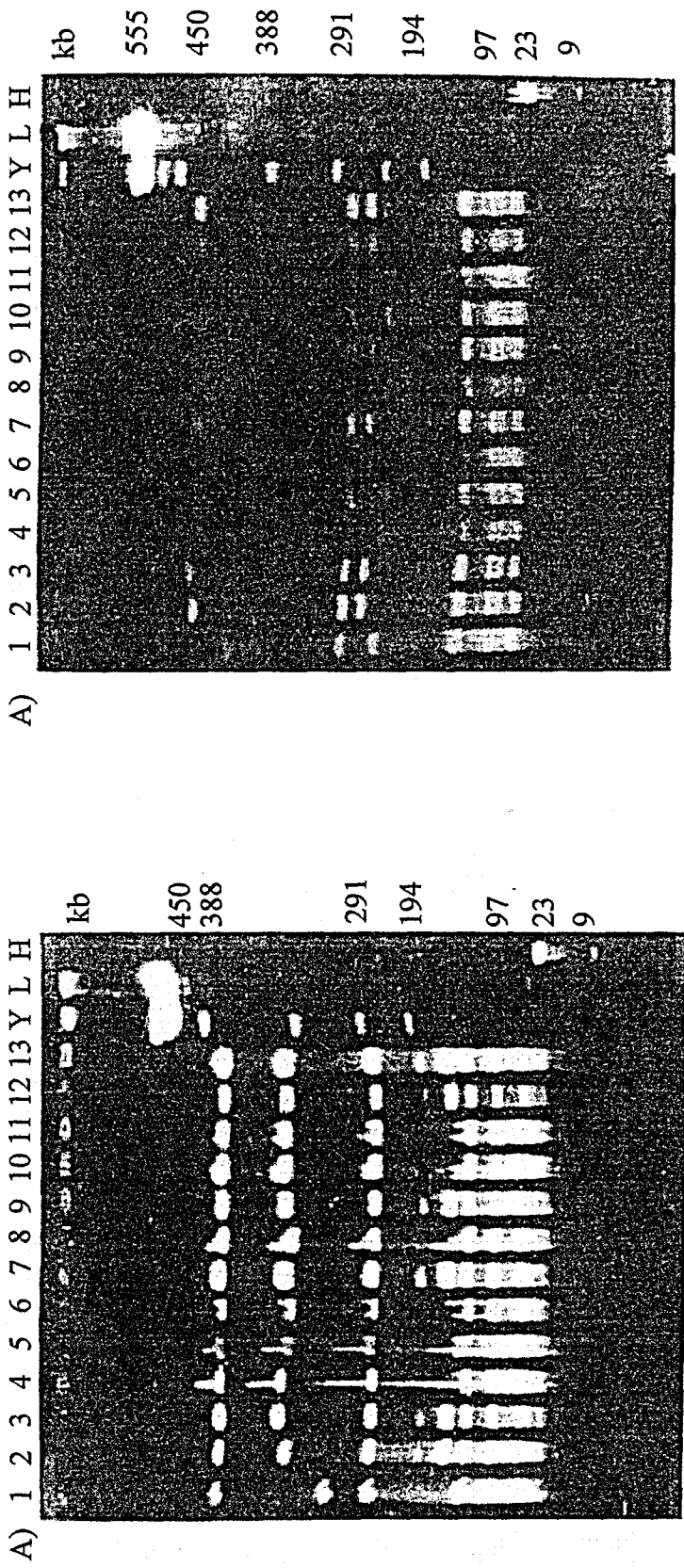


Figure 8 Fractionation by PFGE after separate digestion with Apa I (A) and Not I (B) of restricted genomic DNA from isolates of T. equigenitalis obtained in France. For lanes Y, L, and H, refer to the legend for Figure 1. Lane 1, EQ59; lane 2, NCTC11184<sup>T</sup>; lane 3, Kentucky 188; lane 4, Fr-1; lane 5, Fr-2; lane 6, Fr-3; lane 7, Fr-4; lane 8, Fr-5; lane 9, Fr-6; lane 10, Fr-7; lane 11, Fr-8; lane 12, Fr-9; and lane 13, Fr-10.

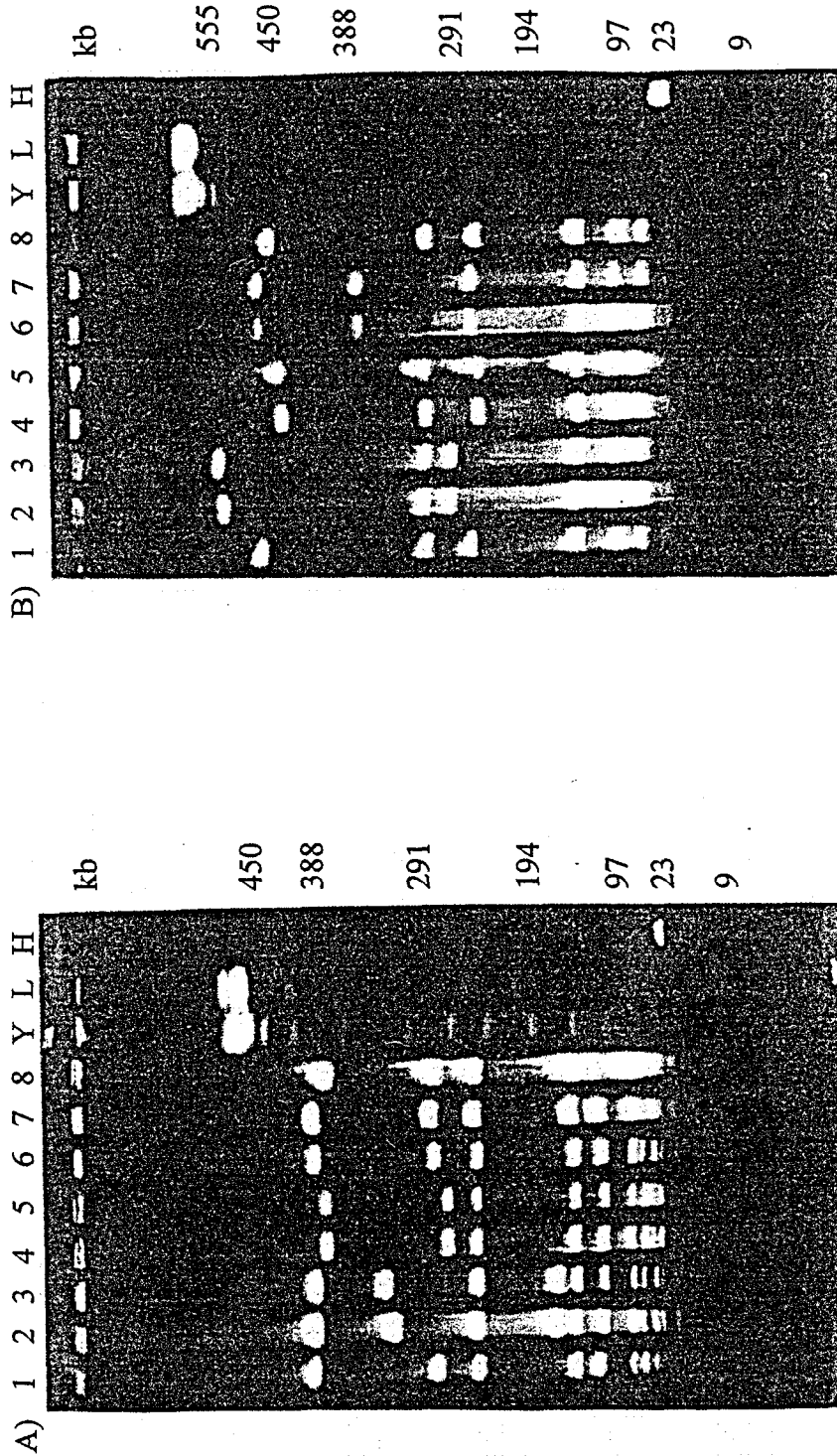


Figure 9 Fractionation by PFGE after separate digestion with Apa I (A) and Not I (B) of restricted genomic DNA from isolates of T. equigenitalis obtained in Sweden. For lanes Y, L, and H, refer to the legend for Figure 1. Lane 1, EQ59; lane 2, NCTC11184<sup>T</sup>; lane 3, Kentucky 188; lane 4, Swe-1; lane 5, Swe-2; lane 6, Swe-3; lane 7, Swe-4; and lane 8, Swe-5.

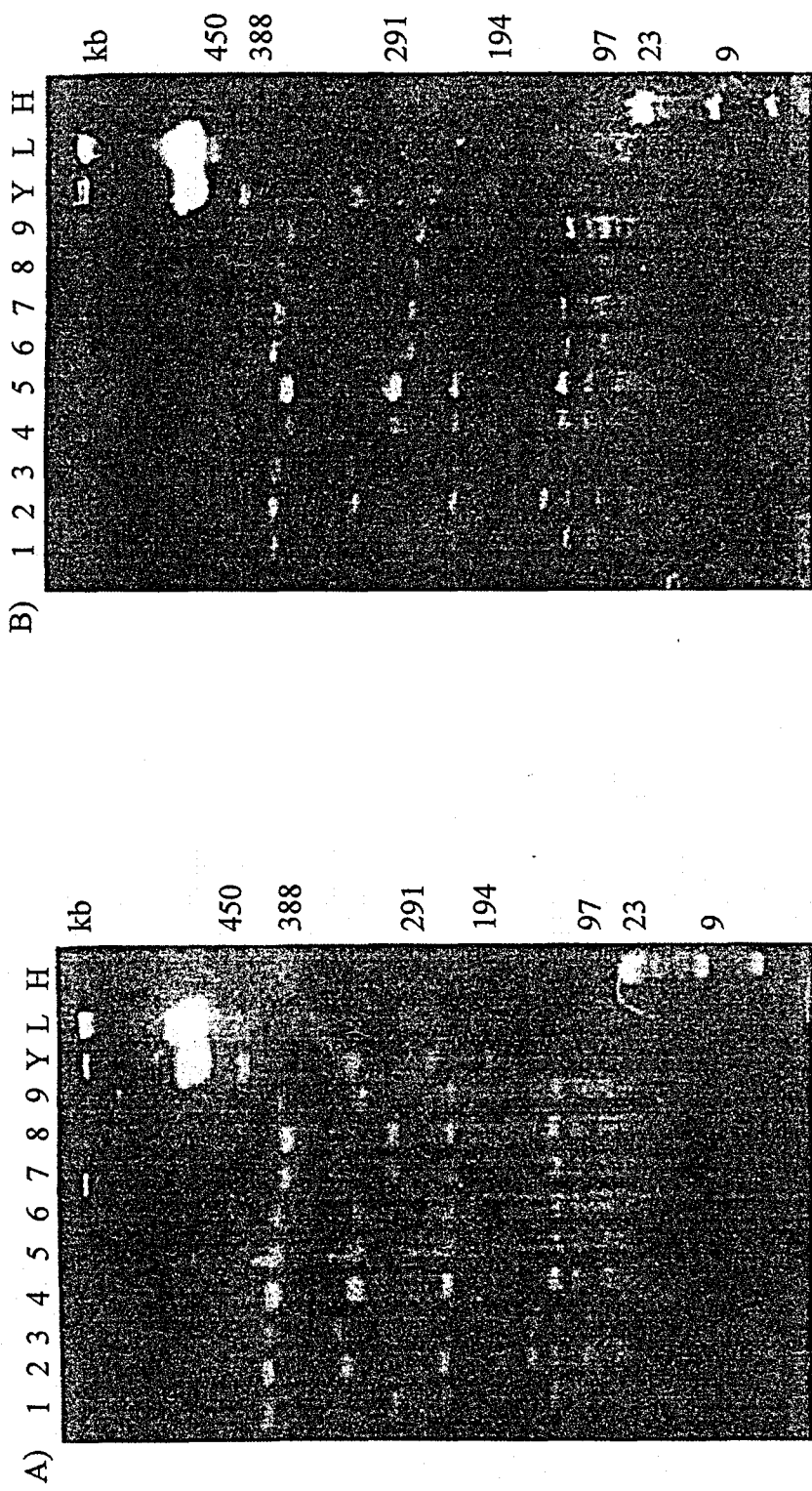


Figure 10 Fractionation by PFGE after separate digestion with Apa I (A and B) and Not I (C and D) from isolates of I. equigenitalis obtained in Switzerland. For lanes Y, L, and H, refer to the legend for Figure 1. Lane 1, EQ59; lane 2, NCTC11184T; lane 3, Kentucky 188; (A and C) lane 4, Swi-1; lane 5, Swi-2 lane 6, Swi-3; lane 7, Swi-4; lane 8, Swi-5; lane 9, Swi-6. (B and D) lane 4, Swi-7; lane 5, Swi-8; lane 6, Swi-9; lane 7, Swi-10; lane 8, Swi-11; and lane 9, Swi-12.



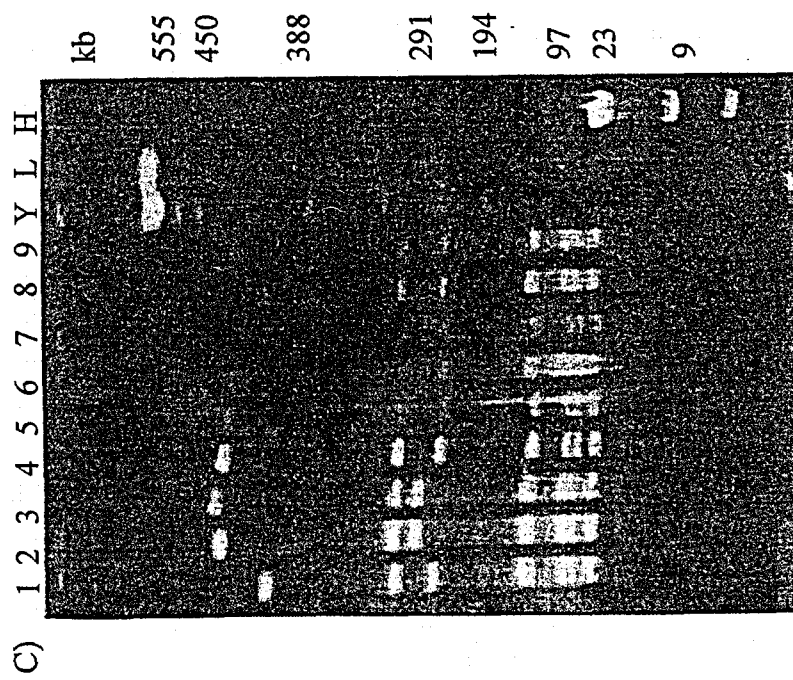
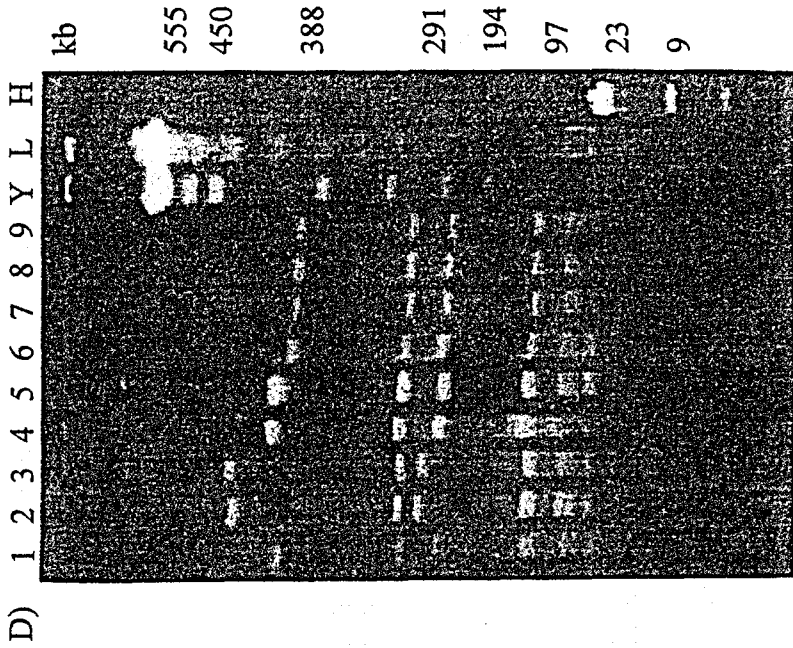


Figure 10 (continued)

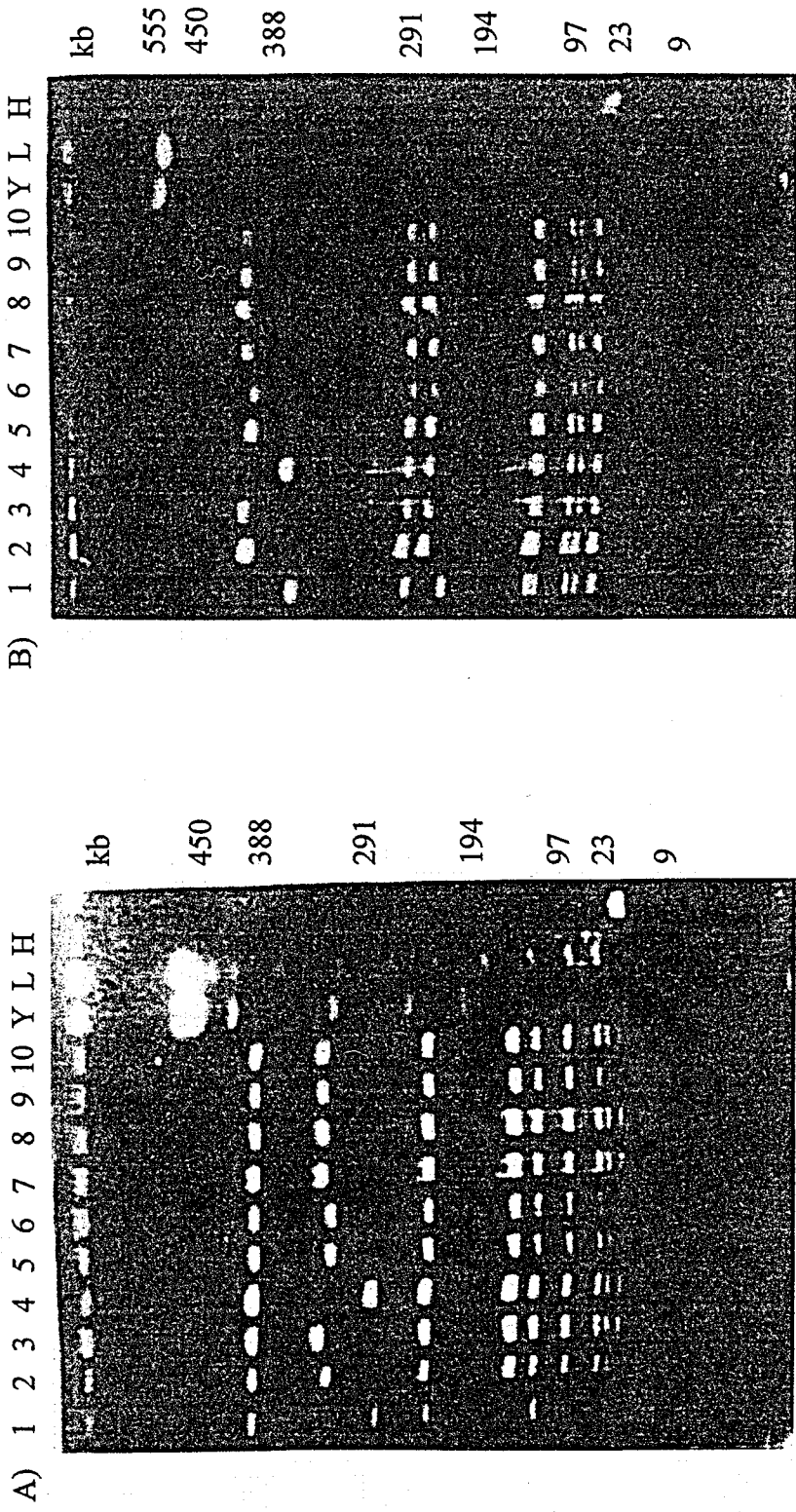


Figure 11 Fractionation by PFGE after separate digestion with Apa I (A) and Not I (B) of restricted genomic DNA from isolates of T. equigenitalis obtained in Australia. For lanes Y, L, and H, refer to the legend for Figure 1. Lane 1, EQ59; lane 2, NCTC11184<sup>T</sup>; lane 3, Kentucky 188; lane 4, Aus 1; lane 5, Aus2; lane 6, Aus 3; lane 7, Aus 4; lane 8, Aus 5; lane 9, Aus 6; and lane 10, Aus 7.

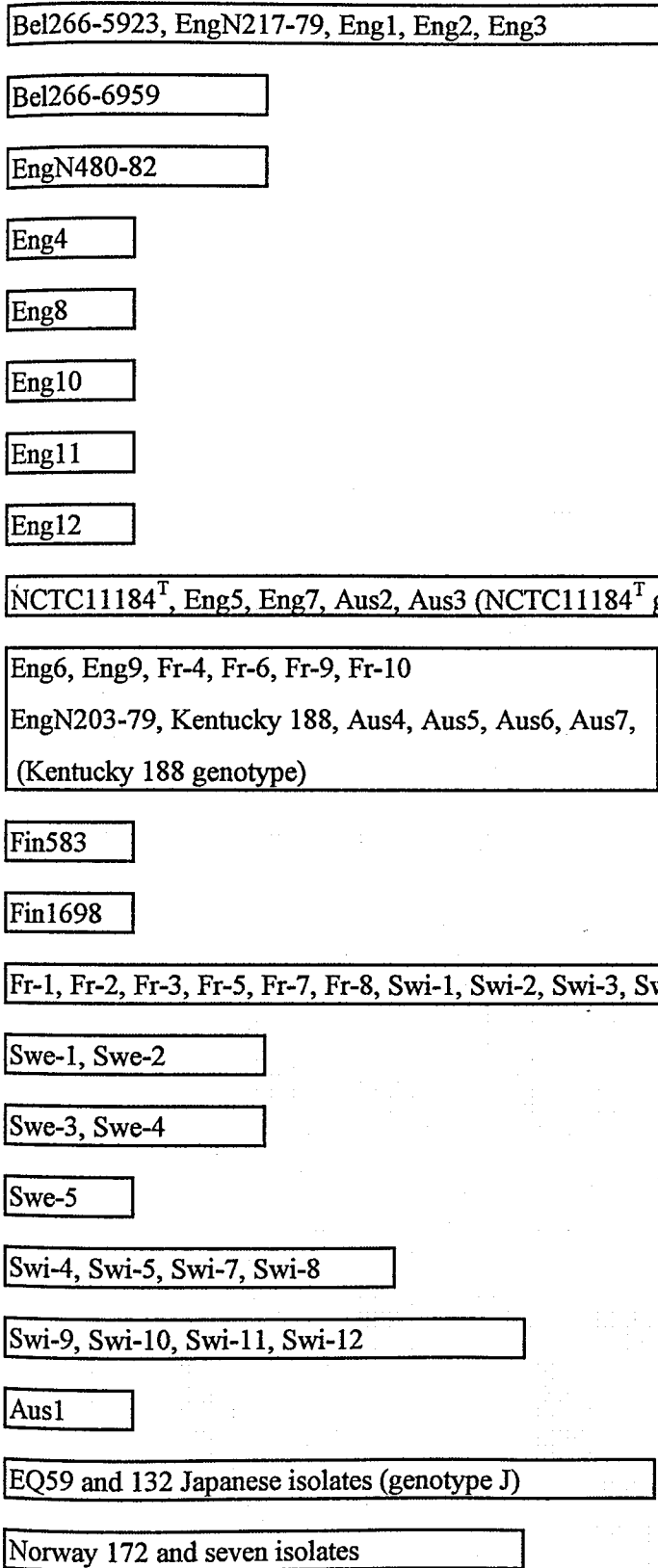


Figure 12 Summary of the results of genotyping by PFGE analysis after separate digestion with Apa I and with Not I of the genomic DNA from isolates of T. equigenitalis. Boxes indicate identical genotypes by PFGE analysis.

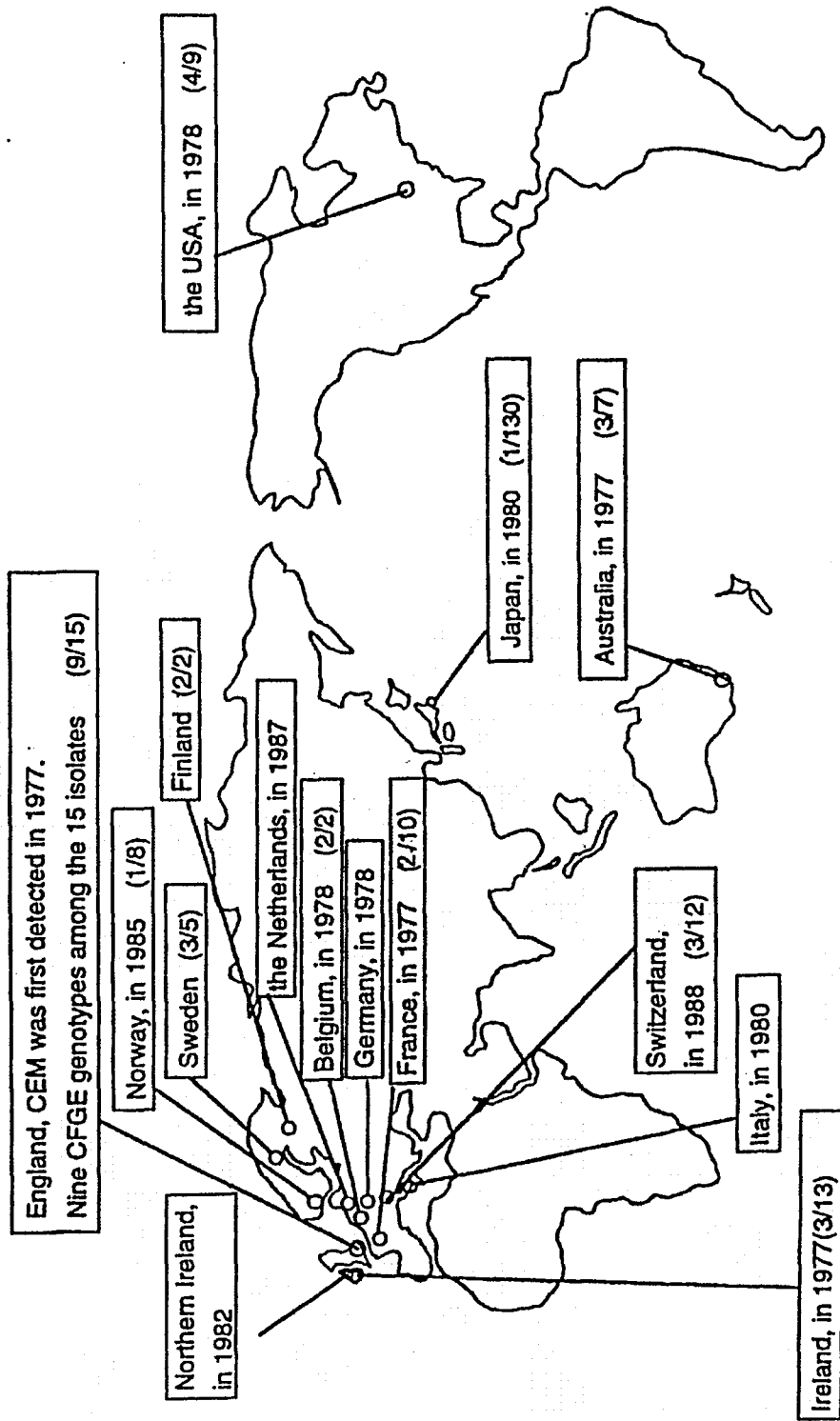


Figure 13 Chronological detection of CEM in several countries and geographical distribution of PFGE genotypes of T. equigenitalis.

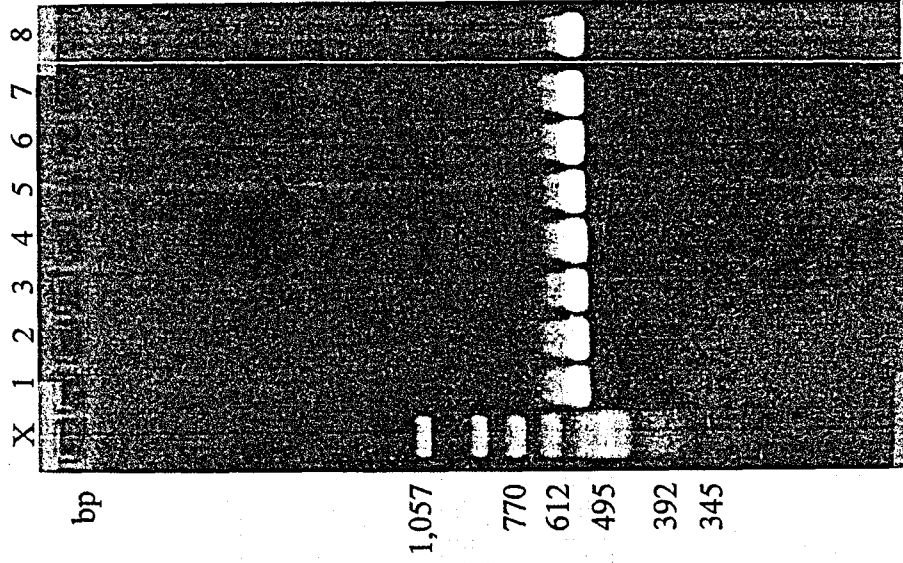


Figure 14 Profiles after 1.5% agarose gel electrophoresis of PCR products of eight strains using the specific primer pair for *I. equigenitalis*. Lane X, *Hinc II* digest of phage  $\phi$   $\chi$  174 DNA. Lane 1, *I. equigenitalis* NCTC11184<sup>T</sup>; lane 2, Kentucky 188; lane 3 EQ59; lane 4, Aus 1; lane 5, Eng 10; lane 6, Fr-1; lane 7, Swi-5; and lane 8, N-187.

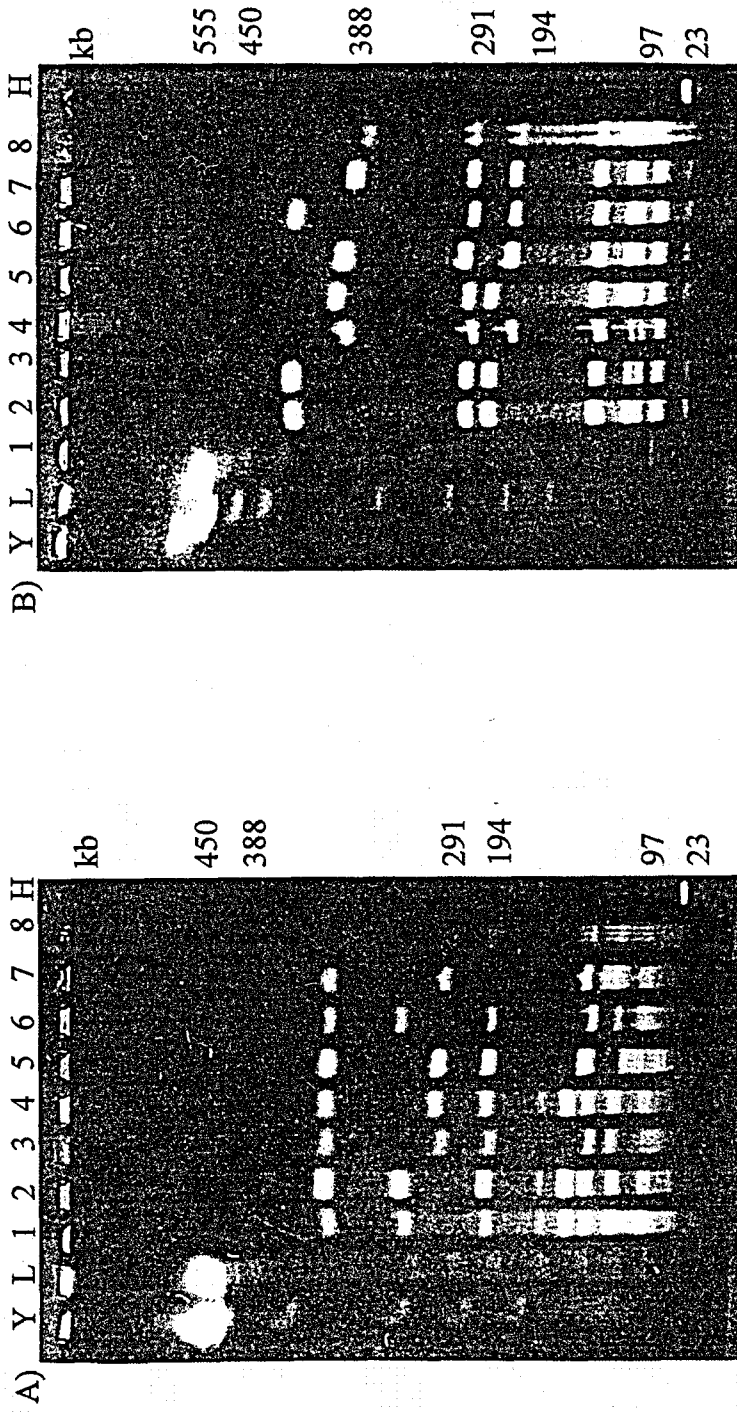


Figure 15 Fractionation by PFGE of restricted genomic DNA from strains of *T. quigenitalis* after digestion with *Apa* I (A) and *Not* I (B). Y, chromosomal genomic DNA from *Saccharomyces cerevisiae* YNN295. Lane L, lambda concatemeric DNA. Lane H, *Hind* III digest of lambda DNA. Lane 1, *T. equigenitalis* NCTC1184<sup>T</sup>; lane 2, Kentucky 188; lane 3, EQ59; lane 4, Aus 1; lane 5, Eng 5, Fr-1; lane 6, Fr-1; lane 7, Swi-5; and lane 8, N-187.

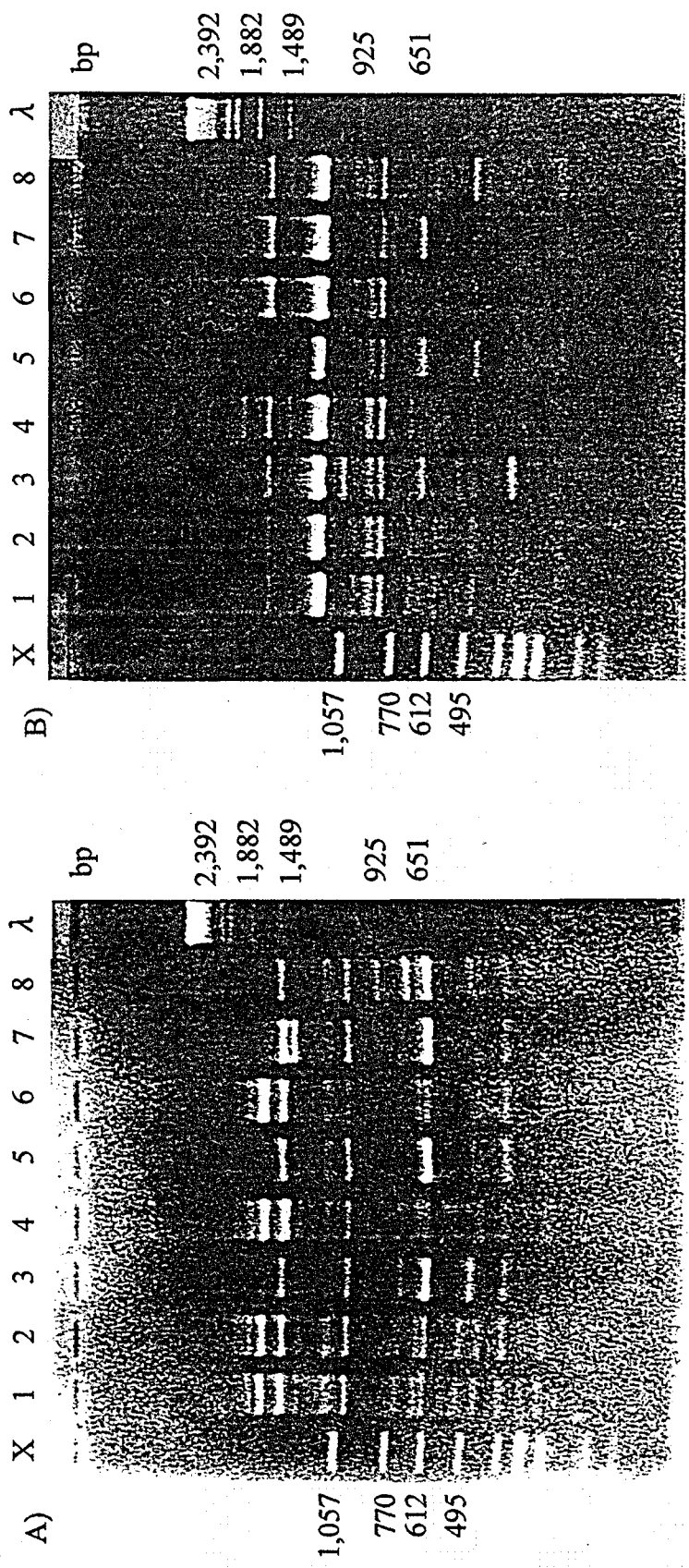


Figure 16 RAPD profiles obtained from strains of *T. equigenitalis* using three kinds of primers. (A) for RAPD using primer 1. (B) primer 2. (C) primer 5. Lane  $\lambda$ ,  $\lambda$ -Eco T14 I / BgIII digest. For lanes X and 1 to 8, refer to legend to Figure 17.

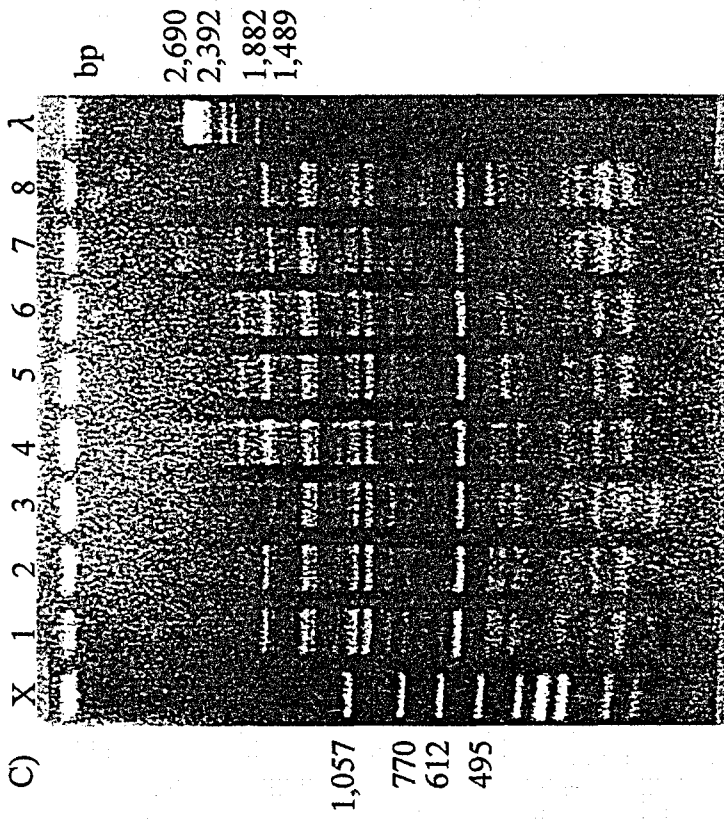


Figure 16  
(continued)



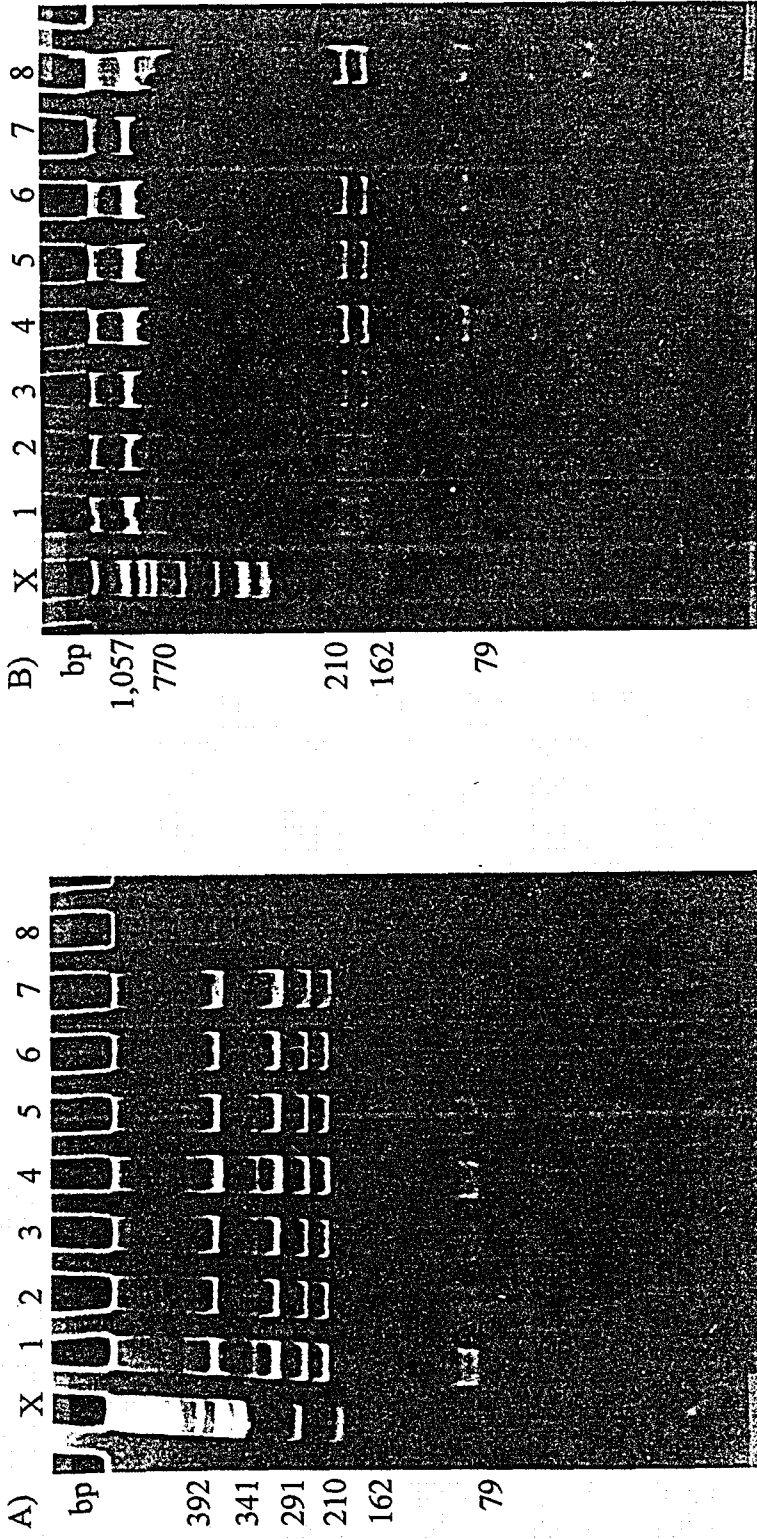


Figure 17 Profiles of ARDRA after digestion with Alu I (A) and with Mbo I (B). For lanes X and 1 to 8, refer to legend to Figures 17 and 18.

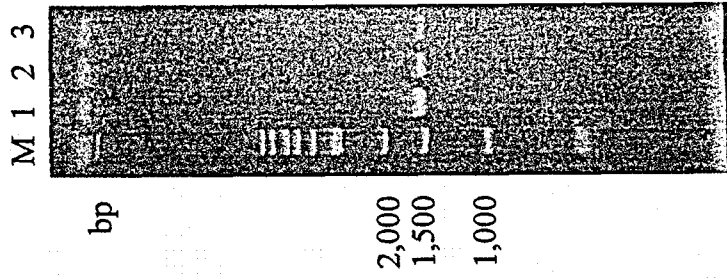


Figure 18 Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified by using a primer pair of fD1 and rD1 for the 16S rDNA of *T. equigenitalis*. Lane M, 1Kb DNA ladder marker. Lane 1, NCTC1184<sup>T</sup>; lane 2, Kentucky 188; and lane 3, EQ59.

```

NCTC11184T      1  ATTGAACGCTAGCGGAATGCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATAGGAGAGCTTGCCTTTTC TTGATGGCGAGTGCCGAACGGGTGAGTAAAGTAT 100
Kentucky188    1  ..... 100
EQ59           1  ..... 100
*****

NCTC11184T    101  CGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACGCCGAAAGCTAGCTACGCCCTGAGGGGGAAAGAGGGGGATCAGAGATGACCTTTTACTA 200
Kentucky188   101  ..... 200
EQ59         101  ..... 200
*****

NCTC11184T    201  TTGAGCGCGCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGCCCTACCAAGCGCAGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGAGCAGCCACAGCCACTGGGACT 300
Kentucky188   201  ..... 300
EQ59         201  ..... 300
*****

NCTC11184T    301  GAGACAGCGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAAATGGGGCAACCCCTGATCTAGCCATCCCGCGTGTGGGATGAGGCCTTC 400
Kentucky188   301  ..... 400
EQ59         301  ..... 400
*****

NCTC11184T    401  GGGTTGTAAAGCAGCTTTGTGAGGGAAAGAAAGTTGTGTTAATACCATGGACTGCTGAGGTTACTGAAATAAAGCACCAGCCGGAATACGTCGCCAGC 500
Kentucky188   401  ..... 500
EQ59         401  ..... 500
*****

NCTC11184T    501  AGCCCGGTAATACGTAAGGTGCGAGGTTAATCGGAATTAATCGGCGTAAAGCGTGGCAGGGGTTCGAAAGAGAGATGTGAATCCAGGGGCTCAA 600
Kentucky188   501  ..... 600
EQ59         501  ..... 600
*****

NCTC11184T    601  CCTGGAACTGCATTTCTAACTGTCGAGCTAGAGTATGTTAGAGGGGGTAGAATCCACGTTAGCAGTGAATCCCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA 700
Kentucky188   601  ..... 700
EQ59         601  ..... 700
*****

```

Figure 19 Nucleotide sequence alignments of almost the full-length of the 16S rDNA sequenced from a British NCTC11184<sup>T</sup>, an American prototype strain, Kentucky 188 and a Japanese strain EQ59 of *T. equigenitalis*.

```

NCTC11184T 701 TGGGAAGCAGCCCTGGGATAAATACGTACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCACGCCCTAAACGATGT 800
Kentucky188 701 ..... 800
EQ59 701 ***** 800

NCTC11184T 801 CAACTAGCTGTGGGACTTACGGGTC TTGGTAGCGAAGCCAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGAGTAGCTGCACAAGANTAAACCTCAAAGGAATTGA 900
Kentucky188 801 ..... 900
EQ59 801 ***** 900

NCTC11184T 901 CGGGACCCGCACAAAGCGTGGGATGATGGGATTAATTCGATGCAACGGCAAAAACCTTACCTACCCCTTGACAATGTTTGGAAATCCTGAAGAGATTAGGA 1000
Kentucky188 901 ..... 1000
EQ59 901 ***** 1000

NCTC11184T 1001 GTGCTGCCAAGAGAACCGAAACACAGGTGCTGATGGCTGCTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGTCAT 1100
Kentucky188 1001 ..... 1100
EQ59 1001 ***** 1100

NCTC11184T 1101 TAGTTCTACAAGTAAGATGGGCACCTTAATAGACTGCCGGTGAATAACCGGAGGAGGTGGGATGAGCTCAAGTCCCTCATGGCCCTATGGGGTAGGG 1200
Kentucky188 1101 ..... 1200
EQ59 1101 ***** 1200

NCTC11184T 1201 CTTACACGTCATACAAATGGTCAGACAGAGGAGCCAAACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAACCTGATCGTAGTCCCGGATGCGAGGCTGCAACTC 1300
Kentucky188 1201 ..... 1300
EQ59 1201 ***** 1300

NCTC11184T 1301 GCCTGCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTTGTACACACCCGCGTACACCATGGGAGTGG 1400
Kentucky188 1301 ..... 1400
EQ59 1301 ***** 1400

NCTC11184T 1401 GTTTTACAGAAAGTAGTTAGTCTAACCGCAAGGAGGGCGGATACCACGGTAGGANTCATGACTGGGGTGAAGTCCGTAACAAGGTAGCCGTAGCGGAAGCT 1500
Kentucky188 1401 ..... 1500
EQ59 1401 ***** 1500

NCTC11184T 1501 GTGGCTGGATCACCTCCT 1518
Kentucky188 1501 ..... 1518
EQ59 1501 ***** 1518

```

Figure 19 (continued)

NCTC11184 1 ATAGAACGCTAGCGGAATGCCCTTACACATGCAAGTCAAGTCAAGGAGAGCTTGCCTTTCTGTGATGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAAGTAT 100  
Kentucky188 1 ..... 100  
EQ59 1 ..... 100  
EQ70 1 ..... 100  
SS28 1 ..... 100  
CEMO12 1 ..... 100  
CEMO13 1 ..... 100  
CEMO14 1 ..... 100  
HH139 1 ..... 100  
Fr-1 1 ..... 100  
Fr-2 1 ..... 100  
Fr-9 1 ..... 100  
Fr-10 1 ..... 100  
Aus1 1 ..... 100  
Aus2 1 ..... 100  
Aus3 1 ..... 100  
Aus4 1 ..... 100  
Aus5 1 ..... 100  
Aus6 1 ..... 100  
Aus7 1 ..... 100  
\*\*\*\*\*

NCTC11184 101 CGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATACACGGAAGCGTAGCT-AATACCGCATACGCCCTGAGGGGAAAGAGGGGATCGAGATGACCTTTTACT 199  
Kentucky188 101 ..... 199  
EQ59 101 ..... 199  
EQ70 101 ..... 199  
SS28 101 ..... 199  
CEMO12 101 ..... 199  
CEMO13 101 ..... 199  
CEMO14 101 ..... 199  
HH139 101 ..... 199  
Fr-1 101 ..... 198  
Fr-2 101 ..... 198  
Fr-9 101 ..... 198  
Fr-10 101 ..... 198  
Aus1 101 ..... 200  
Aus2 101 ..... 200  
Aus3 101 ..... 200  
Aus4 101 ..... 200  
Aus5 101 ..... 200  
Aus6 101 ..... 200  
Aus7 101 ..... 200  
\*\*\*\*\*

Figure 20 Nucleotide sequence alignments of the 16S rDNA from 20 *T. equigenitalis* isolates.

NCTC11184 200 ATTGGAGCGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCCTACCAAGCGGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCACACTGGGAC 299  
 Kentucky188 200 ..... 299  
 EQ59 200 ..... 299  
 EQ70 200 ..... 299  
 SS28 200 ..... 299  
 CEMO12 200 ..... 299  
 CEMO13 200 ..... 299  
 CEMO14 200 ..... 299  
 HH139 200 ..... 299  
 Fr-1 199 ..... 298  
 Fr-2 199 ..... 298  
 Fr-9 199 ..... 298  
 Fr-10 199 ..... 298  
 Aus1 201 ..... 299  
 Aus2 201 ..... 299  
 Aus3 201 ..... 299  
 Aus4 201 ..... 299  
 Aus5 201 ..... 299  
 Aus6 201 ..... 299  
 Aus7 201 ..... 299  
 \*\*\*\*\*

NCTC11184 300 TGAGACGCGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCGTGATTCGCCATTCCCGCTGTGGGATTGAAGGCCTT 399  
 Kentucky188 300 ..... 399  
 EQ59 300 ..... 399  
 EQ70 300 ..... 399  
 SS28 300 ..... 399  
 CEMO12 300 ..... 399  
 CEMO13 300 ..... 399  
 CEMO14 300 ..... 399  
 HH139 300 ..... 399  
 Fr-1 299 ..... 398  
 Fr-2 299 ..... 398  
 Fr-9 299 ..... 398  
 Fr-10 299 ..... 398  
 Aus1 300 ..... 399  
 Aus2 300 ..... 399  
 Aus3 300 ..... 399  
 Aus4 300 ..... 399  
 Aus5 300 ..... 399  
 Aus6 300 ..... 399  
 Aus7 300 ..... 399  
 \*\*\*\*\*

Figure 20 (continued, 1)

```

NCTC11184      400 CGGGTTGTAAGCACTTTTGTTCAGGGAAGAAAGGTTTGTGTTAATACCATGGACTGCTGACGGTACCTGAAGAAATAGCACCGGCAAACTACGTGCCAG 499
Kentucky188    400 .....G..... 499
EQ59           400 ..... 499
EQ70           400 ..... 499
SS28           400 ..... 499
CEM012        400 ..... 499
CEM013        400 ..... 499
CEM014        400 ..... 499
HH139        400 ..... 499
Fr-1          399 ..... 498
Fr-2          399 ..... 498
Fr-9          399 ..... 498
Fr-10         399 ..... 498
Aus1          400 ..... 499
Aus2          400 ..... 499
Aus3          400 ..... 499
Aus4          400 ..... 499
Aus5          400 ..... 499
Aus6          400 ..... 499
Aus7          400 ..... 499
***** 499

NCTC11184      500 CAGCCGGTAATACGTAGGGTGGAGCGTTAATCGGAATTAATCGGCTAAACCGTGGCCAGCGGTTTCGGAAGAGAGATGTGAATCCAGGGCTCA 599
Kentucky188    500 ..... 599
EQ59           500 ..... 599
EQ70           500 ..... 599
SS28           500 ..... 599
CEM012        500 ..... 599
CEM013        500 ..... 599
CEM014        500 ..... 599
HH139        500 ..... 599
Fr-1          499 ..... 598
Fr-2          499 ..... 598
Fr-9          499 ..... 598
Fr-10         499 ..... 598
Aus1          500 ..... 599
Aus2          500 ..... 599
Aus3          500 ..... 599
Aus4          500 ..... 599
Aus5          500 ..... 599
Aus6          500 ..... 599
Aus7          500 ..... 599
***** 599

```

Figure 20 (continued, 2)

NCTC11184 600 ACCTGGAACTGCATTTCTAATCTGTCGAGCTAGAGTATGTTAGAGGGGGGTAGAAATCCACCGTGTAGCAGTGAATCGGTTAGAGATCTGGAGGAAATACCG 699  
 Kentucky188 600 ..... 699  
 EQ59 600 ..... 699  
 EQ70 600 ..... 699  
 SS28 600 ..... 699  
 CEMO12 600 ..... 699  
 CEMO13 600 ..... 699  
 CEMO14 600 ..... 699  
 HH139 600 ..... 699  
 Fr-1 599 ..... 698  
 Fr-2 599 ..... 698  
 Fr-9 599 ..... 698  
 Fr-10 599 ..... 698  
 Aus1 600 ..... 699  
 Aus2 600 ..... 699  
 Aus3 600 ..... 699  
 Aus4 600 ..... 699  
 Aus5 600 ..... 699  
 Aus6 600 ..... 699  
 Aus7 600 ..... 699  
 \*\*\*\*\*

NCTC11184 700 ATGGGAGGACGCCCCCTGGGATAAATACTGACCTGATGACGAAACCGTGGGGAGCAACAGGATAGATACCCTGGTGTCCACGCCCTAAACGATG 799  
 Kentucky188 700 ..... 799  
 EQ59 700 ..... 799  
 EQ70 700 ..... 799  
 SS28 700 ..... 799  
 CEMO12 700 ..... 799  
 CEMO13 700 ..... 799  
 CEMO14 700 ..... 799  
 HH139 700 ..... 799  
 Fr-1 699 ..... 798  
 Fr-2 699 ..... 798  
 Fr-9 699 ..... 798  
 Fr-10 699 ..... 798  
 Aus1 700 ..... 799  
 Aus2 700 ..... 799  
 Aus3 700 ..... 799  
 Aus4 700 ..... 799  
 Aus5 700 ..... 799  
 Aus6 700 ..... 799  
 Aus7 700 ..... 799  
 \*\*\*\*\*

Figure 20 (continued, 3)



NCTC11184 800 TCAACTAGCTGTGGGACTTACGGGTCCTGGTAGCGAAGCCACGGGTGAAGTTGACCCGCTGGGAGTACGGTCCCAAGATTAATAACTCAAGGAATTG 899  
 Kentucky188 800 ..... 899  
 EQ59 800 ..... 899  
 EQ70 800 ..... 899  
 SS28 800 ..... 899  
 CEMO12 800 ..... 899  
 CEMO13 800 ..... 899  
 CEMO14 800 ..... 899  
 HH139 800 ..... 899  
 Fr-1 799 ..... 898  
 Fr-2 799 ..... 898  
 Fr-9 799 ..... 898  
 Fr-10 799 ..... 898  
 Aus1 800 ..... 899  
 Aus2 800 ..... 899  
 Aus3 800 ..... 899  
 Aus4 800 ..... 899  
 Aus5 800 ..... 899  
 Aus6 800 ..... 899  
 Aus7 800 ..... 899  
 \*\*\*\*\*

NCTC11184 900 ACGGGACCCGACAAAGCGGTGGATGATGGATTAAATTCGATGCAACGGGAAACCTTACCTTACCCCTTGACATGTTTGGAACTCTGAAGAGATTAGG 999  
 Kentucky188 900 ..... 999  
 EQ59 900 ..... 999  
 EQ70 900 ..... 999  
 SS28 900 ..... 999  
 CEMO12 900 ..... 999  
 CEMO13 900 ..... 999  
 CEMO14 900 ..... 999  
 HH139 900 ..... 999  
 Fr-1 899 ..... 997  
 Fr-2 899 ..... 997  
 Fr-9 899 ..... 997  
 Fr-10 899 ..... 997  
 Aus1 900 ..... 999  
 Aus2 900 ..... 999  
 Aus3 900 ..... 999  
 Aus4 900 ..... 999  
 Aus5 900 ..... 999  
 Aus6 900 ..... 999  
 Aus7 900 ..... 999  
 \*\*\*\*\*

Figure 20 (continued, 4)

NCTC11184 1000 AGTGCTCGCAAGAGAACCGAAACACACAGGTGCTGCATGGCTGTGGTCACTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCA 1099  
 Kentucky188 1000 ..... 1099  
 EQ59 1000 ..... 1099  
 EQ70 1000 ..... 1099  
 SS28 1000 ..... 1099  
 CEM012 1000 ..... 1099  
 CEM013 1000 ..... 1099  
 CEM014 1000 ..... 1099  
 HH139 1000 ..... 1099  
 Fr-1 998 ..... 1097  
 Fr-2 998 ..... 1097  
 Fr-9 998 ..... 1097  
 Fr-10 998 ..... 1097  
 Aus1 1000 ..... 1099  
 Aus2 1000 ..... 1099  
 Aus3 1000 ..... 1099  
 Aus4 1000 ..... 1099  
 Aus5 1000 ..... 1099  
 Aus6 1000 ..... 1099  
 Aus7 1000 ..... 1099  
 \*\*\*\*\*

NCTC11184 1100 TTAGTGTCTACAGTAAGATGGGCACCTCTAATGAGACTGCCGCTGATAAACCGGAGGATGGGGATGACCTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGG 1199  
 Kentucky188 1100 ..... 1199  
 EQ59 1100 ..... 1199  
 EQ70 1100 ..... 1199  
 SS28 1100 ..... 1199  
 CEM012 1100 ..... 1199  
 CEM013 1100 ..... 1199  
 CEM014 1100 ..... 1199  
 HH139 1100 ..... 1197  
 Fr-1 1098 ..... 1197  
 Fr-2 1098 ..... 1197  
 Fr-9 1098 ..... 1197  
 Fr-10 1098 ..... 1197  
 Aus1 1100 ..... 1199  
 Aus2 1100 ..... 1199  
 Aus3 1100 ..... 1199  
 Aus4 1100 ..... 1199  
 Aus5 1100 ..... 1199  
 Aus6 1100 ..... 1199  
 Aus7 1100 ..... 1199  
 \*\*\*\*\*

Figure 20 (continued, 5)

NCTC11184 1200 GCTTCACAGCTCATACAAATGGTCAGGACAGAGGAGCCAAACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAACCTGATCTCCGGATTCCAGGGTGCACACT 1299  
 Kentucky188 1200 ..... 1299  
 EQ59 1200 ..... 1299  
 EQ70 1200 ..... 1299  
 SS28 1200 ..... 1299  
 CEMO12 1200 ..... 1299  
 CEMO13 1200 ..... 1299  
 CEMO14 1200 ..... 1299  
 HH139 1200 ..... 1241  
 Fr-1 1198 ..... 1297  
 Fr-2 1198 ..... 1297  
 Fr-9 1198 ..... 1297  
 Fr-10 1198 ..... 1297  
 Aus1 1200 ..... 1299  
 Aus2 1200 ..... 1299  
 Aus3 1200 ..... 1299  
 Aus4 1200 ..... 1299  
 Aus5 1200 ..... 1299  
 Aus6 1200 ..... 1299  
 Aus7 1200 ..... 1299  
 \*\*\*\*\*

NCTC11184 1300 CGCCTGCATGATCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGGGTGAAATACGTCCCGGGTCTGTACACACCGCCGTCACACCAATGGGAGTG 1399  
 Kentucky188 1300 ..... 1399  
 EQ59 1300 ..... 1399  
 EQ70 1300 ..... 1399  
 SS28 1300 ..... 1399  
 CEMO12 1300 ..... 1399  
 CEMO13 1300 ..... 1399  
 CEMO14 1300 ..... 1399  
 HH139 1300 ..... 1397  
 Fr-1 1298 ..... 1397  
 Fr-2 1298 ..... 1397  
 Fr-9 1298 ..... 1397  
 Fr-10 1298 ..... 1397  
 Aus1 1300 ..... 1399  
 Aus2 1300 ..... 1399  
 Aus3 1300 ..... 1399  
 Aus4 1300 ..... 1399  
 Aus5 1300 ..... 1399  
 Aus6 1300 ..... 1399  
 Aus7 1300 ..... 1399

Figure 20 (continued, 6)

NCTC11184 1200 GCTTCACACGTCATACAAATGGTTCAGGACAGAGGGAAGCCAAACCAGGAGTGGAGCTAAATCTCACAAACCCTGATCGTAGTCCGGATTCGAGGCTGCAACT 1299  
 Kentucky188 1200 ..... 1299  
 EQ59 1200 ..... 1299  
 EQ70 1200 ..... 1299  
 SS28 1200 ..... 1299  
 CEMO12 1200 ..... 1299  
 CEMO13 1200 ..... 1299  
 CEMO14 1200 ..... 1299  
 HH139 1200 ..... 1241  
 Fr-1 1198 ..... 1297  
 Fr-2 1198 ..... 1297  
 Fr-9 1198 ..... 1297  
 Fr-10 1198 ..... 1297  
 Aus1 1200 ..... 1299  
 Aus2 1200 ..... 1299  
 Aus3 1200 ..... 1299  
 Aus4 1200 ..... 1299  
 Aus5 1200 ..... 1299  
 Aus6 1200 ..... 1299  
 Aus7 1200 ..... 1299  
 \*\*\*\*\* 1299

NCTC11184 1300 CGCCTGCATGAGTCGGGAATCGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTTGTACACACCCCGTCACACCATGGGAGTG 1399  
 Kentucky188 1300 ..... 1399  
 EQ59 1300 ..... 1399  
 EQ70 1300 ..... 1399  
 SS28 1300 ..... 1399  
 CEMO12 1300 ..... 1399  
 CEMO13 1300 ..... 1399  
 CEMO14 1300 ..... 1399  
 HH139 1300 ..... 1399  
 Fr-1 1298 ..... 1397  
 Fr-2 1298 ..... 1397  
 Fr-9 1298 ..... 1397  
 Fr-10 1298 ..... 1397  
 Aus1 1300 ..... 1399  
 Aus2 1300 ..... 1399  
 Aus3 1300 ..... 1399  
 Aus4 1300 ..... 1399  
 Aus5 1300 ..... 1399  
 Aus6 1300 ..... 1399  
 Aus7 1300 ..... 1399  
 \*\*\*\*\* 1399

Figure 20 (continued, 6)

NCTC11184	1400	GGTTTACCAGAAGTAGTTAGTCTTAACCGCAAGGAGGGCGGATTACACCGGTAGGATTCATGACTGGGTGAAGTCGTATACAGGTAGCCGTAGCGGAAGC	1499
Kentucky188	1400	.....	1499
EQ59	1400	.....	1499
EQ70	1400	.....	1497
SS28	1400	.....	1499
CEMO12	1400	.....	1497
CEMO13	1400	.....	1497
CEMO14	1400	.....	1497
HH139			
Fr-1	1398	.....	1497
Fr-2	1398	.....	1497
Fr-9	1398	.....	1497
Fr-10	1398	.....	1497
Aus1	1400	.....	1497
Aus2	1400	.....	1497
Aus3	1400	.....	1497
Aus4	1400	.....	1497
Aus5	1400	.....	1497
Aus6	1400	.....	1497
Aus7	1400	.....	1497

NCTC11184	1500	GTGGCTGGATCACCTCCT	1517
Kentucky188	1500	.....	1517
EQ59	1500	.....	1517
EQ70	1498	.....	
SS28	1500	.....	1517
CEMO12	1498	.....	
CEMO13	1498	.....	
CEMO14	1498	.....	
HH139			
Fr-1	1498	.....	1515
Fr-2	1498	.....	1515
Fr-9	1498	.....	1515
Fr-10	1498	.....	1515
Aus1	1498	.....	
Aus2	1498	.....	
Aus3	1498	.....	
1499			
Aus4	1498	.....	
Aus5	1498	.....	
Aus6	1498	.....	
Aus7	1498	.....	

Figure 20 (continued, 7)

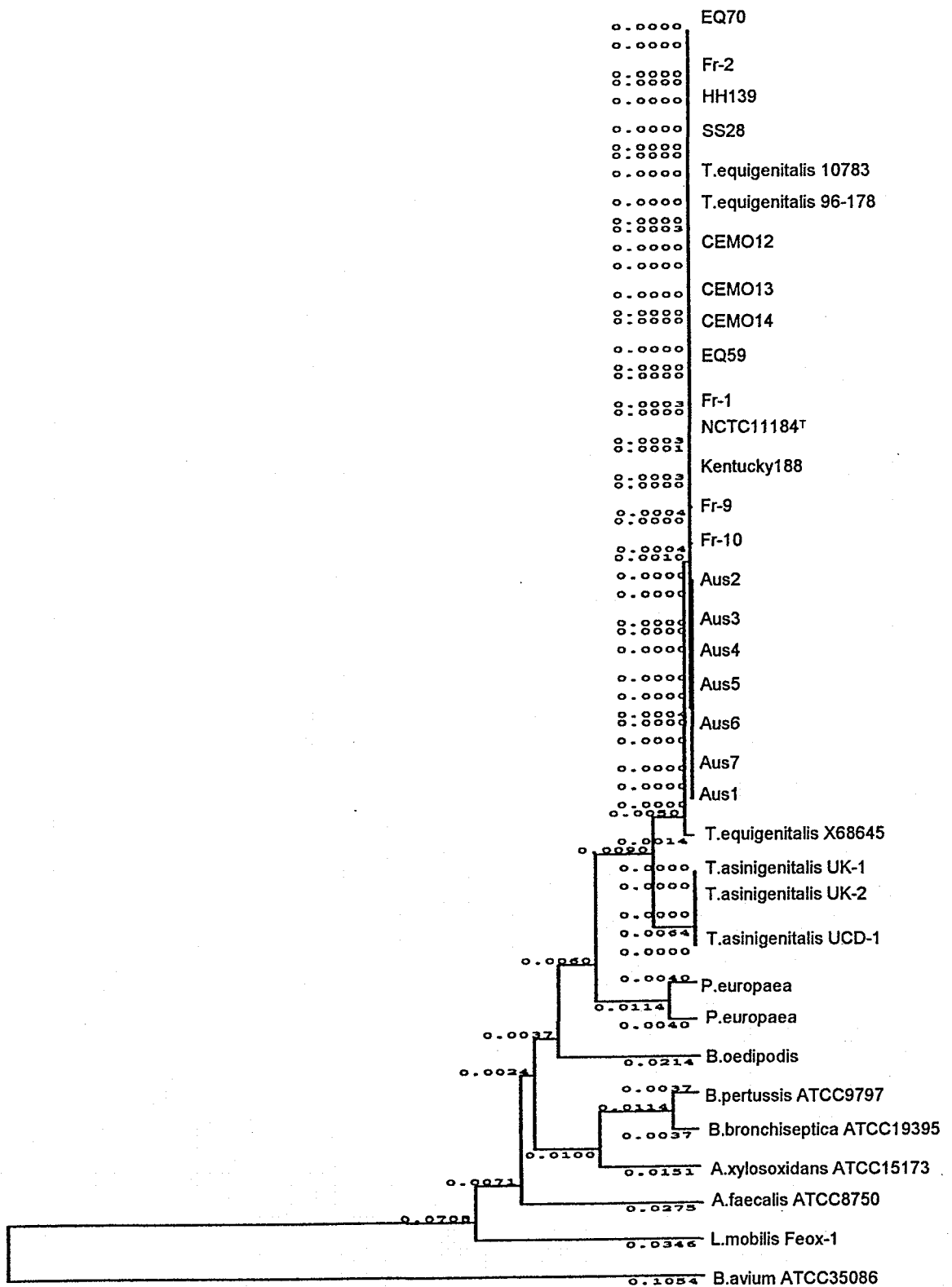


Figure 21 A phylogenetic tree by the UPGMA based on sequence similarity data of the 16S rDNA showing the positions of *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* and various members of the  $\beta$ -Proteobacteria.

```

NISR-A      1  GAITCATGCTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGCGGAAGCTGTGCGTATCACCTCTTTAAGAGAAATAAATAAAGTGTCTATATAGGTTTA-T 99
KISR-A      1  ..... 99
EISR-A      1  ..... 100
NISR-B      1  .....T 100
KISR-B      1  .....T 88
EISR-B      1  .....T 88
*****
NISR-A     100  TAGATTTAGATTAAAGCGCTAAATCACGATATCCACCGTATCCAGCGTTTATTAAGAGAGAGAAAAGA-CAGCTAAAGAAAAGAAAGATATGACAGATTA 198
KISR-A     100  .....A..... 198
EISR-A     101  .....C..... 197
NISR-B      89  .....C..... 137
KISR-B      89  .....C..... 137
EISR-B      89  .....C..... 137
*****
NISR-A     199  GGGTCAGTAGCTAGTCGCTAGAGCAGCCGCTGTGATGAGGCGGGGTGTGCTGCGATCCAGCTTGCACCCACCAAGAGANGACTTTGATCAATTAAG 298
KISR-A     199  .....C..... 298
EISR-A     198  .....C..... 297
NISR-B     138  .....C..... 237
KISR-B     138  .....C..... 237
EISR-B     138  .....C..... 237
*****
NISR-A     299  TATAATGGGGATATAGCTCAGTTGGAGAGGCGCTCTTTGACGACGAGAGGTGTGGTGGATCCCGTCAATCCACCBACACTTTAGGTG-T-GT 396
KISR-A     299  .....C..... 396
EISR-A     298  .....C..... 395
NISR-B     238  .....C.....A.AC..A.A.- 336
KISR-B     238  .....C.....A.AC..A.A.- 336
EISR-B     238  .....C.....A.AC..A.A.- 336
*****
NISR-A     397  GTATGCTCTCTAGTATAGTAGTATGATTCACAAAAGAT-GTT-T-TATAAGCGGTATTTAGTGTGACTTATGCTGACCTT-ATAAGT 492
KISR-A     397  ..... 492
EISR-A     396  ..... 491
NISR-B     337  -T.TT..C..C.C.-T..T..A..... 398
KISR-B     337  -T.TT..C..C.C.-T..T..A..... 398
EISR-B     337  -T.TT..C..C.C.-T..T..A..... 398
*****

```

Figure 22 Nucleotide sequence alignments of the 16S-23S rDNA ISR sequenced from a British NCTC1184<sup>T</sup>, an American prototype strain, Kentucky 188 and a Japanese strain EQ59 of *I. equigenitalis*. Dots indicate identical bases; changes are so indicated, positions identical in all strains are marked by asterisk; two tRNA genes for tRNA<sup>Leu</sup> and tRNA<sup>Ala</sup> are underlined, respectively. Numbers at the left and right refer to base pairs of the amplicons containing of 16S-23S rDNA ISRs.

```

NISR-A 493 ATCTTAAGATGCTTTAAGCGTGTCTTTAACAATTTGGAGAAGCAACAAGTAAACACGAAAAAGAGTTGTGTAAGTGTGTAAGGTGCCACTA 592
NISR-A 493 ..... 592
NISR-A 499 ..... 591
NISR-B 399 ..... 498
NISR-B 399 ..... 498
NISR-B 399 ..... 498
***** * * * *
NISR-A 593 FATGGTCTTGATAGTACTTACAATTACCCCTTTTAAATTTTAGSGTGTGATTCGATATTAAGAAAACACAAACGAAAAATAAGCFTTTAATAAAAAAG 692
NISR-A 593 ..... 692
EISR-A 592 .....G..G..... 691
NISR-B 499 ..... 598
NISR-B 499 ..... 598
NISR-B 499 .....G..G..... 598
***** * * * *
NISR-A 693 CTTAAGTGAAGTTTTTAAGAAGAAGAAGTCTCAAGTTTTTAGAAAATTTCAAAAAGTGAAGCGCGGTAAA-AAAAATAATAAGACGGGATACTC 791
NISR-A 693 ..... 791
EISR-A 692 .....-..... 790
NISR-B 599 .....-..A..... 697
NISR-B 599 .....-..T..... 697
NISR-B 599 .....-..A..... 698
***** * * * *
NISR-A 792 AABAAGAGAGATTAAGTACTGAGAGCTCTTGCTTTAATAAAAAGTAGGTAGGTGAGGTTTAAAGAGTAGCGGTATCAGTTTTTTTGTATAAAGCTG 891
NISR-A 792 ..... 891
EISR-A 791 ..... 890
NISR-B 698 ..... 797
NISR-B 698 ..... 797
NISR-B 699 ..... 798
***** * * * *
NISR-A 892 ATATPAGCGATAGTCTAATGPAAGCGCTAATAGTAGTCTGCTAGTACTGCTAGTACTAGTACTTAAATGPAAGGACTGATGAGTTATAGGA 991
NISR-A 892 .....T..... 991
EISR-A 891 .....TA..... 990
NISR-B 798 ..... 897
NISR-B 798 ..... 897
NISR-B 799 .....T..... 898
***** * * * *
NISR-A 992 TCAAGTCACTAAGTGCACATGTTGGATGCTTGCC 1026
NISR-A 992 ..... 1026
EISR-A 991 ..... 1025
NISR-B 898 ..... 932
NISR-B 898 ..... 932
EISR-B 899 ..... 933
***** * * * *

```

Figure 22 (continued)



```

NISR-A 1' ATAAAGAGGT AGAGATACTT AATGAAAGAG ACACGTGATGA AGTTATAGGA TCAAGTGACT AAGTGCACAT GGTGGATGCC TTGGC
Aeromonas hydrophila (X67946)
GG TTAAGTGGCT AAGCGTACAT GGTGGATGCC TTGGCAGTCA GAGGGGATGA

NISR-A 1' ATAAAGAGGT AGAGATACTT AATGAAAGAG ACACGTGATGA AGTTATAGGA TCAAGTG-AC TAAGTGCACA TGGTGGATGC CTGGC
filamentous photosynthetic Bacterium F198-6 (AB090955)
AA TCAAGCGCGA GAAGGCGGTT TGGTGAANTGC CTAGGCAGTA AGAGGGGATG

NISR-A 1' ATAAAGAGGT AGAGATACTT AATGAAAGAG ACACGTGATGA AGTTATAGGA TCAAGTGACT AAGTGCACAT GGTGGATGCC TTGGC
Plesiomonas shigelloides (X65487)
GG TTAAGTGACT AAGCGTACAC GGTGGATGCC TTGGCAGTCA GAGGGGATGA

NISR-A 1' ATAAAGAGGT AGAGATACTT AATGAAAGAG ACACGTGATGA AGTTATAGGA TCAAGTGACT AAGTGCACAT GGTGGATGCC TTGGC
Pseudomonas aeruginosa (AE004883)
GG TCAAGTGAAG AAGCGCATAAC GGTGGATGCC TTGGCAGTCA GAGGGGATGA

NISR-A 1' ATAAAGAGGT AGAGATACTT AATGAAAGAG ACACGTGATGA AGTTATAGGA TCAAGTGACT AAGTGCACAT GGTGGATGCC TTGGC
Streptomyces scabies (AB042782)
GG CCAAGTTTTT AAGGCGCG

```

Figure 23 Nucleotide sequence alignments analysis of the ISR sequences with the 5' end sequences of the 23S rDNA from several bacterial species. The accession numbers of the sequences used in the present study are shown in the parentheses.

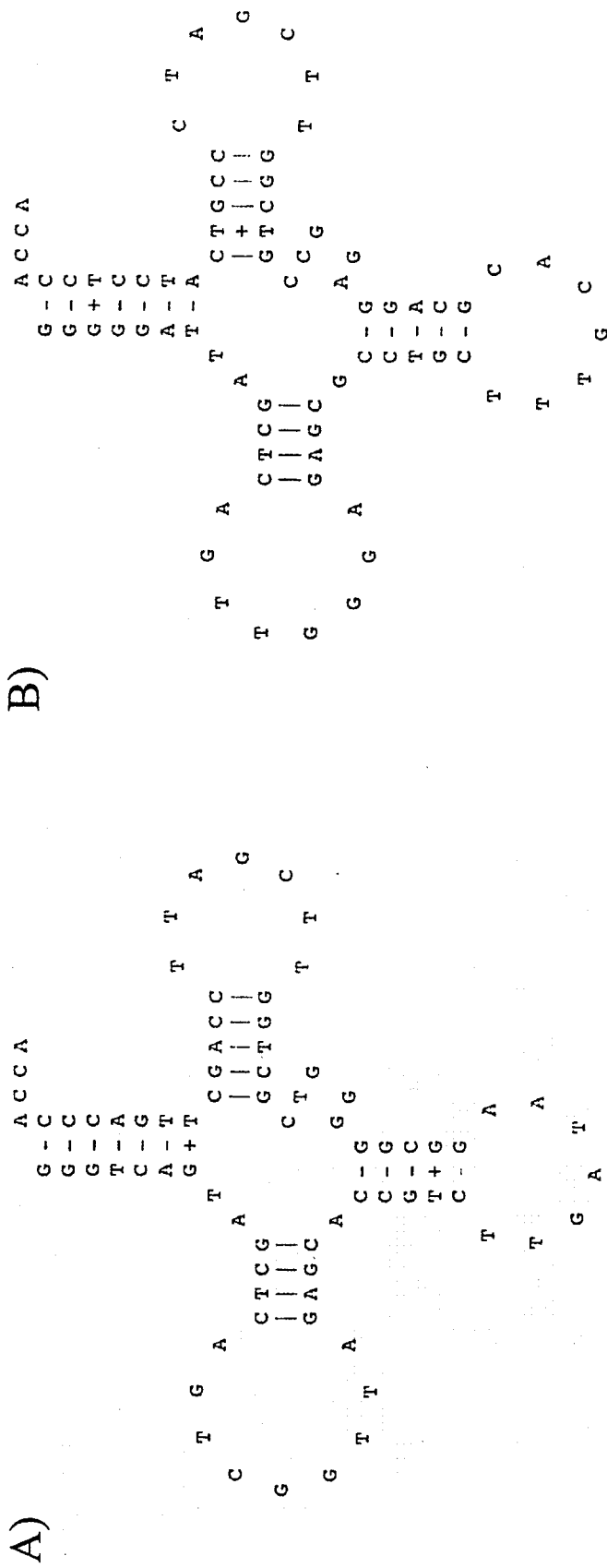


Figure 24 Secondary structures of tRNA<sup>Ile</sup> (A) and tRNA<sup>Ala</sup> (B) genes in the 16S-23S rDNA ISR from *T. equigenitalis* EQ59.

```

NISRA      1 GATTCACTGGGGTGAAGTCTAACAAAGGTAGCCGTAGCGGAAAGCTGTGGGATCACCTCCTTTAAAGAAATAAAAAGTGTCATATATGGTTTA-T 99
KISRA      1 ..... 99
EISRA      1 .....T. 100
EQ70A      1 .....T. 100
SS28A      1 .....T. 100
CEM013A    1 .....T. 100
CEM014A    1 .....T. 100
HH139A     1 .....T. 100
04099A     1 .....T. 100
FlA        1 ..... 99
Aus1A      1 ..... 99
SwiA       1 ..... 99
N184A      1 ..... 99
NISRB      1 .....-C.-----T. 88
KISRB      1 .....-C.-----T. 88
EISRB      1 .....-C.-----T. 88
EQ70B      1 .....-C.-----T. 88
SS28B      1 .....-C.-----T. 88
CEM013B    1 .....-C.-----T. 88
CEM014B    1 .....-C.-----T. 88
HH139B     1 .....-C.-----T. 88
04099B     1 .....-C.-----T. 88
FlB        1 .....-C.-----T. 88
Aus1B      1 .....-C.-----T. 88
SwiB       1 .....-C.-----T. 88
N184B      1 .....-C.-----T. 88
***** ** ** **

```

Figure 25 Nucleotide sequence alignments of 16S-23S rDNA ISRs sequenced from the 13 *T. equigenitlis* isolates.



```

NISRA      199 GGGTCAGTAGCTCAGTCGGTTAGACACCGCTTTCATTAAGCGGGGGTGCCTGCTTCCAGCTTGACCCACCACATGAGATGACTTTGATCAATTAAAG 298
KISRA      198 .....C..... 298
EISRA      198 .....C..... 297
EQ70A      198 .....C..... 297
SS28A      198 .....C..... 297
CEMO13A    198 .....C..... 297
CEMO14A    198 .....C..... 297
HH139A     198 .....C..... 297
04099A     197 .....C..... 296
FrlA       199 .....C..... 298
Aus1A      199 .....C..... 298
Sw1A       199 .....C..... 298
N184A     199 .....C..... 298
NISRB      138 .....C..... 237
KISRB      138 .....C..... 237
EISRB      138 .....C..... 237
EQ70B     138 .....C..... 237
SS28B     138 .....C..... 237
CEMO13B    138 .....C..... 237
CEMO14B    138 .....C..... 237
HH139B     138 .....C..... 237
04099B     138 .....C..... 237
FrlB       138 .....C..... 237
Aus1B      138 .....C..... 237
Sw1B       138 .....C..... 237
N184B     138 .....C..... 237
*****

```

Figure 25 (continued, 2)

NISRA	299	TATATGGGGGATTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGTGGTTCGATCCCTCATCTCCACACACACTTTTAGGTG-T-GT	396
KISRA	299	.....	396
EISRA	298	.....C.....	395
EQ70A	298	.....C.....	395
SS28A	298	.....C.....	395
CEM013A	298	.....C.....	395
CEM014A	298	.....C.....	395
HH139A	298	.....C.....	395
04099A	297	.....C.....	394
FrlA	299	.....	396
Aus1A	299	.....	396
Sw1A	299	.....	396
N184A	299	.....	396
NISRB	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
KISRB	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
EISRB	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
EQ70B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
SS28B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
CEM013B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
CEM014B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
HH139B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
04099B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
FrlB	238	.....C.....	336
Aus1B	238	.....C.....	336
Sw1B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336
N184B	238	.....C.....A.AC..A.A.-	336

\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

Figure 25 (continued, 3)



NISRA	493	ATCTTTAAGATGCTTTAAGGCTGTTCTTTAACAATTTGGAGAAGCACACAACGAAAAAGAGGTTGTGTAAGTGTGTAAGTGCCACTA	592
KISRA	493	.....	592
EISRA	492	.....	591
EQ70A	492	.....	591
SS28A	492	.....	591
CEM013A	492	.....	591
CEM014A	492	.....	591
HH139A	492	.....	591
04099A	491	.....	590
FrlA	493	.....	592
Aus1A	493	.....	592
Sw1A	493	.....	592
NI84A	493	.....	592
NISRB	399	.....	498
KISRB	399	.....	498
EISRB	399	.....	498
EQ70B	399	.....	498
SS28B	399	.....	498
CEM013B	399	.....	498
CEM014B	399	.....	498
HH139B	399	.....	498
04099B	399	.....	498
FrlB	399	.....	498
Aus1B	399	.....	498
Sw1B	399	.....	498
NI84B	399	.....	498

\*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\*

Figure 25 (continued, 5)



```

NISRA      593  TATGGTCTTGATAGTACTTACAAATACCCCTTTTAAATTTTATGGGTTGATTCACATAATTAAGAPAAACACAAACGAAAAATAAGCTTTTAAATAAAAAG 692
KISRA      593  ..... 692
EISRA      592  .....G.G..... 691
EQ70A      592  .....G.G..... 691
SS28A      592  .....G.G..... 691
CEMO13A    592  .....G.G..... 691
CEMO14A    592  .....G.G..... 691
HH139A     592  .....G.G..... 691
04099A     591  .....G.G..... 690
Fr1A       593  ..... 692
Aus1A      593  ..... 692
Sw1A       593  ..... 692
NL84A      593  ..... 692
NISRB      499  ..... 598
KISRB      499  .....G.G.....G..... 598
EISRB      499  .....G.G.....G..... 598
EQ70B      499  .....G.G.....G..... 598
SS28B      499  .....G.G.....G..... 598
CEMO13B    499  .....G.G.....G..... 598
CEMO14B    499  .....G.G.....G..... 598
HH139B     499  .....G.G.....G..... 598
04099B     499  .....G.G.....G..... 598
Fr1B       499  ..... 598
Aus1B      499  ..... 598
Sw1B       499  ..... 598
NL84B      499  ..... 598
***** ** *****

```

Figure 25 (continued, 6)

```

NISRA      693 CTTAAGTGAATTTTTTAAGAAAGAAAGTCTCTCAAGTTTGTAGAAATATTTCTAAAAAGTGTAGCGCGGTAAA-AAAAATAAATAAGACGCGTACTC 791
KISRA      693 .....-..... 791
EISRA      692 .....-..... 790
EQ70A      692 .....-..... 790
SS28A      692 .....-..... 790
CEM013A    692 .....-..... 790
CEM014A    692 .....-..... 790
HH139A     692 .....-..... 790
04099A     691 .....-..... 789
Fl1A       693 .....-..... 791
Aus1A      693 .....-..... 791
Sw1A       693 .....-..... 791
N184A      693 .....-..... 791
NISRB      599 .....-..A..... 697
KISRB      599 .....-..T..... 697
EISRB      599 .....-..A..... 698
EQ70B      599 .....-..A..... 698
SS28B      599 .....-..A..... 698
CEM013B    599 .....-..A..... 698
CEM014B    599 .....-..A..... 698
HH139B     599 .....-..A..... 698
04099B     599 .....-..A..... 698
Fl1B       599 .....-..T..... 697
Aus1B      599 .....-..T..... 697
Sw1B       599 .....-..T..... 697
N184B      599 .....-..T..... 697
*****
*****
***** ** *****

```

Figure 25 (continued, 7)

NISRA	792	AAAAGAAGAGATTA	792	AAAGAGAAAGCTCTTGCTTTAATAAAAAGGTAGGGTAGGGTTTAAAGAAAGGTACTCGGTGTATCAGTTTTTTTCATAAAGCTG	891
KISRA	791	.....	791	.....	891
EISRA	791	.....	791	.....	890
EQ70A	791	.....	791	.....	890
SS28A	791	.....	791	.....	890
CEM013A	791	.....	791	.....	890
CEM014A	791	.....	791	.....	890
HH139A	791	.....	791	.....	890
04099A	790	.....	790	.....	889
Fr1A	792	.....	792	.....	891
Aus1A	792	.....	792	.....	891
Sw1A	792	.....	792	.....	891
N184A	792	.....	792	.....	891
NISRB	698	.....	698	.....	797
KISRB	698	.....	698	.....	797
EISRB	699	.....	699	.....	798
EQ70B	699	.....	699	.....	798
SS28B	699	.....	699	.....	798
CEM013B	699	.....	699	.....	798
CEM014B	699	.....	699	.....	798
HH139B	699	.....	699	.....	798
04099B	699	.....	699	.....	798
Fr1B	698	.....	698	.....	797
Aus1B	698	.....	698	.....	797
Sw1B	698	.....	698	.....	797
N184B	698	.....	698	.....	797
				*****	

Figure 25 (continued, 8)

NISRA	892	ATATAAAGCGATAGTCAAATGAAAGAGGCTATAAAGTAGTAGTACGTCGGTGTACATAAAGAGGAGGTAGAGATACTTAATGAAGAAGACACACTGATGAAGTTATAGGA	991
KISRA	892	.....T.....	991
EISRA	891	.....TA.....	990
EQ70A	891	.....TA.....	990
SS28A	891	.....TA.....	990
CEMO13A	891	.....TA.....	990
CEMO14A	891	.....TA.....	990
HHL39A	891	.....TA.....	990
04099A	890	.....TA.....	989
FLJA	892	.....T.....	991
Aus1A	892	.....T.....	991
SW1A	892	.....T.....	991
N184A	892	.....T.....	991
NISRB	798	.....	897
KISRB	798	.....	897
EISRB	799	.....T.....	898
EQ70B	799	.....T.....	898
SS28B	799	.....T.....	898
CEMO13B	799	.....T.....	898
CEMO14B	799	.....T.....	898
HHL39B	799	.....T.....	898
04099B	799	.....T.....	898
FR1B	798	.....	897
Aus1B	798	.....	897
SW1B	798	.....	897
N184B	798	.....	897

\*\*\*\*\*

Figure 25 (continued, 9)

NISRA	992	TCAAGTACTAAGTGCACATGGTGGATGCCTTGGC	1026
KISRA	992	.....	1026
EISRA	991	.....	1025
EQ70A	991	.....	1025
SS28A	991	.....	1025
CEM013A	991	.....	1025
CEM014A	991	.....	1025
HH139A	991	.....	1024
04099A	990	.....	1024
Ff1A	992	.....	1026
Aus1A	992	.....	1026
Sw1A	992	.....	1026
N184A	992	.....	1026
NISRB	898	.....	932
KISRB	898	.....	932
EISRB	899	.....	933
EQ70B	899	.....	933
SS28B	899	.....	933
CEM013B	899	.....	933
CEM014B	899	.....	933
HH139B	899	.....	933
04099B	899	.....	933
Ff1B	898	.....	932
Aus1B	898	.....	932
Sw1B	898	.....	932
N184B	898	.....	932
		*****	

Figure 25 (continued, 10)