

第28回麻布環境科学研究会 一般演題1

Campylobacter 種間における 23S rRNA 遺伝子内の IVS の比較解析

田積 晃浩¹, 三澤 尚明², 垣沼 由貴¹, 関塚 彩子¹, 目黒 清可¹,
村山 洋¹, Millar B. Cherie³, Moore John E.³, 松田 基夫¹

¹麻布大学環境保健学部遺伝子生物学, ²宮崎大学農学部獣医学科公衆衛生学,
³N. Ireland Public Health Lab, Belfast, UK

はじめに

Campylobacter 属は現在, 約20種より構成され ϵ -*Proteobacteria* に属しており, その中には食中毒を引き起こす *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* 及び *C. upsaliensis* 等が含まれる。*Proteobacteria* に分類される数十種の細菌の23S rRNA 遺伝子内には介在配列である intervening sequence (IVS) が散発的に存在していることが知られており, 既に *C. jejuni* 及び *C. coli* においても, IVS の存在が報告されている。更に, 同一の ϵ -*Proteobacteria* である *Helicobacter* 属のいくつかの種においても IVS の存在は報告されている。23S rRNA 遺伝子内に存在する IVS は, rRNA と同一の1次転写産物としてRNAに転写され, その後, 複数のRNase の修飾を受ける。その結果, 23S rRNA の断片化が生じると考えられている。IVS の存在意義やその機能は未だ不明である。

そこで本研究においては, *Campylobacter* 属9種を対象に23S rRNA 遺伝子内のIVSの有無の確認を行い, それらの構造の比較解析を行った。

材料及び方法

C. jejuni (56株), *C. coli* (11株), *C. lari* [urease-negative (UN) *C. lari*, 27株; urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC), 38株], *C. upsaliensis* (43株), *C. fetus* (33株), *C. hyointestinalis* (30株), *C. sputorum* biovar (*suputorum*, 5株; *fecalis*, 4株; *paraureolyticus*, 5株), *C. curvus* (10株) 及び *C. concisus* (10株) の

合計272株を用いた。23S rRNA 遺伝子内の helix 25 及び45領域をそれぞれ増幅するための2組のプライマーを *in silico* に構築し, PCR を行い IVS の存在の有無の確認を行った。その後, 全ての IVS の塩基配列を決定し比較解析を行った。更に, RNA を抽出しアガロースゲル電気泳動により, 23S rRNA の性状を確認した。

結果及び考察

PCR 及びシーケンシングの結果, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. fetus* 及び *C. curvus* の helix 45 内に IVS の存在が明らかとなり, それらの存在率はそれぞれ, 53.6, 45.5, 70.0, 75.8 及び 90.0% であった。helix 25 内の IVS は *C. sputorum* biovar *suputorum* 及び *fecalis* のそれぞれ1株ずつにのみ存在した。*C. lari*, *C. hyointestinalis* 及び *C. concisus* の全ての株において helix 25 と45 内には IVS が存在していないことが明らかとなった。決定した IVS の塩基配列を解析した結果, *C. jejuni* 及び *C. upsaliensis* の各種内では4種類の異なった IVS が存在していた。しかし一方で, *C. coli*, *C. fetus* 及び *C. curvus* の IVS はそれぞれの種内で100%の塩基配列の相同性を示し, 単一の IVS のみが存在していることが明らかとなった。*C. jejuni* 及び *C. upsaliensis* の複数の IVS は, 各種内で高い塩基配列の類似性を示したが, 各種間での IVS の類似性は *C. jejuni* と *C. coli* 間を除いて低かった。*C. coli* の IVS は *C. jejuni* の1つの IVS と同一

であった。各 *Campylobacter* 種由来の全ての IVS をアライメント解析したが、相関性を示す様な結果は得られなかった。これらのことから、進化の過程でそれぞれの種が確立された後に、23S rRNA 遺伝子内へ異なった IVS の挿入が起こったものと判断された。更に、*C. jejuni* と *C. upsaliensis* で確認された複数の IVS は、類似性が高いことよりゲノム DNA へ挿入された後に変異が起こり、多型が生じたものと判断された。

IVS の2次構造は強い stem-loop 構造を形成することが知られているが、今回得られた *Campylobacter* 属の全ての IVS でも同様に stem-loop を構築する予測結果が得られた。更に、RNA を電気泳動した結果、IVS を所有している株でのみ 23S rRNA の断片化が確認された。これは、今まで報告されている他の属と同様に、IVS の stem 領域が RNase の基質となり、その結果、断片化が生じているものと示唆された。

IVS の 23S rRNA 遺伝子への挿入は後天的な事象であると考えられている。本研究は、IVS の存在が同一種内で散発的なこと、そしてそれぞれの種間の IVS の塩基配列が異なることを示しており、それ故

に、このような考えを示す結果となった。腸内細菌科のいくつかの種間では IVS の相互的な水平伝播が報告されているが、今回の研究で *Campylobacter* 属では *C. jejuni* と *C. coli* 間でその可能性が示唆されたが、しかしそれら以外の種間での水平伝播を示唆する結果は得られなかった。更に、今回明らかとなった全ての *Campylobacter* の IVS の塩基配列を用いてブラスト検索を行ったが、今までに報告されている IVS やその他のいかなる塩基配列とも高い類似性は確認されなかった。

以上のことより、本研究で *Campylobacter* 属の多くの種 (9種中6種) で、23S rRNA 遺伝子内に IVS が存在しており、それらの多くは各々の種に特異的な塩基配列であることが明らかとなった。*Campylobacter* 種間での IVS の相互的な水平伝播は *C. jejuni* と *C. coli* 間でのみ起こっており、他の種間では起こっていないことが示唆された。更に、IVS が存在していなかった *C. lali*, *C. hyointestinalis* 及び *C. curvus* は現在まで IVS の挿入の機会がなかったか、またはゲノム DNA 自身が IVS の所有を許容しない性状を持っているものと考えられる。