

第22回麻布環境科学研究会 講演 B1

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) の ウレアーゼの表現形質及び遺伝形質レベルでの解析

薄井 香織¹, 斎藤 貴雄², 伊与田 尚洋², 田副 ひと美²村山 洋², B.C. Millar³, J.E. Moore³, 松田 基夫^{1,2}

¹ 麻布大学大学院環境学研究科分子生物学, ² 麻布大学環境学部遺伝子生物学,
³ N. Ireland Public Health Lab., Belfast, N. Ireland, UK

はじめに

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (urease-positive thermophilic *Campyrobacter*; 以下, UPTC) は, 河川水などの自然環境下 (Bolton *et al.*, 1985, Matsuda *et al.*, 1996) やカモメの糞から分離されており (Kaneko *et al.*, 1999), それ故に世界的に広く分布している可能性が示唆される。UPTCを含む *C. lari* については最近3つの亜種即ち *C. lari* subsp. *lari*, *C. lari* subsp. *ureaseum* そして *C. lari* subsp. *subantarcticus* が提唱された (On *et al.*, 2001)。UPTC の性状を特徴づけているウレアーゼは, Jack bean (*Canavalia ensiformis*) のほか, 細菌等が広く産生しており, 近年では胃潰瘍の原因の一つである *Helicobacter pylori* のウレアーゼに着目した研究が多い。1926年に初めて結晶化された酵素たんぱく質であるウレアーゼは, 活性中心にニッケル (Ni) を含有し, 尿素を加水分解することでアンモニアと炭酸を生成させ, ヒトでは, 尿路系および消化器系の毒性因子となることがあり, またルーメンのような反芻動物では, 窒素の再利用や窒素化合物の変換に関して重要な役割を担っている (Mobley *et al.*, 1995)。そこで今回, 我々は, カンピロバクター属の中で唯一ウレアーゼを産生する UPTC のウレアーゼの表現形質及び遺伝形質レベルでの解析を行った。

材料及び方法

今回, 研究に用いた UPTC の供試菌株は, 北アイ

erland Belfast の近傍でカモメの糞から分離された A1, A2 および A3 株, フランスでヒトから分離された 89049 および 92251 株の 5 株と, 日本の河川水から分離された CF89-12 および 89-14 であった。また, 対照としてウレアーゼを産生しない *C. lari*, *C. jejuni* および *C. coli* 株を用いた。培養は, Blood agar base No. 2 (OXOID) に馬脱繊維血を 7%, および Butzler 選択剤 (日水製薬) を加えて, Butzler 寒天培地とし, 37°C, 微好気条件下 (5~10% CO₂: Campy pac TM, BBL) で, 48 時間行った。ウレアーゼ遺伝子の解析には, *Helicobacter* 属をはじめ, これまでに報告のある細菌種の Ure A および Ure B 領域の配列情報を基に我々が構築した degenerate プライマー対を用いた。UPTC 細胞からのウレアーゼの分離精製は, 1% n-OGP 処理と超音波によりタンパク質成分を粗抽出し, ゲルろ過とイオン交換クロマトグラフィーを用いる方法により行った。分離精製されたウレアーゼに関しては, その生化学的な性状を解析し, SDS を含まない native-PAGE により活性染色を行ってバンドを確認した後, ゲルをバンドから切り出して SDS-PAGE によりそのタンパク質成分を検出する手法を用いた。

結果及び考察

UPTC のウレアーゼの構造遺伝子は, その約 2 kb に渡る領域のシーケンシングの結果, 株間では約 97.5% (AI と CF98-12, CF98-14), *H. pylori* とは 59% (AI) の相同性がみられた。多くの菌で産生されるウレアー

ゼの構造遺伝子では、構成アミノ酸配列や作用機構に類似性が認められ、トランスポゾンを経た伝播が起こる現象が報告されている(小熊恵二, 2001)。また、ウレアーゼは、*Proteus* や *Klebsiella* 属では、3つ (α , β , γ)、*Helicobacter* では2つ (α , β) サブユニットよりなるが、Jack beanが産生するウレアーゼは、単一であるとされている。いずれにおいても活性部分の配列は、類似しており、また *Proteus* 属の α , β サブユニット遺伝子間の塩基配列には、真核細胞でスプライシングをおこなう配列が認められている。次いで、生化学的手法を用いて UPTC のウレアーゼ精製を行い、得られた画分の SDS-PAGE を行ったところ、約 66 と 31 kDa の 2 つの主要なバンドが確認された。native-PAGE 後の活性染色で得られた活性バンドを切り出して、SDS-PAGE を行ったところ、構成成分が 8 個検出された。近年の遺伝子及び生化学的な解析によって、グラム陰性細菌のウレアーゼは、構造遺伝子の発現のみでは不十分であり、アクセサリ遺伝子のような補足遺伝子が必要であることやアクセサリ遺伝子から産生されたアクセサリタンパク質が必要であることが示唆されている (Lee *et al.*, 1992, Mulrooney and Hausinger, 1990)。*H. pylori* のウレアーゼ遺伝子は、上述した 2 つのサブユニットである Ure A および B のほか、Ni 結合に必要な Ure I, E, F, G および H、発現に関与する Ure C および D の 9 つの遺伝子群からなっていると推測されている (Ferrero and Labigne, 1993)。それ故に、今回検出された 8 個のタンパク質成分のうち 6 個が UPTC のウレアーゼのアクセサリタンパク質である可能性が強く示唆される。また、UPTC 由来のウレアーゼは、Km 値が 0.12 mM と他の細菌と比べ極めて低く、*H. pylori* のウレアーゼと類似していた。更に、UPTC より精製したウレアーゼは、60°C 2 分に安定であったが、5 分以上で

は、すみやかにその活性が失われた。至適 pH は、中性付近 (pH 8) であり、pH 4 の酸性水溶液中では、活性が失われ、逆にアルカリ側の水溶液中では、pH 10 で耐性で失活しなかったが、pH 12 で失活した。ついで、pH の異なる 8 種類の水溶液中で 2, 10 そして 20 分処理したが、活性の変化曲線には、影響を及ぼさなかった。ウレアーゼの阻害剤である、Thiourea, Hydroxyurea および Acetohydroxamic acid を用いて、その活性の変化を調べた結果、50 mM Thiourea, 200 mM Hydroxyurea, および 50 mM Acetohydroxamic acid で、完全に活性が阻害され、更に 20 mM Thiourea, 10 mM Hydroxyurea, 1 mM Acetohydroxamic acid で、活性の 50% 以上が阻害されることが明らかとなった。一般にウレアーゼは、直径 13 nm の円形粒子で菌体の表層に結合しているとされており、特に *H. pylori* のウレアーゼは、細胞内および外膜上にも存在していると言われている (Dunn *et al.*, 1990)。UPTC のウレアーゼについても、超音波によるソニケーションのみでは、最大で 24.6% しか回収できなかったことから、大部分は、細胞表層に存在している可能性が示唆された。

文 献

- Bolton *et al.* 1985. Lancet i: 1217-1218.
Matsuda *et al.* 1996. J Appl Bacteriol 81: 608-612.
Kaneko *et al.* 1999. Lett Appl Microbiol 29: 7-9.
On *et al.* 2001. Int J Med Microbiol Suppl 31: 144.
Mobley *et al.* 1995. Microbiol Reviews 59: 451-480.
小熊恵二. 2001. 医科細菌学, 南江堂.
Lee *et al.* 1992. J Bacteriol 174: 4324-4330.
Mulrooney and Hausinger. 1990. J Bacteriol 172: 5837-5843.
Ferrero and Labigne. 1993. Molecular Microbiol 9: 323-333.
Dunn *et al.* 1990. J Biol Chem 265: 9464-9469.