

北アイルランドで分離された高温性*Campylobacter*, 特にウレアーゼ陽性高温性*Campylobacter* (UPTC) のフラジェリンの解析

権藤 尊睦¹, 関塚 剛史¹, 間中 伸行², 清水 禎也², 横井 妙子²,
J.E. Moore³, B.C. Millar³, 村山 洋^{1,2}, 松田 基夫^{1,2}

¹麻布大学大学院分子生物学, ²麻布大学遺伝子生物学,

³Belfast City Hospital, N. Ireland Public Health Lab., N. Ireland, UK

1. はじめに

1985年, イギリスの Bolton らによって自然環境下からウレアーゼ陽性高温性 *Campylobacter* (UPTC) 10株が初めて発見された。その後, 1988年と1990年にフランスの二人の下痢症の成人の糞便, 虫垂炎の子供の虫垂, そして尿路感染症の患者の尿からUPTCが4株分離された。さらにUPTCの分離株は, 北アイルランド, オランダからも報告されている。1996年には, 当研究室の松田らが日本で初めて1989年に岡山県の河川水から分離されたUPTC分離株2株の性状について報告した (Matsuda *et al.*, 1996)。

我々は細菌の運動性そして走化性あるいは病原性に重要な役割を果たすと想定されている鞭毛 (フラジェリン) に着目し, UPTCを含む高温性 *Campylobacter* のフラジェリンのDNAおよびタンパク質レベルでの解析を行っている。細菌のフラジェリンは直径12~30nmの糸状付属物で, 細菌の運動器官として機能しており, 全てタンパク質から出来ている。また, 本タンパク質はアスパラギン酸, トレオニン, グルタミン酸を多く含むという特徴を有している。当研究室では, *C. jejuni*のフラジェリン遺伝子解析のために構築され, 約1700bpの *flaA* 遺伝子を増幅する事が出来る primer 対 A1, A2がUPTCの一部フラジェリン遺伝子解析にも用いることができ, 約1450bpの断片をPCRにより増幅できる事を明らかにし, またUPTC日本株2株における *flaA* 様配列の存在を既に報告した (Sekizuka *et al.*, 2002)。

そこで, 本研究では北アイルランドで分離されたUPTC株を対象としてフラジェリンの遺伝形質及び表現形質レベルでの解析を行い, *C. jejuni*のそれらと比較検討する事を目的として研究を行った。

2. 材料と方法

菌株は, 北アイルランド, イングランド, フランス, そして日本で分離されたUPTC株44株を用いた。*C. jejuni*の *flaA* 遺伝子の約1700bpをPCRにより増幅できるプライマー対 A1, A2を用いて, UPTCの *flaA* 遺伝子約1450bpをPCRにより増幅し, 1%のTAEアガロースゲルで電気泳動後, 目的のPCR断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。その後, pGET-T vectorを用いてTAクローニングの手法でクローニングを行った。Thermo Sequenase premixed cycle sequencing kitを用いてダイデオキシシーケンシング反応後, Hitachi DNA autosequencer (SQ-5500EL)を用いて, UPTCの *flaA* 遺伝子の塩基配列決定を行った。

さらに, 解析されたフラジェリン遺伝子がそれぞれの細胞内で実際に発現され, そのDNAレベルでの解析から想定されるサイズに対応するフラジェリンタンパク質が実在するか否かを調べる為に, 連続的酸性解離法, 超遠心法および中性pH会合法を組み合わせた, 簡便な方法によりフラジェリンタンパク質を分離精製した。それらをSDS-12%PAGEで電気泳動後, CBBで染色し, 分子量の算出を行った。

3. 結果及び考察

すでに第19回の本研究会において報告したように、プライマー対 A1, A2 を用いた PCR で、北アイルランド、イングランド、フランス、そして日本で分離された UPTC 株 44 株中 33 株で約 1450 bp の大きさの DNA 断片が増幅された。その中から、北アイルランド株 10 株の 1461 ~ 1500 bp の *flaA* 遺伝子の全塩基配列と、*C. jejuni* 北アイルランド株 2 株の 1716 ~ 1725 bp の *flaA* 遺伝子の全塩基配列をそれぞれ決定した。北アイルランド株間では、その塩基配列に 82.7% ~ 87.8% の相同性が見られた。また、*C. jejuni* 81116 株との相同性はそれぞれ 72.2% と 78.6% の相同性であった。

それぞれの株の塩基配列をアミノ酸の配列に変換し、*C. jejuni* 81116 株の flagellin のアミノ酸配列 576 残基との比較検討を行った。その結果 *C. jejuni* 81116 株と UPTC 北アイルランド株 10 株とでは 60.2% ~ 63.4% の、*C. jejuni* 北アイルランド株 2 株とでは 77.4% ~ 89.8% の相同性が示唆された。また、*C. jejuni* 81116 のアミノ末端側の 144 残基、カルボキシル末端側の 63 残基との相同性は、UPTC 北アイルランド株 10 株とでは 77.6% ~ 80.4% と 88.9% ~ 90.5%、*C. jejuni* 北アイルランド株 2 株とでは 93.7% ~ 99.3% と 93.7

% ~ 98.4% であり、このことは得られた PCR クローンが目的とする UPTC の *flaA* 遺伝子である事を強く示唆している。また UPTC の *flaA* の ORF には、アラニン、グリシン、セリン、トレオニンが多く含まれ、システイン、ヒスチジン、プロリン、トリプトファンがほとんど、もしくは全く含まれておらず、これらは flagellin に特徴的なアミノ酸組成であった。

次に、タンパク質レベルでの解析を行う為に、分離精製した flagellin タンパク質を SDS-12% PAGE で電気泳動後、CBB で染色し、分子量の算出を行った。その結果 UPTC の flagellin タンパク質は 37.5 ~ 56 kDa の範囲で、株間におけるそのサイズに差異の存在する事が明らかとなった。UPTC 182 株の flagellin の分子量は約 44 kDa であり、UPTC 475 株のものは約 46 kDa であった。しかし、ORF から予想される flagellin の分子量は UPTC 182 の分子量は約 49.5 kDa、UPTC 475 では約 49.6 kDa であり、精製されたタンパク質と、ORF から予想されるタンパク質の分子量には差異が存在した。

文 献

- Sekizuka *et al.* 2002. Lett. Appl. Microbiol. 35: 185-189.
Matsuda *et al.* 1996. J. Appl. Bacteriol. 81: 608-612.