

# 新しい細菌，ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクターの ゲノム DNA 上の多遺伝子配列情報に基づく分子識別； *recA* 遺伝子の解析

*Molecular discrimination of newly identified eubacterium, urease-positive thermophilic campylobacter (UPTC) based on the sequence information of multiple genes on the genomic DNA; analysis of recA gene*

松田基夫<sup>1</sup>，高宮信三郎<sup>2</sup>，三田明弘<sup>1</sup>，村山 洋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院環境保健学研究科，

<sup>2</sup>順天堂大学大学院医学研究科

Motoo Matsuda<sup>1</sup>, Shinzaburo Takamiya<sup>2</sup>, Akihiro Sanda,<sup>1</sup> Ohoshi Murayama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University;

<sup>2</sup>Graduate School of Medicine, Juntendo University

**Abstract:** In the present study, for the first time, nucleotide sequencing after TA cloning of almost the full-length (about 1,050 bp in length) of the *recA* gene of two isolates of UPTC, NCTC12894 and CF89-12 and a strain of *C. lari* JCM2530<sup>T</sup> amplified using a degenerate primer pair was carried out. Nucleotide sequence comparison analysis of the possible open reading frame (ORF) demonstrated that the two isolates of UPTC showed about 94% sequence homology of the *recA* gene to each other and that they also showed 90-92% and about 84% homology of the *recA* gene to *C. lari* and *C. jejuni*, respectively. The two isolates of UPTC showed 50-60% homology of the *recA* gene to the other family Enterobacteriaceae.

In conclusion, this study presents novel sequence data on *recA* for *C. lari* and UPTC, which may aid in the phylogenetic positioning of the UPTC group within the genus *Campylobacter* and may aid in the discriminating of isolates of the UPTC group.

*recA* 遺伝子は「相同的な遺伝的組換え」及び「DNA 損傷の際の複製を伴う修復」に必須で、また DNA 損傷の際に誘導される SOS 応答においても中心的な役割を果たしている。しかしながら、カンピロバクター属、とりわけ高温性カンピロバクターの *recA* 遺伝子の解析に関する報告は少ない (1)。

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC)

は微好気性でグラム陰性の細菌であり、イングランドで 1985 年に Bolton らによって初めて発見された (2, 3)。その後 UPTC 株はフランス、北アイルランド、オランダそして日本で分離され報告されている (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)。UPTC はドットブロットハイブリダイゼーション及び生化学的性状に関する解析により *C. lari* の “variant” とされて今日に

至っている(4)がその分類学的位置については未確定のままである。更に、UPTC株はフランスでの4株がヒト臨床由来である以外、そのほとんどが河川水、海水、海水中の二枚貝そしてカモメなどの自然環境中から分離されたものである。

そこで、本研究では新しい細菌であるUPTCのゲノムDNA上の多遺伝子配列情報に基づく分子識別法の確立を目指して、まず今回UPTC及びウレアーゼを産生しないウレアーゼ陰性の*C. lari*の*recA*遺伝子に着目して、本研究課題遂行に合致した実験系の開発に取り組んだ。

### 研究材料及び方法

本研究に用いられた高温性カンピロバクターはUPTC NCTC12894, UPTC CF89-12 (10), UPTC A1 (7, 8), *C. lari* JCM2530<sup>T</sup>及び*C. jejumi* JCM2013であった。なお、UPTC及び*C. lari*株の*recA*遺伝子の全領域に渡るPCR増幅のためのPCR用縮重プライマー対(*recAFL-f/recAFL-r*)は、*C. jejumi*81-176 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number, U03121)と*C. fetus*23D (AF020677) *recA*遺伝子の配列情報を基に筆者達がデザインしたものである。そのプライマー配列は*recA* FL-f, GGAAANTNATGGATGATAAT, と*recA* FL-r, NANCATTANTCNTCTCCTTCであった。

*recA*遺伝子のほぼ全長に渡る領域のクローニングは、PCR産物をGene Clean IIキット(Bio 101 Inc. CA, USA)を用いて精製後、pGEM-Tベクターを用いるTAクローニングの常法に従って行った。クローン化後のDNAシーケンシングは日立SQ-5500L DNAシーケンサーを用いて行い、*recA*遺伝子の塩基配列の解析はGENETYX-MAC version9.0を用いて行った。なお、本研究で決定されたUPTC株及び*C. lari*株の*recA*遺伝子の全塩基配列はaccession number AB067767, AB067768及びAB074463でaccessible (DDBJ/EMBL/Genbank)となっている。

### 結果と考察

*recA* FL-fと*recA* FL-rプライマーを用いたPCRでは、用いたUPTC株3株、*C. lari*株1株そして*C. jejumi*株1株の合計5株の高温性カンピロバクター株でいずれも約1,050塩基対のPCR増幅断片が確認さ

れた。

そこで次に、UPTC株2株、NCTC12894とCF89-12、そして*C. lari*株1株、JCM2530<sup>T</sup>を対象とした*recA*遺伝子のTAクローニングとシーケンシングを行った。その結果、3株とも*recA*の開始コドンと終止コドンを含む約1050塩基に渡る領域の配列が決定された。そして、UPTC NCTC12894では345アミノ酸残基からなる分子量37,314の*recA*タンパク質をコードしていると予想される1035ヌクレオチド(NTs)から成る1つのORFが、UPTC CF89-12ではアミノ酸344残基からなる分子量37,200の*recA*をコードしていると予想される1032NTsのORFが、そして*C. lari* JCM2530<sup>T</sup>ではアミノ酸344残基からなる分子量37,161の*recA*をコードしていると予想される1032NTsのORFがそれぞれ同定された。なお、これら3株で同定された*recA*遺伝子の予想されるORFのGC含量は約39%であり、更に*C. jejumi*では約36%、*C. fetus*では約39%と計算され、これらの値はいずれもカンピロバクター属のゲノムDNA全体のGC含量に近い値であった。

予想されるORFの塩基配列の相同性を比較したところ、UPTC株間では94%、UPTCと*C. lari*間では90-92%、UPTCと*C. jejumi*間では約84%そして他の腸内細菌科に属する細菌種とは50-60%であった。

この様に、UPTC株と*C. lari*株を用いて*recA*遺伝子のほぼ全長に渡る領域をPCR増幅しTAクローニングの後、塩基配列を決定し得られた*C. lari*とUPTCの*recA*に関する新しいヌクレオチド配列データは、カンピロバクター属内におけるUPTCグループの系統分類学的位置の確立とUPTC分離株の株間の識別に有用であることを強く示唆している。

そこで、*Campylobacter*の*recA*遺伝子の塩基配列情報をもとにrestriction fragment length polymorphism (RFLP)解析により分子識別が可能であるか否かをGENETYX-MAC Ver. 9.0を用いて検討した。そして、RFLP解析に有効であることが予想される制限酵素を選び、*Campylobacter*の*recA*遺伝子の切断の比較を行った。その結果、適切な2種類の制限酵素を組み合わせることによって容易に、*Campylobacter*間の*recA*遺伝子を標的とした、RFLP解析による分子識別が可能であることが示唆された。

## 要 約

本研究においてデザインされた, *recA* 遺伝子のほぼ全長に渡る領域を増幅するための PCR プライマーを用いて得られた PCR 産物の配列情報は, UPTC 及び他の高温性カンピロバクターの DNA レベルでの分子識別に大変有用であることが強く示唆された。更に, 本研究の主目的である UPTC のゲノム DNA 上の多遺伝子配列情報に基づく分子識別に *recA* 遺伝子を対象とすることは極めて有用であることが初めて明らかとなった。

## 文 献

- 1) Guerry, P., Pope, P. M., Burr, D. H., Leifer, J. Joseph, S. W. and Bourgeois, A. L. Development and characterization of *recA* mutants of *Campylobacter jejuni* for inclusion in attenuated vaccines. *Infect Immun*; 62: 426-432, 1994.
- 2) Bolton, F. J., Holt, A. V. and Hutchinson, D. N. Urease-positive thermophilic campylobacters. *Lancet*; 1217-1218., 1985.
- 3) Owen, R. J., Costas, M., Sloss, L. and Bolton, F. J. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Campylobacter laridis* and allied thermophilic campylobacters from the natural environment. *J Appl Bacteriol*; 65: 69-78, 1988.
- 4) Megraud, F., Chevrier, D., Desplaces, N., Sedallian, A. and Guesdon, J. L. Urease-positive thermophilic campylobacter (*Campylobacter laridis* variant) isolated from an appendix and from human feces. *J Clin Microbiol*; 26: 1050-1051, 1988.
- 5) Bezian, M. C., Ribou, G., Barberis-Gile, C. and Megraud, F. Isolation of a urease positive thermophilic variant of *Campylobacter lari* from a patient with urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 9: 895-897, 1990.
- 6) Wilson, I. G. and Moore, J. E. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol Infect*; 116: 147-153, 1996.
- 7) Moore, J. E., Gilpin, D., Crothers, E., Canney, A., Kaneko, A. and Matsuda, M., Occurrence of *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp. in seagulls (*Larus* spp.), *Vet Borne Zoon Dis*; 2: 111-114, 2002.
- 8) Kaneko, A., Matsuda, M., Miyajima, M., Moore, J. E. and Murphy, P. G., Urease-positive thermophilic strains of *Campylobacter* isolated from seagulls (*Larus* spp.) *Lett Appl Microbiol*; 29: 7-9, 1999.
- 9) Endtz, H. P., Vliegthart, J. S., Vandamme, P., Weverink, H. W., van den Braak, N. P., Verbrugh, H. A. and van Belkum, A. Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*; 34: 79-88, 1997.
- 10) Matsuda, M., Kaneko, A., Fukuyama, M., Ito, T., Shingaki, M., Inoue, M., Moore, J. E., Murphy, P. G. and Ishida, Y. First finding of urease-positive thermophilic strains of *Campylobacter* in river water in the Far East, namely in Japan, and their phenotypic and genotypic characterization. *J Appl Bacteriol*; 81: 608-612, 1996.
- 11) Matsuda, M., Shibuya, T., Itoh, Y., Takiguchi, M., Furuhashi, K., Moore, J. E., Murayama, O. and Fukuyama, M. First isolation of urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) from crows (*Corvus leuiscornis*) in Japan, *Int J Hyg Environ Health*; 205: 321-324, 2002.