

第23回麻布環境科学研究会 講演 B1

ウレアーゼを産生しない *Campylobacter lari* の flagellin の遺伝子およびタンパク質レベルでの解析

横井 妙子¹, 関塚 剛史², 清水 禎也¹, 間中 伸行¹, 権藤 尊睦²,
村山 洋^{1,2}, Millar BC³, Moore JE³, 加藤 行男⁴, 松田 基夫^{1,2}

¹麻布大・環境・遺伝子生物学, ²麻布大院・環境・分子生物学,

³N Ireland Public Health Lab・Belfast・N Ireland, ⁴麻布大・獣医・公衆衛生 II

1. はじめに

ウレアーゼを産生しない *Campylobacter lari* は 1980 年に Skirrow と Benjamin によって初めて初めてナリジキシン酸耐性の高温性カンピロバクター (nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter*; NARTC) グループとして発見され、それ以来、野鳥を含む自然環境、家畜、ヒト患者などから分離されている。また、*C. lari* 感染により、正常な免疫応答能力を持たない場合でも、また持つ場合でも、敗血症や菌血症など、*C. jejuni* と同様の臨床像を呈し、重篤な疾病の要因となることが報告されている。しかし、*C. lari* の病原性に関しては、*C. jejuni* に比べてヒト疾患 (カンピロバクター症) の発症頻度が低いとされ、それ故にあまり注目されず、その病原因子、病状及び疾患の発症機序等に関する研究はほとんどされてこなかった。しかし我々は今回、過去 20 年以上に渡る *C. lari* のヒト臨床症例及びヒト臨床由来株について文献的に詳細を調べたところ、数十症例で 110 株以上が世界の 10 数カ国で報告されていることが明らかとなった。又自然環境に加え、鶏を中心とした各種家畜、食用動物における *C. lari* の汚染が全世界に拡がっており、これらが *C. lari* のリザーバーであることが明らかとなった。以上の様な事実は、*C. lari* がヒトのカンピロバクター症の 1 つの重要なリスクファクターとして注目すべきであることを示唆している。そこで本研究では、*C. lari* の病原性の詳細を明らかにするための第一歩として、病原因子とりわけ宿主

への定着因子の 1 つとして注目されているべん毛に着目し、遺伝子及びタンパク質レベルでの解析を行うこととした。

2. 材料と方法

本研究にはまず、日本で分離された *C. lari* 13 株及び北アイルランドで分離された 11 株を用いた。*C. jejuni* の flaA 遺伝子の約 1700 bp を増幅するとされる PCR 用プライマー対 A1, A2 を用いて PCR を行い、約 1700bp 付近に増幅が認められた株のうち、*C. lari* のカモメ由来の日本株 107, JCM2530^T, 食用動物由来の北アイルランド株 28, 48 の増幅 DNA 断片を TBE を含む 1% アガロースゲルで電気泳動後、目的の PCR 断片を切り出し QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。その後、pGEM-Tvector を用いて TA クローニングを行い、Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit を用いてダイデオキシシーケンシングを行い、HITACHI DNA autosequencer (SQ-5500 EL) を用いて、塩基配列を決定した。

また、実際に発見されているフラジェリンのタンパク質レベルでの解析とその比較のため、塩基配列を決定した上記 4 株と、既に当研究室から塩基配列が報告されている *C. jejuni* 2013 と urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) 27 を対象として、フラジェリンの生化学的な分離精製後、SDS-PAGE を行った。

さらに、これら *C. lari* 4株と、対照として用いた *C. jejuni*, UPTC株のべん毛の表現物質レベルでの解析のために、電子顕微鏡下での観察を行った。

3. 結果及び考察

まず、*C. jejuni* 81116株の *flaA* 遺伝子のPCR解析のために構築されたプライマー対 A1, A2を用いてアニーリング温度 51℃でPCRを行ったところ、*C. jejuni* や *C. coli* では約 1720 bp の DNA 断片が増幅されたが、*C. lari* 株では全くPCR増幅断片は観察されなかった。そこでPCRをより弛緩された条件で行うためアニーリング温度を下げ、41℃でPCRを行ったところ、*C. lari* 日本株 13株中8株、北アイルランド株 11株中5株で、いずれも約 1700bp の DNA 断片が増幅された。

ついで、約 1700 bp 付近に増幅断片が認められた4株の DNA 断片を用いてTAクローニング後、その塩基配列の決定を行った。その結果、約 1700 ~ 1720 bp の領域の塩基配列が決定され、その配列と *C. jejuni* や *C. coli* の *flaA* の配列との間に高い相同性が認められた。このことは、*C. lari* の *flaA* 遺伝子は、*C. jejuni* や *C. coli* の *flaA* 遺伝子とその配列及び長さが類似している事を示している。

次に、実際に発現されているフラジェリンを分離精製しそのサイズを算定し、塩基配列から想定される分子量との比較を行った。ここでは、*C. jejuni* 2013とUPTC 27を対照として用いた。*C. jejuni* では、約 60 Kda 付近にフラジェリンのバンドが認められ、*C. lari* 3株でも同様に約 60 Kda 付近にバンドが認められたが、理由は不明であるが *C. lari* 28ではバンドが認められなかった。バンドが認められた *C. lari* 3

株では、そのSDS-PAGE後の算出されるフラジェリンの分子量は *flaA* の塩基配列から想定されるフラジェリンの分子量よりも大きかった。*C. jejuni* において、フラジェリンタンパク質がグリコシレーションされている可能性があり興味深い。

次に、*flaA* の塩基配列を決定した *C. lari* 4株のべん毛の電子顕微鏡下での観察を行ったところ、4株すべてにおいて、べん毛が認められた。しかし、対照として用いたUPTCではべん毛を持っていない株の存在することも観察された。

今回、*C. lari* の *flaA* について、遺伝子及びタンパク質レベルで解析を行った結果、今回調べられた *C. lari* 株は、*C. jejuni* や *C. coli* に類似したフラジェリンを持っており、このことは *C. lari* が重篤な病状を起し得る必要条件の少なくとも一部を備えていることを示していると示唆される。

我々の研究室の高温性カンピロバクターのフラジェリンに関する研究で、UPTC株には、1700 bp より短い偽遺伝子を持っている株や、短い *flaA* を持っている株が存在すること、そしてべん毛を持っていない株が存在していることなど明らかになっている。UPTCは1985年に最初に発見されて以来、カモメをはじめ自然環境から100株をこえる株が分離されているが、1988年と1990年に報告されたフランスの4株以外ヒト由来株は存在しない。*C. lari* 株のフラジェリンとべん毛を、ヒト疾患のかかわりが明らかに確認されていないUPTC株のフラジェリンとべん毛及び *C. jejuni* のそれらと比較した場合、このウレアーゼを産生しない *C. lari* のフラジェリンとべん毛はUPTCではなく *C. jejuni* に大変類似している可能性が強く示唆される。