

第23回麻布環境科学研究会 講演 B2

Urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) のべん毛の性状

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

¹麻布大学院・環境・分子生物学, ²麻布大・環境・遺伝子生物学,
³ N Ireland Public Health Lab., Belfast

1. はじめに

Campylobacter に起因する腸炎の詳細な発症メカニズムは未だ不明のままである。*Campylobacter* のべん毛は、運動性・走化性に関与すると共に、細胞の付着にも関与することが報告されている。そこで本研究ではヒトへの病原性が確認されている *C. jejuni*, *coli*, そして発症頻度は高くはないがヒト疾患との相関が確認されている *C. lari* (urease-negative thermophilic *Campylobacter lari*; UNTC), そして病原性との相関が明らかにされていない urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) のべん毛に着目しそれぞれ遺伝形質及び表現形質レベルで解析し比較検討した。そして、その様な研究によって、高温性 *Campylobacter* におけるべん毛と疾患との関係を科学的に解明するうえでの重要な基礎的知見が得られると示唆された。

2. 方法

C. jejuni, *coli* そして UPTC の *flaA* を PCR により増幅し、TA cloning の後、シーケンシングを行った。そして、第2の flagellin 遺伝子である *flaB* を解析する為、UPTC 株の SAU3AI 及び *Hind* III の部分消化断片を用いてゲノムライブラリーを作成した。*C. jejuni*, *coli*, UNTC そして UPTC の flagellin を生化学的に精製し、その分子量を算出した。そして flagellin の同定のためにエドマン分解による N 末端アミノ酸配列の決定を行った。べん毛の電子顕微鏡観察は、細胞

を PBS で洗浄後酢酸ウランで染色し、TEM を用いて行った。

3. 結果および考察

まず今回の研究では、*C. jejuni* と *C. coli* の *flaA* (約 1700 dp) の可変領域である large variable region (この領域は、べん毛を構築する際に外側の骨格を構成するとされている) の約 80 アミノ酸残基からなる部位が、野鳥を含まない自然環境中から分離された UPTC の *flaA* (約 1450 dp) では欠失が生じてその結果短くなって (約 1450 dp) おり、あるいは偽遺伝子 (約 1450 dp) となっている事例もあることが明らかとなった。しかし生体即ちカモメから分離された UPTC では、その長さや配列が *C. jejuni* の *flaA* に類似しており large variable region が存在していた。*C. jejuni* や *C. coli* の *flaA* のこの領域のセリン残基には glycosylation の生じている事が近年報告された (Thibault *et al.*, 2001, Logan *et al.*, 2002)。更に *Campylobacter* の宿主細胞への付着には、様々な接着分子が関与するが、第一の付着分子について、flagellin が第2の付着分子になると報告されている (Yao *et al.*, 1994)。今回の我々の結果と Thibault, Logan そして Yao らの報告とから、これら *Campylobacter* のべん毛の可変領域である large variable region が細胞への付着性、つまり病原性に非常に重要な領域である事が示唆される。

更に、イギリスの河川水から分離された UPTC

NCTC 12892の*flaA*の上流と下流の配列の一部を決定し、第2のflagellin遺伝子である*flaB*の存在を*flaA*の上流で確認したが、UPTC NCTC 12892の*flaA*の上流と、下流の配列は、*C. jejuni*のものとは明らかに異なっていた。即ち、*C. jejuni*の*flaA*と*flaB*はゲノム上にこの順番でタンデムに存在しているが、UPTC NCTC 12892では*flaB*、*flaA*の順番でしかも逆向きに存在していた。また、NCTC 12892の*flaA*の下流には*C. jejuni*とは異なり、*topA*遺伝子(DNA遺伝子の構造異性変換酵素をコードする遺伝子)が存在していた。更に、NCTC 12892の*flaA*のプロモーターは σ^{28} であり、そして*flaB*では σ^{54} であった。これは、*C. jejuni*の場合と同様であり、このことはUPTCのべん毛も主に*flaA*で構成されている事を示唆している。

UPTC NCTC 12895株とNCTC12896株のflagellinのN末端アミノ酸配列を決定したところ、*flaA*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致していた。自然環境中から分離されたUPTC株のSDS-PAGE上でのflagellinは、*flaA*の塩基配列の結果と同様、*C. jejuni*、*C. coli*のものよりも小さかった。更に今回精製された*Campylobacter*のflagellinは、遺伝子レベルの解析から予想される分子量よりそれぞれ約3k Da大きいサイズであった。これは、*Campylobacter*のべん毛が翻訳後修飾されており、ThibaultらとLoganらが報告しているようなglycosylationがUPTCでも起きている事を示しているのかもしれない。しかし、これらでは*C. jejuni*のlarge variable regionに相当する領域が欠失している為、病原性を持つ*C. jejuni*や*coli*とは異なる翻訳後修飾が生じている可能性もある。

更に驚くべきことに、カモメから分離されたUPTCのflagellinのSDS-PAGE後の算出された分子量は、*C. jejuni*や*C. coli*のflagellinに類似した値であった。このことから、flagellinのglycosylationに関わるlarge variable regionの存在が細胞への付着性に大きく関与する事が示唆される。日本の河川水から分離されたUPTCの2株CF89-12とCF89-14と、イギリスの河川水及び海水からそれぞれ分離された2つのNCTC株(NCTC 12893, NCTC 12894)ではフラジェリンがSDS-PAGEレベルで、べん毛が電顕レベルでいずれも検出されなかった。日本のUPTCの2株は、*flaA*配列の途中で終止コドンが存在することから、これらの*flaA*はpseudogeneであることが示唆される。また、2つのNCTC株の*flaA*配列中には終止コドンが存在しない事から、転写あるいは翻訳レベルでflagellinの発現が抑制されているものと考えられる。

以上の様々な今回の研究結果と前稿の横井らの結果から、*C. lari*はべん毛に関する“natural mutant population”であること、そしてUNTCとUPTCの2つの代表的なtaxonから成る*C. lari*は高温性カンピロバクターとヒト疾患とのかわりをべん毛のレベルで解析する上ですぐれた実験系であることが強く示唆された。

(参考文献)

- Thibault PM *et al.*, J. Biol. Chem, 276, 34862-34870 (2001)
Logan SM *et al.*, Mol Microbiol, 2, 587-597 (2002)
Yao T *et al.*, Mol Microbiol, 5, 883-93 (1994)