

第23回麻布環境科学研究会 講演 B3

ウマ伝染性子宮炎起因菌 *Taylorella equigenitalis* の 分子生物学的研究：16S rDNA 及び16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) の構造解析と 種間株間の分子識別への応用の可能性

加川志津子¹, 長野由梨子², 芳賀しおり², 葛西 美涼², 田積 晃浩², 大塚 紀子²,
関塚 剛史¹, 薄井 香織¹, 村山 洋^{1,2}, BC Millar³, JE Moore³, 松田 基夫^{1,2}

¹麻布大大学院環境保健・分子生物学, ²麻布大環境保健・遺伝子生物学,

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

1. はじめに

contagious equine metritis (CEM) は1977年に Crowhurst らによってイギリスでサラブレッドの繁殖雌馬での発症が初めて報告 (Crowhurst et al., 1977) されて以来, わずか3年の間にアイルランド, フランスを始め欧州各国, アメリカ合衆国, オーストラリアなど世界の主要なウマの生産国で相次いでその発症が確認された。日本では1980年のウマの繁殖シーズン中に CEM が大流行した (Sugimoto et al., 1980)。その後, 世界各国で CEM とその起因菌 *Taylorella equigenitalis* の清浄化の取り組みが進んできたが, 1990年代の後半になってトルコ (Ozgun et al., 2001) で, 2002年になってイギリス (Jackson et al., 2002) それぞれ CEM の発症とその起因菌が確認されている。この様に CEM は依然として散発的に発生しており, それ故に本疾病はウマの繁殖とその産業上潜在的な驚異となり続けている。

我々は1990年代初めより, 本菌及び CEM の発生と伝播の機構を科学的に解明するための分子疫学的手法の確立を目指して, 国際的な協同研究の体制を組織して研究を行ってきた。そして「*T. equigenitalis* の無傷ゲノム DNA を Apa I と Not I でそれぞれ消化後に pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) を行いその

PFGE パターンで株間の識別を行う分子ジェノタイプングの方法は CEM とその起因菌である *T. equigenitalis* の発生と伝播の機構を科学的に解明し得る重要で有効な方法である」ことを明らかにした (Miyazawa et al., 1995; Kagawa et al., 2001; Matsuda and Moore, 2003)。更に, 他の DNA ジェノタイプングの手法である, random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) や amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) と比べても PFGE 法の方が *T. equigenitalis* の株間のより高い識別能力を有することを明らかにした (Kagawa et al., 2001)。

一方, 細菌種間及び株間の識別と分子系統分類学的解析における 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) を対象とすることの有効性が報告されている。しかし, *T. equigenitalis* を対象としたこれらリボソーム RNA (rrn) オペロンの領域に関する体系的な報告はない。そこで本研究では, *T. equigenitalis* の rrn オペロン特に 16S rDNA 及び 16S-23S rDNA ISR の構造解析のための実験系を確立し, 更にそれらの種間株間の分子識別への応用の可能性を検討することを目的とした。

2. 材料と方法

本研究に用いた *T. equigenitalis* 株は, イギリスの

基準株 NCTC11184^T, アメリカのプロトタイプ株として広く用いられている Kentucky 188 そして日本の EQ59 の3株である。今回の研究では 16S rDNA の約 1500 塩基対の部分と, 16S-23S rDNA ISR を含む 16S rDNA の3'領域から 23S rDNA の5'領域におよぶ部分を PCR で増幅するための PCR プライマーをデザインし, いくつかの予備的実験の後, プライマー fD1/rTel 及び ISR-11f/ISR-5r を構築した。PCR 増幅後の TA クローニングを経たシーケンシング及びダイレクトシーケンシングは Thermo Sequenase premixed cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。得られた rrn オペロン遺伝子の配列の解析は software GEENETYX-MAC version 9 を用いて行った。

3. 結果及び考察

Taylorella equigenitalis 3株 (NCTC11184^T, Kentucky 188 そして EQ59) から調製されたゲノム DNA を鋳型とした PCR では, まず 16S rDNA の増幅を目的としたプライマー対 (fD1/rTel) を用いた場合, いずれも約 1500 塩基対の DNA 断片が増幅された。一方, ISR を含む領域の増幅を目的としたプライマー対 (ISR-11f/ISR-5r) ではそれぞれいずれも約 1300 塩基対 (ISR-A) と約 1200 塩基対 (ISR-B) からなる2つの増幅断片が確認された。次いで, これら増幅断片をダイレクトシーケンシング又は TA クローニング後のシーケンシングによって塩基配列の決定を行った。

まず, 16S rDNA では約 1500 塩基対に及ぶ配列決定された塩基配列の alignment の結果からこれらはいずれも 16S rDNA であると同定された。更に, これら T. equigenitalis NCTC11184^T (イギリス株), Kentucky 188 (アメリカ株) そして EQ59 (日本株) 3株の間での 16S rDNA の配列の差異は多くて2カ所であった (np 369, np 494)。更に, これら3株の 16S rDNA の配列は最近 Taylorella 属の第二の種として発見された T. asinigenitalis の報告されている 16S rDNA の配列とは20数%の相同性であった。また, これら3株は我々のこれまでの PFGE を用いた研究から, 異なる3つのジェノタイプに属することが既に明らかとなっており, この様な 16S rDNA の塩基配列の株間での高い相同性の存在は大変興味ある事実であるが, 3株間では少なくとも PFGE の結果とは

矛盾しないことは明らかである。また従来, T. equigenitalis では同定されていなかった。mRNA 上の Shine-Dalgarno 配列 (AGGAGG) に相補的な CCTCCT 配列が3株とも 16 rDNA の3'末端領域に確認された。

ISR を含む PCR の増幅断片の TA クローニングとシーケンシングでは ISR-A と ISR-B に関して約 1300 塩基対と約 1200 塩基対の全体に渡ってそれぞれ3株とも塩基配列の決定がされ, ISR-A は 922-923 塩基対, ISR-B は 829-830 塩基対として同定された。そして ISR-B と ISR-C の塩基配列のそれぞれの株間での相同性は 98.5-99.7% と 98.9-99.9% であり, 16S rDNA に比べてこの部分は株間で差異に富んでおり, それ故に株間の識別に有用であることが強く示唆された。更に, この ISR-A と ISR-B にはいずれも, 28 ヌクレオチドを挟んで2つの tRNA 遺伝子が 5'-16S rDNA-tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}-23S rDNA-3' の順番に並んで存在していた。

以上の様に, T. equigenitalis の 16S rDNA の塩基配列が種間の分子識別に有用であることは明らかである。更に, T. equigenitalis 株の ISR-A 及び ISR-B の塩基配列, あるいは適当に選択された制限酵素を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析が, 株間の分子識別, 即ち分子疫学研究, に応用可能であると示唆された。

4. 文献

- Crowhurst et al., Vet Rec, 100, 476 (1977)
- Sugimoto et al., Natl Inst Anim Health Q (Jpn), 20, 118-119 (1980)
- Ozgur et al., Vet Rec, 149, 120-122 (2001)
- Jackson et al., Vet Rec, 151, 582 (2002)
- Miyazawa et al., Vet Res Commun, 19, 265-271 (1995)
- Kagawa S. et al., Vet Res Commun, 25, 261-169 (2001)
- Matsuda M and Moore JE, Vet Microbiol, in press (2003)
- Kagawa et al., Vet Res Commun, 25, 565-575 (2001)