

第24回麻布環境科学研究会 講演B4

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) における ウレアーゼ構造遺伝子の多型性と配列情報に基づく クラスター解析

薄井 香織¹, 飯田 春奈¹, 斉藤 貴雄¹, 堀尾 拓矢¹,
村山 洋¹, Millar BC², Moore JE², 松田 基夫¹

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

1. はじめに

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) は thermophilic *Campylobacter lari* の生化学的に非定型的な taxon の1つとされ, 近年報告された *Campylobacter* のこれも非定型的な1つの taxon である *C. sputorum* biovar paraureolyticus と共に, *Campylobacter* 属細菌の中ではめずらしくウレアーゼを産生する細菌である (Matsuda and Moore, 2004)。細菌性ウレアーゼ及びその遺伝子の構造そしてこれらウレアーゼの重要な生理的役割については多くの報告があるが, *Campylobacter* のウレアーゼについての報告はない。

そこで, 本研究においては, UPTC のウレアーゼ遺伝子に着目し, まずその構造遺伝子の約2kbp に渡る領域をクローニングしその塩基配列を決定した。更に, その配列の類似性の解析及びそれら配列情報に基づくクラスター解析を行った。

2. 材料及び方法

本研究の解析に用いた UPTC 株は, 日本の河川水由来の2株, イギリスの河川水由来の NCTC 株2株, 北アイルランドのカモメの糞便由来の3株, 同じく北アイルランドの河川水及び海水中の二枚貝由来の3株, そしてフランスのヒト臨床由来分離株2株の合計12株 (Sekizuka *et al.* 2004) であった。

本研究においては, 既に当研究室で行われた UPTC のウレアーゼの生化学的精製に関する予備的

研究から UPTC の2つのウレアーゼ構造遺伝子 A, B をまず仮説的に想定した。そして *Helicobacter pylori*, *H. hepaticus*, *H. felis*, *H. mustelae*, thermophilic *Bacillus* sp. strain TB-90 など9種類の報告されているウレアーゼ遺伝子の配列情報のアライメントの結果を基に, ウレアーゼ構造遺伝子 A, B の約2 kbp に渡る領域を増幅するための PCR 用 degenerate primer 3対を *in silico* にデザインした。PCR 増幅後に TA クローニングそしてシークエンシングを行い, その結果得られた配列の解析は software GNETYX-MAC version 9 を用いて行った。更に, UPTC 株12株のウレアーゼ構造遺伝子約1.96 kbp のヌクレオチド配列の解析を CLUSTAL W program を用いて行い, デンドログラムの作成は UPGMA 法を用いて行った。

3. 結果及び考察

今回 *in silico* にデザインされた UPTC の仮想的ウレアーゼ構造遺伝子 *ureA*, *B* の約2.0 kbp 領域を増幅するための PCR primer 3対は, *ureA* の約500 bp を増幅する u2f/u2r, *ureA* 及び *B* の約1000 bp を増幅する u1f/u1r そして *ureB* の約670 bp を増幅する u3f/u3r であった。UPTC の12株からそれぞれ調製された鋳型 DNA とこれら3対のプライマーを用いた PCR で, いずれもほぼ想定されるサイズの PCR 産物が1%アガロースゲル電気泳動で確認された。次いで, PCR 産物をそれぞれ TA クローニング後シークエンシングし, プライマーの領域を除く約1.96 kbp 領域につい

てそれぞれマルチアライメントをした結果、お互いにそれぞれ96.7%以上の配列の類似性を有することが明らかとなった。そしてこれら12株の配列情報を他のすでに報告されているウレアーゼ産生細菌のウレアーゼ構造遺伝子のそれらと比較した所、これら約1.96 kbpの領域は *ureA* の3'側約570 bpと *ureB* の5'側約1360 bpから成ることが示唆された。更に、UPTCの *ureA* と *ureB* の間には12株いずれの場合にも29 bpの非コード領域が存在した。また、これら12株の約1.96 kbp中には合計で140カ所のすべて塩基置換からなる heterogeneous site が存在し、それは *ureA* 中では約10塩基に1カ所で、*ureB* 中では約15塩基に1カ所であり、*ureA* 中の方が明らかに高い塩基置換率であった。

ついで、約1.96 kbpの領域の配列の比較に基づく distance matrix を Kimura's 2-parameter model のアルゴリズムを用いて計算し、12株間の進化的距離を求めた。そして今回はじめてUPTCのウレアーゼ遺伝子のヌクレオチド配列情報を基に12株間のデンドログラムを作成した。その結果UPTCの12株は複数のクラスターを構成していることが明らかとなった。このような結果は、UPTCはウレアーゼ構造遺伝子の配

列情報に基づいて、遺伝的に大変変異に富んでいることを示している。そして、これは我々がすでに31株のUPTC株を対象として7つの酵素を指標とした multilocus enzyme electrophoresis typing の手法を用いて報告した結果 (Matsuda *et al.* 2003) とよく一致している。

本研究はUPTCについての初めてのウレアーゼの遺伝子型別に関する分子遺伝学的研究であり、更に1つの細菌 taxon に関して10株以上という多くの株を対象として細菌性ウレアーゼ遺伝子の genotypic heterogeneity を明らかにした初めての報告である。しかし、UPTCのウレアーゼ構造遺伝子及びアクセサリ遺伝子を含む実際のウレアーゼオペロンの全体像は本研究では明らかではなく、それらについては今後の課題である。

4. 文献

- Matsuda M and Moore JE, *Appl. Environ. Microbiol.* 70; 4415-4418, 2004.
- Sekizuka T *et al.*, *Res. Microbiol.* 155; 185-191, 2004.
- Matsuda M *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69; 3308-3310, 2003.