

第24回麻布環境科学研究会 講演B5

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) における ウレアーゼオペロン全体像の解明と 組換え体ウレアーゼの発現

薄井 香織¹, 飯田 春奈², 堀尾 拓矢², 村山 洋^{1,2},
松田 基夫^{1,2}, B.C. Millar³, J.E. Moore³

¹麻布大院・環境保健・分子生物学, ²麻布大・環境保健・遺伝子生物学,
³Northern Ireland Public Health Lab, Belfast, N Ireland, UK

はじめに

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (urease-positive thermophilic *Campylobacter*; UPTC) は、河川水や二枚貝などの自然環境下 (Bolton *et al.*, 1985) やカモメの糞便 (Kaneko *et al.*, 1999) から分離されており、広く世界的に分布している可能性が示唆されている (Matsuda and Moore, 2004)。我々はこれまで、カンピロバクター属の中では珍しくウレアーゼを産生する UPTC のウレアーゼ遺伝子群について解析を行ってきた。その結果、我々は UPTC のウレアーゼオペロンの全体像を初めて解明した。そこでここでは、この UPTC のウレアーゼオペロンの全体像と、更に得られた組換え体ウレアーゼの発現について報告する。

材料及び方法

今回、研究に用いた UPTC の供試菌株は、岡山県の河川水より岡山県環境保健センターの井上正直らによって分離された日本株2株のうちの1株 CF89-12 (Matsuda *et al.*, 1996) である。菌株は、Butzler 選択培地を用いて、37℃、5～10%の微好気条件下 (Campy pacTM, BBL) で48時間培養した。

まず、CF89-12株よりゲノムDNAを調製し、制限酵素 *Mbo* I で部分分解した4～6 kbpのゲノムDNA断片を、あらかじめ *Bam*H I で切断された pUC19 ベクターに挿入してゲノムDNAライブラリーを作成し

た。ついで、UPTCの2つのウレアーゼ構造遺伝子 AB を仮説的に想定し、*ureA* の領域を増幅するための PCR 用プライマーを *in silico* に作成し、増幅された *ureA* プローブと反応するコロニーをハイブリダイゼーションで検索した。ウレアーゼ遺伝子群の解析には、DNA シークエンサー (SQ5500EL, Hitachi 社製) を用い、GENETYX-MAC (version 9; GENETYX 社製) で配列を決定した。また、得られたウレアーゼ遺伝子群の配列情報をもとに、4.2 kbp から成るプロモーター領域を含む全ウレアーゼ遺伝子群を PCR で増幅し、TA クローニング後、大腸菌細胞中での組換え体ウレアーゼの発現を試みた。更に、この組換え体がウレアーゼ活性を示したことから、組換え体を含む大腸菌細胞から全 RNA の抽出を行い、UPTC *ureG* をプローブとして、ノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。

結果及び考察

UPTC CF89-12 株ゲノム DNA ライブラリーより得られた組換え体プラスミド DNA から約 4.2 kbp に渡る全ウレアーゼ遺伝子群の配列決定を行ったところ、ウレアーゼ遺伝子群は2つの構造遺伝子 (*ureA* と *ureB*) 及び3つのアクセサリー遺伝子 (*ureE*, *ureF* 及び *ureG*) から成る5つの遺伝子で構成されていることが初めて明らかとなった。更に、*ureA* 遺伝子の5'側上流には可能なプロモーター領域が、そし

て *ureG* 領域の3'側下流には可能な非依存性の転写終結領域が存在した。また、興味あることに構造遺伝子 *ureB* とアクセサリ遺伝子 *ureE* の間には終止コドンと開始コドンの「overlap」が確認された。更に、UPTCのウレアーゼ遺伝子群の配列はヘリコバクター属のそれらと大変類似していることが明らかとなった。

次いで、PCRで増幅されたUPTCの全ウレアーゼ遺伝子群をサブクローニングし、得られた組換え体が大腸菌細胞内で発現させたところ、ウレアーゼ活性が検出された。そこで、この大腸菌細胞の全RNAを抽出し *ureG* をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、ウレアーゼ遺伝子群の転写レベルでの発現が確認された。

また、決定したウレアーゼ構造遺伝子の配列情報を基に、系統樹を作成したところ、UPTCとヘリコバクター属のウレアーゼ遺伝子は、1つのクラスターを形成することが明らかとなり、共通の祖先に由来することが強く示唆された。

参考文献

- Bolton, F. J. A. V. Holt, and D. N. Hutchinson. 1985. Urease-positive thermophilic campylobacters. *Lancet* i: 1217-1218.
- Kaneko, A., M. Matsuda, M. Miyajima, J. E. Moore, and P. G. Murphy. 1999. Urease-positive thermophilic strains of *Campylobacter* isolated from seagulls (*Larus* spp.). *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 7-9.
- Matsuda, M. and J. E. Moore, 2004. Urease-positive thermophilic *Campylobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4415-4418.
- Matsuda, M., A. Kaneko, M. Fukuyama, T. Itoh, M. Shingaki, M. Inoue, J. E. Moore, P. G. Murphy, and Y. Ishida. 1996. 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.