

第24回麻布環境科学研究会 講演B6

# 高温性 *Campylobacter lari* の 16S rDNA のクローニングと シーケンシングそしてその配列情報に基づく 分子分類学的解析

三橋 直美<sup>1</sup>, 関塚 剛史<sup>1</sup>, 村山 洋<sup>1</sup>, Millar BC<sup>2</sup>, Moore JE<sup>2</sup>, 松田 基夫<sup>1</sup><sup>1</sup>麻布大院・環境・分子生物学, <sup>2</sup>N. Ireland Public Health Lab., Belfast, N. Ireland

## 1. はじめに

ウレアーゼを産生する高温性 *Campylobacter* (UPTC) は、1985年にイギリスの河川水、海水及び海水中の二枚貝などから初めて分離、報告されて以来、現在までに世界で200株近くが分離されている (Matsuda and Moore, 2004)。UPTCは、「従来からのナリジキシン酸耐性の *C. lari*」とその性状とが酷似していることから、*C. lari* の variant あるいは biovar であるとされて今日に至っている。*C. jejuni*, *C. coli* そして *C. lari* に代表される高温性カンピロバクター種はヒト腸炎、下痢症そして食中毒の原因菌として注目されており、それ故にこれら高温性カンピロバクターを正確にそして迅速に同定し、識別する手法の確立は重要である。*C. lari* に関しては、特に *C. jejuni* に比べてヒトカンピロバクター症の発症頻度が低いことから余り注目されてこなかった。しかし我々の研究室で、過去20年以上に渡る詳細な文献的調査を行った所、これまで世界の10数カ国で30症例110株以上のヒト臨床由来株が報告されており、そこで報告されている病徴は胃腸炎、腹痛、下痢症、菌血症、敗血症などであった。それ故に、*C. lari* は *C. jejuni* で報告されているものと大変類似した重篤な疾病の要因となることは明らかである。更に *C. lari* でも、正常な免疫応答のない患者でも十分ある患者でも重篤な疾病の要因となることが報告されている。

そこで本研究では、まず *C. lari* の代表的な2つの taxon とされる urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) と urease-negative thermophilic *Campylobacter*

*lari* (UN *C. lari*) を分子同定、識別するための手法の確立を目的として、リボソームの構成成分の一つである16SリボソームRNAをコードする遺伝子16S rDNAに着目した。16S rDNAは、すべての細菌細胞に普遍的に存在し、配列が保存されており、同時に同じ系統学的祖先を共有している生物群がどれかを推定するのに十分なだけの配列の変異が存在しているとされている。

## 2. 材料と方法

まず *C. lari* (UPTC, n = 12; UN *C. lari*, n = 3) 分離株の16S rDNAの塩基配列を決定し、ついで高温性カンピロバクター種間での16S rDNA配列の比較を行い、分子識別が可能であるか否かを検討した。即ち、様々な環境由来のUPTC 12株及びUN *C. lari* 3株の計15株を用い、PCR法により16S rDNA断片のほぼ全長領域を増幅し、TAクローニング法でクローン体を作成後、塩基配列の決定を行った。また、database上に登録されている高温性カンピロバクター種リファレンス株の16S rDNAの塩基配列を求め、それらと合わせて比較検討した。

## 3. 結果および考察

今回の研究ではまず、PCRによって16S rDNAのほぼ全長にあたる約1,500 bpを増幅し、クローニング後、塩基配列を決定しその配列の類似性を求めたところ、UPTC株間で98.3~100%、UPTCとUN *C. lari* 間で97.8~98.9%、UPTCと *C. jejuni* 間で98.0~

98.6%，UPTCと*C. coli*間で96.7～97.3%，UPTCと*C. jejuni* subsp. *daylei*間で97.7～98.2%，UPTCと*C. upsaliensis*間で94.1～95.0%，UPTCと*C. hyoilei*間で98.1～98.6%，またUN *C. lari*株間で99.3～99.9%の類似性であった。しかしながら、驚くべきことに、今回の研究で配列決定されたUPTC NCTC12896株の16S rDNAの配列はリファレンス株として用いたUN *C. lari* LMG11760株のそれと全く同一であることが初めて明らかとなった。そして次に、UPTC株間、UN *C. lari*株間、UPTCとUN *C. lari*種間での多型部位とその塩基配列を比較した。その結果、UPTC株間ではヌクレオチドポジション (np) 600～1000の400 bpの間に、全体で21ある多型部位のうちその約57%にあたる12部位が集中して存在していることが明らかとなった。また、UPTCとUN *C. lari*の間ではnp 60～90に5つ、np610～630に2つ、np790～800に2つ、np840～850に2つそしてnp1100～1120に2つと、10～30 bpの狭い領域に複数の多型部位が集中して存在していた。

次に16S rRNAの二次構造を基にしてUPTC株間、UN *C. lari*株間及びUPTCとUN *C. lari*の間で比較し、変異が起こっていると考えられる部位を推定し、検討した。二次構造上では、UPTC株間、UN *C. lari*株間での点突然変異はランダムに生じているように見えるが、UPTCとUN *C. lari*間では、ほとんどが変異部位同士で塩基対を形成していることが明らかとなった。

最後に、UPGMA法を用いてリファレンス株を含め系統樹を作成したところ、上述したUPTC1株とUN *C. lari* 1株を除いて、リファレンス株を含めたUPTC株はお互いに明らかに高度な遺伝的変異性を示し、リファレンス株を含むUN *C. lari*株とは分離して1つのクラスターを形成した。また、他の高温性カンピロバクター種はこれら2つのクラスターからは明らかに分離して、更にいくつかのクラスターを形成した。

以上のような結果は、まず第1に*C. lari*は16S rDNAの配列データに基づいて遺伝的に大変多様性に富んでいること、そして第2に*C. lari*は他の高温性カンピロバクター種とは識別され得るが、*C. lari*の代表的な2つのtaxonとされるUPTCとUN *C. lari*は16S rDNAの配列情報に基づいては、系統分類学的に明らかに識別され得ないことを強く示唆している。

以上の結果より、*C. lari*は16S rDNAの配列情報に基づいても遺伝的に大変多様性に富んでいるが、*C. lari*の2つの代表的なtaxonとされるUPTCとUN *C. lari*は16S rDNAを標的としては分子識別出来ないことが初めて明らかとなった。

#### 4. 文献

Matsuda M. and Moore J. E., Appl. Environ. Microbiol. 70, 4415-4418, 2004.