

Campylobacter lari, 特にウレアーゼ陽性高温性 カンピロバクターのゲノム DNA 上の多遺伝子配列情報に 基づく分子識別；フラジェリンの偽遺伝子の発見

Molecular discrimination based on the sequence information of multiple genes on the genomic DNA of Campylobacter lari, in particular urease-positive thermophilic Campylobacter (UPTC); shorter flaA-like sequences containing internal termination codons (TAG)

松田基夫, 高宮信三郎¹, 三田明弘, 村山 洋

麻布大学大学院環境保健学研究科, ¹順天堂大学大学院医学研究科

Motoo Matsuda, Shinzaburo Takamiya¹, Akihiro Sanda, and Ohoshi Murayama

Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University; ¹Graduate School of Medicine, Juntendo University

Abstract. A primer pair of A1 and A2, which ought to generate a product of approx. 1700 bp of the *flaA* gene for *Campylobacter jejuni*, was used to amplify products of approx. 1450 bp for two Japanese isolates of UPTC, CF89-12 and CF89-14. After molecular cloning and sequencing, the nucleotide sequences of the amplicons from the two isolates were found to be 1461 bp in length and to have nucleotide sequence differences in relation to each other at four nucleotide positions, respectively. Nucleotide and amino acid sequence alignment and homology analysis demonstrated that the polymerase chain reaction (PCR) amplicons from the two Japanese isolates have approx. 83% nucleotide and 80% amino acid sequence homology to the possible open reading frame of the *flaA* gene of UPTC NCTC 12892.

Surprisingly, however, both PCR amplicons from the Japanese UPTC have two internal termination codons (TAG) at nucleotide positions from 775 to 777 and 817 to 819, respectively.

はじめに

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) はグラム陰性で微好気性の細菌であり、イングランドで1985年にBoltonらによって初めて発見された(1, 2)。その後UPTC株はフランス, 北アイルランド, オランダそして日本で分離され報告されている(3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)。UPTCはドットプロットハイブリダイゼーション及び生化学的性状に関する解析により*Campylobacter lari*のvariantあるいはbiovarとされて今日に至っているが(2, 4), その

分類学的位置については未確定のままである。更に、UPTCはフランスで分離された4株がヒト臨床由来株である以外、そのほとんどが河川水、海水、海水中の二枚貝そしてカモメなどの自然環境中から分離されたものである。

細菌のフラジェリンはその運動性、走化性更には病原性に関与しているとされているが、*C. lari*のフラジェリンについての知見は従来なかった。一方*C. jejuni*のフラジェリン遺伝子に関しては、クローニングとシーケンシングそしてそれら知見に基づく*flaA*遺伝子増幅のためのPCRプライマーについて報

告されている (12)。

そこで我々は、*C. lari* 及び UPTC のフラジェリンの遺伝形質及び表現形質レベルでの性状を明らかにすることを目的として、*C. jejuni* のために開発された PCR の実験系の有効性の検討を含めて、*C. lari* のフラジェリン解析のための実験系の確立のための研究を行っている。その過程で、我々は今回 UPTC の日本株である CF89-12 及び CF89-14 株中で *flaA* の pseudogenes (偽遺伝子) を発見したので報告する。

材料及び方法

本研究に用いられた UPTC の日本株 CF89-12 及び CF89-14 は、岡山県の旭川と吉井川の河川水からそれぞれ岡山県環境保健センターの井上直正によって分離されたものである (10)。これら 2 株は高温性カンピロバクターに共通する生化学的性状を示したが、いずれも馬尿酸塩及びインドール酢酸加水分解能陰性であることから *C. lari* として同定されている。しかしこれら 2 株は *C. lari* の一般的性状とは異なり、ナリジキシン酸感受性、ウレアーゼ産生能を有し、UPTC taxon とされた。

今回の研究に用いられた UPTC 日本株の *flaA* 遺伝子増幅のための PCR 用プライマーは Harrington (1997) らによって *C. jejuni* 81116 株の *flaA* の open reading frame (ORF) の全長約 1700bp の増幅のために構築されたもので、A1, 5'-GGATTTCGTATTAACA-CAAAATGGTGC-3' と A2, 5'-CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG-3' である。PCR 反応は 50 μ l の反応液中で 94 $^{\circ}$ C 1 分間の熱変性、50 $^{\circ}$ C 1 分間のプライマー会合、そして 72 $^{\circ}$ C 1.5 分間の伸長反応を 30 サイクル行った後に後伸長反応を 72 $^{\circ}$ C 7 分間行うというものであった。

増幅産物をクローン化するために、PCR 産物を精製後 pGEM-T ベクターを用いて TA クローニングを行った。そしてクローン化された増幅産物の塩基配列の決定には、Thermo sequenase premixed cycle-sequencing kit を用いたサイクルシーケンシング反応の後に、日立自動 DNA シークエンサー SQ-5500EL を用いて行った。

結果及び考察

まず本研究において、*C. jejuni* 81116 株の *flaA* 遺伝

子の ORF の全長約 1700bp を増幅するためにデザインされた PCR プライマー対 A1/A2 と、2 つの日本の UPTC 株 CF89-12 及び CF89-14 株から調製された鋳型 DNA を用いて PCR を行った場合に、いずれも 1700 bp より短い約 1450 bp の PCR 産物が増幅されることが明らかとなった (データ省略)。

クローン化し配列決定された後のこれら 2 株の PCR 増幅産物の全塩基配列はすでにデータベース上に公開されている (DDBJ/EMBL/GenBank の accession number AB 084911 と AB084912)。これら増幅産物の全塩基配列はいずれも 1461 bp であり、更にお互いに 4 つのヌクレオチド部位で異なっていた。

これら 2 株の増幅産物の可能な ORF (1458 bp) のヌクレオチド配列から想定されるアミノ酸の配列を、同時に解析した NCTC12892 株のそれとを同時にアライメントした結果を Fig. 1 に示した。なおこれらのアミノ酸配列は、すでにデータベース上に公開されている *C. jejuni* 81116 の *flaA* との間で N 末端 144 アミノ酸残基、C 末端 63 アミノ酸残基に関して調べたところ、いずれも約 76-90 % の高い類似性を示しておりこれらのクローンはフラジェリン又はフラジェリン様遺伝子であることは明らかである。

しかし驚くべきことに、Fig. 1 で明らかな様にこれら 2 つの日本株 CF89-12, CF89-14 の *flaA* クローンは、N 末からアミノ酸 259 残基目と 273 残基目 (ヌクレオチド部位 775 から 777 そして 817 から 819) に相当する 2ヶ所に 2 つの終止コドン配列 (TAG) を持っていた。しかしながら NCTC12892 株の *flaA* 配列の中にはその様な終止コドンは存在しなかった。

このような結果は、これら日本の UPTC 2 株の *flaA* 遺伝子は *flaA*-like sequence 又は *flaA* の pseudogene であることを強く示唆している。なおデータは示さないが、その後の研究でこれら日本の UPTC 株 2 株は flagellin の生化学的精製及び flagella の電子顕微鏡的解析の結果からいずれも flagellin と flagella を持っていないことが明らかとなった。

なお、我々は既に 40 株以上の UPTC 株のプラスミドに関する研究を行っているが、これら日本の UPTC 株 2 株はプラスミドを有していないことが明らかとなっており、今回明らかとなった *flaA*-様配列 (偽遺伝子) はゲノム DNA に由来することは明らかである。

NCTC12892			1
GFRINTNGASLNAQV NAGMNSRALDSSLARLSSGLRINSAADDASGMAIADSLRNQAASL		60	
CF89-12	1L.....KT..N..	60	
CF89-14	1L.....KT..N..	60	
NCTC12892			61
GQAINNGNDAIGILQTADKAMDEQLKILDTIKVKATQAAQDGGSAKTRAMIQGEINKLME		120	
CF89-12	61A...NSM..I.....T.....	120	
CF89-14	61A...NSM..I.....T.....	120	
NCTC12892			121
ELDNIANTTTTYNGKQLLSGAFSNQQFQVGDKANQTINATIGATQSAKIGQTRFETGSRIT		180	
CF89-12	121S.A.A...I.....S.N.....V.V.	180	
CF89-14	121S.A.A...I.....S.N.....V.V.	180	
NCTC12892			181
GSGNAGFTIKNYDGVNDFKIQSVILSTSAGTGLGALAAEINKSSDKTGVRATATVQTISS		240	
CF89-12	181 AG.SS.....S.....YT..P.TI..GV.....A.....S...	240	
CF89-14	181 AG.SS.....S.....YT..P.TI..GV.....A.....S...	240	
NCTC12892			241
GTIQAGNTGDTFTINGVVIGKVAVQAGDKDGLVAAINAKKDTTGVEASVVNGQLVLSA		300	
CF89-12	241 SALT..S..A..A..D..L-VRLFMLMT.MVL-FLLSML.E.....I.D.K.....	298	
CF89-14	241 SALT..S..A..A...L-VRLFMLMT.MVL-FLLSML.....I.D.K.....	298	
NCTC12892			301
DGRGIELSGLGTALSGNIASVNYGRSLVKNDSGSDIIISGGSGAGFGTAAAEATVNLESV		360	
CF89-12	299K...SIGD.DAQ.TEE.....F.....AV.LT.NS.....I	358	
CF89-14	299K...SIGD.DAQ.TEE.....F.....AV.LT.NS.....I	358	
NCTC12892			361
KGQISADIACAMGFNAMSSATQPGSK-TGCVTTLQGAMAVMDIADTAIANLDTIRANIGA		419	
CF89-12	359 ..E.T....S.....T.NTA.K.Q.AG..S.....	418	
CF89-14	359 ..E.T....S.....T.NTA.K.Q.AG..S.....	418	
NCTC12892			420
TQNQITSTINNISVTQVNVKAAESQIRDVDFASESANYSKANILAQSGSYAMAQANAASQ		479	
CF89-12	419	478	
CF89-14	419	478	
NCTC12892	480 NVLRLLQ		486
CF89-12	479	485	
CF89-14	479	485	

Fig. 1 Possible amino acid sequence alignment of *flaA*-like sequences from CF89-12 and CF89-14. Dots indicate identical residues, changes are so indicated; dashes are deleted. Amino acids are designed by the single-letter code. Numbers at left and right refer to amino acid residues of the possible amino acid sequences of the *flaA* gene fragment and *flaA*-like sequence of the three strains, respectively.

要 約

日本の河川水から分離されたウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) 株 2 株, CF89-12,

CF89-14, から, いずれも内部に 2 つの終止コドン (TAG) を持つ *flaA*-様配列 (*flaA* の偽遺伝子) を単離した。これら 2 つの *flaA* 偽遺伝子は更に *C. jejuni* で報告されている *flaA* (約 1,700 bp) よりも短く, そ

の全長はいずれも 1461 bp であった。

なお、これら UPTC2 株からはいずれもプラスミドは分離されておらず、それ故にこれら 2 つの偽遺伝子はゲノム DNA 上にコードされていることが示唆された。

文 献

- 1) Bolton, F. J., Holt, A. V. and Hutchinson, D. N., *Lancet* i: 1217-1218, 1985.
- 2) Owen, R. J., Costas, M., Sloss, L. and Bolton, F. J. *J Appl Bacteriol*, 65: 69-78, 1988.
- 3) Megraud, F., Chevrier, D., Desplaces, N., Sedallian, A. and Guesdon, J. L. *J Clin Microbiol*, 26: 1050-1051, 1988.
- 4) Bezan, M. C., Ribou, G., Barberis-Giletti, C. and Megraud, F. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9: 895-897, 1990.
- 5) Wilson, I. G. and Moore, J. E. *Epidemiol Infect*; 116: 147-153, 1996.
- 6) Moore, J. E., Gilpin, D., Crothers, E., Canney, A., Kaneko, A. and Matsuda, M. *Vet Borne Zoon Dis*, 2: 111-114, 2002.
- 7) Matsuda, M., Kaneko, A., Stanley, T., Millar, B. C., Miyajima, M., Murphy, P. G. and Moore, J. E. *Appl Environ. Microbiol.*, 69: 3308-3310, 2003.
- 8) Kaneko, A., Matsuda, M., Miyajima, M., Moore, J. E. and Murphy, P. G. *Lett Appl Microbiol*; 29: 7-9, 1999.
- 9) Endtz, H. P., Vliegthart, J. S., Vandamme, P., Weverink, H. W., van den Braak, N. P., Verbrugh, H. A. and van Belkum, A. *Int J Food Microbiol*, 34: 79-88, 1997.
- 10) Matsuda, M., Kaneko, A., Fukuyama, M., Ito, T., Shingaki, M. Inoue, M., Moore, J. E., Murphy, P. G. and Ishida, Y. *J Appl Bacteriol*, 81: 608-612, 1996.
- 11) Matsuda, M., Shibuya, T., Itoh, Y., Takiguchi, M., Furuhashi, K., Moore, J. E., Murayama, O. and Fukuyama, M. *Int J Hyg Environ Health*, 205: 321-324, 2002.
- 12) Harrington, C. S., Thomson-Carter, F. M., and Carter, P. *E. J. Clin. Microbiol.*, 35: 2386-2392, 1997.