

## ウレアーゼ陽性高温性 *Campylobacter* (UPTC) の重複する2つの flagellin 遺伝子の構造解析と性状

関塚 剛史<sup>1</sup>, 村山 洋<sup>1</sup>, John E. Moore<sup>2</sup>, B. Cherie Millar<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, UK

### 1. はじめに

*Campylobacter* は、食中毒を起因するグラム陰性のらせん状桿菌であり、この細菌による食中毒は、世界中で報告されている (Moore *et al.*, 2005)。また、感染後、ギラン・バレー症候群を続発する事、更に *Campylobacter* が、悪性免疫増殖性疾患である、免疫増殖性小腸疾患にも関与する可能性があるとの報告もある。しかしながら、*Campylobacter* が引き起こす腸炎のメカニズムでさえも、未だ不明なままである。

*Campylobacter* のべん毛は、運動性及び走化性に関与する以外に、宿主細胞の付着及び侵入にも関与することが報告されている。そこで本研究においては、ヒトへの病原性が確証されている *C. jejuni* 及び *C. coli*, 発症頻度は高くないがヒト疾患との相関が報告されている *C. lari*, そして病原性との相関が確定していない urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC ; Matsuda and Moore, 2004) の自然環境由来1株及び生体由来2株 (カモメ及びヒト由来) のフラジェリンをコードする2つの flagellin 遺伝子の全長の構造を解析し、更に表現形質レベルで比較検討し、*Campylobacter* 属におけるべん毛と疾患との関係を分子生物学的に解明することを目的とした。

### 2. 材料と方法

本研究には、河川水から分離された自然環境由来の UPTC NCTC12892, カモメから分離された生体由来の UPTC A3 及び、ヒトから分離された生体由来の UPTC 89049 を用いた。これらのゲノム DNA を抽出し、まず *Sau*3A I, *Hind* III, *Xba* I の部分消化断片及び、*Hind* III, *Xba* I の完全消化断片を用いてゲノ

ム DNA ライブラリーを作成した。また、flagellin をコードする *flaA* をプローブとし、各々の分離株の目的の断片を含むクローンをゲノム DNA ライブラリーから得た。次いで、クローンから目的の DNA 断片を含むプラスミドを精製し、シーケンスを行った。次に、得られた塩基配列のコンティグを行い、UPTC の各々の株の flagellin をコードする2つの遺伝子の全塩基配列を決定し、更に近接する遺伝子の塩基配列決定及び遺伝子座の解析を行った。また、今回使用した3株の UPTC の flagellin タンパク質を生化学的に精製しその分子量を算出した。

### 3. 結果及び考察

本研究ではまず、1株の自然環境由来及び2株の生体由来の UPTC のそれぞれの2つの flagellin 遺伝子の全塩基配列を決定し、更にそれらの遺伝子に近接した遺伝子の全塩基配列及び部分配列を決定した。生体由来の UPTC2 株の遺伝子座は、従来報告されている *C. jejuni*, *C. coli* 及び *C. lari* のそれらに類似した結果となり、2つの flagellin 遺伝子、*flaA* 及び *flaB* はゲノム上にタンデムに存在していた。また、生体由来の UPTC2 株は、近接する遺伝子も *C. lari* のそれらに類似した結果となった。しかしながら、自然環境由来の UPTC NCTC12892 の遺伝子座は *C. jejuni*, *C. lari* 及び生体由来の UPTC2 株とは明らかに異なっていた。即ち *flaA* 及び *flaB* は逆平行に存在し、また、近接する遺伝子も異なっていた。従って、自然環境由来の UPTC では、flagellin 遺伝子のみならずゲノム上で大きな変異が生じている事が示唆される。

*flaA* 及び *flaB* の予測されるアミノ酸配列のアライ

メントの結果から、生体由来のUPTCでは、各々の2つのflagellin遺伝子間で高い相同性を示し、想定されるopen reading frame (ORF)の長さも同様であった。しかしながら、自然環境由来のUPTCでは、2つのflagellin遺伝子間の相同性は他の*Campylobacter*よりも低く、また*flaA*のORFが*flaB*のORFよりも短いことが明らかとなった。更に、生体由来のUPTCの2つのflagellin遺伝子は*C. lari*のそれらに対して90%以上の高い配列の類似性を示した。しかし、自然環境由来のUPTCのflagellin遺伝子は、生体由来のUPTC及び*C. lari*のそれらに対して約70%の類似性であった。従って、自然環境由来のUPTCのflagellin遺伝子は、生体由来のUPTC及び*C. lari*とは異なる構造となり、独自に進化していったことが考えられる。更に、自然環境由来のUPTCの*flaA*及び*flaB*では、*C. jejuni*及び*C. coli*のflagellinタンパク質の糖鎖修飾されるlarge variable regionに相当する部位の欠失が認められることから、この領域がヒトへの病原性および家禽の腸管内のcolonizationに関与している事が予想された。

次にUPTCのflagellin遺伝子のプロモーター領域の解析から*flaA*のプロモーターは $\sigma^{28}$ 、*flaB*では $\sigma^{54}$ であり、*C. jejuni*の場合と同様であることが明らかとなった。このことはUPTCのべん毛も主に*flaA*で構成されている事を示唆している。また、生体由来のUPTCでは、*flaA*のターミネーター様配列と*flaB*のプロモーター配列との間で特徴的な繰り返し配列が確認された。しかしながら、*C. jejuni*、*C. lari*及び自然環境由来のUPTCには繰り返し配列が認められなかった。それ故に、この繰り返し配列は、

UPTCにおけるflagellin遺伝子及びそれらに近接した遺伝子座の転座あるいは逆位に関与する可能性が示唆される。

更に、3株のUPTCからflagellinタンパク質を生化学的に精製した。また、これらのflagellin遺伝子はプロモーター及びターミネーターを有していることから、今回解析したflagellin遺伝子は機能していることは明らかである。精製したflagellinタンパク質の分子量を算出した結果、flagellinタンパク質は、アミノ酸配列から推定される分子量より大きかった。これまで、*C. jejuni*及び*C. coli*のflagellinタンパク質は糖鎖修飾されていることが報告されている。それ故に、今回精製したUPTCのflagellinタンパク質にも糖鎖修飾の生じていることが予想される。

以上の結果から、UPTCのべん毛を構成するflagellinは、その分離株の由来の違いから大きく2つのタイプに分けられることは明らかである。しかし、発現形式及び翻訳後修飾などの過程は*C. jejuni*及び*C. coli*などと同様である事が予想される。また、病原性を有する*C. lari*、生体由来及び自然環境由来のUPTCの分離プロファイルとflagellin遺伝子の遺伝子座及び構造の特徴性は相関していることから、自然環境由来のUPTCのflagellin遺伝子は自然環境に適応する様に変異し、ヒトへの病原性に影響を与える事が無くなったものと考えられる。

#### (参考文献)

- Matsuda M and Moore J E, Appl. Environ. Microbiol., 70, 4415-4418 (2004)  
Moore J E *et al.*, Vet. Res., 36, 351-382 (2005)