

# 高温性カンピロバクターのゲノム解析と多遺伝子配列情報に基づく分子識別； *Campylobacter lari* の 16S rDNA

*Molecular discrimination based on the sequence information of multiple genes on the genomic DNA of thermophilic Campylobacter; Sequencing and analysis of the 16S rDNA of thermophilic Campylobacter lari and their reliability for molecular discrimination*

松田基夫，三田明弘，村山洋

麻布大学大学院環境保健学研究科

Motoo Matsuda, Akihiro Sanda, and Ohoshi Murayama

Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University

**Abstract.** When the sequences of nearly full-length of 16S rDNA of the 15 isolates of two representative taxons of *Campylobacter lari* consisting of 12 urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) and three urease-negative *Campylobacter lari* (UN *C. lari*) were analyzed, the 12 isolates of UPTC showed 99.0-100 % sequence similarities, with major hypervariable region of the 15 heterogeneous sites being from nucleotide position 620 to 1110 to each other, the three of UN *C. lari* showed 99.8-99.9 % similarities with the three heterogeneous sites. However, the 15 isolates revealed to share relatively lower sequence similarities of 98.2-98.9 %. Alternatively, a total of 40 heterogeneous sites of the seven isolates of UN *C. lari* including the other four reference strains were located throughout the sequences of the 16S rDNA. Surprisingly, however, one of the UPTC isolates examined showed the identical 16S rDNA sequence to that of a reference UN *C. lari* strain.

The phylogenetic tree constructed by the mean of UPGMA method demonstrated that the UPTC isolates including a reference strain examined formed a cluster having a genetic hypervariability separate from the isolates of UN *C. lari*, except for the two isolates described above. Other thermophilic *Campylobacter*s formed some clusters apparently separate from these two clusters. Thus, the present results clearly demonstrated that the species of *C. lari* is genetically diverse and the two representative taxons of UPTC and UN *C. lari* cannot be reliably discriminated by use of 16S rDNA sequence data.

## 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100株以上が分離されている (Matsuda and Moore, 2004)。UPTCは「従来からのナリジキシン酸耐性の *C. lari*」とその性状がと酷似し

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。しかし我々が、過去20年以上に渡る文献上の調査を詳細に行った所、これまで世界の10数か国で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。

高温性カンピロバクター3菌種*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*では16S rDNAの配列の類似性は、一般に細菌種の識別の指標とされている97%より、高いとされてきた。しかし、*C. lari*の16S rDNAの配列に関しては従来、詳細に解析されておらず、またその類似性や分類学的解析にはその内部に多くの未同定の塩基を含む配列が多く用いられている。更に、*C. lari*の代表的な2つのtaxonであるウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター(UPTC)とウレアーゼ陰性(UN)*C. lari*が、16S rDNAの配列情報によって分子識別可能であるか否かは不明のままである。それ故に、*C. lari*分離株の16S rDNAの配列情報の詳細な解析を行うことは重要な課題の1つである。そこで本研究では、多くの*C. lari*株の「16S rDNAのほぼ全長に渡る領域」をクローニングし、内部に未同定の塩基を含まない配列の決定を行い、比較検討した。

## 材料と方法

まず*C. lari* (UPTC, n = 12; UN *C. lari*, n = 3) 分離株の16S rDNAの内部に未同定の塩基を含まない塩基配列を決定し、ついで高温性カンピロバクター種間での16S rDNAの配列を比較検討した。即ち、カモメを含む様々な自然環境及びヒト由来のUPTC 12株及びUN *C. lari* 3株の計15株 (Table 1) 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、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のリファレンス株の16S rDNAの塩基配列を求め、それらと合わせて比較検討した。

## 結果及び考察

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、12株のUPTC株間で99.0~100%、UPTCとUN *C. lari* 間で98.2~98.9%、そしてUN *C. lari* 株間で99.8~99.9%の類似性であった (Table 2)。このような結果はUPTCの12株間の配列の方がUN *C. lari* 3株の配列に対するよりも明らかに16S rDNA配列の類似性が高いことを示している。また、UN *C. lari* 3株間では99.8~99.9%と16S rDNAの高い配列類似性が認められた。更に、これら*C. lari* 15株間での16S rDNAの「maximum sequence diversity」は

Table 1. Isolates of UPTC and UN *C. lari* used in the present study and accession numbers of the nucleotide sequence data of the 16S rDNA accessible in the DDBJ/EMBL/GenBank

Isolate no.	Organism	Source	Country	NAL (30 µg/ml)	Accession number
CF89-12	UPTC	River Water	Japan	S	AB066098
CF89-14	UPTC	River Water	Japan	S	AB181356
NCTC12892	UPTC	River Water	England	S	AB181357
NCTC12893	UPTC	River Water	England	S	AB181358
NCTC12894	UPTC	Sea Water	England	S	AB181359
NCTC12895	UPTC	Mussel	England	S	AB181360
NCTC12896	UPTC	Mussel	England	S	AB181361
A1	UPTC	Seagull	N. Ireland	S	AB181362
A2	UPTC	Seagull	N. Ireland	S	AB181363
A3	UPTC	Seagull	N. Ireland	S	AB181364
89049	UPTC	Human	France	S	AB181365
92251	UPTC	Human	France	S	AB181366
JCM2530 <sup>T</sup>	UN <i>C. lari</i>	Seagull	Japan	R	AB181368
84C-1	UN <i>C. lari</i>	Human	N. Ireland	R	AB181367
84C-2	UN <i>C. lari</i>	Human	N. Ireland	R	AB181369

S, sensitive; R, resistant.

1.8%であった。

具体的に15株間の配列を見ると大変興味あることに、日本の河川水から分離されたUPTC CF89-12株とイギリスの海水中のムラサキガイから分離されたNCTC12895株の16S rDNAの配列は全く同一であった。しかしながら、更に驚くべきことに、今回の研究で配列決定されたUPTC株の1つでイギリスの海水中の二枚貝から分離されたNCTC12896株の16S rDNAの配列はリファレンス株として用いたカナダのヒト臨床由来のUN *C. lari* LMG11760株のそれと全く同一であることが明らかとなった。これはUPTCとUNC. *lari*で16S rDNAの配列が同一であるという初めての報告である。

次に *C. lari* の16S rDNAの配列に関して、他に同一のあるいは同一に近い配列の事例が存在するか否かを詳細に検討するために、内部に未同定の塩基を含まない4株のリファレンス配列を含む合計19株の *C. lari* の16S rDNA配列について調べた (Table 2)。その結果 *C. lari* の19株のそれぞれ2株間で、約1400塩基対での塩基配列の差異は0-38ヌクレオチドであった。具体的には、上述した2株間で同一の1事例

をはじめ1塩基の差異が10事例、2塩基の差異が7事例、3塩基の差異が7事例等々であった。

更に、UPGMA法を用いて、リファレンス株を含めてクラスター解析を行い系統樹を作成した所、*C. lari*株は他の高温性 *C. jejuni*及び *C. coli*とは離れて、いくつかの小さなクラスターからなる大きな1つのクラスターを形成することが明らかとなった (Fig. 1)。

以上の様に、内部に未同定の塩基を含まない *C. lari*15株の16S rDNAの配列に関する今回の研究から16S rDNAの配列情報は *C. lari*の2つの代表的な taxonであるUNC. *lari*とUPTCの分子識別には有効ではないことが初めて明らかとなった。

近年の細菌菌のDNAレベルでの分子同定の基準について言及すれば、16S rDNAの塩基配列の3%以上の配列の差異が異なる細菌種を示す境界値であるとされている。今回の高温性 *Campylobacter* の16S rDNA配列に関する結果はGorkiewiczらの報告(2003)とともに、これらの境界値に相当しない、16S rDNAの値が低い配列の類似性を種間で示す事例の典型的な1例であることを示している。

Table 2. Sequence similarities and numbers of nucleotide sequence differences of the 16S rDNA sequences of UPTC, UN *C. lari* and other thermophilic *Campylobacter* organisms

thermophilic <i>Campylobacter</i> organism	% Sequence similarities and numbers of nucleotide sequence differences																																			
	UPTC CF89-12	UPTC CF89-14	UPTC NCTC 12892	UPTC NCTC 12893	UPTC NCTC 12894	UPTC NCTC 12895	UPTC NCTC 12896	UPTC A1	UPTC A2	UPTC A3	UPTC 89049	UPTC 92251	UPTC CCUG 18267	<i>C. la</i> 84C-1	<i>C. la</i> 84C-2	<i>C. la</i> JCM2359	<i>C. la</i> LMG7607	<i>C. la</i> LMG11251	<i>C. la</i> LMG11760	<i>C. la</i> LMG14338	<i>C. la</i> CCUG23947	<i>C. je</i> CCUG11284	<i>C. do</i> CCUG24567	<i>C. co</i> CCUG11283	<i>C. hy</i> RMIT32A	<i>C. up</i> CCUG14913										
UPTC CF89-12	99.8	99.5	99.4	99.9	99.8	99.9	99.4	99.5	99.5	99.6	99.6	98.7	98.4	98.5	98.4	98.5	97.3	99.9	98.6	98.2	98.4	98.1	97.3	98.5	94.6											
UPTC CF89-14	3	99.6	99.3	99.9	100	99.9	99.4	99.7	99.3	99.8	99.7	98.7	98.5	98.6	98.5	98.6	97.4	99.9	98.7	98.3	98.5	98.1	97.3	98.5	94.6											
UPTC NCTC12892	7	6	99.7	99.6	99.6	99.7	99.2	99.4	99.1	99.4	99.4	99.1	98.7	98.9	98.7	98.9	97.7	99.6	98.9	98.5	98.5	98.1	97.0	98.3	94.4											
UPTC NCTC12893	8	10	4	99.4	99.3	99.4	99.0	99.1	99.0	99.1	99.1	98.8	98.5	98.6	98.5	98.6	97.4	99.4	98.7	98.3	98.2	97.8	96.7	98.1	94.1											
UPTC NCTC12894	1	2	6	8	99.9	99.9	99.4	99.6	99.4	99.7	99.7	98.7	98.5	98.6	98.5	98.6	97.4	99.9	98.7	98.3	98.5	98.1	97.3	98.5	94.6											
UPTC NCTC12895	3	0	6	10	2	99.9	99.4	99.7	99.3	99.8	99.7	98.7	98.5	98.6	98.5	98.6	97.4	99.9	98.7	98.3	98.5	98.1	97.3	98.5	94.6											
UPTC NCTC12896	2	1	5	9	1	99.5	99.7	99.4	99.7	99.7	99.7	98.8	98.5	98.7	98.5	98.7	97.5	100	98.7	98.3	98.5	98.2	97.4	98.6	94.6											
UPTCA1	9	6	11	15	8	8	7	99.7	99.4	99.7	99.7	98.5	98.5	98.3	98.5	98.4	97.1	99.5	98.4	98.0	98.2	97.8	97.1	98.3	94.6											
UPTCA2	7	4	9	13	6	4	4	4	99.3	99.9	99.8	98.6	98.3	98.5	98.3	98.6	97.2	99.6	98.5	98.1	98.3	98.0	97.1	98.4	94.8											
UPTCA3	7	9	13	15	8	10	9	6	9	99.2	99.2	98.3	98.3	98.2	98.3	98.2	97.0	99.4	98.2	97.8	98.0	97.7	97.1	98.1	94.1											
UPTC89049	6	3	9	13	5	3	4	5	1	10	99.9	98.6	98.4	98.5	98.4	98.7	97.3	99.7	98.6	98.2	98.4	98.0	97.2	98.5	94.8											
UPTC92251	6	4	9	13	4	5	4	4	3	11	2	98.6	98.4	98.5	98.4	98.7	97.3	99.7	98.6	98.2	98.4	98.0	97.2	98.5	95.0											
UPTC CCUG18267	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	98.0	98.1	98.0	98.1	97.0	98.8	98.2	98.2	98.4	97.1	97.1	98.4	94.3										
<i>C. lari</i> 84C-1	23	22	18	22	22	22	21	22	24	24	23	23		99.9	99.9	99.6	98.5	98.5	99.7	99.3	97.6	97.3	96.7	97.4	94.1											
<i>C. lari</i> 84C-2	21	20	16	20	20	19	19	23	22	25	21	21	ND	2	99.8	99.8	98.7	98.7	99.9	99.4	97.8	97.4	96.7	97.6	94.3											
<i>C. lari</i> JCM2359	22	22	18	22	22	21	20	22	24	24	23	23	ND	1	3	99.7	98.4	98.5	99.8	99.4	97.6	97.3	96.7	97.4	94.1											
<i>C. la</i> LMG7607	21	20	16	20	20	20	19	22	20	26	19	19	ND	5	3	4	98.4	98.7	99.9	99.5	97.7	97.4	96.7	97.5	94.4											
<i>C. lari</i> LMG11251	38	37	33	37	37	37	36	41	39	43	38	38	ND	21	19	22	22	97.5	98.5	98.1	97.2	96.9	96.2	97.0	94.8											
<i>C. la</i> LMG11760	2	1	5	9	1	1	0	7	5	9	4	4	ND	21	19	21	19	36	98.7	93.3	98.5	98.2	97.3	98.6	95.6											
<i>C. lari</i> LMG14338	20	19	15	19	19	19	18	23	21	25	20	20	ND	4	2	3	1	21	18	99.6	97.8	97.5	96.8	97.6	94.3											
<i>C. la</i> CCUG23947	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94.4											
<i>C. jejuni</i> CCUG11284	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	95.1											
<i>C. doylei</i> CCUG24567	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94.6											
<i>C. coli</i> CCUG11283	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94.2											
<i>C. hyoilei</i> RMIT32A <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94.9											
<i>C. upsaliensis</i> CCUG14913	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94.9											

<sup>a</sup>The values on the upper right are the levels of sequence similarities, and the values on the lower left are the numbers of nucleotide sequence differences; ND, not determined.

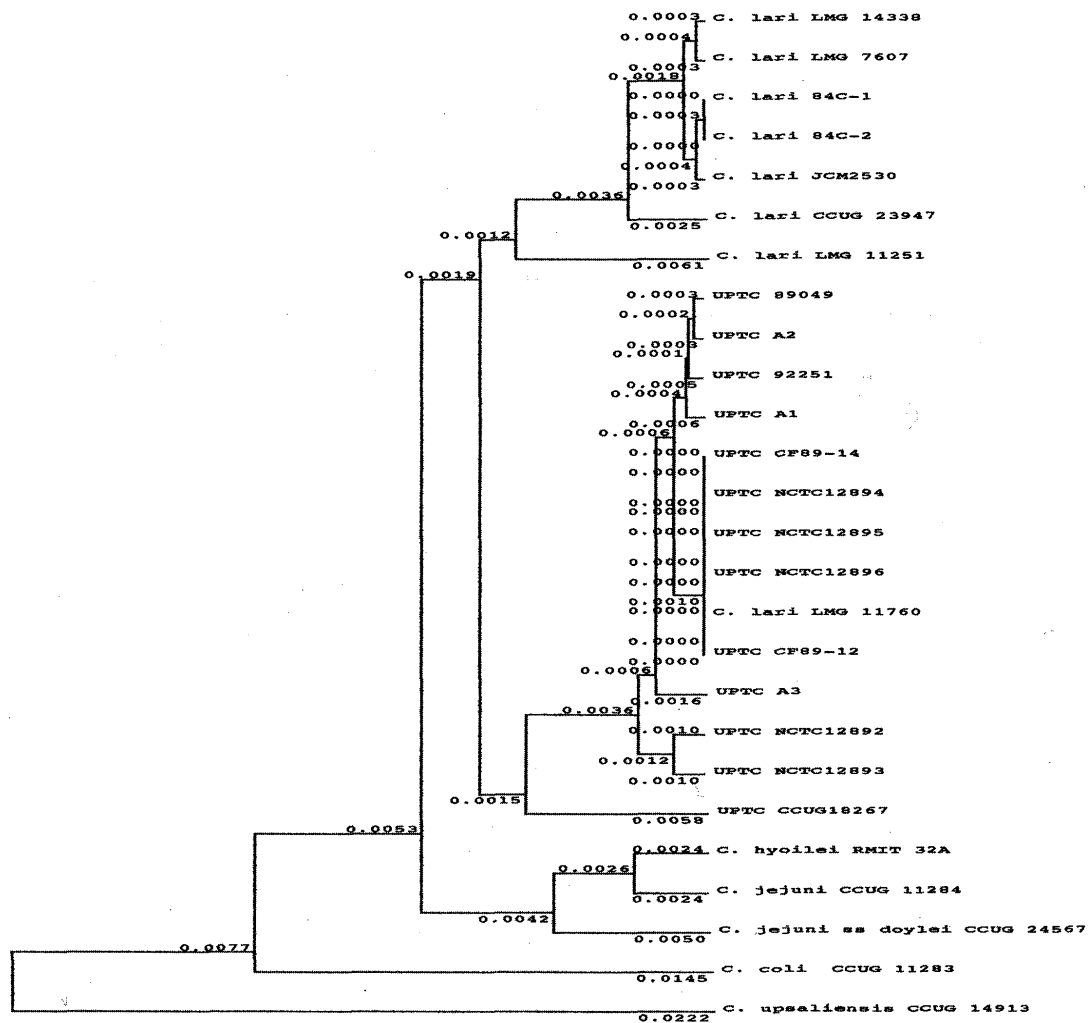


Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on the similarity data of the nearly full-length 16S rDNA sequences from the 12 UPTC isolates and the three UN *C. lari* isolates. The sequence data of the nearly full-length of the 16S rDNA from some other reference thermophilic campylobacters were also analyzed. The tree was constructed by the UPGMA. Values in the figure represent evolutionary distances.

## 要約

解析した *C. lari* 15 株での配列の類似性は、98.2-100%であった。そして、驚くべきことに、今回の研究で配列決定された UPTC 株の 1 つでイギリスの海水中の二枚貝から分離された NCTC12896 株の 16S rDNA の配列とレファレンス株として用いたカナダのヒト臨床由来の UN *C. lari* 11760 株のそれとは全く同一であった。更に、UPGMA 法を用いてレファレンス株を含めて系統樹を作成したところ、*C. lari* は、他の高温性 *C. jejuni* 及び *C. coli* とは離れて、いくつ

かの小さなクラスターからなる大きな 1 つのクラスターを形成することが明らかとなった。

以上の様に *C. lari* の代表的な 2 つの taxon である UPTC と UN *C. lari* を 16S rDNA の配列情報で分子識別できないことが初めて明かとなった。

## 文献

- Matsuda M. and Moore J. E. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4415-4418, 2004.  
Gorkiewicz, G. et al., J. Clin. Microbiol. 41: 253-2546, 2003.