

カンピロバクターのDNA分子識別

—*Campylobacter lari*の細胞膨脹化致死毒素遺伝子オペロンの クローニングと構造解析—

*Cloning and structural analysis of full-length cytolethal distending toxin (CDT)
gene operon from Campylobacter lari*

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. Approximately 2.5 k base pair (bp) amplicons encoding a *cdt* gene operon of about 2.3 kbp and two partial and putative open reading frames (ORFs) were identified with all the six urease-negative (UN) *Campylobacter lari* isolates obtained from different sources and in different countries using a novel PCR primer pair constructed *in silico*. Three closely spaced and possible ORFs for *cdtA*, *B* and *C* and two putative promoters and a hypothetically intrinsic ρ -independent transcription terminator were found in the operon. Each ORF commenced with an ATG start codon and terminated with a TGA stop codon for *cdtA* and *B* and a TAA for *C*. A possible overlap was identified between the four nucleotides including the stop codon (TGA) of the *cdtA* and the four nucleotides including the start codon (ATG) of the *B*, and the non-coding region of six bp occurred between *cdtB* and *C*. The start codons for the three *cdt* genes were preceded by Shine-Dalgarno sequences. Although nucleotide sequence differences were identified at seven loci in the *cdtA* gene, six *B* and two *C*, among seven isolates, including *C. lari* RM2100 reference strain, no polymorphic sites were demonstrated to occur in the putative promoters, hypothetically intrinsic transcription terminators and three ribosome binding sites among the seven isolates.

Although no PCR amplicons were generated with more than 10 isolates of urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) using the primer pair, *C. lari* consisting of UN *C. lari* and UPTC was suggested to carry a *cdt* gene operon in the genome.

目 的

*Campylobacter lari*は高温性カンピロバクターの一種で、最初はほ乳動物及びとり、特に *Larus* 属のカモメ (seagull) から分離された (Skirrow and Benjamin, 1980; Benjamin *et al.* 1983)。*C. lari*は臨床感染の原因となることも報告されている (Nachamkin

et al. 1984; Simor and Wilcox, 1987; Martinot *et al.* 2001; Werno *et al.* 2002)。その後1985年に *C. lari* の非定型的なウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) がイングランドで自然環境から分離された (Bolton *et al.* 1985; Matsuda and Moore, 2004)。

いくつかのカンピロバクターの細菌毒素の存在が同定されている (Johnson and Lior, 1988; Schulze *et al.*

1998) が, その性状が報告されているのは cytolethal distending toxin (細胞膨脹化致死毒素, CDT) だけである。CDTは進行性の細胞膨脹を引き起こし, 最終的には細胞死をもたらすことがいくつかの細胞系列で報告されている (Johnson and Lior, 1988; Picket *et al.* 1996)。更に, CDTはいくつかのタイプの細胞で細胞周期を阻害することが報告されている (Whitehouse *et al.* 1998)。CDTBはCDTの毒性成分 (I型DNase) を有する活性サブユニットで, CDTAとCDTCは標的細胞へCDTBを運搬する役割を果たしているとされている (Lara-Tejero and Galan 2000)。

一方筆者達は最近, UPTC 8株を含む *C. lari* 24株を用いて, 約720塩基対 (bp) から成る *cdtB* 遺伝子領域をPCRクローニングとシークエンシング後に比較解析し, *C. lari* 分離株間における *cdtB* 遺伝子の遺伝的多型性を報告した (Shigematsu *et al.* 2007)。しかしながら, *C. lari* の *cdt* 遺伝子全長に渡る解析に関する報告はない。

そこで本研究では, ウレアーゼ陰性 (UN) *C. lari* 株から転写のプロモーターとターミネーターを含む *cdt* 遺伝子全長に渡る領域をクローン化し, シークエンシングし解析し, 更に, 他の高温性カンピロバクターの *cdt* 遺伝子の分子性状との比較検討を行うことを目的とした。

材料及び方法

本研究では異なる分離源 (カモメ, ヒト, イガイ) と異なる国 (日本, 北アイルランド) からそれぞれ得られた UN *C. lari* 6株を用いた。細菌細胞はウマ脱繊維血を含み, あらかじめ加えられたカンピロバクター選択培地を含む血液寒天培地上, 微好気性条件下 37℃で2日間培養した。鋳型DNAは5分間のボーリング法で調製した。PCR増幅用のプライマー対の対合部位を含む *C. lari* RM2100株の *cdt* 遺伝子と遺伝的座位の模式図を Fig. 1 に示した (Fouts *et al.* 2005; Genbank accession no. NZ_AAFK0100004)。本研究において, 筆者達は *C. lari* RM2100株の *cdt* 遺伝子オペロンとその近接した遺伝子座位の配列情報に基づいて, プロモーターとターミネーターを含む *cdt* 遺伝子オペロン全長に渡る領域 (約2.3 kbp) を増幅するための新しいPCRプライマー対 (f-Clcdtallとr-Clcdtall) を *in silico* にデザインした。PCR混合物は

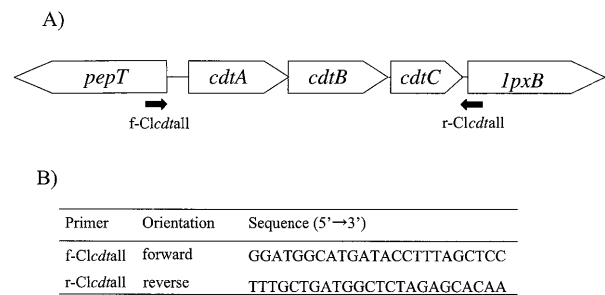


Fig. 1 A schematic representation of the *cdt* gene operon and its adjacent genetic loci in *C. lari* RM2100 including the locations of a primer pair for PCR amplification (A) and the primer details (B). (A) *pepT*, peptidase T; *lpxB*, lipid A-disaccharide synthase.

10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 400 μM プライマー, そして (1ユニットの EXTaqDNA ポリメラーゼ (宝酒造) を含んでいた。PCRは50 μlの反応容量中で, 94℃ 1分, 50℃ 1分, 72℃ 1.5分を30サイクルくり返した後に, 72℃ 7分間の最終伸長反応を行った。

増幅されたPCR産物は0.5 × TBE緩衝液を用いて, 100 Vで1%アガロースゲル電気泳動によって分画し, EtBrを用いた染色によって検出した。次いで, PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen社)を用いて精製し, pGEM-Tベクター中に挿入した。そして, Thermo Sequenase Pre-Mixed Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いてダイデオキシヌクレオチドシークエンシングを行った後に, 日立DNA自動シークエンサー (SQ-5500EL)を用いてクローン化された *cdt* 遺伝子のシークエンシングを行った。なおPCR産物のシークエンシング解析はコンピューターソフトウェア GENETYX-MAC version 9 (GENETYX CO.)を用いて行った。

結果及び考察

今回の研究で決定した UN *C. lari* 6株の *cdt* 遺伝子の全長に渡る領域のヌクレオチド配列は既に DDBJ に登録されておりその登録番号は Table 1 に示す通りである。本研究においては, 約2.5 kbpのPCR増幅産物の配列中で, 2つのプロモーターと1つの ρ -非依存性の転写のターミネーターを含む *cdt* 遺伝子オペロン2.3 kbp領域とそのオペロンの上流と下流にそれぞれ位置する2つの部分的で想定され得る open

Table 1. UN *C. lari* isolates and other reference strains analyzed in the present study, accession numbers of the nucleotide sequence data of the *cdt* gene operon accessible in the DDBJ/EMBL/GenBank, and their CMW of the possible ORF

Isolate no.	<i>Campylobacter</i>	Source	Country	Accession number	CMW (Da)		
					CDTA	CDTB	CDTC
JCM2530 ^T	UN <i>C. lari</i>	Seagull	Japan	AB292351	30,351	29,333	21,886
264	UN <i>C. lari</i>	Mussel	Japan	AB292354	30,391	29,333	21,886
298	UN <i>C. lari</i>	Human	Japan	AB292355	30,391	29,333	21,886
84C-1	UN <i>C. lari</i>	Human	N. Ireland	AB292352	30,391	29,332	21,886
84C-2	UN <i>C. lari</i>	Mussel	N. Ireland	AB292353	30,391	29,332	21,886
448	UN <i>C. lari</i>	Mussel	N. Ireland	AB292356	30,351	29,333	21,886
RM2100	UN <i>C. lari</i>	Human	U. S. A.	NZ_AAFK01000004	30,381	28,213	21,886
RM1221	<i>C. jejuni</i>	Chicken	U. S. A.	NC_003912	29,946	28,942	21,157
RM2228	<i>C. coli</i>	Chicken	U. S. A.	NZ_AAFL01000003	29,205	29,006	19,919

UN *C. lari* = urease-negative *Campylobacter lari*; CMW, calculated molecular weight; ORF, open reading frame.

reading frame (ORF) が同定された。それらを UN *C. lari* JCM2530^T 株を例にすると、3つの可能な ORF、即ち 810 bp の *cdtA* (ヌクレオチド位置 209-1,018 bp)、804 bp の *cdtB* (1,031-1,821 bp) そして 573 bp の *cdtC* (1,831-2,403 bp) のヌクレオチド配列が同定され、それらは全て同一の方向に転写、翻訳されることが想定された。なお、以下今回の研究で用いたヌクレオチド位置は UN *C. lari* JCM2530^T (AB292351) のものである。UN *C. lari* JCM2530^T 株の *cdtA* は 270、*cdtB* は 268 そして *cdtC* は 191 個のアミノ酸残基から成るペプチドをそれぞれコードしていると予測され、計算された分子量はそれぞれ 30,351, 29,333 そして 29,333 Da であるとされた (Table 1)。なお、本研究における *cdtA*、*cdtB* そして *cdtC* の 3つの可能な ORF は、*C. jejuni* の対応する *cdt* 遺伝子のヌクレオチド配列と想定されるアミノ酸配列 (Pickett *et al.* 1996) の類似性の比較に基づいて同定した。UN *C. lari* JCM2530^T の *cdt* 遺伝子のおおの ORF は開始コドンは全て ATG であり、終止コドンは *cdtA* と *cdtB* が TGA そして *cdtC* が TAA であった。また、*cdtB* と *cdtC* の間に 6 bp の非コード領域が存在した。更に興味あることに、*cdtA* と *cdtB* の間には *cdtA* の終止コドンを含むヌクレオチドと *cdtB* の間とコドンを含む 4 ヌクレオチド (ATGA, 1,018-1,021 bp) の間にオーバーラップが存在した。なお、*C. jejuni* 81-176 株に関しては既に *cdtA* と *cdtB* 遺伝子間での 4 ヌクレオチドのオーバーラップと、*cdtB* と *cdtC* の間の 10 ヌクレオチドの非コード領域の存在が報告されている

(Pickett *et al.* 1996)。16S rRNA の 3'末端に近接し高度に保存された CCUCCU 配列に相補的な可能なりボゾーム結合部位 [Shine-Dalgarno (SD) 配列] が、*cdtA* に関して AGGAGG (199-204 bp)、*cdtB* に関して AGGAG (1,009-1,013 bp) そして *cdtC* に関して AGGAG (1,823-1,827 bp) が同定された。更に、仮説的な ρ -非依存性転写終結領域 (2,413-2,428 bp) (Fig. 2) が同定されたが、この転写終結領域の構造は、GC に富むステム構造とその近傍の T 塩基の一本鎖領域 (2,426-2,428 bp) を含み、*cdtC* の直ぐ下流に存在していた。又これら SD 配列は全て 3つの *cdt* 遺伝子の開始コドンの上流に位置していた。更に、開始コドン ATG (209-211 bp) と共に -35 様領域 (TTTACT; 159-164 bp) と -10 領域 (TTATATT; 184-190 bp) から成る 2つの推定されるプロモーター構造が *cdtA* 遺伝子の直ぐ上流に同定された。この様に今回の研究において UN *C. lari* 6 株で同定された *cdtA*、*cdtB* そして *cdtC* 遺伝子は 1つのオペロンを構成し、そして細胞内で機能していると推定される。

ヌクレオチド配列の差異に関しては、UN *C. lari* RM2100 株を含む 7 株間で *cdtA* では 6ヶ所 (278, 461, 515, 644, 671, 818 そして 865 bp)、*cdtB* では 6ヶ所 (1,212, 1,233, 1,476, 1,659, 1,732 そして 1,803 bp) そして *cdtC* では 2ヶ所 (1,987 と 2,325 bp) で認められた。一方、プロモーター領域、ターミネーター領域そして 3つの RB 部位に関してはこれら 7 株間での遺伝的多型性部位は認められなかった。また、*cdtA* の ORF はアミノ酸配列レベルで 7 株間で

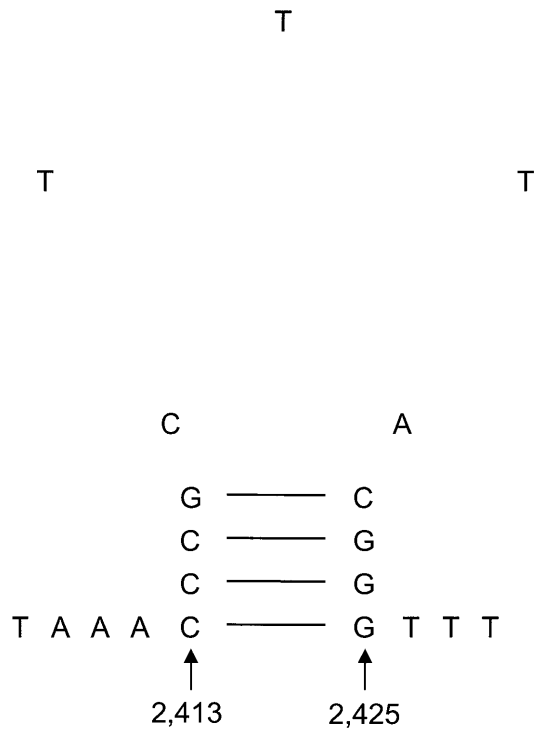


Fig. 2 A hypothetically intrinsic ρ -independent transcription terminator structure which contains a G + C rich region near the base of stem (2,413-2,425 bp) and a single-stranded run of T residues (2,426-2,428 bp) for UN *C. lari* JCM 2530^T.

98.5-100%の、そして *cdtB* は 95.9-100%の配列の類似性をそれぞれ示した。又 *cdtC* の類似性はこれら株間で 100%であった。これら7株の *cdtA*, *B*, *C* のORFのアミノ酸配列は *C. jejuni* RM1221株のそれ (NC_003912) とは 50.5-66.5%の配列の類似性を示した。

Cdt 遺伝子オペロンの上流にはペプチダーゼ T (*pepT*) 遺伝子の部分的で想定される ORF (1-63 bp), 更に -35 (128-133 bp) と -10 (92-97 bp) 領域から成るプロモーター構造, そして RB 部位 (TCCT) が7株すべてで逆方向に存在することが同定された。又このオペロンの下流にはもう1つの部分的で推定されるリピッド-A-2 糖類合成酵素 (*lpxB*) の ORF (2,485-2,501), 更に2つのプロモーター [-35 領域, TTTAAA (2,462-2,431 bp) と -10 領域, TAAAAT (2,462-2,467)] そして RB 部位 (GTAGG, 2,477-2,481 bp) の存在が同定された。

さて筆者達は既に, 異なる分離源と様々な国から得られた *C. lari* 24株 (UN *C. lari* 16株と UPTC 8株) を用いて約 720 bp から成る *cdtB* 遺伝子領域をクロー

ニング, シークエンシングそして比較解析を行って報告した (Shigematsu *et al.* 2007)。そして *C. lari* 分離株間の *cdtB* 遺伝子断片の遺伝的多型性について報告した。実際はお互いに 81-100%のヌクレオチド配列の類似性を示すものであった。今回の解析に用いた UN *C. lari* 6株 (JCM2530^T, 264, 298, 84C-1, 84C-2 そして 448) に関して言えば, この約 720 bp 領域に全く同一の多型性部位の存在することが確認された。

Elwell と Dreyfus は大腸菌の *cdtB* はホ乳動物 DNase I 型に対して著しく高い部位特異的の相同性を有していることを報告した (Elwell and Dreyfus 2000)。驚いたことに, この大腸菌 *cdtB* の9アミノ酸残基のすべてが, 今回調べた 448株を含む *C. lari* 25株の *cdtB* 遺伝子部位で完全に保存されていた (Fig. 3)。Figure 3 から明らかな様に, これらは *C. jejuni* RM1221 及び *C. coli* RM2228 株でも同様に完全に保存されていた。また, 筆者らの前回の報告 (Shigematsu *et al.*, 2007) と今回の報告は, 調べられた *C. lari* すべての株 (UN *C. lari* と UPTC) でそのゲノム DNA 中に *cdt* 遺伝子オペロンが存在することを示唆している。

今回の研究で筆者達は, 鋳型として 10株以上の UPTC 株のゲノム DNA を用いて同様の PCR を行ったが, いずれも PCR 増幅断片は検出されなかった。これは用いた PCR 用プライマー対 (f-/r-Clcdtall) の標的部位が UPTC 株では完全に保存されておらず, その結果用いたプライマーとの間での安定なハイブリダイゼーションが成立しないことに起因するのであると示唆される。それ故に, UPTC を用いた *cdt* 遺伝子全長の解析には新しいアプローチが必要であると考える。

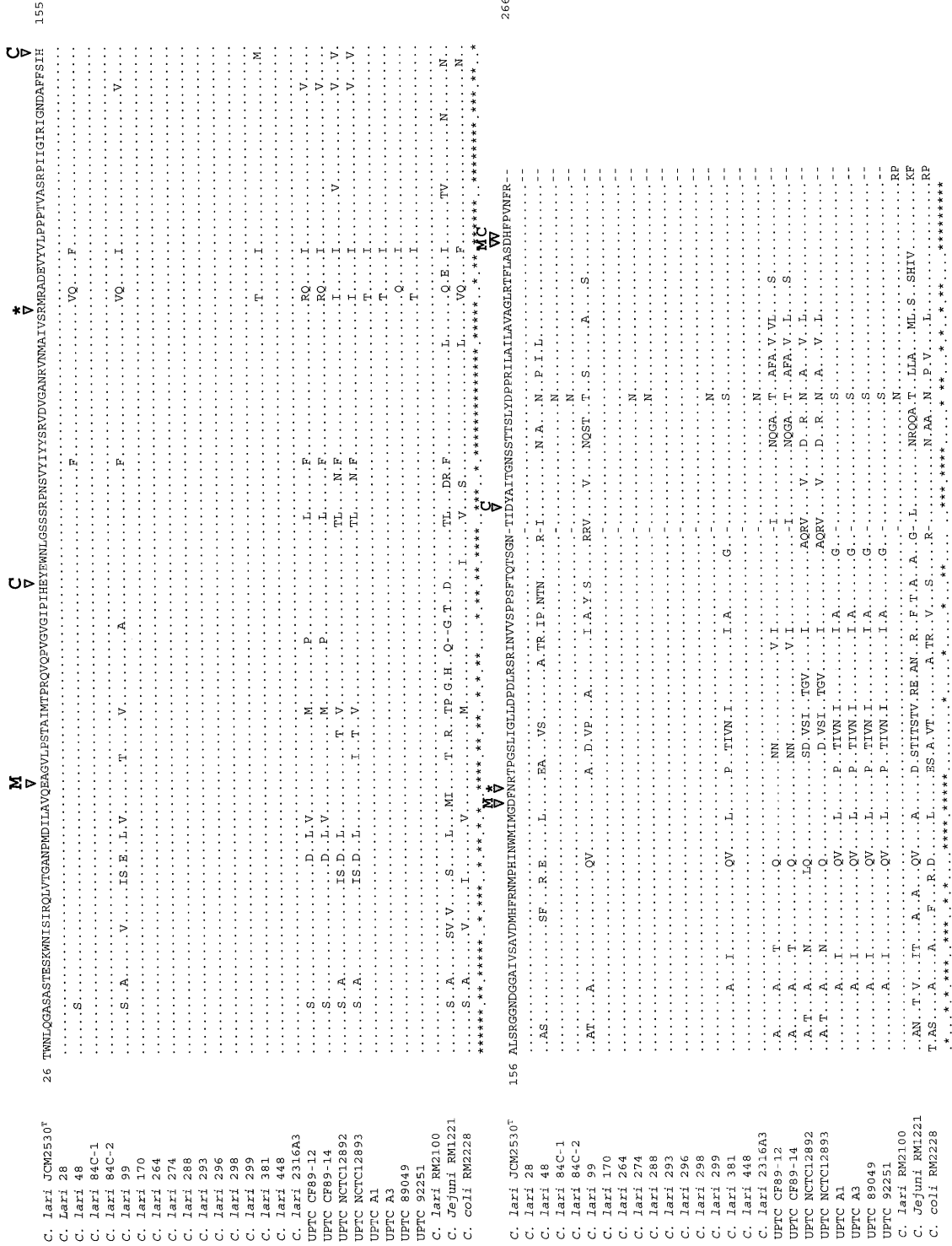


Fig. 3 Amino acid sequence alignment analysis of the possible ORF for cdt gene from the 25 *C. lari* isolates. Some of the sequences used in this alignment are derived from the previous report (Shigematsu *et al.* 2007). Amino acid sequences of those from the three *Campylobacter* reference strains were also aligned for comparison. M, metal ion-binding residues; C, catalytic residues; asterisk, DNA contact residues. Numbers at the left and right refer to the amino acid positions in putative ORF for *cdtB* of UN *C. lari* JCM2530^T (AB292351).

文 献

- Benjamin J, Leaper S, Owen R J, Skirrow M B. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr Microbiol* 1983; 8: 231-8.
- Bolton F J, Holt A V, Hutchinson D N. Urease-positive thermophilic campylobacters. *Lancet* 1985; i: 1217-18.
- Elwell C A, Dreyfus L A. DNase 1 homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol* 2000; 37: 952-63.
- Fouts D E, Mongodin E F, Mandrell R E, Miller W G, Rasko D A, Ravel J, Brinkac L M, DeBoy R T, Parker C T, Daugherty S C, Dodson R J, Durkin A S, Madupu R, Sullivan S A, Shetty J U, Ayodeji M A, Shvartsbeyn A, Schatz M C, Badger J H, Fraser C, Nelson K E. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol*. 2005; 3: e15. 0072-0085. [Online.] <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pbio.0030015>.
- Johnson W M, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* 1988; 4, 115-26.
- Lara-Tejero M, Galan J E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease 1-like protein. *Science* 2000; 290: 354-7.
- Martinot M, Jaulhac B, Moog R, De Martino S, Kehrl P, Monteil H, Piemont Y. *Campylobacter lari* bacteremia. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 96-97.
- Matsuda M, Moore J E. Urease-positive thermophilic *Campylobacter* species. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70: 4415-8.
- Nachamkin I, Stowell C, Skalina D, Jones A M, Hoop R M, Smibert R M. *Campylobacter laridis* causing bacteremia in an immunosuppressed patient. *Ann Int Med* 1984; 101: 55-7.
- Pickett C L, Pesci E C, Cottle D L, Russell G, Erdem A N, Zeytin H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. *cdtB* genes. *Infect Immun* 1996; 64, 2070-8.
- Pickett C L, Whitehouse C A. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol* 1999; 7, 292-7.
- Schulze F, Hanel I, Borrmann E. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. *Zentralbl Bakteriol* 1998; 288, 225-36.
- Shigematsu M, Harada Y, Sekizuka T, Murayama O, Millar B C, Moore J E, Matsuda M. Genetic heterogeneity of the cytolethal distending toxin (*cdt*) B gene locus amongst isolates of *Campylobacter lari*. *Br J Biomed Sci* 2007; 63: 179-81.
- Simor A E, Wilcox L. Enteritis associated with *Campylobacter laridis*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 10-2.
- Skirrow M B, Benjamin J. '1001' campylobacters: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. *J Hyg (Camb)* 1980; 85:427-42.
- Werno A M, Klerna J D, Shaw G M, Murdoch D R. Fatal case of *Campylobacter lari* prosthetic joint infection and bacteremia in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1053-5.
- Whitehouse C A, Balbo P B, Pesci E C, Cottle D L, Mirabito P M, Pickett C L. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2 phase cell cycle block. *Infect Immun* 1998; 66: 1937-40.