

第26回麻布環境科学研究会 一般講演4

β -Proteobacteria に属す *Taylorella* 属の 23S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子の 遺伝的多型性と 23S rRNA の断片化

田積 晃浩¹, 斉藤 智¹, 関塚 剛史¹, 長野由利子^{1,2},
村山 洋¹, J. E. Moore², B. C. Millar², 松田 基夫¹

¹麻布大学(大学院) 環境保健学 遺伝子生物学, ²N. Ireland Public Health Lab., Belfast, UK

1. はじめに

Taylorella equigenitalis はウマの細菌性性感染症のひとつであるウマ伝染性子宮炎 (contagious equine metritis ; CEM) の起因菌である。*Taylorella* 属は *T. equigenitalis* と *T. asinigenitalis* の2菌種から成り、 β -Proteobacteria に属する。本研究室では、*Taylorella* 属のリボソーム RNA (*rrn*) operon の詳細な構造解析と分子進化学的解析を目的とし、現在まで、16S rDNA と 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) の塩基配列を決定してきた。そして2005年に、*T. asinigenitalis* UK-1株の一つの *rrn* operon の全領域の塩基配列を決定したところ、23S rRNA 遺伝子の塩基配列中に、他菌種には見られない *T. asinigenitalis* に特異的な挿入配列が2箇所が存在することが確認された。23S rRNA 遺伝子の挿入配列については、 α , γ そして ϵ -Proteobacteria では既に報告されており intervening sequence (IVS) と呼ばれているが、 β -Proteobacteria では報告はない。23S rRNA 遺伝子内の IVS の存在により、23S rRNA は転写後、生成過程において IVS が強い stem-loop 構造をとることで RNase により断片化されることが予想される。

そこで本研究では、我々が β -Proteobacteria で初めて発見した *Taylorella* 属の 23S rRNA 遺伝子の配列中の IVS に着目し、その遺伝的多型性と rRNA の断片化について解析したので報告する。

2. 材料と方法

本研究で用いた細菌株は、サラブレッド由来の *T. equigenitalis* の基準株及びそれに準ずる3株 (NCTC11184^T, Kentucky188 及び EQ59) と雄ロバ由来の *T. asinigenitalis* 3株 (UCD-1^T, UK-1 及び UK-2) の合計6株である。まず、我々が既に構造を決定した UK-1 株の1つの *rrn* operon の塩基配列情報を基に、*Taylorella* 属の 23S rDNA を増幅するための primer を構築し、PCR 後、TA クローニング、シーケンシングを行い、6株すべての amplicon の塩基配列を決定した。そして得られた塩基配列情報を基に IVS の二次元構造予測を行った。また、rRNA の断片化を確認するため、それぞれの細菌株から全 RNA を抽出精製し、電気泳動後、*Taylorella* 属の 23S rRNA に特異的な断片 (23S rDNA の5'末端の約 500 bp) をプローブとして用い、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

3. 結果及び考察

本研究で用いた *Taylorella* 属6株の 23S rRNA 遺伝子のシーケンシングの結果、*T. equigenitalis* 3株では、23S rRNA 遺伝子の最初の 1/4 近傍の領域に存在する helix 25 の部位には IVS は存在せず、中央部分の領域の helix 45 の部位に1種類の IVS が存在した。また、*T. asinigenitalis* 3株では helix 25 の部位に2種類の IVS が存在し、更に helix 45 の部位では UCD-1^T 株に

においては3種類、UK-1, UK-2株においては2種類のIVSが存在した。今回の *Taylorella* 属6株の23S rRNA 遺伝子内のIVSの存在は、 β -*Proteobacteria*では初めてである。さらに、*T. asinigenitalis*では同一ゲノム上に3つ存在する *rrn* operon に各々異なったIVSが挿入されていた。現在この様な報告例はなく *T. asinigenitalis* でのみ確認されるものである。決定された塩基配列を基に alignment 解析を行ったところ、*T. equigenitalis* と *T. asinigenitalis* の間でのIVSについては相関性は認められず、異なった配列で遺伝的多型性を有することが明らかとなった。そして、*T. asinigenitalis* UK-1 と UK-2 株それぞれの helix 25 と helix 45 のIVS間にもその配列の相関性は認められなかった。興味深いことに、*T. asinigenitalis* のいくつかのIVSでは、約20 bp または 80 bp 単位の繰り返し配列が確認された。これまでに、この様なIVS内での繰り返し配列の報告はない。

ついで、決定された塩基配列情報を基にIVSの二次元構造を予測した結果、報告されている *Proteobacteria* の他の subclass のIVSと同様に、強い stem-loop を構築することが明らかとなり、RNaseにより切断されることが強く示唆された。

また、全RNAの抽出精製後、ホルムアルデヒドを含む変性アガロースゲルで電気泳動を行いrRNAの存在を確認したところ、*Taylorella* 属の6株すべてで23S rRNAが断片化されていることが明らかとなった。断片化された23S rRNAのサイズは、*T. equigenitalis* では約1,700 b と 1,200 b であり、更に *T. asinigenitalis* では約1,700 b, 700 b 及び 500 b であった。この様な結果は、23S rRNA 遺伝子内のIVSの位置から予測される23S rRNAの断片化のサイズと一致していた。しかし一方、各IVSに相当する大きさ

のRNA断片が確認されなかったことから、転写されたIVS分子は消化されたか、あるいは小さな分子に分解されたものと予想される。

以上のように、 β -*Proteobacteria* に属する細菌におけるrRNA 遺伝子内のIVSの存在が本研究により初めて明らかとなった。そして、*Taylorella* 属の23S rRNA 遺伝子はまず第一次転写産物として転写され、ついで断片化されることが強く示唆された。なお今後は正確な切断部位を決定することが必要である。

今回、*T. asinigenitalis* では各 operon により異なったIVSが挿入されていることが初めて明らかとなった。更に、その中のいくつかの塩基配列中には、約80 bp または 20 bp の繰り返し配列が存在していた。これまでにこのような報告はない。それ故に、今回の *T. asinigenitalis* にのみ特異的にみられる23S rRNA 遺伝子内のIVSの発見は、23S rRNA 遺伝子中に存在するIVSの意義やその役割の解明に大きく寄与するものと考えられる。

2005年から2006年にかけてヨーロッパのいくつかの国々で、26株の *T. asinigenitalis* 株がウマから分離されている。今後、この *Taylorella* 属のIVS塩基配列情報が *T. equigenitalis* と *T. asinigenitalis* の種間の分子識別に有用となることが予想される。

〈参考文献〉

- Matsuda M and Moore J E, Vet. Microbiol., 97, 111-122 (2003)
Elena Evguenieva-Hackenberg, Mol. Microbiol., 57, 318-325 (2005)
Kagawa S *et al.* Vet. Res. commun. 30, 343-355 (2006)
Matsuda M *et al.* BMC Vet. Res. 2: 1 (<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/1>) (2006)