

Campylobacter 属の細胞侵入性病原因子 *flaC* の 分子生物学的解析

関塚 剛史¹, 村山 洋¹, John E. Moore², B. Cherie Millar², 松田 基夫¹

¹麻布大院 環境 遺伝子生物学, ²N. 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 jejuni の FlaC は、細菌のべん毛タンパク質 flagellin が有する Bacterial flagellin N-terminus domain 及び Flagellin and related hook-associated proteins domain を持つ約 250 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質である。しかしながら、FlaC はべん毛の flagellin として機能するのではなく、*Campylobacter* が宿主腸管上皮細胞へ侵入する際に必要とされる病原因子として機能していることが報告された。そこで本研究においては、*C. lari* の biovar もしくは variant であり、病原性との相関が確定していない urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC; Matsuda and Moore, 2004) の自然環境由来及び動物由来株 (カモメ及びヒト由来) の FlaC をコードする遺伝子の全長の構造を解析することを目的とした。次に、これまでにゲノムシーケンスにより配列が明らかとなっている *C. jejuni* subspecies *jejuni*, *C. jejuni* ss *doylei*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. fetus*, *C. consisus*, *C. curvus*, urease-negative *C. lari* (UNC. *lari*) の *flaC* と比較解析し、*C. lari* の種及び株間における *flaC* の多様性及び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、自然環境由来の UPTC6 株、動物由来の UPTC5 株を用いた。これらのゲノム DNA を抽出し、*C. lari* の *flaC* 遺伝子の全長及びそれに近接する遺伝子の部分配列を増幅するための新しい degenerated PCR primer pair (ClflaC-f/ClflaC-r) を *in silico* に作成し、PCR を行った。そして、TA cloning の後、シーケエンシングを行った。

3. 結果及び考察

本研究で、自然環境及び動物由来の UPTC の *flaC* を解析した結果、11 株全てにおいて 747bp の open reading frame (ORF) を構成していることが明らかとなった。また、*C. jejuni* ss *jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* 及び UNC. *lari* も同様な ORF を構成していた。また、UPTC の *flaC* の上流には、 σ^{70} promoter 様配列 (-35 領域; TTTAAA, -10 領域 (Pribnow box); TATAAT) 及び ribosome-binding sites (RBS) 様配列が、下流には ρ -independent terminator 様配列が存在した。故に、今回解析した UPTC11 株の *flaC* は、モノシストロニックなオペロンであることが強く示唆され、その他の *Campylobacter* の *flaC* も同様であった。

UPTC11 株全てにおいて、*flaC* の上流に CLA0934 様配列、下流に CLA0932 様配列が認められた。これは、ゲノムシーケンスにより塩基配列が明らかとなっている *C. lari* RM2100 の遺伝子座と同様であった。それ故に、*C. lari* の *flaC* 近傍の遺伝子座は保存されていることが示唆された。

UPTC11株間の*flaC*の塩基配列及び予測されるアミノ酸配列の類似性は、それぞれ90.5-100%及び94.8-100%であった。一方、*C. jejuni ss jejuni*及びUPTC株間では、それぞれ69.1-70.6%及び65.9-67.5%の類似性であった。更にUPTCの*flaC*の予想されるアミノ酸配列についても、*C. jejuni*のそれと同様に、Bacterial flagellin N-terminus domain及びFlagellin and related hook-associated proteins domainを有していた。それ故に、*flaC*は、*Campylobacter*属に幅広く存在しており、*C. jejuni*のみならず、宿主細胞への侵入において病原因子として重要な働きを示すことが予想されるが、その配列の保存性は種間では近いが種内では極めて高いことが示唆された。

*Campylobacter*属の*flaC*の塩基配列のマルチプルアライメントを基にしたUPGMA法によるphylogenetic treeを作成したところ、いくつかの主要なクラスターが観察された。特に、UPTC及びUNC. *lari* RM2100は、他の*Campylobacter*とは離れて、遺伝的に変異性に富んだ2つの小さなクラスターを形成し

た。興味深いことに、この2つのクラスターは、自然環境より分離された6株のUPTCと、カモメ及びヒト臨床由来の5株のUPTC及びヒト臨床由来のUNC. *lari* RM2100に分かれていた。即ち、*flaC*の配列の構造の差異が、分離された由来及び病原性と関連していたのである。それ故に、*C. lari*の*flaC*は、種内で高い保存性を保ちながらも、その僅かな配列の差異が*flaC*の細胞侵入性病原因子としての機能を担うために重要であることが示唆される。

これまでに、*C. jejuni*及び*C. coli*においては、*Campylobacter*腸炎を引き起こす際に重要である病原因子の報告は多数ある。今回の結果から、*C. lari*においても多数の病原因子が存在する中で、*flaC*はそのうちの重要な一因子であることが予想された。

(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)