

# 高温性カンピロバクターラリーのゲノム解析と 多遺伝子配列情報に基づく分子識別； ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクターの ウレアーゼ遺伝子の分離株間における 遺伝的な不均一性に関する研究

*Genetic heterogeneity of urease gene loci in urease-positive thermophilic Campylobacter (UPTC)*

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.** Degenerate PCR primers were designed *in silico* based on two urease structural genes, namely *ureA* and *ureB*, for urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) organisms. Resultant PCR amplification employing these primers generated an amplicon of approximately 2 kb, which was cloned and sequenced, in UPTC organisms (n = 12), isolated from various parts of Europe and Japan. Overall, sequence similarities were shown to be 96.7 to 99.9 % and following sequence alignment analysis, the approximate 1.96-kb regions from the 12 isolates were deduced to consist of parts of *ureA* (about 570 bps) and *ureB* (about 1390 bps) which contain an overlapping region between the *ureA* and *ureB* gene loci. Although a total of 144 heterogeneous sites of all substitutions were located throughout this region, the substitution ratio was higher in the *ureA* region (1/10 bases) than in the *ureB* region (1/15 bases). A resulting dendrogram was constructed, which was based on the nucleotide sequence data of 12 UPTC isolates examined and demonstrated that the UPTC organisms were genetically variable. UPTC organisms formed a major cluster with *Helicobacter* organisms, separate from the other urease-producing bacteria examined, suggesting a shared ancestry between UPTC organisms and *Helicobacter*.

## 目 的

ウレアーゼ陽性高温性 *Campylobacter* (UPTC) は Bolton らにより 1985 年に初めてイギリスで分離された (Bolton *et al.*, 1985)。この最初の報告の後, UPTC は現在までにフランス, 北アイルランド, そしてオ

ランダでその分離が報告され, 日本でも分離が報告された (Megraud *et al.*, 1988; Bezing *et al.*, 1990; Wilson and Moore; Matsuda *et al.*, 1996; Endtz *et al.*, 1997; Kaneko *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2003)。

多くの細菌種はウレアーゼ (urea amidohydrolase;

EC. 3. 5. 1. 5) を産生する。UPTCは *Campylobacter* 属の中ではめずらしく、*C. sputorum* biovar *paraureolyticus* (On *et al.*, 1998) と共にウレアーゼを産生する生化学的に非定型的なタキソンの1つである。しかし、UPTCのウレアーゼについては報告はない。そこで、本研究ではUPTCのウレアーゼ遺伝子をPCRで増幅するための新しい縮退プライマーを *in silico* に作成し、このプライマーを用いてUPTCのウレアーゼ構造遺伝子の約2 kbpに渡る領域をクローン化することを目的とした。更に、筆者らは得られたPCRクローンの塩基配列の決定と配列類似性の解析を行い、UPTC12株間及びUPTC12株と他のいくつかのウレアーゼ産生細菌の間での配列データに基づく系統分類学的関係を示す「クラスター解析」を行った。

#### 材料及び方法

今回の研究に用いたUPTC12株とその詳細をTable 1に示した。ゲノムDNAの調製はSambrook等の方法を用いて行った (Sambrook *et al.*, 1989)。1%アガロースゲル電気泳動で分画し精製されたPCR産物を、次にTAクローニングの手法を用いてpGEM-Tベクターにクローン化した。M13を用いたサイクルシーケンシング反応の後、クローン化されたPCR産物の塩基配列の決定を日立SQ5500-EL DNA自動シーケンサーを用いて行った。UPTC12株の得られた約1.96 kbpに渡るウレアーゼ構造遺伝子の塩基配列をCLUSTAL W software (Thompson *et al.*, 1994) (1.7 program) を用いて他のウレアーゼ産生細菌の配列データと比較した。なお、系統樹はUPGMA法を

用いて作成した。

#### 結果及び考察

本研究においては、UPTCのウレアーゼ構造遺伝子について、まず筆者らのUPTCウレアーゼの予備的な生化学的精製に関する実験の知見に基づいて仮説的な *ureA* と *ureB* 遺伝子を想定した。UPTCのウレアーゼ構造遺伝子の約2 kbp領域をPCR増幅するために今回の研究で *in silico* にデザインし、用いたプライマーセットをFig. 1に示した。PCRプライマーは細菌とjack beanのウレアーゼ構造遺伝子とそれらの推定されるアミノ酸配列に基づいて *in silico* にデザインしたものである。用いた配列情報は *H. pylori* (accession no. AB032429), *H. hepaticus* (AF332656), *H. felcis* (AF508004), *H. mustelae* (L33462), thermophilic *Bacillus* sp. strain TB-90 (D14439), *Klebsiella aerogenes* (M36068), *Proteus mirabilis* (M31834), *Yersinia enterocolitica* (L24101) そして *Canavalis ensiformis* (jack bean; M65260) に由来するものであった。

今回の研究で作成された新しいPCRプライマーを用いて、筆者らは約2 kbpに渡るUPTCウレアーゼ構造遺伝子の領域を増幅し、TA-クローン化しそして配列を決定した。塩基配列のマルチアライメントを行ったところ、約1.96 kbpから成るUPTC 12株の塩基配列が得られた (AB182111-AB182122; Table 1)。Table 2に示されているように、UPTC12株の3つのアンプリコンそれぞれはお互いに96.7-99.9%の塩基配列の類似性を示した。今回の研究で得られた塩基

Table 1. Isolates of urease-positive thermophilic *Campylobacter* used in the present study and accession numbers of the nucleotide sequence data of their urease genes accessible in the DDBJ/EMBL/Genbank

Organism	Isolate no.	Country	Source	Accession number
UPTC	CF89-12	Japan	River water	AB182111
UPTC	CF89-14	Japan	River water	AB182112
UPTC	NCTC12892	England	River water	AB182115
UPTC	NCTC12895	England	Mussel	AB182122
UPTC	A1	N. Ireland	Seagull	AB182117
UPTC	A2	N. Ireland	Seagull	AB182118
UPTC	A3	N. Ireland	Seagull	AB182119
UPTC	87	N. Ireland	Sea water	AB182116
UPTC	136	N. Ireland	Scallop	AB182121
UPTC	182	N. Ireland	Sea water	AB182120
UPTC	89049	France	Human	AB182113
UPTC	92251	France	Human	AB182114

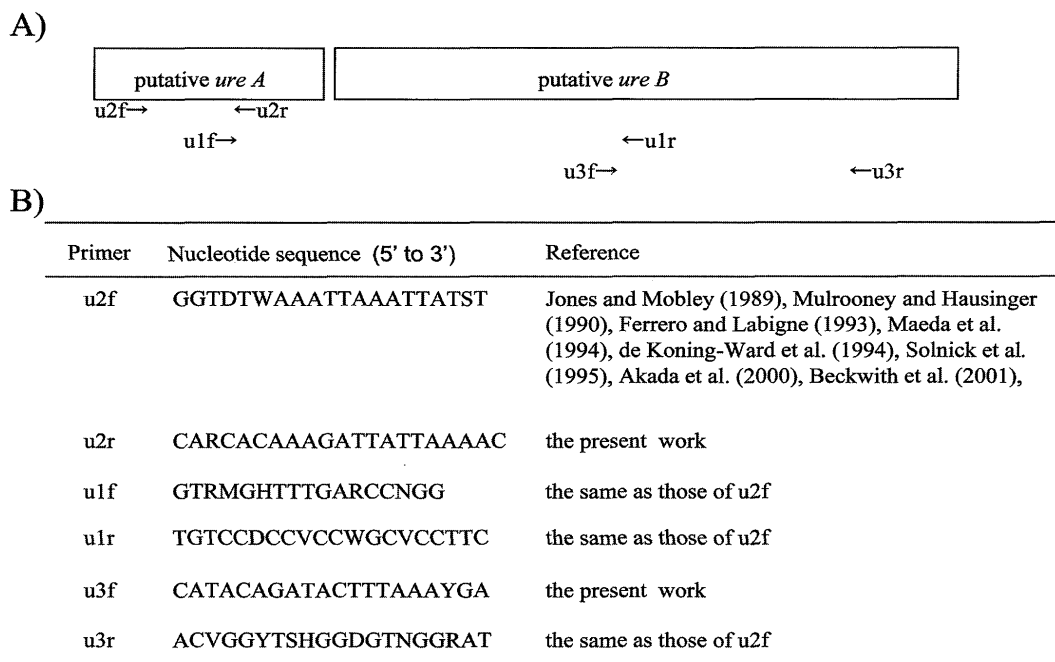


Fig. 1 Schematic representation of a hypothetically putative *ureA* and *ureB* structural gene organization for urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) organisms, including the locations of primers for PCR amplification (A) and primer sequences (B).

Table 2. Sequence similarity of the urease structural genes (approximate 1.96 kbp region) among UPTC isolates

UPTC organism	Sequence similarity (%)											
	UPTC CF89-12	UPTC CF89-14	UPTC NCTC12892	UPTC NCTC12895	UPTC A1	UPTC A2	UPTC A3	UPTC 87	UPTC 136	UPTC 182	UPTC 89049	UPTC 92251
UPTC CF89-12		99.9	98.1	98.3	97.7	97.4	97.4	97.7	98.2	97.5	97.8	97.6
UPTC CF89-14			98.2	98.4	97.7	97.5	97.3	97.8	98.2	97.6	97.9	97.6
UPTC NCTC12892				99.1	97.3	97.0	97.0	98.3	98.6	98.0	97.6	97.2
UPTC NCTC12895					97.6	97.3	97.2	98.4	98.8	97.8	97.8	97.3
UPTC A1						99.6	98.6	97.2	97.3	97.4	98.6	98.7
UPTC A2							98.5	97.0	97.1	97.1	98.4	98.5
UPTC A3								96.7	97.0	97.1	98.1	98.3
UPTC 87									98.6	97.9	97.5	97.1
UPTC 136										98.0	97.6	97.4
UPTC 182											97.7	97.5
UPTC 89049												98.9
UPTC 92251												

配列データに基づいて、UPTC12株の1.96 kbp領域はウレアーゼA遺伝子 (*ureA*) の3'側約570 bpとウレアーゼB遺伝子 (*ureB*) の5'側約1390 bpから成ると判断された。そして、これらの1.96 kbp領域は *ureA* と *ureB* の明らかなオーバーラップ領域を含んでいた。塩基配列上の多型性部位を調べたところ、全体で144ヶ所のすべて塩基置換から成る不均一な部位が認められた。しかしながら、その置換率は *ureA* 領域が約1/10塩基で、約1/15塩基の *ureB* 領域より高かった。

UPTC12株のウレアーゼ遺伝子の配列情報に基づ

いてUPGMA法を用いて作成された系統分類学的関係を示すデントログラムをFig. 2に示した。Fig. 2は明らかにUPTC12株間における高い変異性の存在を示している。このことは、調べた限りではUPTCはウレアーゼ構造遺伝子情報に基づく、遺伝子変異に富んでいること、*Helicobacter*属のウレアーゼ遺伝子とは相関が高いこと、しかし他のウレアーゼ産生細菌とは相関が低いことを示している。それ故に、UPTCと*Helicobacter*との間でのウレアーゼ遺伝子の“共通の祖先”の存在が強く示唆された。

以前筆者らは、multilocus enzyme electrophoresis

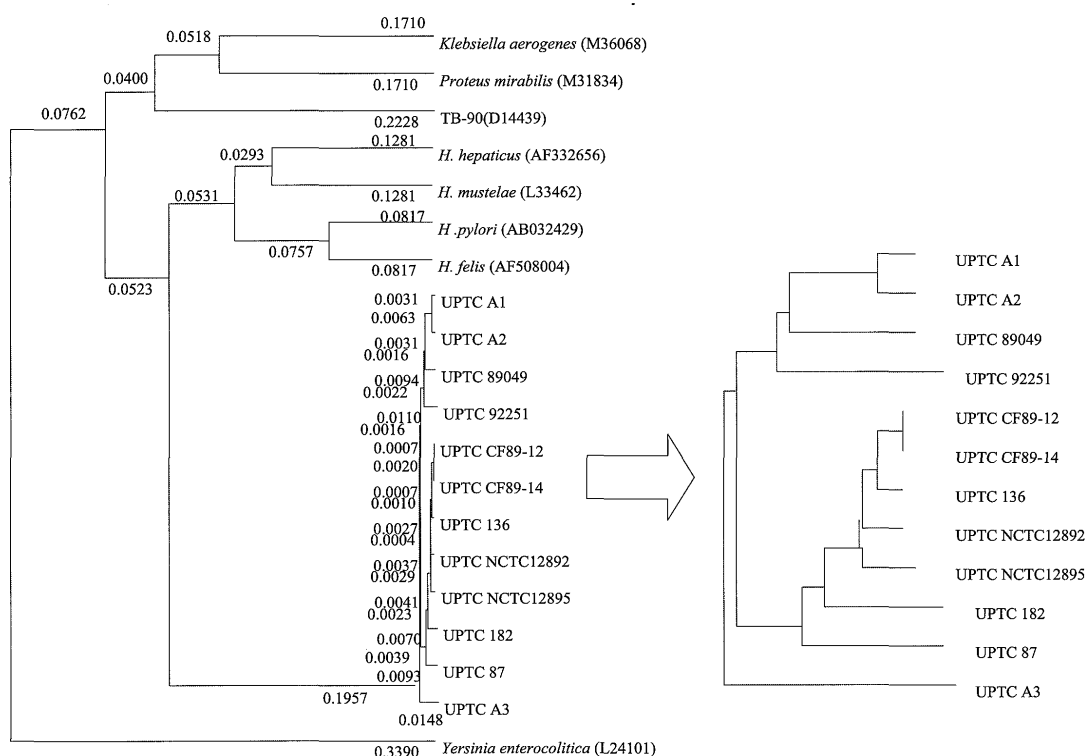


Fig. 2 Phylogenetic tree based on sequence similarity data of the urease structural genes from 12 UPTC isolates examined and other urease-producing bacteria. The tree was constructed by the UPGMA method. Values in the figure represent evolutionary distances. The accession numbers for the sequences used in the study are shown in parentheses. A cluster of 12 UPTC isolates was enlarged on the right side of the arrow, ⇨, in the figure.

(MLEE; Matsuda *et al.*, 2003) の手法を用いて UPTC31 株の遺伝的変異性について報告した。今回得られた結果はその MEE の手法を用いて得られた結果と一致している。

今回の研究で筆者らは UPTC の仮説的な 2 つのウレアーゼ遺伝子を想定し、PCR プライマーを *in silico* にデザインし、UPTC12 株から 1.96 kbp に渡るウレアーゼ遺伝子の領域を解析したが、UPTC のウレアーゼ構造遺伝子とアクセサリー遺伝子全体の遺伝子構成に関しては未だ不明のままであり今後の課題である。

今回の筆者らの研究は UPTC のウレアーゼ遺伝子の初めての遺伝的解析であり更に、10 株以上の UPTC タクソンを対象として細菌性ウレアーゼ遺伝子の不均一性を示した初めての報告である。

### 文 献

Bezian, M.C., Ribou, G., Barberis-Giletti, C., Megraud, F.: Isolation of a urase positive thermophilic variant of

*Campylobacter lari* from a patient with urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 895-897 (1990)

Bolton, F.J., Holt, A.V., Hutchinson, D.N.: Urease-positive thermophilic campylobacters. *Lancet* i 25, 1217-1218 (1985)

Endtz, H. P., Vliegthart, J. S., Vandamme, P., Weverink, H. W. van den Braak N. P., Verbrugh, H. A., van Berkum, A.: Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 79-88 (1997)

Kaneko, A., Matsuda, M., Miyajima, M., Moore, J.E., Murphy, P.G.: Urease-positive thermophilic strains of *Campylobacter* isolated from seagulls (*Larus* spp.). *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 7-9 (1999)

Matsuda, M., Kaneko, A., Fukuyama, M., Itoh, T., Shingaki, M., Inoue, M., Moore, J.E., Murphy, P.G., Ishida, Y.: First finding of urease-positive thermophilic strains of *Campylobacter* in river water in the Far East, namely, in Japan, and their phenotypic and genotypic characterization. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 608-612 (1996)

Matsuda, M., Shibuya, T., Itoh, Y., Takiguchi, M., Furuhashi, K., Moore, J.E., Murayama, O., Fukuyama, M.: First

- isolation of urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) from crows (*Corvus leuillanti*) in Japan. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205, 321-324 (2002)
- Matsuda, M., Kaneko, A., Stanley, T., Millar, B.C., Miyajima, M., Murphy, P.G., Moore, J.E.: Characterization of urease-positive thermophilic *Campylobacter* subspecies by multilocus enzyme electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3308-3310 (2003)
- Megraud, F., Chevrier, D., Desplaces, N., Sedallian, A., Guesdon, J. L.: Urease-positive thermophilic *Campylobacter* (*Campylobacter laridis* variant) isolated from an appendix and from human feces. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1050-1051 (1988)
- On, S.L.W., Atabay, H.I., Corry, J.E.L., Harrington, C.S., Vandamme, P.: Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* biovar paraureolyticus, a urease-producing variant from cattle and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 195-206 (1998)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680 (1994)
- Wilson, I.G., Moore, J.E.: Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 116, 147-153 (1996)