

機関番号 : 32701

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580346

研究課題名 (和文) 高温性カンピロバクターラリーの病原遺伝子の比較分子生物学

研究課題名 (英文) Molecular and comparative analyses of pathogenic genes in the thermophilic *Campylobacter lari*

研究代表者 松田 基夫 (Matsuda Motoo)

麻布大学・環境保健学部・教授

研究者番号 : 50139531

研究成果の概要 (和文) : 本研究においては、*cdt*、*ciaB*、*vacJ*、*cadF*、*flaC*、*p450*、*luxS*などの *Campylobacter* 症の想定される病原遺伝子の全長とそれらに近接する遺伝子座位の分子比較解析をそれぞれ 10 株以上の *Campylobacter lari* 株を用いて行った。これら解析した遺伝子に加えて、各々の構造遺伝子の 5' -及び 3' -非コード領域にプロモータ及びターミネーター構造の同定を行い、更にいくつかの遺伝子では転写レベルでの発現及び転写開始点が確認された。しかしながら、*C. lari* 株では *C. jejuni* と比べてこれら病原遺伝子の異なる分布プロファイルが明らかとなった。即ち、*vacJ* や *cadF* の様に活性ドメインが *C. jejuni* と比べて不十分な例、あるいは *luxS* の様に遺伝子が存在しない事例が認められた。この様に本研究の結果から、我々が研究開始当初から仮設していた、*C. lari* 生物はカンピロバクター症の病原遺伝子の自然突然変異体である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

In the present study, molecular and comparative analyses of the full-length cytolethal distending toxin (*cdt*), *Campylobacter* invasion antigen B (*ciaB*), virulence-associated chromosome locus J (*vacJ*), *Campylobacter* adhesin to fibronectin protein (*cadF*), flagellin C (*flaC*), cytochrome *p450*, *luxS* genes and so on and their adjacent genetic loci were carried out with more than 10 *C. lari* isolates. Promoter and terminator structures were also identified to exist within the 5' - and 3' - non coding regions of each structural gene for the isolates, respectively. Their gene expression and transcription initiation sites were also demonstrated in the bacterial cells. However, different pathogenic genes distributions of *C. lari* isolates occurred from those of *C. jejuni*, the organisms carrying poor active domains or those doing no genes. Thus, *C. lari* organisms may possibly be identified to be the natural mutants regarding pathogenesis genes.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：遺伝子、感染症、細菌、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

Campylobacter jejuni は下痢症や腸炎を主な症状とする食中毒起因菌であり、敗血症、関節炎、髄膜炎あるいはギランバレー症候群を起こすこともある。2000年2月には *Campylobacter* では初めて、*C. jejuni* NCTC11168株の全ゲノムシーケンスが、更に2005年には *C. jejuni* RM1221、*C. coli* RM2228、*C. lari* RM2100 そして *C. upsaliensis* RM3195株のドラフトシーケンス (Fouts *et al*, PLoS Biol 3(1) e15) が発表され *Campylobacter* 症における、重要な病原遺伝子群総体としての解析が可能かつ必要となった。しかし、このような解析はなされておらず、更にそれら病原因子がどのように働き、相互作用しそして宿主に影響を及ぼすのかは依然不明のままであった。

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、その後約10年の間に世界で200株近くが主に自然環境から分離された [Matsuda and Moore, Appl Environ Microbiol 70, 4415- (2004)]。UPTC は *C. lari* とその性状が酷似していることから、*C. lari* の variant あるいは biovar とされた。この UPTC のヒト臨床由来株はフランスの4株のみが報告されているが、ヒト疾患との相関は確定してない。

ウレアーゼ陰性 (UN) *C. lari* に関しては、特に *C. jejuni* に比べて本菌

種を原因とする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。しかし研究開始当時、我々が過去20年以上の文献の詳細な精査を行ったところ、世界の10数カ国で、30症例110株以上のヒト臨床由来 UN *C. lari* 株が報告されていることが明らかとなった (Matsuda and Moore, 未発表)。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、UN *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り、更に UN *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っていた。

この様に、*C. lari* を構成する2つの代表的な taxon である UPTC と UN *C. lari* のヒトへの病原性に関する大きな差異は、UPTC グループと UN *C. lari* グループの間での病原遺伝子の何らかの差異の存在の結果である可能性が示唆された。そして又、そのことがこれら細菌株の分離のプロファイルの大きな差異に影響しているのかもしれないと代表者は考えた。更に、UPTC 株が有しているウレアーゼ遺伝子の性状及び、その UPTC 及び *Campylobacter* における生物学的機能、役割は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、高温性 *Campylobacter lari* を対象として「推定される病原遺伝

子」を比較分子生物学的に解析し、カンピロバクター症の発症にかかわる病原因子とその発症機構を解明しようとするものであった。更に、病原遺伝子の発現調節に関わるとされている quorum sensing の機構についてもその分子解析を行う。

3. 研究の方法

本研究においてはまず、UPTC 株、UN *C. lari* 株の両方で、べん毛の構成成分フラジエリンをコードする flagellin 遺伝子 (*flaA*, *flaB*, *flaC*, *flaD*)、細胞致死性膨張毒素の cytolethal distending toxin 遺伝子 (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*)、進襲因子の *Campylobacter* invasion antigen 遺伝子 (*ciaB*) Fibronectin-binding protein (*cadF*) 遺伝子、そして宿主抵抗性因子の putative peptide methionine sulfoxide reductase 遺伝子 (*mrsA*)、virulence associated chromosome J (*vacJ*) の病原遺伝子群 (オペロン)、更に *luxS*, P450 遺伝子を対象として研究を行う。加えて UPTC 株のウレアーゼ遺伝子群も研究対象とする。

なお、各病原遺伝子の全塩基配列情報を解析対象とした *C. lari* 株全てについて、アライメントし解析する。その際、*fla*、*cdt*、*ciaB*、*cadF*、*mrsA* そして *vacJ* 遺伝子を解析対象とした際と同様に、オペロン構成、遺伝子の方向性、プロモーター構造、構造遺伝子の変異、欠失、付加、偽遺伝子の存在の有無等を比較検討する。

更に、平成22年度には各病原遺伝子産物の対象細胞効果を調べる。

4. 研究成果

本研究においてはまず、細胞致死膨張毒素をコードする *cdt* 遺伝子の解析で多くの研究成果が得られた。UN *C. lari* 株 6 株と UPTC 株 12 株を対象として PCR 法とインバース PCR

法そして塩基配列決定法を駆使して、転写のプロモーター領域、*cdtA*, *B*, *C* 遺伝子、転写終結領域の全てを決定した。構造遺伝子領域の株間での多型性が明らかとなり又 *cdt* 遺伝子の発現、ターミネータ領域の下流に位置する遺伝子座位の株間における大きな差異の存在も明らかとなった。更に、HeLa 細胞に及ぼす *C. lari* の *cdt* 効果の比較解析を行ったところ、用いた *cdt* 遺伝子を有し、かつそれらをタンパク質レベルで発現しているが CDT 効果の陽性株と陰性株の存在することが明らかとなった。

Campylobacter invasion antigen B (*ciaB*) 遺伝子に関しては *C. lari* 18 株 (n=7 UN *C. lari*; n=9 UPTC 及び *C. jejuni* 1 株と *C. coli* 1 株) を対象として、プロモーター、構造遺伝子そしてターミネーターを含む約 2.2 kbp の領域が 18 株全てでクローン化され構造を決定した。更に RT-PCR 法によって *C. lari* JCM2530^T、UPTC CF89-12 の *ciaB* 遺伝子の転写レベルでの発現が確認された (発表論文 2)。

Virulence-associated chromosome locus J (*vacJ*) 遺伝子とその近接する遺伝子座については、20 株の *C. lari* 株を対象としてその約 1.14 kbp のクローン化に成功した。又 RT-PCR による転写レベルでの発現の確認と *vacJ* の遺伝子情報に基づく NJ 法による *C. lari* 種内における UPTC と UN *C. lari* taxon 間の強い分子識別能力の存在が示唆された (発表論文 3)。*Campylobacter* adhesin to fibronectin protein (CadF) をコードする遺伝子についても、*C. lari* 16 株を対象に約 2.3 kbp の領域に、*cadF* の構造遺伝子とその上流、下流に non coding 領域そして多の open reading frame (ORF) が同定された。RT-PCR で転写そしてプライマーエクステンションで転写始点が同定された。しかし、*C. lari* 全ての株 (n=12 UPTC; n=4 UN *C. lari*)

で推定される *cadF* の ORF が *C. jejuni* で報告されている ORF より 9 アミノ酸分長く、更に *C. jejuni* の CadF の G フィブロネクチン最大結合活性を示す部位 (ドメイン) が FRLS でなく FALG (50% の同一性) であり、*C. lari* 種では *C. jejuni* より CadF の Fn 結合活性の低いことが強く示唆された (発表論文 5)。

また、*C. lari* の P450 及び *LuxS* についても新しい知見が得られた (発表論文 7 及び 10)。

以上のように *C. lari* の想定される病原遺伝子の比較分子生物学の解析によって、多くの新しい研究成果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Tazumi A. Kakinuma Y. Moore J E. Millar B C. Taneike I. Matsuda M. Demonstration of the absence of intervening sequences within 23S rRNA genes from *Campylobacter lari*. J Basic Microbiol (査読有) 49, 386-394 (2009)
2. Onozato J. Kumagai A. Sekizuka T. Tazumi A. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Cloning, sequencing and expression of full-length *Campylobacter* invasion antigen B gene operon from *Campylobacter lari*. J Basic Microbiol (査読有) 49, 342-349 (2009)
3. Takaku C. Sekizuka T. Tazumi A. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. *Campylobacter lari*: molecular and comparative analyses of the virulence-associated chromosome locus J (*vacJ*) gene homologue, including promoter region. Br J Biomed Sci (査読有) 66, 85-92 (2009)
4. Sekizuka A. Tazumi A. Nakanishi S. Megro S. Kakinuma Y. Misawa N. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Absence of intervening sequences (IVSs) in helix 11 region within 16S rRNA genes among more than 240 isolates of the seven *Campylobacter* species. Br J Biomed Sci (査読有) 66, 103-106 (2009)
5. Hirayama J. Sekizuka T. Tazumi A. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Structural analysis of the full-length gene encoding a fibronectin-binding-like protein (CadF) and its adjacent genetic loci within *Campylobacter lari*. BMC Microbiol (査読有) 9, 192 (2009)
6. Tazumi A. Kakinuma Y. Misawa N. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Identification and characterization of intervening sequences within 23S rRNA genes from more than 200 *Campylobacter* isolates from seven species including atypical campylobacters. BMC Microbiol (査読有) 9, 256 (2009)
7. Nakanishi S. Tazumi A. Aihara N. Tajima N. Sekizuka T. Amano K. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Structural analysis and expression of full-length cytochrome P450 gene operon in *Campylobacter lari*. Br J Biomed Sci (査読有) 67, 133-139 (2010)
8. Tazumi A. Nakanishi S. Megro S. Kakinuma Y. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Occurrence and characterization of intervening sequences (IVSs) within 16S rRNA genes from two atypical *Campylobacter* species, *Campylobacter sputorum* and *C. curvus*.

- Br J Biomed Sci (査読有) 67, 77-81 (2010)
9. Nakanishi S. Tazumi A. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Molecular and comparative analyses of full-length cytolethal distending toxin (*cdt*) gene operon and its adjacent genetic loci from the urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) organisms. Br J Biomed Sci (査読有) 67, 208-215 (2010)
10. Tazumi A. Negoro M, Tomiyama Y. Misawa N. Itoh K. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Uneven distribution of *luxS* gene within the genus *Campylobacter*. Br J Biomed Sci (査読有) 68, 1-4 (2011)
11. Kakinuma Y. Hayashi K. Tazumi A. Moore J E. Matsuda M. Molecular analysis and characterization of a urease gene operon from *Campylobacter sputorum* biovar paraureolyticus. Folia Microbiol (査読有) (accepted)
12. Hirayama J. Tazumi A. Nakanishi S. Tasaki E. Hayashi K. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Reliability of nucleotide sequence information of full-length flagellin A gene (*flaA*) and *flaA*-short variable region (SVR) for molecular discrimination of *Campylobacter lari* organisms. Folia Microbiol (査読有) (accepted)
13. Murayama M. Sekizuka T. Tazumi A. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. Molecular analysis and characterization of full-length flagellin C gene (*flaC*) from *Campylobacter lari*. Br J Biomed Sci (査読有) (accepted)
14. Hirayama J, Tazumi A. Hayashi K. Tasaki E. Kuribayashi T. Moore J E. Millar B C. Matsuda M. A phylogenetic comparison of urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) and urease-negative *C. lari*. J Basic Microbiol (査読有) (accepted)

[雑誌論文] (計 14 件)

[学会発表] (計 26 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田基夫 (Matsuda Motoo)

研究者番号 : 50139531