

ウレアーゼ陽性高温性カンピロバクター (UPTC) の ウレアーゼ遺伝子オペロンの分子解析

Molecular analysis of a urease gene operon from urease-positive thermophilic Campylobacter (UPTC)

松田基夫, 三田明弘

麻布大学大学院環境保健学研究科

Motoo Matsuda and Akihiro Sanda

Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University

Abstract: When cloning, sequencing and characterization of the genetic organization of urease genes within urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) were carried out, an approximate 5.1 kilo base pair region encoding a urease gene operon was identified with recombinant plasmid DNAs from a genomic DNA library of a Japanese isolate (CF89-12). Six closely spaced and putative open reading frames (ORFs) for *ureA*, *ureB*, *ureE*, *ureF*, *ureG* and *ureH* were detected. ATG codons initiated each ORF of the UPTC urease operon except for *ureB* and *ureH*, which commenced with the most probable TTG codon. Overlaps were detected between *ureA* and *ureB* and also between *ureB* and *ureE*. Probable ribosome-binding sites and a putative ρ independent transcriptional termination region were identified. Two putative promoter structures, consisting of consensus sequences at the -35 and -10 like regions were also identified. Construction of a neighbor-joining tree based on the nucleotide sequence data of urease genes indicated that UPTC formed a cluster with some *Helicobacter* organisms separate from the other urease-producing bacteria, suggesting a commonly shared ancestry between UPTC and *Helicobacter* urease genes.

目 的

urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) は1985年にBoltonらが初めて自然環境中から分離したもので、非定型的な *C. lari* の1つの taxon とされている (Bolton *et al.* 1985)。 *C. lari* は、 *Campylobacter* 症の起原菌で代表的な *C. jejuni* や *C. coli* と比べその頻度及び感染対象動物に差異はあるものの、細菌性胃腸炎の原因菌である。UPTCはウレアーゼを産生するという特徴を有するが、 *Campylobacter* 属の中でこのウレアーゼを産生する taxon はUPTCと *Campylobacter sputorum* biovar paraureolyticus のみで

ある。なお、この *Campylobacter* 属菌が何故ウレアーゼ遺伝子を持っているのか、このウレアーゼの病原性への関与はあるのか否か等は不明なままである (Matsuda and Moore 2004)。

そこで本研究では、UPTCのウレアーゼ遺伝子オペロンについて詳細な解析を行い、分子性状の全体像の解明に到達することを目的として研究を行った。なお本研究で得られる成果は、 *Campylobacter* 属でUPTCと共にウレアーゼを産生する *C. sputorum* biovar paraureolyticus のウレアーゼ遺伝子の研究を開始する上でも重要で、更に *Campylobacter* 属のウレアーゼの存在意義に迫る上でも重要であると考えた。

材料と方法

本研究では、UPTCのウレアーゼ遺伝子オペロンの全体像の理解のためにUPTC CF89-12（日本株；Matsuda *et al.* 1996, 岡山県環境保健センター井上正直氏分離）を用いてゲノムDNAライブラリーを作成し、新たに*ureG*領域でDIG標識をしたプローブを用いてウレアーゼ遺伝子のスクリーニングを行った。

結果及び考察

まず、ゲノムDNAライブラリーによるウレアーゼ遺伝子のスクリーニングの結果、UPTCのウレアーゼ遺伝子オペロンの構成は構造遺伝子*ureA*, *ureB*そしてアクセサリ遺伝子*ureE*, *ureF*, *ureG* *ureH*の存在することが初めて明らかとなった。*ureA*の上流には-35及び-10領域から成る転写のプロモーター様配列と*ureH*の下流には他のウレアーゼ遺伝子のORFは存在せず、 ρ -非依存性の転写終結領域をもって終結していた。以上の結果から、転写のプロモーター領域、*ureA* (672), *ureB* (1698), *ureE* (468), *ureF* (669), *ureG* (600), *ureH* 遺伝子 (753 bp) と転写終結領域を含む約5 kbpに渡るUPTC CF89-12のウレアーゼオペロンの全体像が初めて明らかとなった。

今回、UPTCのウレアーゼ遺伝子オペロン構成の全体像が明らかとなったので、次に構造遺伝子に加えて、アクセサリ遺伝子を含むオペロン全体の多型性、さらにはneighbor joining (NJ) 法を用いたphylogenetic解析を行なった。その結果、UPTCのウレアーゼ遺伝子オペロンは*Campylobacter*属と同じ ϵ -*Proteobacteria*に属し近縁であるとされる*Helicobacter*属のウレアーゼ遺伝子と同じクラスターを形成することが明らかとなり、このウレアーゼ遺伝子オペロンは*Helicobacter*属のウレアーゼ遺伝子と共通の祖

先に由来している可能性が強く示唆された。UPTC株間での各ウレアーゼ遺伝子の多型性は、構造遺伝子でありウレアーゼの活性中心が存在しているとされる*ureB* 遺伝子で最も塩基置換の頻度が低く、この*ureB* 遺伝子の配列はUPTC株間で良く保存されていた。更に、*ureB* 遺伝子内に存在することが報告されているウレアーゼ活性中心のCys-His配列は解析した株全てで保存され、さらに*H. pylori*, jack beanのCys-His配列の中の9つのアミノ酸残基の位置とも完全に一致していた。このウレアーゼオペロンの転写のプロモーターに関しては、調べたUPTC12株間で-35と-10領域にその構造が認められたが、-35領域については株間での多型性が認められた。また、CF89-12株の*ureB* 遺伝子で認められたTTG開始コドンは、他のUPTC11株でも同様に開始コドンとして使用されていることが明らかとなった。更に、*ureA* と*ureB* 遺伝子間、及び*ureB* と*ureE* 遺伝子間に調べた12株及び6株のUPTC株全てでそれぞれオーバーラップが認められた。この構造遺伝子*ureA* と*ureB* 間のオーバーラップは今回のUPTC株が初めての事例である。*ureH*下流に存在する ρ -非依存性の転写終結領域は解析したUPTC株間で全く同一であり保存された配列であった。

文 献

- Bolton F F *et al.* Lancet (1985) I, 1217-1218.
 Matsuda M *et al.* J Appl Microbiol (1996) 81, 608-612.
 Matsuda M and Moore J E. Appl Environ Microbiol (2004) 70, 4415-4418.

謝辞

この研究の一部は、日本私立学校振興・共済事業団の私学助成によって行われた。