

研究ノート

gyrB 遺伝子による *Arcobacter* 属の系統解析とその多様性について

川崎 晋*, 稲津 康弘, 川本 伸一

Phylogenetic analysis of *Arcobacter* species by sequencing of *gyrase B* gene

Susumu Kawasaki*, Yasuhiro Inatsu, Shinichi Kawamoto

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

Abstract

The genus *Arcobacter* includes the bacteria previously known as aerotolerant campylobacter, which belongs to the family *Campylobacteraceae*. In our previous study, we showed that the analysis of the *gyrase B* (*gyrB*) gene is an effective approach for classifying different species of the genus *Campylobacter*. In this study, we analyzed 6 strains each of *Arcobacter* species and *Bacteroides ureolyticus*. The *gyrB* gene of all the bacteria was sequenced, and the phylogenetic tree was constructed; this phylogenetic tree was similar to the tree previously constructed on the basis of 16S rRNA sequences. However, *gyrB* was found to provide a better resolution for *Arcobacter* species with lower interspecies sequence similarities (ranging from 88.2% to 80.5%) than the 16S rRNA gene (ranging from 98.6 to 93.9%). The *gyrB* gene is a useful taxonomic marker for genus *Arcobacter*.

Keywords: Phylogenetic tree (系統樹), *Arcobacter*, *gyrase B* gene (*gyrase B* 遺伝子)

緒 言

Arcobacter 属は *Campylobacter* 属の近縁種として知られ、かつては *Campylobacter* の 1 菌種に位置してす
ると考えられていた属である。 *Arcobacter* はグラム陰
性で運動性を有し、孢子を形成しない、らせん形細菌
である。現在、 *Arcobacter* は *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis* の 4 菌種からなり、前
者 3 菌種はヒトや家畜類から分離され、腸炎や敗血症
を引き起こした患者からの分離例が報告されている¹⁾。
日本においては、2005年に敗血症患者から初の *A.*

butzleri 分離例が報告された²⁾。また、 *A. nitrofigilis* は病
原性の報告は無く、窒素固定菌として分離された例が
報告されている³⁾。本菌は、 *Campylobacter* の選択培地
である CCDA 培地(*Campylobacter* Charcoal Differential
Agar) 上において微好気および好気のいずれの条件
でも増殖できることが知られている。しかし、通常の
Campylobacter の検査では、好気条件でも増殖可能な
分離株は以降の検査対象とされないために *Arcobacter*
属を同定されることがない⁴⁾。すなわち、我が国にお
いてヒトからの *Arcobacter* の分離例が少なく同定に至
らないのは、微好気による検査対象が主に *Campylo-*
bacter に限定されるためとも考えられている。このよ

*Corresponding author E-mail: skawasa@affrc.go.jp

2009年10月30日受付 2009年10月30日受理

うに *Arcobacter* は病原性の可能性が示唆されるものの、その認識度は低く、どのような感染経路を持つのか、特に水系汚染や家畜からの汚染が原因となっているのか、未だ不明な点が多い。

一般に微生物検査を行うには培養法による検出・同定が主流となる。しかし、培養法の場合、本菌や *Campylobacter* 属では微好気条件での培養が最初のステップとなり、血液培地での前培養、抗生物質を含んだ選択培地での分離、さらには多種多様な生化学性状試験を実施しなければ種まで決定できない。近年、迅速かつより正確な同定、もしくは検体中の1次スクリーニングを目的として、PCR法を用いた遺伝子検出手法が開発されており、高感度かつ高い特異性を提供できる可能性について数多く報告されている⁵⁾。例えば16Sや23S rRNAを標的としたPCR法による検出同定法が *Arcobacter* についても報告されている⁶⁾。しかし、塩基配列が高度に保存された16Sや23S rRNAを標的にした場合、特に近縁種間ではそれぞれが極めて類似した配列を持っていることが容易に想像できる。仮に、特異的なPCR反応プライマーの設計が出来たとしても、極めて厳密な反応条件が要求され、近縁種間を判別するのが難しい反応系となる。一方、特異的な遺伝子検査法の開発ではその標的遺伝子に毒素遺伝子（例えば *Clostridium botulinum* の毒素遺伝子 BoNT など⁷⁾）や侵入性遺伝子（例えば *Salmonella* sp. の *invA*⁸⁾）などに代表される、病原性に関する遺伝子が標的とされるが、*Arcobacter* や *Campylobacter* 属のように、その病原性遺伝子が決定されていない場合、PCR検出への応用は困難である。

我々は *Campylobacter* 属について、この問題を解決するため *Campylobacter* 属の12菌種のDNAサンプルを収集し、これらにおいてDNAトポイソメラーゼのベータサブユニットをコードする遺伝子 *gyrB* の塩基配列決定を試みた。その塩基配列の多重配列解析を行った結果、16S rRNAよりも配列相同性に多様性が認められ、また系統樹解析を行った際の判別解像度が高いことを報告した。さらに、これらの多様性に着眼して、PCR-RFLPによる迅速同定や、PCRによる迅速検出法に活用できる可能性を見出した⁹⁾。

本報では、将来 *Arcobacter* 属への迅速検出同定法の開発を目的として、異なる *Arcobacter* 属4菌種と、さらに *Arcobacter* 属や *Campylobacter* 属にも近縁種とされる *Bacteroides ureolyticus* について *gyrB* の塩基配列決定を試みた。また、得られた配列から多重配列表作成を行い、それにより得られた系統樹について検討し、

その多様性を考察した。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株は米国農務省東部研究所が保有する *A. butzleri* 3255, *A. cryaerophilus* 1A 3551, *A. cryaerophilus* 2710, *A. cryaerophilus* 1B 3256, *A. skirrowii* 3524, *A. nitrofigilis* 3258, *B. ureolyticus* を用いた。これらは微好気条件（ガス濃度条件 O₂:CO₂:N₂=5:10:85）で30–48時間、5%羊脱繊維血を添加したミューラーヒントン培地で培養したものをを用いた。

2. PCR および *gyrB* 塩基配列決定、系統樹解析

供試菌からのDNA抽出には PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems) を用いた。*gyrB* 遺伝子の塩基配列はPCRによるダイレクトシーケンス法により決定した。PCR反応とダイレクトシーケンスは Kawasaki らの方法⁷⁾に従った。*gyrB* 遺伝子のおよそ1250bpの断片を増幅できるプライマーとして5'-TAAATACGACTCACTATAGGGGTCGACCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3 (T7-FWD) と5'-GATTTTAGGTGACACTATAGCTCGAGCCRTCNACRTCNCGCRTCNGTCA-3 (SP6-REV) を用いてPCR反応に供した。PCR反応は、PCR buffer, 4 mM MgCl₂, 0.625 U rTaq DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 0.2 mM dNTPs, 0.4 mM のプライマー対に Template DNA を1 μl 加え、計100 μl の系で反応に供した。アガロースゲル電気泳動により観察された予測断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Science, Maryland, USA) にて精製した。この断片をシーケンスプライマーである、5'-TAAATACGACTCACTATAGGGGTCGACC-3 (T7kai) と5'-GATTTTAGGTGACACTATAGCTCGAG-3 (SP6kai) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応および泳動解析は ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) と ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystems) を用いて行い、これら両端からプライマーウォーキング法により *gyrB* 遺伝子の配列を決定した。多重配列表作成には、DNASIS Pro program (version 2.0) (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて行った。進化距離行列データおよび系統樹作成は DDBJ ウェブサイト中の CLUSTAL W program¹⁰⁾ (www.ddbj.nig.ac.jp/Welcomes-e.html)

Table 1. *gyrB* 遺伝子配列より作成した進化距離行列表および G C 含量

	<i>A. cyraerophilus</i> 1A 3551	<i>A. cryaerophilus</i> 2710	<i>A. cryaerophilus</i> 1B 3256	<i>A. skirrowii</i> 3524	<i>A. butzleri</i> 3255	<i>A. nitrofigilis</i> 3258	<i>B. ureolyticus</i>
<i>A. cyraerophilus</i> 1A 3551	100.0	96.6	91.0	84.9	87.0	81.9	66.8
<i>A. cryaerophilus</i> 2710		100.0	91.0	84.3	86.2	81.0	66.8
<i>A. cryaerophilus</i> 1B 3256			100.0	87.4	88.2	80.5	67.1
<i>A. skirrowii</i> 3524				100.0	85.0	81.7	67.8
<i>A. butzleri</i> 3255					100.0	80.8	68.9
<i>A. nitrofigilis</i> 3258						100.0	65.9
<i>B. ureolyticus</i>							100.0
GC%	30.1	30.4	30.4	30.0	30.1	30.7	29.0

Table 2. 16S rRNA 遺伝子配列より作成した進化距離行列表および G C 含量

	<i>A. cyraerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>B. ureolyticus</i>
<i>A. cyraerophilus</i>	100.0	98.6	97.4	93.9	85.2
<i>A. skirrowii</i>		100.0	97.1	94.0	84.8
<i>A. butzleri</i>			100.0	94.2	84.9
<i>A. nitrofigilis</i>				100.0	84.0
<i>B. ureolyticus</i>					100.0
GC%	46.5	46.2	46.9	48.5	46.8

により, Kimura の2-parameter モデルと近隣結合法¹¹⁾での算出により作成した。

3. 既存データの入手

系統樹解析結果を比較するために, DDBJ ウェブサイトより *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis*, *B. ureolyticus* の16S rRNA 遺伝子配列を入手 (Accession number; L14626, L14624, L14625, L14627, L04321) し, 2.と同様に多重配列表作成と進化距離行列表データおよび系統樹作成を行った。

実験結果および考察

gyrB および16S rRNA 遺伝子の配列から各々多重配列表を作成し, 進化距離行列表データを作成した結果を表1, 2に示す。本実験に供した *gyrB* 遺伝子の GC %は30.4~29.0%であり, 顕著な差は認められないものの, 各々の相溶性は *Arcobacter* 属内で88.2~80.5%と大きな違いが得られた。*Arcobacter* 属に最も近い属とされる *B. ureolyticus* と各 *Arcobacter* 属との相溶性は68.9~65.9%程度しかなく, その区別は容易であると考えられた。また, *A. cryaerophilus* について, サブグループ2種 (1Aと1B) について比較したところ, その相溶性は91.0%以上となり種間の相溶性よりも高い結果が得られ, 生化学的な分類に準じた結果を反映

していることが分かった。また, 多重配列表を *B. ureolyticus*, *C. jejuni* と比較して確認したところ, *Arcobacter* 属には127 - 129塩基の位置に, 属間に特異的な3塩基の挿入が認められた。一方, 16S rRNA の結果では, *Arcobacter* 属内では98.6~93.9%と高い相溶性を示し, *B. ureolyticus* と比較した場合でも85.2~84.9%と高い相溶性の結果となった。Yamamoto and Harayama¹²⁾は, 海洋微生物の進化系統樹について論じており, *gyrB* 遺伝子はDNA複製に関する有用な Housekeeping gene であり, 16S rRNA 遺伝子により作成できる系統樹よりも高い解像度が得られることを報告している。また, Yamada ら¹³⁾も *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis* について16S rRNA と *gyrB* を比較したところ, やはり *gyrB* の解像度が高く, 16S rRNA では *B. cereus* と *B. anthracis* を区別できないところを区別できることを報告している。著者らも *Campylobacter* 属において, その相溶性を比較したところ89.2~58.3%程度⁷⁾であり, 本遺伝子の分子生物学的進化系統樹作成の有用なマーカーとなることを確認した。今回の *Arcobacter* 属においても, その解像度の高さを確認できた。

表1, 2, *gyrB* および16S rRNA 遺伝子の多重配列表から系統樹を作成した結果を図1に示す。どちらの系統樹においても *Arcobacter* 属は *B. ureolyticus* と大きく進化距離が離れる結果となった。*C. jejuni* を含んで解析した場合, *B. ureolyticus* のさらに Out group と

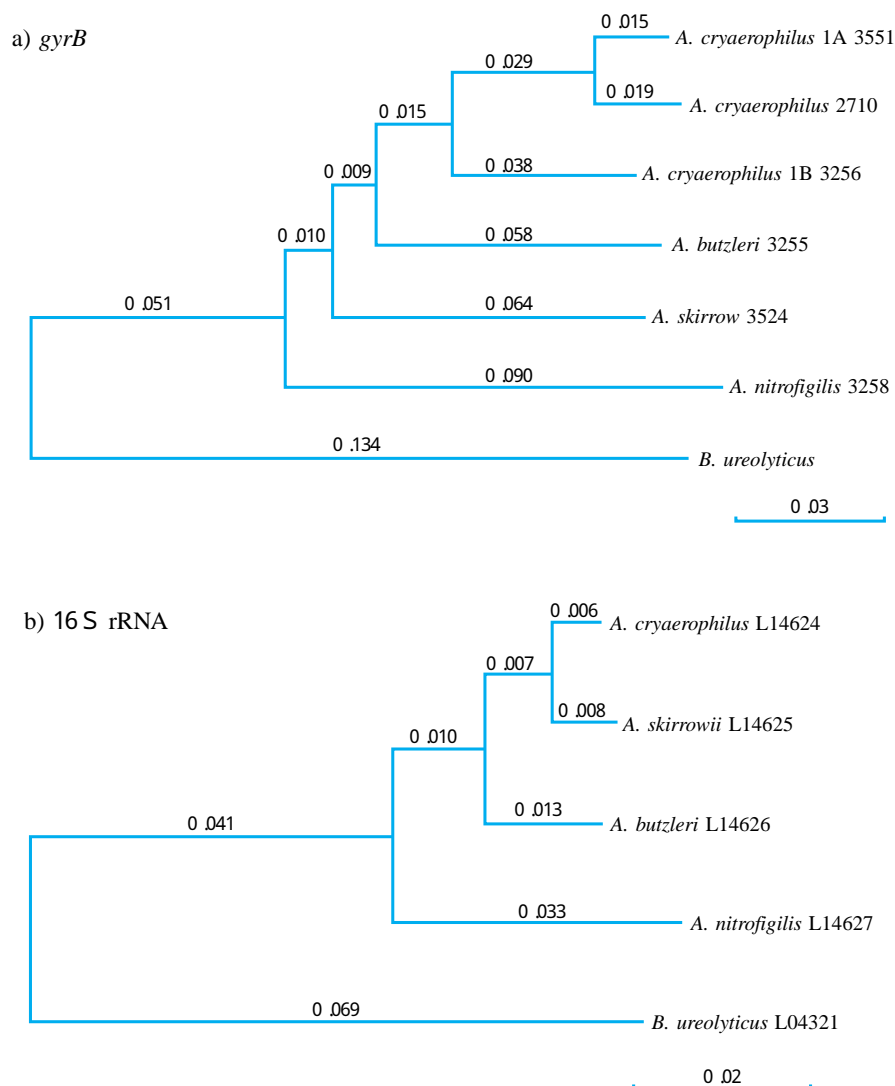


図1 . *gyrB* (A) および16 S rRNA (B) 遺伝子配列から作成した系統樹

して位置し (Data not shown) , 両遺伝子解析の結果のいずれも *Arcobacter* 属が1つのクラスターを形成することがわかった。しかし、図1で比較したところ、*A. butzleri* と *A. skirrowii* の間に若干、系統樹の位置が異なっていた。これをより検討するには *Arcobacter* 属の菌株をさらに収集して多数の株を含んで解析する必要があるが、より詳細な系統樹の解析にはさらなる株の分離と遺伝子解析の必要があると考えられた。しかしながら、本報で得られた *gyrB* 遺伝子の塩基配列情報を活用することで、16 S rRNA を標的とした遺伝子検査法よりも特異性の高い検査法を設計することが可能であり、*Arcobacter* 属の迅速診断への活用と、より詳細な系統樹の作成に将来寄与するための基礎的データになりうると思われた。

謝 辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術」(DI7104) の一部として行われたものである。

文 献

- 1) Nachamukin, I., and Blaser, M. J., *Campylobacter* 2nd Edition, ASM Press. Washington.D.C.(2000)
- 2) 依田 清江, 内村 眞佐子, 村田 正太, 土岐 朋子. 病原微生物検出情報 (IASR) 月報, 27 , 15.

- 16 . (2006) .
- 3) Gonzalez, A., Botella, S., Montes, R. M., Moreno, Y., and Ferrus, M. A., Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain. *J. Food Prot.*, **70**, 341–347 (2007)
- 4) 日本食品衛生協会編 , 食品衛生検査指針 - 微生物編 - , 日本食品衛生協会 , 東京 (2007) .
- 5) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *J. Food Prot.*, **68**, 551–556 (2005)
- 6) Pentimalli, D., Pegels, N., Garcia, T., Martin, R., and Gonzalez, I., Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. *J. Food Prot.*, **72**, 1491–1495 (2009)
- 7) Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H., and Fujii, T., Rapid quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 206–216 (2001)
- 8) Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Kusunoki, J., Itoh, T., and Flood Susan J. A., Evaluation of TaqMan PCR assay for Detecting *Salmonella* in Raw Meat and Shrimp. *J. Food Prot.*, **62**, 329–335 (1999)
- 9) Kawasaki, S., Fratamico, P. M., Wesley, I. V., and Kawamoto, S., Species-specific identification of *Campylobacters* by PCR-restriction fragment length polymorphism and PCR targeting of the gyrase B gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2529–2533 (2008)
- 10) Tompson, J. D., Higgins, D.G., and 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)
- 11) Saito, N. and Nei, M., The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406–425 (1987)
- 12) Yamamoto, S. and Harayama, S., PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1104–1109 (1995)
- 13) Yamada, S. Ohashi, E., Agata, N., and Venkateswaran, K., Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1483–1490 (1999)