〔原 著〕

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による Thermophilic *Campylobacter* 3 菌種の DNA 解析

松田基夫*・松本一政**・金内長司**・政岡俊夫***
赤堀文昭***・山田隆紹†

SUMMARY

In order to determine the suitable conditions for gaining distribution of DNA fragments useful for the chromosomal DNA analysis of the thermophilic *Campylobacter*, *C. coli*, *C. jejuni* and *C. laridis*, we were interested in the poor G+C content of the chromosomal DNAs and the intact DNAs embedded in agarose blocks were digested with 15 restriction enzymes which can recognize sequences containing only G and C nucleotides (*Not*I, *Sfi*I, *Apa*I, *Bgl*II, *Sac*II, *Sma*I and *Hpa*II), sequences rich with G and C (*Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I and *Xho*I) and some other sequences (*Dra*I, *Eco*RI and *Hind*III) respectively. The resulted restriction fragments were fractionated by pulsed-field gel electrophoresis.

When the chromosomal DNAs prepared from the 3 *Campylobacter* strains were digested with two restriction enzymes (*Not*I and *Sfi*I) available with 8-base recognition, electrophoretic profiles of the digested chromosomal DNAs were shown to be very similar to those of each undigested chromosomal DNAs, respectively.

The DNAs digested with *Eco*RI migrated at the same level as each undigested chromosomal DNAs by unknown reason(s).

Twelve other restriction enzymes were able to cut the DNAs from the 3 *Campylobacter* strains with the exception that *Kpn*I did not cut the DNA from the *C. jejuni* strain. Among the enzymes, *Apa*I, *Sal*I and *Sma*I cut the DNAs from the 3 *Campylobacter* strains into a relatively limited number of restriction fragments in the range of approximately 50-1,500 kb in length.

Thus, three restriction enzymes, *Apa*I, *Sal*I and *Sma*I, were found to produce distributions of DNA fragments useful for chromosomal DNA analysis of the 3 *Campylobacter* strains by pulsed-field gel electrophoresis.

Moreover, the genome size of the 3 bacterial strains were preliminarily estimated to be approximately 2,000 kb for *C. coli* JCM 2529^T, 1,900 kb for *C. jejuni* JCM 2013 and 1,700 kb for *C. laridis* JCM 2530^T in length, respectively.

Key words: Mb chromosomal DNA analysis, thermophilic *Campylobacter* strains, pulsed-field gel electrophoresis, *Apa*I, *Sal*I and *Sma*I.

DNA analysis of the thermophilic *Campylobacter* by pulsed-field gel electrophoresis.

* Motoo Matsuda; 麻布大学生物科学総合研究所遺伝子研究部

** Kazumasa Matsumoto, Choji Kaneuchi; 麻布大学獣医学部公衆衛生学第二講座

*** Toshio Masaoka, Fumiaki Akahori; 麻布大学獣医学部薬理学講座

† Takatsugu Yamada; 麻布大学獣医学部内科学講座

Correspondence address: Motoo Matsuda, Department of Gene Biology, Azabu University Research Institute of Biosciences, Fuchinobe, Sagami-hara 229, Japan.

(受付 1990年6月20日, 受理 1990年10月8日)

はじめに

Campylobacter coli, *C. jejuni*, *C. laridis* は好温性カンピロバクター3菌種で、人畜共通感染症の原因菌、とくに食中毒におけるヒト腸炎起病性菌として近年注目されている¹⁻³⁾。しかしこれら *Campylobacter* 3菌種(以下 C. 3 菌種)の染色体 DNA の分子生物学的性状に関する報告は少なく、ゲノムの全長やフィジカルマップをはじめとしてその染色体 DNA の性状に関しては不明のままである。

一方、近年メガベース単位での DNA 解析がパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) の開発⁴⁾により可能となり原核細胞・真核細胞を問わず巨大染色体単位での解析が行われる様になってきた。PFGE 法はゲルの四方に電極を設置し向かい合う電極間で互いに2方向に電場を連続的に転換させる時間間隔 (パルスタイム) により DNA の分画可能範囲を調整するものである。この手法を用いることによって、従来のアガロースゲル電気泳動法では分画不可能であった数メガベース単位での巨大染色体 DNA およびその制限酵素消化断片の分画、解析が可能となってきた。

そこでわれわれは C. 3 菌種の染色体 DNA のメガベース単位での解析に、より適した条件をスクリーニングにより確定する事を目的として、その G+C 含量がともに 30~34% と低い⁵⁾ことに着目して、GC に富む塩基配列を認識する酵素をはじめ 15 種類の制限酵素を用いてそれぞれアガロースブロックに包埋された無傷の巨大染色体 DNA の切断実験を行い PFGE を用いる手法でこれら C. 3 菌種の DNA 解析を行った。

材料および実験方法

1. 材料: 菌株 (Table 1)

使用菌株はブタ由来 *C. coli* JCM 2529^T, ヒト由来 *C. jejuni* JCM 2013 およびカモメ由来 *C. laridis* JCM 2530^T でいずれも基準株あるいはそれに準ずるものであった。*Saccharomyces cerevisiae* X 2180-1A はその染色体 DNA を電気泳動の際の DNA サイズマーカーとして用いた。

2. 方法

1) アガロースブロック法による DNA インサートの調製

アガロースブロック法は細胞をアガロース中に封入した状態で DNA を抽出、制限酵素で消化する方法で、この方法では DNA の物理的切断が少なく巨大染色体

Table 1. Strains used in this study.

Organism	Strains	Obtained from:
<i>Campylobacter coli</i>	JCM 2529 ^T , ^a JCM ^b	
<i>Campylobacter jejuni</i>	JCM 2013	JCM
<i>Campylobacter laridis</i>	JCM 2530 ^T	JCM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X 2180-1A	S. Murakami ^c

^a T, the type strain

^b JCM, Japan Collection of Microorganisms, Wako, Saitama 351-01, Japan.

^c Department of Biophysics, Cancer Research Institute Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan

DNA が得られる⁴⁾。

まず集菌した細菌細胞を 10 mM Tris-HCl [pH 7.6] 1 M NaCl で洗浄し、遠心後上記緩衝液に再懸濁して、これと等量の 1% 低融点アガロース (FMC, IncertTM) 水溶液を混合し、インサートモールド [10×5×2 mm (100 μl)] 中に注入後速く 4℃ で固型化した。なお用いた細菌細胞数は約 5×10⁷/インサートモールドとなるよう調製した。ついでこれらアガロースブロックを 6 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1 M NaCl, 100 mM EDTA [pH 7.5], 0.5% Brij 58 (シグマ社 P 5884), 0.2% デオキシコール酸ナトリウム, 0.5% Lauroyl Sarcosine を含む緩衝液 (Lysis 溶液) 中でリゾチーム (終濃度 1 mg/ml; 和光純薬) と RNase (終濃度 20 μg/ml; シグマ社) で 37℃ 一晩消化して細菌細胞をスフェロプラスト化した。さらにプロティナーゼ K (終濃度 1 mg/ml; 和光純薬) を含む 0.5 M EDTA [pH 9.0], 1% Lauroyl Sarcosine (シグマ社 L-5125) 中で 50℃, 2 日間消化して蛋白質を分解除去し、無傷の巨大染色体 DNA を含むアガロースブロックを調製した。

2) 制限酵素による DNA の消化

今回の実験に使用した制限酵素 (東洋紡および宝酒造) とその認識配列を Table 2 に示した。酵素反応は 32~80 ユニットの制限酵素を含む反応溶液 (150 μl) 中で通常は 1/2 ブロック (50 μl) を用いて 4 時間行った。なお反応液と反応温度はそれぞれ酵素の発売元の指定に従って行った。

3) PFGE 法による DNA 消化断片の分画

今回われわれはファルマシア LKB 社製 PulsaphorTM システムを使用した。まず水平なトレー上に作られた 1% アガロースゲル (16×16×0.5 cm; 宝アガロース LO3) のウェル中に 1/2 アガロースブロックを挿入した。電気泳動は電極が均一な電場の形成されるように工夫さ

Table 2. Restriction enzymes used in this study.

Restriction enzyme	Recognition sequence
1) <i>Not</i> I	GC'GGCCGC
<i>Sfi</i> I	GGCCNNNN'NGGCC
2) <i>Apa</i> I	GGGCC'C
<i>Bam</i> HI	G'GATCC
<i>Bgl</i> II	GCCNNNN'NGGC
<i>Dra</i> I	TTT'AAA
<i>Eco</i> RI	G'AATTC
<i>Hind</i> III	A'AGCTT
<i>Kpn</i> I	GGTAC'C
<i>Pst</i> I	CTGCA'G
<i>Sac</i> II	CCGC'GG
<i>Sal</i> I	G'TCGAC
<i>Sma</i> I	CCC'GGG
<i>Xho</i> I	C'TCGAG
3) <i>Hpa</i> II	C'CGG

Restriction enzymes are available with 8 base recognition 1), 6 base recognition 2) and 4 base recognition 3), respectively.

れたヘキサゴナル電極を用い、いくつかの予備的な実験の後に、エディット・ステッピングモードで 200 V、パルスタイムは 70 秒で 15 時間の後、120 秒で 12 時間、TBE 緩衝液 (89 mM Tris, 89 mM ほう酸, 2 mM EDTA) 中、13°C で行った。

電気泳動後のゲルは Ethidium Bromide (1 µg/ml) で染色し、トランスイルミネータ下で観察した。

実験結果

今回の実験でわれわれは *C. 3* 菌種の染色体 DNA のメガベース単位での解析に、より適した条件をスクリーニングにより確定することを目的として 15 種類の制限酵素を用いた DNA 解析を行ったが、これら *C. 3* 菌種の染色体 DNA ではまず *Not*I, *Sfi*I および *Eco*RI で消化した場合対照として同時に泳動された未消化 DNA インサートの場合と類似の泳動像を示した。これらのうち *Eco*RI を用いた場合の結果を Fig. 1 に示した。ついで用いた 15 種類の制限酵素のうち、これら 3 種類を除く 12 種類では、*Kpn*I による *C. jejuni*

Fig. 1. PFGE separation of *Eco*RI digested-restriction fragments of chromosomal DNAs.

lane Y: chromosomal DNA from *Saccharomyces cerevisiae* as size marker. (A) lane 1: *C. coli* DNA undigested. lane 2: *C. coli* DNA digested with *Eco*RI. (B) lane 1: *C. jejuni* DNA undigested. lane 2: *C. jejuni* DNA digested with *Eco*RI. (C) lane 1: *C. lariidis* DNA undigested. lane 2: *C. lariidis* DNA digested with *Eco*RI.

Fig. 2. PFGE separation of restriction fragments of chromosomal DNAs.

lane Y: chromosomal DNA from *Saccharomyces cerevisiae* as size marker. (A) Digestion with *Bgl*I. lane 1: *C. coli*. lane 2: *C. jejuni*. lane 3: *C. laridis*. (B) Digestion with *Pst*I. lane 1: *C. coli*. lane 2: *C. jejuni*. lane 3: *C. laridis*. (C) Digestion with *Hpa*II. lane 1: *C. coli* DNA undigested. lane 2: *C. coli* DNA digested with *Hpa*II. lane 3: *C. jejuni* DNA undigested. lane 4: *C. jejuni* DNA digested with *Hpa*II. lane 5: *C. laridis* DNA undigested. lane 6: *C. laridis* DNA digested with *Hpa*II.

DNA 消化実験の場合を除いてはすべて複数の切断断片が観察された。これらのうち *Bam*HI, *Bgl*I, *Dra*I, *Hind*III, *Hpa*II および *Pst*I の6種類の制限酵素を用いた場合では、いずれも *C. 3* 菌種株染色体 DNA は効率よく切断されて、*Bgl*I では 200 kb 以下の断片が10数本、*Bam*HI, *Pst*I では 400 kb 以下に *Hpa*II では 200 kb 以下にそれぞれ多数の断片が確認された。これらのうちで *Bgl*I, *Pst*I および *Hpa*II を用いて得られた実験結果を Fig. 2 に示した。また *Dra*I, および *Hind*III では確率的に当然予想されるように泳動ゲルの先端部分に多くの小さな DNA 断片が確認された(データ省略)。*Kpn*I を用いた場合では *C. coli* と *C. laridis* 染色体 DNA でそれぞれ約 600 kb 以下の領域に切断された DNA 断片が検出されたが、*C. jejuni* DNA では消化切断された DNA 断片は検出されず、未消化 DNA の領域に相当する部位に止まったままであった (Fig. 3)。

一方、*Apa*I, *Sal*I および *Sma*I を用いて消化した

C. 3 菌種の PFGE-EtBr 染色像は約 50~1,500 kb の間に比較的大きな2~十数個の DNA 切断断片を示した。それらの結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 に示されているように *Apa*I では *C. coli* で3個、*C. jejuni* で2個、*C. laridis* で2個、*Sal*I ではそれぞれ6, 6, 3個また *Sma*I ではそれぞれ11, 5~7, 5個の断片が鮮明に分離検出された。また Fig. 4 に示されているように、三つの酵素で消化された *C. 3* 菌種株染色体 DNA はそれぞれ独特の PFGE の泳動パターンを示した。

最後に *C. 3* 菌種株の *Apa*I, *Sal*I および *Sma*I による DNA 消化切断断片の電気泳動パターンと、サイズマーカーとして用いた *S. cerevisiae* の染色体の電気泳動像をもとにこれら *C. 3* 菌種株の染色体 DNA の全長を推測した。*C. coli* JCM 2529^T で約 2,000 kb, *C. jejuni* JCM 2013 で約 1,900 kb および *C. laridis* JCM 2530^T では約 1,700 kb と推定された。これらは *E. coli* K-12 の約 4,550 kb⁶⁾ に比べかなり小さいサイズであることが明らかとなった。

Fig. 3. PFGE separation of *KpnI* digested-restriction fragments of chromosomal DNAs. lane Y: chromosomal DNA from *Saccharomyces cerevisiae* as size marker. lane 1: *C. coli* DNA undigested. lane 2: *C. coli* DNA digested with *KpnI*. lane 3: *C. jejuni* DNA undigested. lane 4: *C. jejuni* DNA digested with *KpnI*. lane 5: *C. laridis* DNA undigested. lane 6: *C. laridis* DNA digested with *KpnI*.

考 察

今回の実験において、GC のみから成る配列を認識する 8塩基対認識酵素 *NotI* および *SfiI* を用いた PFGE による解析では *C. 3* 菌種株の染色体 DNA は未消化 DNA と類似のパターンを示した。このような事実からは、G+C% の低いこれら *C. 3* 菌種株の染色体 DNA 上には両酵素による認識配列が 1 個しか存在しないか、存在しないか、あるいは存在しても切断されない状態になっているか、三つの可能性が考えられる。もちろん、実験結果から認識配列が 1 個存在する可能性を考慮するのはこれら *C. 3* 菌種株染色体 DNA が閉環状構造をとっていることを前提とした場合である。染色体 DNA が閉環状構造の場合、制限酵素による切断箇所が 1 個だと酵素処理によって染色体 DNA 全体が直鎖状構造となり未消化のコントロール染色体 DNA と電気

Fig. 4. PFGE separation of restriction fragments of chromosomal DNAs.

泳動上類似の移動度を示すようになりうるかもしれないからである。この点については *Apal* 等との二重消化実験を含めさらに検討が必要で現在これらを実施しているところである。われわれが用いた *NotI*, *SfiI* については *E. coli* K-12 ML-1410 株の染色体 DNA を用いた予備的実験で、Smith らが報告している泳動パターン⁶⁾ とそれぞれ高い類似性を示したので酵素活性に関する問題点は当然除去されうる。このように *NotI*, *SfiI* に関してはわれわれが当初実験目的とした *C. 3* 菌種の染色体 DNA の「メガベース単位での解析に適した制限酵素」ではないことが明らかとなった。*EcoRI* を用いた実験の場合確率的にはさきに述べた三つの可能性

の1番2番目を想定するのは困難であり、3番目の「存在しても切断されない状態」すなわち C. 3 菌種株 DNA 上の *EcoRI* 認識配列中のメチル化等の可能性を考慮に入れるべきであろう。 *KpnI* に関しては、他のいずれの酵素を用いた場合とも異なり *C. coli* と *C. laridis* は消化切断されるが *C. jejuni* 株は未消化 DNA の場合と類似の泳動像を示すという大変特徴的な結果が得られた。この結果は大変興味ある事実であり今後詳細な解析が必要である。

今回用いた酵素のなかで結果は示さなかったが、*SacII* および *XhoI* の場合も 50~1,500 kb の範囲で C. 3 菌種株 DNA の切断断片が分離検出されたが断片の数が多くまた分離の度合いが鮮明ではなく「メガベース単位での解析に、より適した条件」を満たすものとはいえなかった。

今回の実験で C. 3 菌種株の「メガベース単位での解析に、より適した条件」として 15 種の制限酵素を用いたスクリーニングにより *ApaI*, *SalI* および *SmaI* の三つの酵素が合致していることが明らかとなった。

さて今回われわれが行った PFGE の泳動実験条件では、約 50~2,000 kb の DNA の分離分画が可能であり、C. 3 菌種株染色体 DNA の全長を *ApaI*, *SalI* および *SmaI* を用いた実験結果より推定するには大変好都合なものであった。もちろん C. 3 菌種株の染色体 DNA の全長の決定には現在ほとんどその分子遺伝学的知見のないファージの有無等についても考慮する必要がある。

一方、PFGE を用いた細菌巨大染色体 DNA の解析に関する報告は少ないが、最近、大腸菌 K-12⁹⁾、ラクトコッカス属菌⁷⁾、クラミジア菌⁸⁾、ミュータンスレンサ球菌⁹⁾、コウロバクター属菌¹⁰⁾ 等で報告があいつぎ、これまで未決定のままであった各種染色体 DNA の全長の決定やフィジカルマップの作製等を具体的解析内容として独自の研究領域を形成しつつあり今後の急速な新展開が強く示唆される。

ま と め

われわれは thermophilic *Campylobacter* 3 菌種 (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. laridis*) の染色体 DNA のメガベース単位での解析に、より適した条件をスクリーニングにより確定することを目的として、これら C. 3 菌種染色

体 DNA の GC 含量が低いことに着目し、その認識配列中に G+C をすべてかあるいは多くを含む酵素をはじめ 15 種類の制限酵素を用いて、染色体 DNA の消化をアガロースブロック法で行った後、PFGE によってその染色体断片の解析を行った。

まず *NotI*, *SfiI* を用いた実験では C. 3 菌種株染色体 DNA は未消化 DNA と類似の泳動像を示し、*NotI*, *SfiI* は上記実験目的に合致しないことが明らかとなった。*BglII*, *XhoI* をはじめ他の 10 種類の制限酵素の場合も PFGE による実験結果より「染色体 DNA のメガベース単位での解析に、より適した条件」を備えていなかった。

一方、*ApaI*, *SalI* および *SmaI* の三つの制限酵素では C. 3 菌種染色体 DNA をそれぞれ 50~1,500 kb の範囲で 2~11 個の断片に切断し、C. 3 菌種はそれぞれ異なる独特の泳動像を示した。また *ApaI*, *SalI* および *SmaI* を用いた実験結果より、われわれは今回はじめて C. 3 菌種染色体 DNA の全長を *C. coli* JCM 2529^T 約 2,000 kb, *C. jejuni* JCM 2013 約 1,900 kb および *C. laridis* JCM 2530^T 約 1,700 kb と予測した。

以上の結果より C. 3 菌種染色体 DNA の全長の決定やフィジカルマップの作成などを内容とした DNA 解析には *ApaI*, *SalI* および *SmaI* と PFGE を用いる手法が適していることが明らかとなった。

S. cerevisiae X 2180-1A 株を分与いただいた金沢大学がん研究所村上清史先生に深謝します。

文 献

- 1) Skirrow, M. B.: J. Hyg. Camb., 89: 175, 1982.
- 2) Fricker, C. R. et al.: J. Hyg., 91: 445, 1983.
- 3) Blaser, M. J. et al.: *Campylobacter Infection in Man and Animals*, Butzler, J. P. (ed.), [CRC Press, BocaRaton Florida, 1984, p. 143.
- 4) Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.: Cell, 37: 67, 1984.
- 5) Benjamin, J. et al.: Curr. Microbiol., 8: 231, 1983.
- 6) Smith, C. L. et al.: Science, 236: 1448, 1987.
- 7) Bourgeois, P. L. et al.: FEMS Microbiol. Lett., 59: 65, 1989.
- 8) Frutos, R. et al.: J. Bacteriol., 171: 4511, 1989.
- 9) 岡崎暢夫, 他: 日本細菌学雑誌, 45: 272, 1990.
- 10) Ely, B. et al.: J. Bacteriol., 172: 1262, 1990.