

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

マイコプラズマ検査法に関する研究

研究分担者 原澤 亮 特定非営利活動法人いわて野生生物疾病研究センター 理事長
(岩手大学 名誉教授)

研究要旨

ヘモプラズマは哺乳動物を宿主とするマイコプラズマの一群で、赤血球に寄生して増し、感染動物に溶血性貧血を引き起すことが知られている。ヘモプラズマはこれまでの報告で述べたとおり、試験管内での人工培養に成功していないため、16S リボソーム RNA 遺伝子、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサー領域などの塩基配列に基づいて分類・同定が行われている。このほか、RNase P RNA 遺伝子も菌種に固有の塩基配列をもつことから、分類・同定に利用されている。本研究ではウシに感染するヘモプラズマ菌種について、RNase P RNA 遺伝子の構造を評価するための基盤となる調査研究を実施した。その結果、RNase P RNA 分子の P12 ヘリックス領域に想定される二次構造がヘモプラズマ菌種に固有の回文様塩基配列を呈することを示し明し、分類・同定のための根拠となることを明らかにした。

A．研究目的

ヘモプラズマにはかつてリケッチア目アナプラズマ科のヘモバルトネラ属あるいはエペリスロゾン属に属していた菌種のほか、新たに発見された菌種が含まれている。これらヘモプラズマ菌種はいずれも、試験管内での人工培養が成功しないため性状解析ならびに分類学的な検討が遅れている。そのため、菌種の分類・同定は 16S リボソーム RNA 遺伝子、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサー領域あるいは RNase P RNA 遺伝子の塩基配列相同性に基づいて行われている。RNase P RNA は、触媒活性を有する RNA 分子のひとつで、バクテリア、

アーキア、ユーカリアを含むすべての生物に共通に検出されている。原核生物の RNase P RNA はリボザイムであり、tRNA 分子の 5' 側を切り離して、tRNA 分子を成熟、完成させる機能をもっている。バクテリアの RNase P RNA は、特異ドメインと触媒ドメインからなり、二次構造の違いからグラム陰性菌のものは A 型、陽性菌のものは B 型に分けられている。マイコプラズマの RNase P RNA は、グラム陽性菌と同じ B 型を呈している。マイコプラズマは細胞壁を欠くため、グラム染色では陰性に染まるが、分類学的にはグラム陽性菌の仲間である。本研究ではウシに感染するヘモプ

ラズマ菌種を対象に PCR 法により、RNase P RNA 遺伝子を検索し、その塩基配列から想定される二次構造を指標に、菌種の同定が可能かを検討した。

B . 研究方法

岩手大学農学部附属牧場で飼育されている黒毛和牛 20 頭から採取した全血 (EDTA 添加) を材料として、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。DNA を被検サンプルとして、ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子を標的とした PCR を以下のとおり試みた。ウシのヘモプラズマ *M. wenyonii* の RNase P RNA 遺伝子の塩基配列に基づいて設計した Forward プライマー: 5'-AGTCTGAGATGACTR TAGTG-3' (*M. wenyonii* RNase P RNA 遺伝子の 1~20 番目の塩基配列に相当) および Reverse プライマー: 5'-TRCTTG MGGGGTTTGC-3' (*M. wenyonii* RNase P RNA 遺伝子の 170~189 番目の塩基配列に相当) を用い、サーマルサイクラー-Dice (タカラバイオ社) によりエンドポイント PCR を行った。増幅された DNA 分子を、さらに NucleoSpin Extract II kit (Macherely-Nagel 社) により精製し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いてその塩基配列を決定した。

C . 研究結果

ウシには 2 種類のヘモプラズマ *M. wenyonii* および '*Candidatus M.*

haemobos 'が感染することが知られているが、今回の PCR では、*M. wenyonii* の RNase P RNA 遺伝子のみが増幅できた。検出された RNase P RNA 遺伝子の一次構造は既知の *M. wenyonii* の配列と同一であり、その二次構造を推定したところ、P12 ヘリックスにおける終末ループの 4 塩基配列 GAAA が保存されていることが判明した (図 1)。

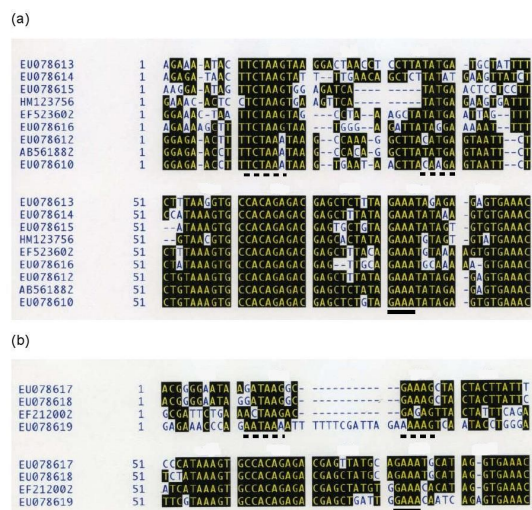


図 1) ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子の整列比較。配列名は塩基配列のアクセッション番号により示した。上段 (a) はエペリスロゾーン群、下段 (b) ヘモバルトネラ群を示す。4 塩基配列 GAAA に下線を引いた。

P12 ヘリックスを形成するステム領域の多くは 7 塩基対からなっており、菌種に固有の配列であることが明らかになった。しかも、P12 ヘリックスにみられる回文様塩基置換がヘモプラズマ菌種に固有のパターンを示すことを見いだした (図 2)。

また、P10.1 ヘリックスの典型的な 11 塩基配列 (5'-TCTAAG-----TATGA-3') は、エ

ペリスロゾン群のヘモプラズマでよく保存されていた。

AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
G A	G A	G A	G A	G A	G A	G A
A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T*G	T-A
A-T	A-T	G*T	T*G	A-T	A-T	G*T
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
T-A	T*G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	A-T	G*T
5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-T*G-3'
haemophilum	ovis	wenyonii	haemolamae	haemocervae	aotii	kahanei
[-5.40]	[-3.60]	[-4.20]	[-4.20]	[-7.20]	[-4.20]	[0.00]
AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
G A	G A	G A	G A	G A	G A	G A
A-T	A-T	A-T	A-T	G-C	G-C	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G	T-A	T-A	T-A
A-T	G-C	G-C	T-A	T-A	T-A	A-T
T-A	T-A	A-T	A-T	A-T	A-T	G-C
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
5'-T-A-3'	5'-G A-3'	5'-T*G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'
suis	haematoparvum	haemofelis	haemocanis	turicensis	coccoides	
[-3.90]	[-5.20]	[-7.60]	[-9.70]	[-7.50]	[-6.90]	

図2) ヘモプラズマのRNase P RNA 遺伝子のP12ヘリックス領域に想定される二次構造。鍵括弧内は計算上の自由エネルギー値 (Kcal/mol)。

D. 考察

RNase P RNA 分子のP12ヘリックスのステム領域にみられる塩基置換は、二次構造を維持するように相補的に起きていることから、これを回文様塩基置換 (palindromic nucleotide substitution) と名付けた。この回文様塩基置換がヘモプラズマ菌種に固有の配列であることから、菌種の同定に有用であると考えられた。つまり、従来の分類・同定法は、一次構造の比較に基づく系統樹により行われていたが、P12ヘリックス領域の回文様塩基置換に基づく方法によると、系統樹の作製が不要となり、二次構造の比較により一義的に同定できることになる。例えば、*M. haemofelis* と *M. haemocanis* は、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の系統樹だけでは、両者を区別することができないが、RNase P RNA 分子のP12ヘ

リックス領域の回文様塩基置換の配列の違いから直ちに鑑別同定が可能である。

また、想定される二次構造の自由エネルギーは負の値をとり、P12ヘリックス領域が安定なステム・ループ構造を呈することが示唆された。

B型のRNase P RNA 分子におけるP12ヘリックス領域のGAAA4塩基は、同分子のP10.1ヘリックスにある特定の11塩基からなるレセプターと親和性をもつことが知られている。したがって、P12ヘリックス領域における塩基置換は、P10.1ヘリックス領域における塩基置換と連動して起きることが想定される。点変異は無秩序に発生するが、これらの領域における変異は二次構造を保つように制御されていることが示唆された。換言すれば、致死変異となる点変異は、観察されることがない。つまり、RNase P RNA 分子の二次構造を構成する回文様相補配列において観察される点変異は、バイアスを受けた結果として、生き残ったものと考えられる。

E. 結論

住血マイコプラズマはヒトを含む多くの哺乳動物から検出されている、感染性貧血の病因微生物であり、細胞培養に用いるウシ血清のもとになる、ウシ胎児血液を汚染することから、警戒を要する汚染因子と考えられる。試験管内培養ができないことから、遺伝子レベルでの同定・分類に依拠せざるをえない。本研究により、RNase P RNA の二次構造から、菌種の同定が可能で

あることが示唆された。

F . 健康危険情報

動物のヘモプラズマのうち、ヒツジおよびブタのヘモプラズマがヒトへ感染することが海外で報告されていて、人獣共通病原体として認識されるようになってきた。また、ヒト固有のヘモプラズマが近年知られるようになってきている。

G . 研究発表

1 . 論文発表

Iso, T., Suzuki, J., Sasaoka, F., Sashida, H., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., and Harasawa, R. 2013. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Vet. Microbiol.* 163: 184-189.

Giangaspero, M., Orusa, R., Savini, G., Di Genaro, A., Osawa, T., and Harasawa, R. 2013. Serological survey to determine the occurrence of *Blue tongue virus*, *Bovine leukemia virus* and *Herpesvirus* infections in the Japanese small ruminant population from northern districts. *Clin. Microbiol.* 2: 104-109.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J. Virol.*

Methods 192: 59-67.

Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Hirata, T., and Harasawa, R. 2013: Two genotypes among ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemobos*’ strains based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 361-364.

Fujihara, M., Wakita, J., Kondoh, D., Matsushita, M., and Harasawa, R. 2013. Effects of urea on length distribution and morphology of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cells. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7: 1780-1786.

Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Nagai, K., Fujita, H., Kadosaka, T., Ando, S., and Harasawa, R. 2013. Two clusters among *Mycoplasma haemomuris* strains, defined by the 16S-23S rRNA intergenic transcribed sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 643-648.

Giangaspero, M., Bonfini, B., Orura, R., Savini, G., Osawa, T., and Harasawa, R. 2013. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetti*, *Brucella* spp., Leptospirosis, and *Orf virus* among sheep from northern districts

of Japan. J. Vet. Med. Sci. 75: 679-684.

Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Kobayashi, S., Furuhashi, K., and Harasawa R. 2013. Detection of hemotropic mycoplasmas in free-living brown sewer rats (*Rattus norvegicus*). J. Vet. Med. Sci. 75: 979-983.

Fujihara, M., Kondoh, M., and Harasawa, R. 2013. The bacterial cell division protein FtsZ forms rings in swarmer cells of *Proteus mirabilis*. Ann. Microbiol. 63: 399-401.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Palindromic nucleotide substitutions: A new software for pestivirus genotyping. Int. Res. J. Biochem. Bioinf. 3: 52-63.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Palindromic nucleotide substitutions software version 2.0. Genotyping based on the secondary structure alignment in the 5' untranslated region of *Pestivirus* RNA. J. Bioinf. Intell. Control 2: 40-64.

Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., Harasawa, T. 2013. Prevalence of antibodies against *Parainfluenza virus* type 3, *Respiratory syncytial virus* and bovine *Herpesvirus* type 1 in sheep from northern prefectures of Japan. Vet. Ital. 49: 285-289.

Mitsui, T., Fujihara, M., and Harasawa, R. 2013. Salivary nitrate and nitrite may have antimicrobial effects on *Desulfovibrio* species. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77: 2489-2491.

2 . 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし