

Listeria monocytogenes の *actA* 遺伝子配列及び系統別 ミスマッチ PCR 法の検討

石村 勝之

はじめに

Listeria monocytogenes(以下, リステリア, *L. m*)は通性嫌気性グラム陽性の短桿菌で, 1981年にカナダの Nova Scotia で発生したコールスローサラダを原因とした集団発生以来, 食品が媒介する感染症の原因菌として認識され, 欧米ではほぼ毎年のように食品媒介リステリア症の集団発生が報告されている¹⁾。我が国では, 年間約 200 例の高齢者, 乳児等を中心とした散発事例の発生があることが推定報告されているが, 原因(食品等)は不明であり, 原因食品が確認された事例は 2001年に北海道で発生した 1 事例のみである²⁾。しかし, 本邦の食品類も欧米と同様にリステリア汚染があること^{1), 3), 4)}が確認されており, 平成 26 年 12 月には厚生労働省令第 142 号及び告示第 496 号が公布され, 非加熱食肉製品とナチュラルチーズにリステリアの基準値が設定された。超高齢・少子化社会が進む我が国では, その管理がより重要となることから, 今後, リステリアについて, その検出検査や疫学的検査^{5), 6)}の必要性が高くなると考えられる。そこで, 本菌の病原因子群の一つである, 細胞に侵入後, 細胞内や細胞間の移動に関わる病原蛋白質 ActA⁷⁾の部分塩基配列について調べ, スクリーニング手法として, 血清型ごとの配列差異を利用した系統別ミスマッチ PCR 法を検討した。

方 法

1 供試菌株及び血清型別

散発事例由来 *L. m* 13 株, 食品由来 *L. m* 31 株を供試した。血清型別は市販抗血清(デンカ生研)により行った。

2 *actA* 遺伝子の PCR 増幅及びシーケンス解析

Moriishi の報告した PCR プライマー(PR5, PR3)⁸⁾により *actA* 遺伝子を増幅した。ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し, Proline-Rich Repeats (PRR) 領域を比較した。

3 系統別ミスマッチ PCR 法の構築

上記の塩基配列を血清型別ごとに比較し, lineage I (血清型 4b, 1/2b), lineage II (1/2a, 1/2c), 及び PRR 領域内第 4PRR のアミノ酸が

FPLMP⁷⁾である *L. m* 4b 株検出用 PCR 法を検討した。

結果と考察

1 *L. m* の *actA* 遺伝子 PRR 領域のアミノ酸配列及びシーケンス結果

ActA 内の第 4PRR 領域のアミノ酸配列及びシーケンス解析結果を血清型ごとに表 1 に示した。第 4PRR のアミノ酸配列は, 血清型 4b 株は, FPPMP (PRR 繰り返し回数 4 リピート型 (I 型)) と FPLMP (3 リピート型 (II 型)) が認められた。1/2b 株には FPPMP (I 型) と FPPIP (I 型と II 型) が認められた。一方, 1/2a 株は FPPIP のみで, PRR 繰り返しは I 型及び II 型がみられた。1/2c 株は FPPIP (I 型) のみであった。

塩基配列の比較では, 4b 及び 1/2b 株は FPPMP と FPLMP のアミノ酸 F は ttt でコードされていた。一方, 1/2a 及び 1/2c では ttc であった。

さらに, 表 1 で示すように 15 番, 17 番及び 29 番コドンの塩基配列には lineage I (血清型 4b, 1/2b) 株と lineage II (1/2a, 1/2c) 株に特徴がみられ, 1/2b 株には両 lineage の特徴が共存した *actA* 塩基配列の保有が認められた。

2 系統別 *actA* ミスマッチ PCR 法の検討結果

表 2 のミスマッチプライマーを設計作成し, lineage I (血清型 4b, 1/2b) 増幅用, lineage II (1/2a, 1/2c) 増幅用, 及び血清型 4bFPLMP 保有株増幅用の PCR 系を検討した結果, それぞれの系で識別された増幅が認められた。

以上の結果から, 本邦の *L. m* 4b 株にも欧米の集団発生株に認められた FPLMP アミノ酸配列の第 4PRR 部位を有する ActA 蛋白保有株⁷⁾が患者及び食品由来株ともに認められ, 本邦におけるその分布及び割合と菌特性などの詳細な検討が必要である。

検討した 3 種類のミスマッチ PCR 法は, 本邦における *L. m* の疫学検討において, 系統別のスクリーニング手法として利用可能と考えられた。

謝 辞

散発事例株及び食品由来株を分与いただいた国立感染症研究所井上智先生に対し深謝いたします。

文 献

- 1) 中村寛海:総説 食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染—リステリアの施設定着株を取り巻く話題, 日食微誌, 32, 1~11(2015)
- 2) 食品安全委員会:微生物・ウイルス評価書, 食品中のリステリア・モノサイトゲネス., (2013)
- 3) 仲真晶子:解説 食品媒介リステリア症, 防菌防黴, 34, 149~154(2006)
- 4) 仲真晶子:11 *Listeria monocytogenes*, 食品由来感染症と食品微生物, 401~423(2009)
- 5) 石村勝之 他:iap および iap 類似遺伝子のPCR 検出による *Listeria* spp. 同定法の検討, 広島市衛生研究所年報, 13, 50~54(1994)
- 6) Ishimura K et al.: Evaluation of PCR-based identification and genotyping methods for the *iap* genes in *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp., Jpn. J. Food Microbiol., 23, 223~229(2006)
- 7) Wiedmann R et al.: Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential, Infect. Immun., 65, 2707~2716 (1997)
- 8) Inoue S et al.: RAPD- and *actA* genotyping of *Listeria monocytogenes* isolates of human listeriosis, the intestinal contents of cows and beef, Microbiol. Immunol., 45, 127~133(2001)

表1 *actA* 遺伝子の PRR 繰り返し回数型と第 4PRR のアミノ酸配列及び塩基配列解析結果

血清型	PRR 型	第 4PRR アミノ酸配列	第 4PRR 塩基配列 (5'----3')	15 番* コドン	17 番* コドン	29 番* コドン
4b	I	F P P M P	-ttt-cca-cca-atg-cca-	ggt(G)	ata(I)	ggc(G)
	II	F P L M P	-ttt-cca- cta -atg-cca-	ggt(G)	ata(I)	ggc(G)
1/2 b	I	F P P M P	-ttt-cca-cca-atg-cca-	ggt(G)	ata(I)	ggc(G)
	II	F P P I P	-ttt-cca-cca-atc-cca-	ggc(G)	ata(I)	ggt(G)
1/2 a	I	F P P I P	- ttc -cca-cca-atc-cca-	ggc(G)	aga(R)	ggt(G)
	II	F P P I P	- ttc -cca-cca-atc-cca-	ggc(G)	aga(R)	ggt(G)
1/2 c	I	F P P I P	- ttc -cca-cca-atc-cca-	ggc(G)	aga(R)	ggt(G)

*: 第 4PRR のアミノ酸 F(ttt, ttc)から数えた番号

表2 系統別ミスマッチ PCR 系の Primer 及び増幅サイクル

増幅系	ミスマッチ reverse Primer	増幅サイクル
Lineage I (4b, 1/2b)	5'-CTC-TTC-TTC-TGT-TGG-G-3'	94°C, 64°C, 72°C 各 1min, 35 回
Lineage II (1/2a, 1/2c)	5'-ACT-AAA-IIC-TTC-AGA-TGT-TGG-TC-3'	94°C, 53°C, 72°C 各 1min, 35 回
4b FPLMP 型	5'-CAA-CTC-TTC-TTC-TGT-TGG-CAT-AA-3'	94°C, 66°C, 72°C 各 1min, 35 回
共通 forward Primer(PR5):	5'-TGC-AGA-GGT-AAA-TGC-TTC-GGA-CTT-3'	