

## 【原著】

## A 群レンサ球菌接種マウスの同一病巣から接種菌と共に同時に分離された変異菌の遺伝子解析の検討

西村俊夫<sup>1</sup> 沼田紀義<sup>2</sup><sup>1</sup>西村医院 (旧) <sup>2</sup>三菱化学メディアエンス株式会社  
食の安全サポート事業部 (旧)

(受付：平成 22 年 11 月 8 日)

(受理：平成 22 年 11 月 10 日)

## 要 旨

A 群レンサ球菌接種マウスの同一病巣から接種菌と共に同時に分離された変異菌について遺伝子解析を行った。A 群レンサ球菌の変異株には Uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine-4-epimerase があり、A 群標準株には認められなかったとの報告がある。この酵素の遺伝子の塩基配列は未だ不明である。だが 4-epimerase は UDP-glucose と UDP-*N*-acetylglucosamine の両方を基質とすることが証明されている。また *Enterococcus faecalis* V583 には 2 種類の UDP-glucose-4-epimerase 遺伝子 (galE-1、galE-2) が見ついている。そこで検体の加熱処理物 (genomic DNA) を鋳型として galE-1 および galE-2 遺伝子を増幅するように設計した PCR Primer を用いて解析を行った。変異株では増幅できたが標準株ではできなかった。そこで NCBI より取得した galE-1、galE-2 配列を参照配列 (基準となる配列) とした。シーケンスの結果、変異株は galE-1、galE-2 の配列を有していた。変異の種類は frame shift、ミスセンス変異、サイレント変異であった。しかしこれら変異菌の由来生物種までは確定できなかった。これら変異菌については Bergey's Manual の生化学的性状や血清学的検査所見、また DNA 相同試験などにより *Enterococcus faecalis* と同定し前回報告した。それ故に今回はこれら変異菌を *Enterococcus faecalis* を除いた *Enterococcus* と同定した。

**キーワード：**A 群レンサ球菌、*Enterococcus*、変異、*Enterococcus faecalis* V583、UDP-glucose 4-epimerase 遺伝子 (galE-1、galE-2)

## 緒 言

A 群レンサ球菌接種マウスの同一病巣から接種菌と共に遺伝的変異を示唆する *Enterococcus faecalis* やその他の D 群菌を同時に分離したことをすでに報告した<sup>1-2)</sup>。今回はこれを遺伝子解析により確証するため検討を試みた。

吉岡<sup>3)</sup>は Uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine-4-epimerase は UDP-*N*-acetylglucosamine に作用して UDP-*N*-acetylgalactosamine に変える酵素である。これが変異株にはあり A 群標準菌株には認められなかった。また epimerase は新しく生じたものか、それとも構造遺伝子は元来有しているが、調節遺伝子の抑制が解けて作られるようになったのか不明であるとのべている。

これらの知見から標準菌株 A 群 24 型菌は変異株の親株と疑われる。

ところが Uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine-4-epimerase の DNA の塩基配列は未だ不明である。一方、UDP-glucose 4-epimerase は UDP-glucose と UDP-*N*-acetylglucosamine の両方を基質とすることが証明されている<sup>4-6)</sup>。さらにまた *Enterococcus faecalis* V583 には 2 種類の UDP-glucose 4-epimerase 遺伝子 (galE-1、galE-2) が報告されている<sup>7-10)</sup>。そこで解析領域を UDP-glucose-4-epimerase galE-1 と galE-2 とした。

標準菌株 A 群 24 型菌に galE-1 および galE-2

が存在した場合、これらの配列と変異菌の配列を比較することにより変異株が親株由来の菌株である可能性を期待し検討することにした。

### 材料と方法

下記 5 検体の解析をタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターに依頼した。

標準株 # 19 (A 群 24 型菌)

変異株 # 56-2、# 59-2、# 12-2、# 18-2

検体送付は 2 回行った。2009 年 10 月 23 日に # 19、# 56-2、2010 年 2 月 9 日に # 12-2、# 18-2、# 59-2 を送付した。ただし標準菌株 # 19 は前回作成したプライマーで -20℃ 保存したものを送付した。これらの分離菌は凍結乾燥しアンフルに封入し 4℃ に保存したものである。これらの保存菌株を少量採取しブレインハートインフュージョン (BHI) ブイヨンに接種、35℃ 一昼夜 (24h) 培養した。そのブイヨン菌液より 5% 馬血液加普通寒天培地にて 35℃ 一昼夜 (24h) 培養後、生理食塩水で約  $10^7$  cfu/ml の菌液を作製した。その菌液を 100℃ 10 分加熱した。培地はいずれも栄研化学、馬脱繊維血液はコージンバイオ (株) を使用した。-20℃ 凍結しドライアイス保存でタカラバイオ (株) に発送した。

### 作業工程

#### (A) サンプル

上記 5 検体について、解析を行った。各検体は約 1ml/tube が 5 本ずつあり、うち 1 本ずつ開封して実験に使用した。

#### (B) 解析領域情報

参照配列は NCBI より収集した以下のデータをもとに作成した。各検体について、以下の 2 遺伝子の解析を行った。この galE-1、galE-2 配列を参照配列 (基準となる配列) とした。

##### (1) galE-1

|                  |                                   |
|------------------|-----------------------------------|
| Gene ID          | 1199974                           |
| Gene description | UDP-glucose 4-epimerase           |
| Gene type        | protein coding                    |
| Organism         | <i>Enterococcus faecalis</i> V583 |
| Chromosome 配列    | Nc-004668.1 (REGION:              |

1041858, 1042847)

アミノ酸配列 Np-814802.1

PCR プライマーセット

galE1 F010-galE1 R010

内部シーケンスプライマー

galE1s F010, galE1s R010

##### (2) galE-2

Gene ID 1201632

Gene description UDP-glucose 4-epimerase

Gene type protein coding

Organism *Enterococcus faecalis* V583

Chromosome 配列 Nc-004668.1 (REGION: 2687197, 2688189)

アミノ酸配列 Np-816409.1

PCR プライマーセット

galE2 F010-galE2 R010

内部シーケンスプライマー

galE2s F010, galE2s R010

#### (C) PCR

検体を滅菌水にて 100 倍希釈し、それを PCR の鋳型として用いた。PCR は鋳型を 2  $\mu$  l 用い、20  $\mu$  l の反応系にて行った。PCR cycle は、通常の 3step 法を用いた。試薬はいずれもタカラバイオ製で、ポリメラーゼは Takara Ex Taq を、緩衝液は Ex Taq Buffer (20mM Mg<sup>2+</sup> + plus)、LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> + free)、GC Buffer I (5mM Mg<sup>2+</sup> + plus)、GC Buffer II (5mM Mg<sup>2+</sup> + plus) から適宜選択して使用した。PCR 装置は、Takara PCR Thermal Cycler Dice Gradient を使用した。

なお、galE-1、galE-2 とともに、12-2 を除いた 56-2、59-2、18-2 の変異株では増幅できたが、標準株では増幅が確認できなかった。そのため、標準株と 12-2 について下記希釈列を作製して PCR を再度試みたが、いずれでも増幅できなかった。変異株では増幅できたため、プライマーや PCR 条件等には問題が無く、標準株には上記データベースから取得した UDP-glucose 4-epimerase 遺伝子に相当する配列が存在しないと考えられる。PCR 産物が得られた変異株のみシーケンスを行った。

希釈列：

原液( $\times 10^0$ )、10 倍希釈( $\times 10^{-1}$ )、100 倍希釈( $\times 10^{-2}$ )、1000 倍希釈( $\times 10^{-3}$ )、10000 倍希釈( $\times 10^{-4}$ )

PCR プライマーの位置および配列は別紙参照のこと。(図 1 と図 2)

緑文字 : exon

灰色文字：遺伝子の周辺配列

青文字 : forward primer

赤文字 : revers primer

(D) シークエンス

得られた PCR 産物について、exonuclease I および alkaline phosphatase (Shrimp) (いずれもタカ

| PCR プライマー |                       |
|-----------|-----------------------|
| プライマー名    | プライマー配列 (5' -> 3')    |
| galE1F010 | GTTGGCCAGAGTTATCAAGAT |
| galE1R010 | CGTCAAATAATAGCGGTCTGT |
| galE2F010 | GAAATGGCCAAATTAATCCTG |
| galE2R010 | CGGTTCTGAAGATATAAGCGA |

  

| 内部シークエンスプライマー |                       |
|---------------|-----------------------|
| プライマー名        | プライマー配列 (5' -> 3')    |
| sF010         | GCCATCTGGTGTATCATAATC |
| sR010         | TTGGAAGTCATGCAAGAATTC |

図 1 プライマー配列やその位置

| galE-1    |         |         |             |             |            |            |             |             |            |
|-----------|---------|---------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| 001041258 | 0000000 | 0000000 | CACTATGAAA  | TGGTTCCCGC  | CAAATTAGGT | GAGTATACGA | TTGTCATTAT  | GAATACTAAC  |            |
| 001041318 | 0000000 | 0000000 | AAACGCCGTG  | AATTAGCAGA  | TTCAAAATAT | AATGAACGTC | GTGAGAATG   | GGAAGAAGCC  |            |
| 001041378 | 0000000 | 0000000 | GTTTCGTTGC  | TTCAAAAAGA  | GTTATCTATT | GAATTTTATG | GTGAATTAGA  | CAGCGAGACA  |            |
| 001041438 | 0000000 | 0000000 | TTTGAACAAT  | ATCAAGCATT  | GATTGGAGAT | CCAGCGTTGA | TTAAACGAGC  | CGGTCATGCC  |            |
| 001041498 | 0000000 | 0000000 | GTCACAGAAA  | ATGAACGAAC  | TTTATTGGCA | AAACAAGCGC | TAATGAAGG   | GGATTGGAA   |            |
| 001041558 | 0000000 | 0000000 | GAATTTGCCT  | TATTATTA    | TGCCTCACAT | CGTTCGCTAA | AAGAAGATTA  | CGAAGTAACT  |            |
| 001041618 | 0000000 | 0000000 | GGCATTGAGT  | TGGATACCTT  | AGTGGCTTGT | GCGCAAGAAC | AACCAGGCGT  | TTTGGGCGCA  |            |
| 001041678 | 0000000 | 0000000 | CGGATGACTG  | GTGCAGGGTT  | TGGCGGTTGT | AGTATTGCTT | TGGTACCAA   | GCAAAAATATA |            |
| 001041738 | 0000000 | 0000000 | GAYGCATTA   | TTGAAGCTGT  | TGGCCAGAGT | TATCAAGATA | AAATTGGCTA  | TGCTGCTGAT  | galE1F010  |
| 001041798 | 0000000 | 0000000 | TTTTATCCTG  | CATCAATTGA  | TGATGGTGCC | AGAAAGTTAT | TTTAGAAAGG  | AAGGCTTTAA  |            |
| 001041858 | 0000000 | 0000001 | ATGTCTATTT  | TAGTATTAGG  | TGGCGCAGGC | TACATCGGCT | CACATGCCGT  | CGATCAATTA  |            |
| 001041918 | 0000000 | 0000061 | ATTTCAAAGG  | GCTATGCCGT  | TGTTGTTGTT | GATAATTTAT | TAACGGGGCA  | TCGTTACAGCA |            |
| 001041978 | 0000000 | 0000121 | GTTTCATGAAC | AAGCGACTTT  | CTATGAAGGG | GATATTGCTG | ATAAAGCTTT  | TTTACGTAGT  |            |
| 001042038 | 0000000 | 0000181 | GTCTTTGAAA  | AGGAATCAAT  | TGAAGGGGTG | TTGCACCTTG | CGGCCAATTC  | TTTAGTAGGA  |            |
| 001042098 | 0000000 | 0000241 | GAATCCGTGG  | AGAAAACCGTT | AATGTATTTC | AATAACAATG | TTACCGGCAC  | TCAAATTGCC  | galE1sF010 |
| 001042158 | 0000000 | 0000301 | TTGGAAGTCA  | TGCAAGAATT  | CGGAGTAAA  | CACATTGTTT | TTTCTTCCAC  | AGCGGCCACT  |            |
| 001042218 | 0000000 | 0000361 | TATGGCGAAC  | CAAAAGCAAT  | GCCATTACA  | GAAGAACC   | CAACGAATCC  | TAAAAACCCG  |            |
| 001042278 | 0000000 | 0000421 | TATGGGAAA   | GTAATTAAT   | GATGGAAAA  | ATCATGAAAT | GGTGCACAA   | CGCTTATGAA  |            |
| 001042338 | 0000000 | 0000481 | ATGAAATATG  | TTGCTTTGCG  | TTATTTAAT  | GTTGCAGGAG | CAAAAAAGA   | TGCCTCAATT  |            |
| 001042398 | 0000000 | 0000541 | GGTGAGGATC  | ACACGCCAGA  | AACGCATATT | GTGCCAATTA | TTTTACAAGT  | GGCATTGGGC  |            |
| 001042458 | 0000000 | 0000601 | CAACGAGCAG  | AGCTAAGTAT  | TTTTGGGGAT | GATTATGATA | CACCAGATGG  | CACGTGCATT  | galE1sR010 |
| 001042518 | 0000000 | 0000661 | CGAGATTATG  | TTTACATTGA  | AGACTTGATT | GCAGCACATA | TTTTGGCTTT  | AGAATACTTG  |            |
| 001042578 | 0000000 | 0000721 | AAAAATGGCG  | GCGAAAGTGA  | CGTCTTTAAT | CTGGGTAGCA | ACAACGGCTA  | TTCTGTATAA  |            |
| 001042638 | 0000000 | 0000781 | GAAATGTTAG  | ATGCTGCTCG  | CGAAGTGACA | GGTCAAGAAA | TTCTGCGAC   | AATCGCCCA   |            |
| 001042698 | 0000000 | 0000841 | CGCCGAGCAG  | GGGATCCTAG  | TACGTTAATT | GCTTCTAGTG | AAAAAGCCA   | ACGAGTTTAA  |            |
| 001042758 | 0000000 | 0000901 | GGCTGGCAAC  | CAGAAGTAAC  | TGAGGTCAAG | GATATTATCG | CCACCGCTTG  | GCAATGGCAT  |            |
| 001042818 | 0000000 | 0000961 | GTGAAACATC  | CTCAAGGCTA  | TAATGAATAG | GAGAACATCA | GATGATGAAA  | GAAAGTAGTA  |            |
| 001042878 | 0000000 | 0000000 | AATGGATTGC  | TGCATTTGTA  | GAGATAATCA | TAGAAAATGG | CGATTGGACG  | GAAACAGACC  | galE1R010  |
| 001042938 | 0000000 | 0000000 | GCTATTATTT  | GACGAATCGG  | ATTGCCAAAC | TAGTTGGCTG | TGATTTTTTT  | GAACAACCAG  |            |
| 001042998 | 0000000 | 0000000 | AAGCGGTTGC  | TTGTGAGCAA  | GAACCGTTGC | GTGTGGTGA  | ACATCTTTTA  | AATATTGCAC  |            |
| 001043058 | 0000000 | 0000000 | AAGCCAATCA  | CCAAATCGAT  | GACTCAATTA | CGGAAGCAGA | ACAACCTGGAT | GCGGAGTTAA  |            |
| 001043118 | 0000000 | 0000000 | TGATTTTAT   | TACGCCGACC  | CCAACCATCA | TTAATCAGAA | GTTTATGGAT  | TATTATCAAG  |            |
| 001043178 | 0000000 | 0000000 | AGTCTCCACG  | AAAAGCAACG  | GATTATTTTT | ATCAGTTATG | TAAAACGAAT  | AACTACATTA  |            |
| 001043238 | 0000000 | 0000000 | AAACGAAAGC  | AATCGCCAAA  | AATATTATTT | TCCCAATGGA | CTCACCTATG  | GCTAAACTAG  |            |
| 001043298 | 0000000 | 0000000 | AAATTACCAT  | TAACCTATCG  | AAGCCAGAAA | AGGATGCTCG | AAAAATTTTG  | GGTAAAAAGA  |            |
| 001043358 | 0000000 | 0000000 | AAATGAGTCA  | AAAAAATAT   | CCAGCGTGTA | TGTTATGTAT | GGAGAATGAA  | GGCTATTATG  |            |
| 001043418 | 0000000 | 0000000 | GCCGTGTA    | TTATCCAGCA  | CGTACAAACC |            |             |             |            |

図 2 プライマー配列やその位置

ラバイオ) を用いて酵素的に精製した。精製 PCR 産物を鋳型として Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用い Dye Terminator 法によりシーケンス反応を行った。プライマーは、上記 PCR プライマーおよび内部シーケンスプライマーを用いた。シーケンス反応には Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) を使用し、Kit の取り扱い説明書に準じた条件で行った。シーケンス反応後の精製は、X Terminator (Applied Biosystems 社) を使用した。シーケンスは、96well プレートフォーマットのキャピラリーシーケンサー AB13730X1 (Applied Biosystems 社) を用いて行った。

#### (E) 多型塩基検出

シーケンスデータは 'KB base Caller' を用いて波形配列データに変換した。得られた波形データについては波形閲覧ソフト SEQUENCHER (Gene code) にてアSEMBルおよび多型解析を行った。

なお、標準株の配列データが得られなかったため、前記 NCBI より取得した galE-1、galE-2 配列を参照配列 (基準となる配列) とした。

#### (F) 結果

先ず表 1 の記載方法についてのべる。アミノ酸は genotype list の方法に従って記載した。例として galE-1 position 113 では R[cgt]38p[cct] と記載しているがそれぞれ以下の意味である。

R : reference のアミノ酸

cgt : reference のコドン

38 : reference のアミノ酸の位置

p : 塩基置換後のアミノ酸

cct : 塩基置換後のコドン

シーケンスの結果、表 1 記載の多形が検出された。

なお、これ以外の箇所には多型は確認されなかった。

変異の種類については塩基の挿入による frame shift は、サンプル 56-2 の galE-1 position 836-837 でのみ確認された。それ以外の箇所および検体

では、塩基置換のみ確認された。アミノ酸置換があるものはミスセンス変異で 8 箇所認められた。ないものはサイレント変異で 27 箇所認められた。

今回は酵素 UDP-Glc 4-epimerase しか解析しておらず、変異株 # 56-2、# 18-2、# 59-2 いずれも *Enterococcus faecalis* と同定できなかった。今回の実験からは、PCR 増幅したこれら検体は、少なくとも galE-1、galE-2 配列を有していることは言えるが、由来生物種までは確定できなかった。

これは、実験としては NCBI から取得した *Enterococcus faecalis* の galE-1、galE-2 配列に特異的なプライマーを設計したが、これが他の生物種由来 UDP-glucose 4-epimerase を絶対に増幅しないと断言できないためである。

しかしこれらの変異菌は前回報告<sup>1)</sup>したごとく、Bergey's Manual の生化学的性状や血清学的検査所見、また DNA 相同試験などにより *Enterococcus faecalis* と同定された菌株である。さらに他の細菌が混在しない理由についても前報<sup>1)</sup>に詳述した。以上よりこれら変異菌を *Enterococcus faecalis* を除いた *Enterococcus* と同定した。

#### 考 察

変異株では PCR が増幅され、標準株 A 群レンサ球菌では PCR が増幅されなかった。そのため標準菌株 A 群レンサ球菌が変異株の親株であるとの疑問を解明するための検討はできなかった。また変異株は galE-1、galE-2 の配列を有し Bergey's Manual その他の成績から *Enterococcus faecalis* と同定されたが、*Enterococcus faecalis* と断定することはできなかった。galE-1、galE-2 以外の遺伝子やその他の検討が必要と考える。

ところで今回の変異菌について *Enterococcus faecalis* と断定できぬため *Enterococcus* 群(腸球菌) と同定した。腸球菌は血清学的に D 群に属するが、本菌群は他の連鎖球菌とかなり相異した性質をもっている。本菌群は生物学的性状によって次の 4 種類に分類される<sup>11)</sup>。

① *Streptococcus faecalis* ② *Streptococcus liquefaciens*

表 1 各検体について 2 遺伝子の解析

galE-1

| Position(*1) | Reference | 56-2 | 12-2 | 18-2 | 59-2 | Amino Acid                        | アミノ酸置換の有無     |
|--------------|-----------|------|------|------|------|-----------------------------------|---------------|
| 113          | G         | C    | NG   | C    | C    | R[ <i>cgt</i> ]38P[ <i>cct</i> ]  | 有             |
| 180          | T         | C    | NG   | C    | C    | S[ <i>agt</i> ]60S[ <i>agc</i> ]  | 無             |
| 192          | G         | A    | NG   | A    | A    | K[ <i>aag</i> ]64K[ <i>aaa</i> ]  | 無             |
| 207          | G         | T    | NG   | T    | T    | G[ <i>ggg</i> ]69G[ <i>ggt</i> ]  | 無             |
| 333          | C         | T    | NG   | T    | T    | H[ <i>cac</i> ]111H[ <i>cat</i> ] | 無             |
| 417          | C         | T    | NG   | T    | T    | N[ <i>aac</i> ]139N[ <i>aat</i> ] | 無             |
| 479          | A         | G    | NG   | G    | G    | E[ <i>gaa</i> ]160G[ <i>gga</i> ] | 有             |
| 597          | G         | A    | NG   | A    | A    | L[ <i>tgt</i> ]199L[ <i>tta</i> ] | 無             |
| 717          | C         | T    | NG   | T    | T    | Y[ <i>tac</i> ]239Y[ <i>tat</i> ] | 無             |
| 751          | C         | T    | NG   | T    | T    | L[ <i>ctg</i> ]251L[ <i>tgt</i> ] | 無             |
| 756          | T         | A    | NG   | A    | A    | G[ <i>ggt</i> ]252G[ <i>gga</i> ] | 無             |
| 813          | T         | C    | NG   | C    | C    | G[ <i>ggg</i> ]271G[ <i>ggc</i> ] | 無             |
| 828          | G         | A    | NG   | A    | A    | A[ <i>gcg</i> ]276A[ <i>gca</i> ] | 無             |
| 836-837(*2)  | :         | G    | -    | -    | -    | A[ <i>gcc</i> ]279A[ <i>gcg</i> ] | (frame shift) |
| 837          | C         | -    | NG   | G    | G    | A[ <i>gcc</i> ]279A[ <i>gcg</i> ] | 無             |

\* 1 : position は、参照配列の最初の塩基を “1” とした場合の位置。

\* 2 : positin 836-837 間に “G” の挿入があり、以降の codon frame がずれている。

本来の stop codon より早い位置に stop codon が生じている。

galE-2

| Position(*1) | Reference | 56-2 | 12-2 | 18-2 | 59-2 | Amino Acid                        | アミノ酸置換の有無 |
|--------------|-----------|------|------|------|------|-----------------------------------|-----------|
| 36           | T         | C    | NG   | C    | C    | I[ <i>att</i> ]12I[ <i>atc</i> ]  | 無         |
| 82           | A         | G    | NG   | G    | G    | I[ <i>att</i> ]28V[ <i>gtg</i> ]  | 有         |
| 84           | T         | G    | NG   | G    | G    | I[ <i>att</i> ]28V[ <i>gtg</i> ]  | 有         |
| 108          | A         | G    | NG   | G    | G    | G[ <i>ggt</i> ]36G[ <i>ggg</i> ]  | 無         |
| 109          | T         | C    | NG   | C    | C    | Y[ <i>tat</i> ]37H[ <i>cat</i> ]  | 有         |
| 120          | A         | C    | NG   | C    | C    | A[ <i>gca</i> ]40A[ <i>gcc</i> ]  | 無         |
| 180          | C         | T    | NG   | T    | T    | S[ <i>agc</i> ]60S[ <i>agt</i> ]  | 無         |
| 197          | C         | T    | NG   | T    | T    | S[ <i>tca</i> ]66L[ <i>tta</i> ]  | 有         |
| 300          | G         | C    | NG   | C    | C    | A[ <i>gcg</i> ]100A[ <i>gcc</i> ] | 無         |
| 324          | G         | A    | NG   | A    | A    | G[ <i>ggg</i> ]108G[ <i>gga</i> ] | 無         |
| 333          | C         | T    | NG   | T    | T    | H[ <i>cac</i> ]111H[ <i>cat</i> ] | 無         |
| 417          | T         | C    | NG   | C    | C    | N[ <i>aat</i> ]139N[ <i>aac</i> ] | 無         |
| 479          | A         | G    | NG   | G    | G    | E[ <i>gaa</i> ]160G[ <i>gga</i> ] | 有         |
| 598          | G         | A    | NG   | A    | A    | G[ <i>ggc</i> ]200S[ <i>agc</i> ] | 有         |
| 729          | T         | C    | NG   | C    | C    | G[ <i>ggt</i> ]243G[ <i>ggc</i> ] | 無         |
| 751          | C         | T    | NG   | T    | T    | L[ <i>ctg</i> ]251L[ <i>tgt</i> ] | 無         |
| 756          | T         | A    | NG   | A    | A    | G[ <i>ggt</i> ]252G[ <i>gga</i> ] | 無         |
| 798          | T         | A    | NG   | A    | A    | A[ <i>gct</i> ]266A[ <i>gca</i> ] | 無         |
| 813          | C         | T    | NG   | T    | T    | G[ <i>ggc</i> ]271G[ <i>ggt</i> ] | 無         |
| 828          | A         | G    | NG   | G    | G    | A[ <i>gca</i> ]276A[ <i>gcg</i> ] | 無         |
| 837          | C         | G    | NG   | G    | G    | A[ <i>gcc</i> ]279A[ <i>gcg</i> ] | 無         |

③ *Streptococcus zymogens* ④ *Streptococcus durans*

②と③は①の変異、④は *Streptococcus faecium* の変種とみなされている<sup>12)</sup>。

今回の変異菌はこの腸球菌群の鑑別点からみても①の *Streptococcus faecalis* である。しかし下記の知見が示すように *Streptococcus faecalis* がこの種の分類以外の菌種に変異を生ずる可能性がある。

吉岡<sup>3)</sup> は A 群レンサ球菌の段階的変異は存在しうると考え、変異の方向としては A 群から C または D 群に類似の性状を備えるように代謝の営みや細胞壁の構造へ変えるために、菌の環境に対する抵抗性が変わってくるのではないであろうか、しかしどのくらいの単位の遺伝子に変異に関与しているのか不明であるとしている。

以上より変異株 # 56-2、# 59-2、# 18-2 を *Enterococcus* (腸球菌) と同定した。

文 献

- 1) 西村俊夫、沼田紀義：A 群レンサ球菌接種マウスから接種菌の遺伝的変異を示唆する D 群レンサ球菌の分離. 本誌 **133(3)** : 107-117 1996
- 2) 西村俊夫、沼田紀義：A 群レンサ球菌接種マウスから接種菌の遺伝的変異を示唆する D 群レンサ球菌の分離と臨床との関連. 本誌 **146(3)** : 45-50 2003
- 3) 吉岡守正：レンサ球菌の遺伝的変異と臨床との関連についての考察. 東京女子医科大学雑誌 **45 (2)** : 55-69 1975
- 4) Piller F., Hanlon MH et. al: Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands. J Biol Chem. **258(17)**: 10774-10778 1983
- 5) Kingsley DM, Kozarsky KF et. al: Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. Cell **44**: 749-759 1986
- 6) 今堀和友、山川民夫監修：生化学辞典（第 3 版）、東京化学同人（株）、東京、1998、P212
- 7) Paulsen IT, Banerjee L et. al: Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science **299**: 2071-2074 2003
- 8) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- 9) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1199974?ordinalpos=8&itool=EntrezSystem2.PEntrez...>
- 10) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1201632?ordinalpos=12&itool=EntrezSystem2.PEntrez...>
- 11) 小酒井 望：臨床検査技術講座 第 6 集 細菌学 橋本寛敏、緒方富雄監修、金原出版、東京、大阪、京都、1975 PP208-226
- 12) Cowan ST (坂崎利一)：医学細菌同定の手びき (第 2 版) 近代出版、東京、1977 PP70-76

連絡先：西村俊夫  
西村医院 (旧)  
埼玉県所沢市美原町 2-2930-17 (〒 359-0045)

## A Genetic Analysis of Mutants Separated Simultaneously with an Inoculated Organism from the Same Lesion in Mice Inoculated with Group A Streptococcus

Toshio NISHIMURA<sup>1</sup>, Kiyoshi NUMATA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nishimura Clinic (now-defunct),

<sup>2</sup>The department of the Food Sanitation & Hygiene Analysis, Mitsubishi Chemical Medience Corporation (now-defunct)

### Summary

Mutants separated simultaneously with an inoculated organism from the same lesion in mice inoculated with group A streptococcus were genetically analyzed. Mutants of group A streptococcus include uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine-4-epimerase, which is not reported to be among group A reference strains. The base sequence of the genes of this enzyme remains unknown. However, it is demonstrated that 4-epimerase has both substrates of UDP-glucose and UDP-*N*-acetylglucosamine. And it is found that *Enterococcus faecalis* V583 has 2 kinds of UDP-glucose 4-epimerase genes (*galE-1*, *galE-2*). Therefore, we attempted to amplify *galE-1* and *galE-2* genes using the heat treated products (genomic DNA) of the specimens as the template, and analyze them by PCR Primer. Amplification was successful using the mutants, whereas it failed using the reference strains. Therefore, we regarded the sequences of *galE-1* and *galE-2* obtained from NCBI as the reference sequence. The result of sequencing revealed that the mutants had the sequences of *galE-1* and *galE-2*. The types of mutant strains included frame shift, missense mutation, and silent mutation. However, the biological strain producing these mutants was not determined. These mutants were identified as *Enterococcus faecalis* based on the biochemical properties described in Bergey's Manual, serologic test findings, and DNA homologous sequence test, which was previously reported. Thus, in this study, they were identified as *Enterococcus* excluding *Enterococcus faecalis*.

(Med Biol 155: 53-59 2011)

**Key words:** group A Streptococcus, *Enterococcus*, mutation, *Enterococcus faecalis* V583, UDP-glucose 4-epimerase genes (*galE-1*, *galE-2*)

Contact: Toshio Nishimura  
Nishimura Clinic (now-defunct)  
2-2930-17 Mihara-cho, Tokorozawa, Saitama 359-0045 Japan

