(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5214083号
(P5214083)

(45)発行日　平成25年6月19日(2013.6.19)　(24)登録日　平成25年3月8日(2013.3.8)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12R	1/32	(2006.01)	C12Q	1/68	A
			C12R	1:32	

請求項の数 7　(全 27 頁)

(21)出願番号　特願2001-551236(P2001-551236)
(86)(22)出願日　平成13年1月10日(2001.1.10)
(65)公表番号　特表2003-519494(P2003-519494A)
(43)公表日　平成15年6月24日(2003.6.24)
(86)国際出願番号　PCT/SE2001/000031
(87)国際公開番号　WO2001/051662
(87)国際公開日　平成13年7月19日(2001.7.19)
審査請求日　平成19年12月14日(2007.12.14)
(31)優先権主張番号　0000061-2
(32)優先日　平成12年1月10日(2000.1.10)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)

前置審査

(73)特許権者　502248913
ビョルン・ハーマン
スウェーデン国エス－７５６　４７，ウプサラ，スクリンドヴェーゲン　２１
(73)特許権者　502248924
レイフ・キルセボム
スウェーデン国エス－７５５　９１，ウプサラ，ヴェレタ・ステランドヴェーグ　２０
(73)特許権者　502248935
ペレ・ストルテ
スウェーデン国エス－７５５　９１，ウプサラ，ヴェレタ・ステランドヴェーグ　２０，セー／オー・レイフ・キルセボム

最終頁に続く

(54)【発明の名称】病原性生物体の検出法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

マイコバクテリアの種間識別の方法であって、ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子のＰ３超可変領域の分析を含む方法。

【請求項２】

核酸増幅を含み、そして核酸が種同定のために配列決定される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

核酸が、種同定のためにフィンガープリントされる、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

種間識別を含むマイコバクテリアの試料中での検出方法であって、試料中に存在する疑いのあるマイコバクテリアからのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の超可変領域Ｐ３の核酸の増幅；公知の生物からのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の対応する領域の対照の核酸とのヘテロ二重鎖の形成；およびそれらの分析を含む方法。

【請求項５】

マイコバクテリウム　アビウム（ＭＡＩ）複合体の間の識別を含む、請求項１乃至４の何れか１項に記載の方法。

【請求項６】

マイコバクテリウム　ガストリとマイコバクテリウム　カンサシの間の識別を含む、請求項１乃至４の何れか１項に記載の方法。

【請求項７】
マイコバクテリアの感染処置のための医薬製造における薬剤標的としての、ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子中のＰ３可変領域の使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
技術分野
本発明は病原性生物体を検出するための方法に関しており、ここで本方法は種間の識別を含んでいる。本方法は特に、従来の方法で検出するには困難な、および／または労力を必要とする病原性生物体による感染を検出および診断するのに適している。本発明はＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の特異的変異領域の分析に依存している。
背景技術
ＲＮａｓｅ　Ｐはすべての生きている細胞に存在する酵素である。それはｔＲＮＡ前駆体分子から５’リーダー配列の除去を触媒する。細菌において、ＲＮａｓｅ　Ｐは約４００ｎｔの長さのＲＮＡ分子（１１、２８）および小さな（約１２０ａａ）蛋白質から成っている（３３）。細菌門において、ＲＮＡ部分はインビトロにおいて有効な触媒として機能することが示されており（１２）；それ故に、少なくともこれらの生物体において、ＲＮａｓｅ　Ｐはリボザイムである（化学反応を触媒しているＲＮＡ分子）。細菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡは二つの主な構造的部類へ分けられている。Ａ型は最も普通の構造的部類であり、およびＢ型は低Ｇ＋Ｃグラム陽性細菌に見出されている（５０）。ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡの二次構造は多くの細菌系列で特徴付けられており、ヘリックス間の変異は有用な系統発生的情報を提供する（５１）。
【０００２】
ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列は細菌群間で非常によくは保存されていない（５）、しかし、属内では遺伝子はかなり類似することがありうる。数百のＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ配列がＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡデータベースに存在している（ｈｔｔｐ：／／ｊｗｂｒｏｗｎ．ｍｂｉｏ．ｎｃｓｕ．ｅｄｕ／ＲＮａｓｅＰ／ｈｏｍｅ．ｈｔｍｌ）。
【０００３】
クラミディア目は、独特の発育サイクルおよび病原性を持つ偏性細胞内細胞の群である。それらはヒトおよび広範囲の動物の寄生生物である。クラミディア科中の種は最近９つの種を含む、２つの属（クラミディアおよびクラミドフィラ）に再分類された（４３）。加えて、現在、新規の科もまたクラミディア目に属しており、それらはパラクラミディア科およびシムカニア科を含んでいる（４３）。パラクラミディア科の菌型種はパラクラミディア　アカントアメーバ（Ｐａｒａｃｈｌａｍｖｄｉａ　ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａｅ）（アメーバ　アカントアメーバ　カステラニ（Ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａ　ｃａｓｔｅｌｌａｎｉ）の共生生物、およびこのアメーバを獲得した人々にはしばしば病原体）である（３４）。シムカニア　ネゲベンシス（Ｓｉｍｋａｎｉａ　ｎｅｇｅｖｅｎｓｉｓ）もまたヒト感染を起こす（５６、５７、６１）。
【０００４】
クラミディア属中のＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子は種間で十分に異なっており診断道具として有用であることが以前に示されている（１３）；それ故、この遺伝子は株識別に有用である可能性がある。配列間の識別はまた、分子のどの部分が触媒活性に重要であるかのヒントを与え、突然変異および構造研究を補足している。
【０００５】
迅速でおよび感度のよい診断法が重要である別の重要な病原体の科はマイコバクテリアである。伝統的診断法は、培養に続いて、臨床試料中の抗酸菌を示すことに依存している。この方法では信頼はおけるが、マイコバクテリウム　ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）のような増殖が遅い種では十分に大きな集団を形成するのに６から８週間を必要とするので時間がかかりすぎる。ここ数年、多くのＰＣＲに基づいた検出アッセイが、ｈｓｐ６０遺伝子のｅｇ（１６）、または１６Ｓおよび２３Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子間の可変散在性領域（１５、２４、３０）に基づいて開発され

ており、この傾向は続いている。M．ツベルクローシスからのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列（６）、ならびにM．ボビス（ｂｏｖｉｓ）　ＢＣＧおよびM．レプレ（ｌｅｐｒａｅ）からのものは既知である。M．ボビス配列はM．ツベルクローシスからのものと同一であるが、一方、M．レプレとは相違している。触媒活性に重要であると他の手段により同定されているＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ中の領域は、マイコバクテリア間でほとんど全部が保存されていた。マイクロバクテリアのような微生物属内の密接な関係は、同一属の種間の識別を非常に困難にまたは不可能にしている。

発明の要約

本発明は、マイコバクテリアおよびクラミディアのような、同一属内種間識別の問題を解決している。さらに、本発明は通常の方法で検出するのが困難なおよび／または労力を必要とする病原体を検出する問題を解決している。

【０００６】

本発明の方法は基本的に、任意の種類の病原性生物体による感染を診断するために使用される。従って、病原体には古細菌および真性細菌が含まれる。後者には、その基本群として滑走細菌、スピロヘータ、剛性細菌およびマイコプラズマが含まれている。剛性細菌には放線菌類および単純単細胞細菌が含まれる。後者の群は偏性細胞内寄生生物および自由生活細菌から成っている。自由生活変異菌の中には（１）グラム陽性菌（この中には（ａ）球菌、（ｂ）非胞子形成杆菌、（ｃ）胞子形成杆菌、これはさらに偏性好気性菌および偏性嫌気性菌に副分割できる、が存在する）；および（２）グラム陰性菌（この中には（ａ）球菌、（ｂ）らせん形の非腸内杆菌および直杆菌、および（ｃ）通性嫌気性菌、偏性好気性菌および偏性嫌気性菌を含む腸内杆菌が存在する）が存在する。特異的細菌種はさらにＭｅｄｉｃａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ（Ｂｒｏｏｋｓら編，第１９版（１９９１），Ｐｒｅｎｔｉｃｅ－Ｈａｌｌ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，ＵＳＡ）を参照されたい。

【０００７】

病原体にはまた、病原性酵母および糸状菌を含んでいる真菌もまた含まれる。その例はコウジカビ、カンジダ、アブシジア、ケカビ、クモノスカビ、クリプトコッカス、ヒソプラズマ、ブラストミセス、コクシジオイデス、パラコクシジオイデス、スポロトリコーシス、色素酵母菌、菌種、小胞子菌、白癬菌および表皮菌である。診断される他の病原体は原虫類および藻類に見いだされる。

【０００８】

もちろん、本発明の方法は非病原性細菌の検出にも使用できる。以下の細菌は本発明の目的に特に興味が持たれる：ＩＩ門の細菌－緑色細菌；ＩＩＩ門－デイノバクテリア（テルムス／デイノコッカス）；ＩＶ門－スピロヘータ；ＶＩ門－グラム陰性嫌気性菌および滑走細菌（バクテロイド／フラボバクテリウム）；ＶＩＩＩ門－クラミディア；ＩＸ門－グラム陽性菌と３つの系列：系列Ａ（“グラム陰性”）、系列Ｂ（Ｇ＋Ｃ－リッチ細菌）、系列Ｃ（Ｇ＋Ｃ－プア細菌）；Ｘ門－シアノバクテリア；ＸＩ門－プロテオバクテリアと５つの系列アルファ、ベータ、ガンマ、デルタおよび“Ｅ”。

【０００９】

本発明者は種決定を可能にするために十分なＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ中の相違を検出した。

第一の様相において、本発明は種間識別を含んだ、病原性生物体を検出するための方法に関しており、診断標的としてＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子のＰ３および／またはＰ１９超可変領域を使用することを含んでいる。

【００１０】

本発明の方法の目的は、例えば、病原性細菌により起こされる感染の診断および薬剤耐性細菌の拡がりの疫学的調査である。

好適には、該領域はＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）によるように増幅され、および配列決定されるか、または、さもなければ、ヘテロ二重鎖分析、サイズ決定、ＲＦＬＰ（制限断片長多形）、融点決定などによるようにフィンガープリントされる。

【００１１】
第二の様相において、本発明は種間識別を含んだ、細菌を検出するための方法に関しており、病原体からのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の、超可変領域核酸の増幅；関連核酸とのヘテロニ重鎖の形成；およびそれらの分析を含んでいる。
【００１２】
ヘテロ二重鎖分析を含んでいる本発明に従った方法の例は、増幅反応、ハイブリダイゼーション工程および未変性ゲル電気泳動分析から成っている。全過程は２４時間未満で実施できる。
【００１３】
第三の様相において、本発明は微生物感染のための医薬製造における薬剤標的として、ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子中のＰ３および／またはＰ１９超可変領域を使用することに関している。
発明の詳細な説明
本発明はここで２つの非制限的実施例に関してより詳細に説明されるであろう。
実施例１：マイコバクテリア
材料および方法
細菌株．　本研究で使用された微生物が下記表１に掲げられている。臨床的株は各々の供給源地の研究所での１６Ｓ　ＲＮＡ遺伝子配列決定によりすでに型分けされている。Ｍ．ツベルクローシス、Ｍ．ボビス　ＢＣＧおよびＭ．レプレのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ配列はＧｅｎＢａｎｋ配列データベースから検索された。
【００１４】

【表１】

種	株の説明	出所
M.ガストリ	ATCC 15754	ATCC
M.カンサシ	ATCC 12748	ATCC
M.イントラセルラレ	D673	Trudeau Mycobacterial Collection
M.ゼノピ	ATCC 19276	ATCC
M.スメグマチス	mc^2 155	Ref. 26
M.アビウム	D702	Trudeau Mycobacterial Collection
M.マリヌム	臨床株	Research Centre Borstel
M.フォルツイツム	臨床株	Research Centre Borstel
M.マルモエンス	臨床株	Research Centre Borstel
M.パラツベルクローシス	6783	G-F Gerlach School of Veterinary Medicine, Hanover Germany
M.ゴルドニエ	臨床株	Research Centre Borstel
M.セラツム	臨床株	Research Centre Borstel

【００１５】

ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子のＰＣＲ増幅．　Ｍ．ツベルクローシスおよびＭ．レプレの公表された配列（各々ＧｅｎＢａｎｋ受け入れ番号Ｚ７０６９２およびＬ７８８１８）に基づき、遺伝子の末端近傍にハイブリダイズするプライマー対が設計された。フォワードプライマーｔｂｆ（５’　ＣＧＧＡＴＧＡＧＴＴＧＧＣＴＧＧＧＣＧＧ　３’）およびリバースプライマーｔｂｒ（５’　ＧＴＴＧＧＣＣＴＧＴＡＡＧＣＣＧＧＡＴＴ　３’）の両方ともＭ．レプレ配列に対して１つの誤対合を示している。このプライマー対を使用し、ＲＮａｓｅ　Ｐ遺伝子が試験されたすべてのマイコバクテリアから増幅できた。ほとんどの反応は、染色体ＤＮＡを前もって単離および精製することなく、培養からの未処理マイコバクテリアに対して実施された。ＰＣＲはＲａｐｉｄｃｙｃｌｅｒキャピラリーＰＣＲ装置（Ｉｄａｈｏ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，　Ｉｄａｈｏ　Ｆａｌｌｓ　ＵＳＡ）を使用し、５０μｌの反応液中で、以下のパラメーターで実施された：９４℃　１０"；５０℃　１０"；７２℃　１５"。

配列決定．　ＰＣＲ生成物はプライマーを除去するため、１パーセントアガローズゲルで精製された。精製ＤＮＡの約１／２０が、増幅反応で使用されたものと同じプライマーを用い、自動化配列決定に使用された。配列決定はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓモデル３１０キャピラリーシークエンサーで実施された。

ヘテロ二重鎖分析．　ＲＮａｓｅ　Ｐ　Ｐ３ループ領域のヘテロ二重鎖分析のため、約２５０ｂｐの生成物を与えるオリゴヌクレオチドｔｂｆおよび（５’ＣＴＴＧＣＴＴＧＣＣＣＴＣＣＣＴＴＴＧＣＣ　３’）でＤＮＡが増幅された（５０μｌ反応液）。生成物はゲル精製され、生成物の約１／１０が各々の分析に使用された。ＤＮＡは等量のＭ．ツベルクローシスからのＤＮＡと混合し、９５℃で１’加熱し、室温まで放置して冷却した。生成物は１５ｍＡで１４時間の１０パーセント未変性ポリアクリルアミドゲルで分離された。バンドは銀染色で可視化された。

ＤＮＡゲルの銀染色．　ゲルは１０パーセントエタノール中で５”固定し、１パーセント硝酸中で５”インキュベートした。染色は硝酸銀の１ｍｇ／ｍｌ溶液中で３０”であった。バンドは炭酸ナトリウム／ホルムアルデヒド溶液（１５ｇの無水炭酸ナトリウムおよび３００μｌの３７パーセントホルムアミドを５００ｍｌの水に）中、明瞭に見えるようになるまで発色させた。反応は１０パーセント酢酸で停止した。

結果

実施例１の結果は付随する図、図１－５と連携して以下に示されている。

【００１６】

オリゴヌクレオチドｔｂｆおよびｔｂｒを使用するマイコバクテリアからのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子のＰＣＲ増幅において、各々の反応でマイコバクテリア種に依存して３８７（Ｍ．セラツム（ｃｅｌａｔｕｍ））から４２８（Ｍ．ツベルクローシス）ｂｐの範囲の単一断片が得られた。

【００１７】

これらのオリゴヌクレオチドを使用し、培養物またはプレートからの未処理細胞を使用し、試験されたすべてのマイコバクテリアからＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子を増幅することが可能であった。前もっての染色体ＤＮＡ精製は必要ではなかった。

【００１８】

配列のアラインメント（図１）は、ほとんどの遺伝子に沿って非常によく保存されたヌクレオチド配列を示したが、３つの主要な領域は除かれ、そこでは類似性が壊れおよび適切なアラインメントが不可能であった。遺伝子全体の類似性は８０から８５パーセントの間であった。しかしながら、これは非常に情報を与える図ではない、よく保存されている領域内の類似性は１００パーセントに近いのに、一方、分岐進化領域は整列させるにはあまりにも似ていない。

【００１９】

分岐進化領域がＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ分子の二次元表現上に局在しているとすれば（図２）、ほとんどの相違がどのように、ステムーループ構造の末端に属している領域内に置かれているのかをはっきり見ることができる。主な分岐進化領域はＰ３、Ｐ１６およびＰ１９ループである。加えて、Ｍ．スメグマチス（ｓｍｅｇｍａｔｉｓ）およびＭ．フォルツイツム（ｆｏｒｔｕｉｔｕｍ）中のＰ１２ループには、このループのいくつかの不対ヌクレオチドから成る欠失が存在する。主な種問相違はＰ３およびＰ１９ループ内に存在している。

【００２０】

分析されたすべての種は特異的ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子を持っていた。いくつかの密接に関連した種がＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ配列に基づいて識別できた。ＭＡＩ複合体Ｍ．アビウム（ａｖｉｕｍ）およびＭ．イントラセルラレ（ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ）のメンバーは、Ｍ．アビウムのＰ１９ループ中の欠失を含んでいくつかの位置が異なっている（図２）。Ｍ．パラツベルクローシス（ｐａｒａｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）およびＭ．アビウムはＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列に基づいては区別できなかった。

【００２１】

我々の分析が行われた限り、種内では、配列は同一である。Ｍ．ツベルクローシス複合体（Ｍ．ツベルクローシス、Ｍ．ボビス、Ｍ．ボビス　ＢＣＧ、Ｍ．アフリカヌム（ａｆｒｉｃａｎｕｍ）、Ｍ．ミクロチ（ｍｉｃｒｏｔｉ）およびＭ．ツベルクローシス亜種ア

ジアチクム）のすべてのメンバーからの臨床試料を配列決定したが、公表されているM．ツベルクローシス配列（６）からの変異は検出されなかった。従って、この群のメンバーはＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子相違に基づいて識別できなかった。

【００２２】

いくつかの種において、マイコバクテリアの異なった血液型亜型間の配列相違の可能性が調べられた。M．アビウムおよびM．イントラセルラレの場合、５つのM．アビウム（動物）および５つのM．イントラセルラレ（ヒト）の臨床単離物からのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子が増幅され、および配列決定された。血液型亜型間の相違は検出できなかった。

【００２３】

異なった血液型亜型間で異種性のＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列が観察された１つの種はM．カンサシであった（図３）。相違は主としてＣ－Ｔ変換であった。M．ガストリ（ｇａｓｔｒｉ）の２つの株が同様に配列決定されたが、この種では単離物間の遺伝子配列は同一であった。４つの位置で、M．カンサシ株からのすべてのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列はM．ガストリからの配列と異なっていた。これらの相違の内の３つはＣ－Ｔ変換であり、４つ目はＣ－Ａ変換であった。

【００２４】

Ｐ３およびＰ１９ループで観察された種間相違は、ヘテロ二重鎖分析による簡単な診断応用の試みのためには十分大きいと考えられた。超可変Ｐ３領域をこの分析のために選択し、ｔｂｆおよび２８０ｒオリゴヌクレオチドを使用して増幅した。各々のＰＣＲ反応で約２５０ｂｐの単一バンドが得られた。M．ツベルクローシスからの領域を標品として使用し、異なった種からの生成物と等量で混合した。未変性ポリアクリルアミドゲルで断片を分子した後、バンドを染色した。試験されたすべての種間でヘテロ二重鎖に明瞭な相違が存在した（図４Ａ）。

【００２５】

この分析は、以前に型分けされている、またはいない臨床試料（スウェーデン感染性疾患制御研究所から）にさらに応用された。得られたゲル（図４Ｂ）上、レーン２、３および６の試料はM．アビウムによるものであり（レーン８と比較して）、一方、試料４、５および７はM．イントラセルラレであると思われる（レーン９と比較して）。各々の場合において、ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の配列決定し、ヘテロ二重鎖分析から得られた結果を確認した。

議論

クラミディアの場合と比較し、マイコバクテリアからのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子は、８０－８６パーセントの全体での類似性を持ち、種間でよりよく保存されている。しかしながら、この全体の値は誤解させるものであり、ほとんどの相違は特異的領域に集まっており、そこでの変異性はあいまいなアラインメントも不可能にする程度である。すべてのマイコバクテリアＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡは、クラミディアおよびシアノバクテリア型のＰ１５－Ｐ１７領域（１３、３１）を示し、それは驚くべきことには生物体の密接な同族性を与えない。

【００２６】

研究されたすべての種はそれら自身の目立った配列特性を持っていた。種内では、他の背景に基づいて異質性であると記載されている株であるM．カンサシ（１４、３２）を除いて相違は観察されなかった。数個の変異位置がM．カンサシおよびM．ガストリ間で共有されていたが、微量配列決定またはヘテロ二重鎖分析で、密接に関連するM．ガストリとの識別を可能にする遺伝子中の十分な－M．カンサシ特異的塩基が存在した。M．カンサシは非ツベルクローシスマイコバクテリアにより生じる肺疾患の重要な原因である。

【００２７】

ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列中の非常によく保存された領域および超可変部位の組み合わせは、未知のマイコバクテリア試料の迅速な型分けを可能にする。オリゴヌクレオチドは完全にまたはほとんど完全に整合した保存領域へハイブリダイズするであろうの

で、その間の可変部に対する信頼可能な増幅を可能にする。

【００２８】

Ｍ．アビウムおよびＭ．イントラセルラレを含むＭ．アビウム　複合体（ＭＡＩ）はＡＩＤＳ患者における主な日和見感染である（２１、２２）。この複合体のメンバー間の識別は分子的方法およびＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子からのＰＣＲ生成物の我々のヘテロ二重鎖分析を必要とし、現在の方法に対して迅速でおよびかなり安価な代替法を提供する（７、８，１０、１８、１９、２３、２７、２９）。

【００２９】

種間のＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子中の配列変異はまた、ＲＮＡの分子構造についての手掛かり得ることもできる。マイコバクテリアの場合（図２）、配列中のほとんどすべての変異は非対合領域、またはインビトロでの触媒活性に重要と思われる構造中に存在している。

【００３０】

例えば、Ｍ．スメグマチスおよびＭ．フォルツイツムの２つの種において、Ｐ１２ループ末端に相当する塩基１６０－１６４（図２）はＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列に存在していない。マイコプラズマ　フェルメンタンス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）のような、いくつかの他の生物体からの遺伝子ではＰ１２ループは失われているので（４、２５）、リボザイム活性には必要とされないようである。

【００３１】

アラインメントはまた、他の実験から導かれたＲＮａｓｅ　Ｐ構造についての結論を支持している。モチーフ７５－８５およびｎｔ４０９－４１７の対形成（図２）のような示唆された重要な領域は、すべての分析されたマイコバクテリア種を通して保存されている。たぶん、これら２つの領域の塩基対は、整合している配列であり、生物体間でよく保存されている。マイコバクテリア種間のほとんどの可変領域は各々Ｐ３およびＰ１９ループであった。Ｐ１９構造はインビトロでのＲＮａｓｅ　Ｐ活性には必要ではなく（２５）、および生物体間のＰ３ループにもかなりの変異性が存在するが、インビボでの役割は不明である。

【００３２】

Ｍ．ツベルクローシスＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡの示唆された構造は種間の配列変異の助けを借りて今でも改良できる。重要であると信じられている構造はＰ１８ステム－ループ（領域ｎｔ３３０－３５１）であり、それは大腸菌およびクラミディアＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡでよく保存されたステムを持っている。示唆されたマイコバクテリア構造はあまり納得のゆかないステム構造を持っている（図２参照、これは古い構造予測に基づいている）。しかしながら、Ｍ．スメグマチスおよびＭ．マリヌムにおいて、共通配列からの変異が存在している（図１）。わずかに異なったステム－ループ構造は、これらの構造が一方で共通二次構造を天然のまま維持しながら、同時により納得がいく塩基対形成パターン（図５）を可能にすることに便宜をはかっているのであろう。このことはまた、ＲＮａｓｅ　Ｐ機能におけるこのステムーループの重要性の議論を強化している。

実施例２：クラミディア

材料および方法

細菌株．　分析された生物体のＤＮＡは、細胞培養増殖生物体の標準プロテイナーゼＫ処理により放出され、およびフェノール抽出され、精製ＤＮＡ調製試料として提供された。

【００３３】

【表２】

表2：株，起源の宿主，文献，源及び加盟番号

上付きの「T」は種のタイプを示す

株	起源の宿主	文献	源*	加盟番号
クラミドフィラ シッタシ				
6BC^T (VR-125^T)†	オウム	Golub & Wagner (1947)	Storey	AJ012169
GD	カモ	Illner (1960)	NADC	
NJ1	シチメンチョウ	Page (1959)	NADC	
WC	ウシ	Page (1967)	NADC	
VS225	オウム		NADC	
360	カモ		Storey	
N352	カモ	Richmond *et al.* (1982)	Storey	
Cal10	ヒト	Francis & Magill (1938)	Storey	
CP3 (VR-574)	ハト	Page & Bankowski (1960)	NADC	
M56 (VR-630)	マスクラット	Spalatin *et al.* (1966)	NADC	
クラミドフィラ アボルツス				
B577^T (VR-656^T)	ヒツジ，発育停止	Perez-Martinez & Storz (1985)	Denamur	AJ131092
EBA	ウシ，発育停止	Perez-Martinez & Storz (1985)	NADC	
OSP	ヒツジ	Andersen & Van Deusen (1988)	NADC	
EAE/Lx	ヒツジ，発育停止		Storey	
AB7	ヒツジ，発育停止	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
OC1	ヒツジ，結膜炎	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
AV1	ウシ，結膜炎	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
AC1	ヤギ，結膜炎	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
iC1	ヒツジ	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
クラミドフィラ フェリス				
FP Baker^T	ネコ	Baker (1942)	NADC	AJ012171
Cello	ネコ	Cello (1967)	Storey	
Pring	ネコ	Wills *et al.* (1984)	Storey	
クラミドフィラ カビエ				
GPIC^T (VR-813^T)	モルモット	Murray (1964)	Storey	AJ012172
クラミドフィラ ペコルム				
E58^T (VR-628^T)	ウシ	McNutt & Waller (1940)	NADC	AJ012173
iB1	ヒツジ	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	AJ131091
iC4	ヒツジ	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
AB10	ヒツジ，発育停止	Rodolakis *et al.* (1989)	Rodolakis	
IPA (VR-629)	ヒツジ	Page & Cutlip (1968)	NADC	AJ131090
H3	コアラ		Storey	AJ131089
クラミドフィラ ニューモニエ‡				
TW183^T (VR-2282^T)	ヒト	Grayston *et al.* (1989)	ATCC	AJ012174
CM1 (VR-1360)	ヒト	Black *et al.* (1992)	Black	
CWL011	ヒト	Black *et al.* (1992)	Black	
CWL029 (VR-1310)	ヒト	Black *et al.* (1992)	Black	
CWL050	ヒト	Black *et al.* (1992)	Black	
FML16	ヒト	Black *et al.* (1992)	Berdal	
P1	ヒト	Herrmann *et al.* (1996)	UHU	
JG915	ヒト	Herrmann *et al.* (1996)	UHU	
JG954	ヒト	Herrmann *et al.* (1996)	UHU	
TWAR 2023 (VR-1356)	ヒト	Chirgwin *et al.* (1989)	ATCC	
クラミドフィラ トラコマチス				
A/Har-13^T (VR-571B^T)§	ヒト	Wang & Grayston (1962)	Persson	AJ131088
L1/440/LN (VR-901B)§	ヒト	Schachter & Meyer (1969)	Persson	AJ012175
クラミドフィラ スイス				
S45^T (VR-1474^T)	イノシシ	Kaltenboeck *et al.* (1993)	NADC	AJ012176
R22	イノシシ	Rogers *et al.* (1993)	NADC	
クラミドフィラ ムリダルム				
MoPn^T (VR-123^T)	マウス	Nigg (1942)	NADC	AJ012177
SFPD	ハムスター	Stills *et al.* (1991)	NADC	
シムカニア ネゲベンシス				
Z^T (VR-1471^T)	細胞培養	Kahane *et al.* (1995)	Kahane	AJ012178
パラクラミジア アカントアメーバ				
Bn$_9^T$	アメーバ／ヒト	Amann *et al.* (1997)	Michel	AJ012179
Berg$_{11}$	アメーバ／ヒト	Amann *et al.* (1997)	Michel	

【００３４】

ＰＣＲ増幅およびＤＮＡ配列決定．　クラミディア科の種におけるｒｎｐＢ遺伝子は、Ｃ．トラコマチス配列（１３）に基づいて設計されたプライマー対ＢＨ１－ＢＨ２を用いるＰＣＲにより増幅された（表３）。

【００３５】

【表３】

表３．*mpB*遺伝子の増幅に使用したプライマー

プライマー	配列	クラミジア トラコマチスの *mpB* のヌクレオチド位置（図６参照）：
BH1	5'-CGGACTTTATAAGAAAAGAT-3'（上部）	64から83
BH2	5'-(A/G)TAAGCCGGGTTCTGT-3'（下部）	392から377
BM1	5'-(A/G)(A/G)(C/A)G(A/G)(A/G)GAGGAAAGTCC-3'（上部）	48から64
JB1	5'-CGAACTAATCGGAAGAGTAAGGC-3'（上部）	−8から15
JB2	5'-GAGCGAGTAAGCCGG(A/G)TTCTGT-3'（下部）	398から377

【００３６】

反応混合物は０．２μＭの各々のプライマー、２００μＭ　ｄＮＴＰ、１．５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、５０ｍＭ　ＫＣｌ、１５％グリセロールおよび２Ｕ　Ｔａｑポリメラーゼを含んでいた。増幅条件は、９４℃で４５秒、４２℃で４５秒、７２℃で１分を７サイクル、続いてアニーリング温度が５８℃に上げられた３５サイクルから成っていた。特に記載しない限り、本文中に述べられたすべてのＰＣＲ－生成物は、完全長遺伝子の８２％を増幅するプライマー対ＢＨ１－ＢＨ２を使用することを指している。９つのクラミディア科種の型株からの５’－隣接領域を発生させるため、Ｃ．トラコマチスの完全ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子配列から得られたプライマー対ＪＢ１－ＪＢ２（親切にもＪ．Ｂｒｏｗｎ博士から提供された）を使用した。増幅条件はＢＨ１－ＢＨ２で記載したような条件であったが、ただし、グリセロールは除かれ、アニーリング温度は各々５３℃および５８℃であった。Ｓ．ネゲベンシスおよびＰ．アカントアメーバの増幅のためには、ＢＨ１プライマーは、前に説明したように（１３）高度に保存されたヌクレオチドを含むが、ｒｎｐＢの５’末端の配列決定を許可しないＢＭ１に置き換えられた。生じたＰＣＲ生成物はターミネーター標識サイクル配列決定化学を使用することにより配列決定され、配列反応は３１０　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）で分析された。配列はＥＭＢＬに寄託され、表２に掲げたすべての受け入れ番号は本研究からのものである。

配列アラインメントおよび系統発生的分析．　配列アラインメントは各々のＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ分子の二次元構造モデル化を必要とし、それは比較配列分析を使用することにより人力で実施された。予想された構造は続いてループおよびステム領域同定の助けとしてアラインメント法で使用された。アラインメントは分子系統発生を研究するために使用された。計算された距離マトリックスはＪｕｋｅｓ　＆　Ｃａｎｔｏｒ（１９６９）（５５）の一パラメーターモデルにより、一つの位置での多塩基変化で補正された。このマトリックスは続いて、近隣結合プログラム（７７）を使用することにより進化系統樹を計算するために使用され、Ｐｈｙｌｏｇｅｎｅｔｉｃ　Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ　Ｐａｃｋａｇｅ、ＰＨＹＬＩＰバージョン３．５１ｃ中の名前ＮＥＩＧＨＢＯＲで実施された（４４）。最節約樹はＤＮＡＰＡＲＳプログラムを使用して推論された。データ組を１０００回再サンプリングすることにより、近隣結合および最節約に基づき樹をブーストラップするため、ＳＥＱＢＯＯＴプログラムが使用された。最見込み樹の構築は、経験的塩基頻度、全体再配置およびジャングルオプションを応用した分子進化のＦ８４モデルを使用するＤＮＡＭＬプログラムで実施された。

ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡおよび基質の調製．　ｒｎｐＢ触媒活性を試験するため、完全長Ｃ．トラコマチス　ｒｎｐＢがＰＣＲ増幅され、Ｔ７プロモーターの後にクローン化され、ｔＲＮＡ前駆体切断がアッセイされた。我々は５’末端に整合するＰＣＲプライマーを設計した（５’ＴＴＧＡＡＴＴＣＧＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＣＧＡＡＣＴＡＡＴＣＧＧＡＡＧＡＧＴＡ）。下線を付けた残基はＣ．トラコマチス　ｒｎｐＢと一致しており、一方、プライマーの残りの部分はＴ７プロモーターへ対応している。

我々は３’末端に相補的なプライマーを設計した（５’ＴＴＴＡＡＧＣＴＴＧＧＡＴＧＧＴＡＣＣＴＴＧＧＡＡＡＡＧＣＴＣＧＧＡＡＧＡＧＣＧＡＧＴＡＡ）。下線を付けた残基はＣ．トラコマチス　ｒｎｐＢと相補的であり、印がついていない残基は、生じたプラスミドをＦｏｋＩで切断できるように取り込まれた。ＰＣＲ増幅Ｃ．トラコマチス　ｒｎｐＢはＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで切断され、同じ酵素で切断されているｐＵＣ１９内へ挿入された。組換えプラスミドで標準プロトコールに従って大腸菌株ＤＨ５ａを形質転換した。

【００３７】

大腸菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ、Ｃ．トラコマチス　ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡおよび前駆体ｔＲＮＡ^{Tyr}Ｓｕ３は別の所で説明されているように（５９およびその参考文献）、Ｔ７　ＤＮＡ依存性ＲＮＡを使用して発生させた。

ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡアッセイ．　ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ活性は以前に記載されているように（５９およびその参考文献）、我々の標準反応緩衝液（５０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ６０００、１００ｍＭ　NH_4Cl（または指示されている場合、１Ｍ　NH_4Cl）および１００ｍＭ　$MgCl_2$）中、３７℃でモニターされ、Ｃ．トラコマチス　ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡの最終濃度は　２．４ピコモル・ｍＬ$^{-1}$であり、前駆体ｔＲＮＡ^{Tyr}Ｓｕ３は　０．０５２ピコモル・ｍＬ$^{-1}$であった。

ヌクレオチド配列受け入れ番号．　試験された種の代表的ヌクレオチド配列はＥＭＢＬに寄託された。受け入れ番号は表２に掲げられている。

結果

実施例２の結果は付随する図、図６－８と連携して以下に議論されるであろう。

ｒｎｐＢ配列の比較

完全ｒｎｐＢ遺伝子の８２％を含むＰＣＲ生成物が６０のクラミディア株から得られた。Ｐ．アカントアメーバ株Bn_9^Tおよび$Berg_{17}$からの生成物は３１３塩基長であり、それらの配列は同一であった。Ｓ．ネゲベンシスのZ^T株からの２９９－ｂｐ生成物の配列はＰ．アカントアメーバ配列と６８．９％同じであった。クラミディア科ＰＣＲ生成物は　Ｐ．アカントアメーバおよびＳ．ネゲベンシスから入手可能なセグメントと６３．８％から６９．３％の間の類似性であった。クラミディア科の２つの属である、クラミディアおよびクラミドフィラからのｒｎｐＢ配列は７５．９％－８３．３％類似していた。クラミディアに属する１８株は＞８９．９％類似しており；クラミドフィラに属する３８株は＞８４．８％類似していた。１４のＣ．トラコマチス配列ではトラコーマ次亜種と比較してＬＧＶ次亜種では単一塩基が置換されていることのみ異なっていた。２つのクラミディア　スイス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｓｕｉｓ）株は２つのヌクレオチド位置のみが異なっていた。６つのクラミディア　ペコルム（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｐｅｃｏｒｕｍ）株は同一であるかまたは１または２塩基が異なっていた。１０のクラミディア　シッタシ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｐｓｉｔｔａｃｉ）株（株Ｍ５６を除いて、下記参照）、１０のクラミディア　ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）　ＴＷＡＲ次亜種配列、９つのクラミディア　アボルツス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ａｂｏｒｔｕｓ）配列、３つのクラミディア　フェリス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｆｅｌｉｓ）配列および２つのクラミディア　ムリダルム（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｍｕｒｉｄａｒｕｍ）配列については種内で配列は同一であった。

【００３８】

９つのクラミディア科種のすべてを含んでいる１４株の副組から、プライマーＪＢ１およびＪＢ２を使用するＰＣＲにより、ほとんど完全長の遺伝子セグメント（ｒｎｐＢ遺伝子の９８％）が発生された。これらの配列の比較は、それらは可変Ｐ３領域を含んでいるので、種間類似性を２．６％ほど減少させた。ｒｎｐＢにおける多様性は、クラミディア科の種組分けを明瞭に区別するために十分大きかった。ｏｍｐＡ遺伝子（５０％まで異なる）およびリボソームＲＮＡ遺伝子（＜１０％相違している）と異なり、この多様性は属－および組－特異的ＰＣＲプローブを設計することを容易に可能にするであろう。

【００３９】

種Ｃ．ムリダルムの株ＭｏＰｎＴ（マウス）およびＳＦＰＤ（ハムスター）はＭＯＭＰ遺伝子配列が異なっていることが示されている（８５）。対照的に、２つのＣ．ムリダルム株中のｒｎｐＢ遺伝子は、リボソーム１６Ｓ／２３Ｓ遺伝子間スペーサーおよび２３Ｓドメイン１セグメントでも観察されるように、同一であった（４２）。表面発現蛋白質に対する進化的圧力は、翻訳過程に関与する遺伝子に対するよりも明らかに大きかった。

【００４０】

最近までＣ．シッタシとして分類されていた２２の株は、Ｃ．シッタシ、Ｃ．アボルツス、Ｃ．フェリスおよびＣ．カビエ（ｃａｖｉａｅ）へ現在分離されている。我々の研究はこれらの株を、６．７％までのｒｎｐＢ遺伝子配列相違により４つの種の組へ分類した（データは示されていない）。これらの種は遠位起源の宿主群から単離されており、それらは広いスペクトルの疾患を起こす（表２）。Ｃ．シッタシ株Ｍ５６のみがＣ．シッタシとしてのその分類に矛盾し、この株のＰＣＲは、本研究で分析されたネコ配列と一致したｒｎｐＢ配列を生成した。Ｍ５６の歴史はこのことがなぜ起こるかについてのいくつかの考察を提供する。Ｍ５６は１９６１年にカナダのマスクラットから単離され（７９）、Ａｍｅｓ，Ｉｏｗａ，ＵＳＡのＵＳＤＡ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｅｎｔｅｒで保存され、ＡＴＣＣへ配送された。細胞培養において、Ｍ５６のＡＴＣＣ調製試料は１つの細胞株でのＭ５６血清型として、および別にネコ血清型として増殖された（Ａｎｄｅｒｓｅｎ，未発表）。Ｆｕｋｕｓｈｉ ＆ Ｈｉｒａｉ（１９８９）（４６）はＡＴＣＣから得られたＭ５６に対してネコ血清型を報告した。胎児を有する卵の卵黄嚢中で、８／１／９０にＮＡＤＣで培養されたＭ５６のＰＣＲはＣ．シッタシ－トリ－様リボソームおよび完全長主膜外蛋白質遺伝子配列を与えたと報告している（４２）。現在の研究に使用されたＭ５６ ＤＮＡは１９９７年の研究からの一部であった。この歴史を鑑みると、我々のｒｎｐＢ分析は、Ｍ５６培養物が１９６０年代の間にネコクラミディア科で汚染されたことを示唆しており、汚染されていない単離物はもはや入手不可能である。

ＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡの二次構造

９つのクラミディア科種から誘導されたｒｎｐＢ遺伝子配列のアラインメントは、示唆された二次構造中に、Ｐ３、Ｐ１２、Ｐ１７およびＰ１９と表示された、独特なステムループに位置している超可変領域を示した（図７）。

【００４１】

Ｐ１５ループ（図７参照）は、ほとんどの細菌ＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡ分子がｔＲＮＡの３’－終端ＲＣＣＡモチーフとの塩基対形成によりｔＲＮＡと相互作用するＧＧＵ－モチーフを繋ぎ止めているので（６０）、興味が持たれる。クラミディア科のすべてのメンバーにおけるこの配列モチーフの不在は目立っており、Ｃ．ニューモニエ（ＧＡＡＡ）およびＣ．フェリス（ＡＣＡＡ）を除いた９つすべてのクラミディア科種でＡＴＡＡ－バルジが観察される（Ｃ．シッタシにおける２９１から２９４位、図７）。さらに、クラミディア科種のＰ１５領域中の異なった構造は、どの同定されたｔＲＮＡ遺伝子も３’－終端ＣＣＡ配列をコード化していない（８０）という発見により合理的に説明される。

【００４２】

興味あることに、Ｐ．アカントアメーバのＰ１５領域はＧＧＵ－モチーフを運んでいるプリンに富んだバルジを繋ぎ止めている。このことは、ＣＣＡ配列がこの種のｔＲＮＡ遺伝子中にコード化されていると仮定すれば、これらのＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡは大腸菌ＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡが行うように３’終端ＲＣＣＡ配列と相互作用することを示していると言ってもさしつかえない。対照してみると、Ｓ．ネゲベンシスから誘導されたＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡのＰ１５ループ構造は、ほとんどのシアノバクテリアで観察された構造（８７）と類似しており、テルムス テルモフィルス（Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）に由来するＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡが行うように（５３）、Ｐ１５ループ中にＧＧＡＵ－モチーフを運んでいる。Ｔ．テルモフィルス中のＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡのこのループはｔＲＮＡ前駆体の３’末端に対する高親和性結合部位を運んでおり、それ故、それはＳ．ネゲベンシスにもあてはまるであろう。

【００４３】
クラミディア科種のＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡはＰ１８ヘリックスを持っているが、一方、Ｐ．アカントアメーバおよびＳ．ネゲベンシスはこの要素が欠けているようである。Ｐ１８ヘリックスは触媒活性を失うことなく欠失できることが以前に示されており、それは直接触媒作用には関係しないことを示唆している（４９）。存在する場合、Ｐ１８ヘリックスは、Ｐ８中の示唆されたレセプター（Ｃ．シッタシにおけるＧ８３Ｃ９３塩基対；図２；３８、６８）内にドッキングする系統発生的に保存されているＧＮＲＡテトラループに関係している。さらに、Ｐ１８ヘリックスを欠く細菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡは伸張されたＰ８ヘリックスを持っており、このことがｐ１８の喪失を補償していると示唆されている（３８）。Ｐ．アカントアメーバおよびＳ．ネゲベンシスとも伸張されたＰ８またはＧＮＲＡテトラループを含む明白なＰ１８を持っていないが、多分、Ｐ１８領域中のヌクレオチドがＰ８と相互作用する別の構造要素を形成するのであろう。

【００４４】
Ｐ１４ヘリックス中のＧＮＲＡテトラループおよびＰ８ステム問の遠距離相互作用もまた示唆されている（３８、６２）。このことは、クラミディア科の９つすべての種における我々のデータ（Ｃ．シッタシにおけるＵ８２Ａ９４塩基対およびＧ２０１；図７）により、およびＰ．アカントアメーバおよびＳ．ネゲベンシスにおけるＰ１４ループのＡおよびＰ８のＧＣ塩基対の存在（図２）により支持される。この相互作用を仮定すれば、Ｃ．トラコマチスの３つの血清型Ｌ１からＬ３においてＧ２０５ヌクレオチド（Ｃ．シッタシにおけるＧ２０１に相当する、図７）がＡにより置換されているが、Ｐ８ヘリックスにおいて相当する塩基対移動がないことは驚くべきことである。

【００４５】
最少共通細菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡにおいて、ある位置は１００％保存ヌクレオチド塩基を持っている（３９）。我々のデータは、６０位のよく保存されているシトシンがクラミドフィラ属のすべての試験された種においてはウラシルにより置き換えられており（図７）、一方、クラミディア属では変化は観察されなかったことを示している。このことは、３７６位（番号付けはＣ．シッタシを参照）の残基に依存してＵＧゆらぎ塩基対またはＵＡ塩基対を発生させる。これらの種に由来するＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡの領域は、本研究で使用されたプライマーでは試験できない。

Ｃ．トラコマチスＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡによるｔＲＮＡ前駆体の切断

細菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡはＲＮａｓｅ　Ｐ蛋白質部分が存在しなくても触媒的に活性である（３３およびその引用文献）。クラミディアＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ単独でその基質を切断できるかどうかを調べるため、我々はＣ．トラコマチスＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡを発生させ、基質として大腸菌ｔＲＮＡ^{Tyr}Ｓｕ３（ｐＳｕ３）前駆体を使用して切断パターンを分析した。このＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡは実際、方法で説明したように、高濃度のNH_4Clを使用した場合にのみ予測された位置でｐＳｕ３を切断できた。このことはＣ．トラコマチスＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡによる切断についての以前の観察（５１）と一致している。構造的観察と一緒にすると、このことは触媒活性にはＰ１５内部ループ（またはＰ１５ヘアピンループ）は必要とされないことを示している。しかしながら、Ｃ．トラコマチスＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ切断の程度は、大腸菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡによる切断と比較すると著しく減少していることが認められた。

クラミディア科の系統発生学

ヘリックスＰ１５、Ｐ１６、Ｐ１７、Ｐ１８およびＰ１９の二次構造はクラミディア科のメンバーにとっては解明するのが最も困難な領域であった。結果として、これらの領域の内２つ、即ちＰ１７およびＰ１９は系統発生計算に使用された最終データ組から除かれた。このことは、Ｐ１７の場所での高いヌクレオチド変異性、およびＰ．アカントアメーバ　ｒｎｐＢ遺伝子中のヘリックスＰ１９の明らかな不在によっている（図６＆７）。また、不確かに整列された位置９４、１５０、１５１、１５３、２８６および２９８（図６におけるＣ．トラコマチスのｒｎｐＢ遺伝子の番号付けに従って）は系統発生的分析に先立って除かれた。１から６８位はＳ．ネゲベンシスおよびＰ．アカントアメーバについて

は決定されていないので、５’末端の終端を除いてギャップ位置は一般的に最終アラインメントから省かれた。その結果、補正された最終アラインメントは２７１の位置を含んでいた。

【００４６】

クラミディア科種間の系統発生的関係を明らかにするため、進化樹の計算に異なったアルゴリズムが使用された。事実上、同一の樹トポロジーが距離マトリックスおよび特質に基づいた方法を使用することにより得られた。近隣結合法（ＮＪ）（Ｓａｉｔｏｕ　＆　Ｎｅｉ，１９８７）を使用することにより導かれた代表的進化系統樹が図３に示されている。分岐オーダーの安定性は、ブートストラップパーセンテージ値を決定することにより統計的に評価された。これらの値はＮＪにより得られ、および最節約は結節点に与えられている。最見込み樹（ＭＬ）により支持された分岐オーダーもまた図３の各々の分岐点に加えられている。ＭＬにより構築されたデンドログラム中、２つのタクソンはいくぶん異なって分岐し、この不安定性を示している実際の節にはアステリスクが付けられている。図３に示したようなものと同一の樹トポロジーがまた、クラミドフィラおよびクラミディアに属している種からのｒｎｐＢデータのみを使用して、ただし、データ組を５’末端のヌクレオチド情報を含ませた場合にも得られた。従って、樹のこの部分の分岐オーダーは解明されなかった。

【００４７】

図８の樹は属クラミドフィラおよびクラミディアはｒｎｐＢ遺伝子配列を比較することによりお互いに容易に区別できることを示している。これらの発見は、最近公表された完全長１６Ｓおよび２３Ｓリボソーム ＲＮＡ遺伝子、およびそれらの遺伝子間スペーサー領域に基づいた系統発生学（４２、４３、７３）と一致している。しかしながら、Ｐｅｔｔｅｒｓｓｏｎら（１９９７）による１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子に対して示された結果とは矛盾している。１６Ｓ　ｒＲＮＡ研究はこれらの遺伝子についてただの４／５の完全長ヌクレオチド情報に基づいていること、および比較に使用されたいくつかの配列はどちらかといえば遠い関係であったことが最も妥当な説明である。従って、いくつかの系統発生的情報が最終データ組で失われていた。ほとんど完全な１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子配列および外群として密接な関係物のみを使用する続いての１６Ｓ　ｒＲＮＡ分析においては、他の分岐オーダーとの相関が制限されている。従って、１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子は、クラミディア科メンバーの進化的相互関係を記述するには低い程度の分離度しか提供しないことが結論できる。

【００４８】

ｒｎｐＢ遺伝子の分析は、弱い分岐土台しかない遺伝子に完全に頼る必要なくクラミディア系統発生学を示した。１６Ｓ　ｒＲＮＡ分析は集団が付いた多数の長い枝を示すのに対し、ｒｎｐＢ分析は、科、属および種レベルでクラミディア群を区別する、平等に分布した配列相違を示している。クラミディア目の種におけるｒｎｐＢ遺伝子の配列多様性は、クラミディア種の区別のためにこの遺伝子を使用することを可能にしている。さらに、この特異性は記載されているような種特異的生態学的地位（７０）と一致する各々の組分けの機能的単離を明らかにする。保存もまた従来同定されている組分けと一致する。ｔＲＮＡプロセッシングとしての機能での特異性はかなり基本的であることが観察され、クラミディア科における種組分けは非常に長い時間で進化的に分離されたことを示唆している。本系統発生的分析は以前に記載されているような（４３）、クラミディア科の分類の修正を支持している。

【００４９】

要約すると、ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子（ｒｎｐＢ）の配列がクラミディア科の９つの種および関連するクラミディア目の種、パラクラミディア　アカントアメーバおよびシムカニア　ネゲベンシスを代表する６０の株で決定された。これらの配列はクラミディア科間の進化的関係を推論するために使用された。分析はクラミドフィラおよびクラミディアを二つの系統に分離し、クラミドフィラは３つの固有の集団を形成する：クラミドフィラ　ニューモニエ株、クラミドフィラ　ペコルム株および第三の集団は種クラミドフィ

ラ シッタシ、クラミドフィラ、 クラミドフィラ アボルツス、クラミドフィラ カビエおよびクラミドフィラ フェリスから成っている。クラミディア下降列は２つめ集団を含んでいる、クラミディア トラコマチスおよびクラミディア ムリダリムの株からはっきりと分離したクラミディア スイス。この分析は、ｒｎｐＢ配列および構造がクラミディア科の種に対して固有のマーカーであることを示した。我々はまた、Ｃ．トラコマチスから誘導されたＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡは蛋白質不在下でｔＲＮＡ前駆体を切断できることも示した。我々の発見はクラミディアＲＮａｓｅ Ｐ ＲＮＡの構造に関連して議論された。

【００５０】

【表４】

文 献

1. **Abed, Y., C. Bollet, and P. De Micco** 1995. Demonstration of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity by the amplification of the 16S-23S spacer region. J. M. Microbiol. 43: 156-158

2. **Alcaide F., I. Richter, C. Bernasconi , B. Springer, C. Hagenau R. Schulze-Robbecke, E. Tortoli, R. Martin, E. C. Böttger, and A. Telenti.** 1997. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: Implications for epidemiological and pathogenicity studies. J. Clin. Microbiol. **35:**1959-1964

3. **Bascunana C. R. and K. Belak K.** 1996. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. **10:**2351-2355.

4. **Brännvall, M., J. G. Mattsson, S. G. Svärd S.G., and L. A. Kirsebom.** 1998. RNase P RNA structure and cleavage reflect the primary structure of tRNA genes. J. Mol. Biol. **283:**771-83

5. **Brown J. W. and N. R. Pace.** 1992. Ribonuclease P RNA and protein subunits from bacteria. Nucleic Acids Res. **20:**1451-1456.

6. **Cole S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. 3rd Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, et al.**, 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature **393:**537-44.

7. **Crawford J. T.** 1994. Development of rapid techniques for identification of *M. avium* infections. Res. Microbiol. **145:**177-181.

8. **Devallois A., M. Picardeau, K.S. Goh, C. Sola, V. Vincent, and N. Rastogi.** 1996. Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J. Clin. Microbiol. **34:**2756-2759.

9. **Devallois A., M. Picardeau, C. N. Paramasivan, V. Vincent, and N. Rastogi.** 1997 Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-

【００５１】

【表５】

restriction enzyme analysis, 16S rRNA gene sequencing, and DT1-DT6 PCR. J. Clin. Microbiol. **35**:2767-2772.

10. **Frothingham R., and K.H. Wilson.** 1994. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. J. Infect. Dis. **169**:305-312.

11. **Gardiner K. and N. R Pace.** 1980. RNase P of Bacillus subtilis has an RNA component. J. Biol. Chem. **255**:7507-7509

12. **Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. L. Marsh, N. R. Pace, and S. Altman.** 1983. The RNA moiety of RNase P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell **35**:849-857

13. **Herrmann B., O. Winqvist, J. G. Mattsson , and L. A. Kirsebom LA.** 1996. Differentiation of *Chlamydia* spp. by sequence determination and restriction endonuclease cleavage of RNase P RNA genes. J. Clin. Microbiol. **34**:1897-1902.

14. **Iinuma Y., S. Ichiyama, Y. Hasegawa, K. Shimokata, S. Kawahara, and T. Matsushima.** 1997. Large-restriction-fragment analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its application in molecular typing. J. Clin. Microbiol. **35:** 596-599

15. **Ji -e Y., K. E. Kempsell, M. J. Colston and R. A. Cox.** 1994 Nucleotide sequences of the spacer-1, spacer-2 and trailer regions of the rrn operons and secondary structures of precursor 23S rRNAs and precursor 5S rRNAs of slow-growing mycobacteria Microbiology **140**:1763-1773.

16. **Kapur V., L.-L. Li, M. R. Hamrick, B. B. Plikaytis, T. M. Shinnick, A. Telenti,**
Jr W. R. Jacobs, A. Banerjee, S. Cole, K.Y. Yuen, J. E. Clarridge III, B. N.Kreiswirth, and J. M. Musser. 1995. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. Arch. Pathol. Lab. Med. **119**:131-138.

17. **Kole R. M. F. Baer, B. C. Stark , and S. Altman.** 1980. *E. coli* RNAase P has a required RNA component *in vivo.* Cell **19**:881-887

18. **Kulski J.K., C. Khinsoe, T. Pryce, and K. Christiansen.** 1995. Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. J. Clin. Microbiol. **33**:668-674.

【００５２】

【表６】

19. **Nishimori K., M. Eguchi, Y. Nakaoka, Y. Onodera, T. Ito, and K. Tanaka.** 1995. Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium* complex from swine by using IS901-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J. Clin. Microbiol. 8:2102-2106.

20. **Picardeau M., G. Prod'hom, L. Raskine, M. P. LePennec, and V. Vincent.** 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J. Clin. Microbiol. **35** 25-32.

21. **Rastogi N., W. W. Barrow, J. O. Falkinham III, C. O. Thoen, J. T. Crawford, B. T. Mangura, L. B. Reichman, L. B Heifets, B. Dautzenberg, L. S. Young, L. E. Bermudez, C. D. Inderlied, A. E. Suzuki, J. M. Inamine, P. R. J. Gangadharam, M. V. Reddy, M. Denis, H. Shiratsuchi, J., L. Johnson, J. J. Ellner, J. T. Belisle, and P. J. Brennan.** 1994. 11th Forum in Microbiology, "Laboratory and clinical aspects of the *Mycobacterium avium* epidemic: contributing factors associated with variability of drug susceptibility and immune responsiveness, and the multifaceted nature of pathogenicity". Res. Microbiol. **145:**167-261.

22. **Rastogi N., J. J. McFadden, M. L. Gourgeon, L. Montagnier, F. M. Collins, C. R. Horsburgh, R. J. Coker, T. J. Hellyer, I. N. Brown, J. N. Weber, I. M. Orme, D. Chatterjee, J. D. A. Van Embden, D. Van Soolingen, P. M. Small, P. W. M. Hermans, S. E. Hoffner, G. Källenius, S. B. Svenson, R. S. Wallis, J. J. Ellner, H. Shiratsuchi, G. A. W. Rook, A. Vyakarnam, D. M. Yajko, L. S. Young, L. E. M. Bermudez, C. B. Inderlied, Z. M. Kunze, F. Portaels, and V. Labrousse.** 1992. 8th Forum in Microbiology, "Mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune system." Res Microbiol. **143:**357-440.

23. **Richter E., S. Niemann, S. Rusch-Gerdes, and S. Hoffner.** 1999 Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. J. Clin. Microbiol. **37:** 964-970

24. **Roth A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch.** 1998
Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J. Clin. Microbiol. **36:**139-147.

25. **Siegel, R. W., A. B. Banta, E. S. Haas, J. W. Brown, and N. R. Pace.** 1996. *Mycoplasma fermentans* simplifies our view of the catalytic core of ribonuclease P RNA. RNA **2:** 452-62.

【００５３】

【表７】

26. **Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and Jacobs WR Jr.** 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol 4:1911-1919

27. **Sritharan V., J.V. Iralu, and R.H. Barker Jr.** 1995. Specificity of diagnostic PCR amplification for *M. avium* using the probe pMAV22. Mol. Cell. Probes **9:**71-74.

28. **Stark, B. C., R. Kole, E. J. Bowman and S. Altman.** 1978. Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
3717-3721

29. **Telenti, A. F. Marchesi, M. Balz, F. Bally E.C. Böttger, and T. Bodmer.** 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. **31:**175-178.

30. **Van der Giessen J. W. B., R. M. Haring, and B. A. M. Van der Zeijst.** 1994
Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. Microbiology. **140:**1103-1108.

31. **Vioque A.** 1992. Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. Nucleic Acids Res. **20:**6331-37

32. **Woolford A. J., R. G. Hewinson, M. Woodward, and J. W. Dale** 1997. Sequence heterogeneity of an mpb70 gene analogue in *Mycobacterium kansasii*. FEMS Microbiol. Lett. **148:**43-48)

33. **Altman, S. & Kirsebom, L. A.** (1999). Ribonuclease P. In The RNA world: Second edition (Gesteland, R.F., Cech, T. & Atkins, J.F., eds.), pp.351-380. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

34. **Amann, R., Springer, N., Schonhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E. N., Muller, K. D., Michel R. (1997).** Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl Environ Microbiol* **63**, 115-121..

35. **Andersen, A. A. & Van Deusen, R. A. (1988).** Production and partial characterization of monoclonal antibodies to four *Chlamydia psittaci* isolates. *Infect Immun* **56**, 2075-2079.

【００５４】

【表８】

36. **Baker, J. A. (1942).** A virus obtained from a pneumonia of cats and its possible relation to the cause of atypical pneumonia in man. *Science* **96**, 475-476.

37. **Black, C. M., Tharpe, J. A. & Russell, H. (1992).** Distinguishing *Chlamydia* species by restriction analysis of the major outer membrane protein gene. *Mol Cell Probes* **6**, 395-400.

38. **Brown, J. W., Nolan, J. M., Haas, E. S., Rubio, M-A. T., Major, F., Pace, N. (1996).** Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structural elements. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 301-3006.

39. **Brown, J. W. (1998).** The Ribonuclease P Database. *Nucl Acids Res* **26**, 351-352.

40. **Cello, R. M. (1967).** Ocular infections with PLT (Bedsonia) group agents. *Am J Ophthalmol* **63**, 1270-1273.

41. **Chirgwin, K., Roblin, P. M. & Hammerschlag, M. R. (1989).** In vitro susceptibilities of *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydia* sp. strain TWAR). *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1634-1635.

42. **Everett, K. D. & Andersen, A. A. (1997).** The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int J Syst Bacteriol*, **47**, 461-473.

43. **Everett, K. D. E., Bush R. M. & Andersen, A. A. (1999).** Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae* including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 415–440.

44. **Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP (Phylogeny inference package) (version 3.51c). Distributed by the author. University of Washington, Seattle, Department of Genetics.

45. **Francis, T., Jr., & Magill, T. P. (1938).** An unidentified virus producing acute meningitis and pneumonia in experimental animals. *J Exp Med* **68**, 147-160.

46. **Fukushi, H. & Hirai, K. (1989).** Genetic diversity of avian and mammalian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. *J Bacteriol* **171**, 2850-2855.

【００５５】

【表９】

47. **Golub, O. J. & Wagner, J. C. (1947).** Studies on the interference phenomenon with certain members of the psittacosis-lymphogranuloma group of viruses. *J Immunol,* **59,** 59-70.

48. **Grayston, J. T.,Kuo, C.-C.,Campbell, L. A. & Wang, S. P. (1989).** Chlamydia pneumoniae sp nov for Chlamydia sp strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol,* **39,** 88-90.

49. **Haas, E. S., Brown, J. W., Pitulle, C. & Pace, N. R. (1994).** Further perspective on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci* **91,** 2527-2531.

50. **Haas, E. S., Banta, A. B., Harris, J. K., Pace, N. R. & Brown, J. W. (1996).** Structure and evolution of ribonuclease P RNA in Gram-positive bacteria. *Nucl Acids Res* **24,** 4775-4782.

51. **Haas, E. S. & Brown, J. W. (1998).** Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucl Acids Res* 26, 4093-4099.

52. **Hardt, W-D., Schlegl, J., Erdmann, V. A. & Hartmann, R. K. (1995).** Kinetics and thermodynamics of the RNase P RNA cleavage reaction: Analysis of tRNA 3'-end variants. *J Mol Biol* **247,** 161-172.

53. **Hartmann, R. K. & Erdmann, V. A. (1991).** Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from *T. thermophilus* HB8. *Nucl Acids Res* **19,** 5957-5964.

54. **Illner, V. F. (1960).** Zur Frage der Uebertragung des Ornithosevirus durch das Ei. *Monatsh Veterinaermed* **17,** 116-117.

55. **Jukes, T. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism,* pp. 21-132. Edited by H. N. Munro, New York: Academic Press.

56. **Kahane, S., Metzer, E. & Friedman, M. G. (1995).** Evidence that the novel microorganism 'Z' may belong to a new genus in the family *Chlamydiaceae. FEMS Microbiol Lett* **126,** 203-207.

57. **Kahane, S., Greenberg, D., Friedman, M. G., Haikin, H., & Dagan, R. (1998).** High prevalence of "*Simkania Z,*" a novel chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis. *J Infect Dis* **177,** 1425-1429.

58. **Kaltenboeck, B., Kousoulas, K. G. & Storz, J. (1993).** Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane

【００５６】

【表１０】

protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol*, **175**, 487-502.

59. **Kirsebom & Svärd (1992).** The kinetics and specificity of cleavage by RNase P is mainly dependent on the structure of the amino acid acceptor stem. *Nucl Acids Res* **20**, 425-432.

60. **Kirsebom, L. A. & Svärd, S. G. (1994).** Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate. *EMBO J* **13**, 4870-4876.

61. **Lieberman, D., Kahane, S., Lieberman, D., & Friedman, M.G. (1997).** Pneumonia with serological evidence of acute infection with the chlamydia-like microorganism *"Z"*. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **156**, 578-82.).

62. **Massire, C., Jaeger, L. & Westhof, E. (1998).** Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. *J Mol Biol* **279**, 773-793.

63. **McNutt, S. H. & Waller, E. F. (1940).** Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease). *Cornell Vet* **30**, 437-448.

64. **Murray, E. S. (1964).** Guinea pig inclusion conjunctivitis virus. I. Isolation and identification as a member of the psittacosis-lymphogranuloma-trachoma group. *J Infect Dis* **114**, 1-12.

65. **Nigg, C. (1942).** Unidentified virus which produces pneumonia and systemic infection in mice. *Science* **95**, 49-50.

66. **Page, L. A. (1959).** Experimental ornithosis in turkeys. *Avian Dis.*, **3**, 51-66.

67. **Page, L. A. (1967).** Comparison of "pathotypes" among *Chlamydial* (psittacosis) strains recovered from diseased birds and mammals. *Bull Wildl Dis Assoc*, **2**, 166-175.

68. **Page, L. A. & Bankowski, R. A. (1960).** Factors affecting the production and detection of ornithosis antibodies in infected turkeys. *Am J Vet Res.*, **21**, 971-978.

69. **Page, L. A. & Cutlip, R. C. (1968).** Chlamydial polyarthritis in Iowa lambs. *Iowa Vet* **39**, 10-18.

70. **Palys, T., Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1997).** Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1145-1156.

【００５７】

【表１１】

71. **Perez-Martinez, J. A. & Storz, J. (1985).** Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. *Infect Immun* **50**, 905-910.

72. **Pettersson, B., Andersson, A., Leitner, T., Olsvik, O., Uhlén, M., Storey, C., Black, C. M. (1997).** Evolutionary relationships among members of the genus *Chlamydia* based on 16S ribosomal DNA analysis. *J Bacteriol* **179**, 4195-4205.

73. **Pudjiatmoko, Fukushi, H., Ochiai, Y., Yamaguchi, T. & Hirai, K. (1997).** Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 425-431.

74. **Richmond S. J., Sterling, P., Ashley, C. R. (1982).** Virus infecting the reticulate bodies of an avian strain of Chlamydia psittaci. *FEMS Microbiol. Letters,* **14**, 31-36.

75. **Rogers, D. G., Andersen, A. A., Hogg, A., Nielsen, D.L. & Huebert, M.A. (1993).** Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with chlamydiae in swine. *J Am Vet Med Assoc* **203**, 1321-1323.

76. **Rodolakis, A., Bernard, F. & Lantier, F. (1989).** Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res Vet Sci* **46**, 34-39.

77. **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

78. **Schachter, J. & Meyer, K. F. (1969).** Lymphogranuloma venereum. II. Characterization of some recently isolated strains. *J Bacteriol* **99**, 636-638.

79. **Spalatin, J., Fraser, C. E. O., Connell, R. P. & Berman, D. T. (1966).** Agents of psittacosis-lymphogranulomavenereum group isolated from muskrats and snowshoe hares in Saskatchewan. *Can J Comp Med Vet Sci* **30**, 225-420.

80. **Stephens, R. S., Kalman, S., Fenner, C., Davis, R. (1998)** Chlamydia Genome Project.

81. **Stills, H. F. J., Fox, J. G., Paster, B. J. & Dewhirst, F. E. (1991).** A "new" *Chlamydia* sp. strain SFPD isolated from transmissible proliferative ileitis in hamsters. *Microbiol Ecol Health Dis* **4**, S99.

【００５８】

【表１２】

82. **Vioque, A. (1997).** The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucl Acids Res* **25,** 3471-3477.

83. **Wang, S.-P. & Grayston, J. T. (1962).** Classification of trachoma virus strains by protection of mice from toxic death. *J Immunol* **90,** 849-856.

84. **Wills, J. M., Gruffydd-Jones, T. J., Jones T, Richmond, S., Paul, I. D. (1984).** Isolation of *Chlamydia psittaci* from cases of conjunctivitis in a colony of cats. *Vet Rec* **114,** 344-346.

85. **Zhang, Y. X., Fox, J. G., Ho, Y., Zhang, L., Stills, H. J. & Smith, T. F. (1993).** Comparison of the major outer-membrane protein (MOMP) gene of mouse pneumonitis (MoPn) and hamster SFPD strains of *Chlamydia trachomatis* with other *Chlamydia* strains. *Mol Biol Evol* **10,** 1327-42.

【図面の簡単な説明】

【図１】　マイコバクテリアからのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の配列アラインメント。ダッシュは配列同一性を示し；星印塩基は配列中で失われている。

【図２】　Ｍ．ツベルクローシスＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡの二次構造。マイコバクテリア種間で変異している領域は影を付けられている。比較的重要でない可変領域は示されていない。

【図３】　Ｍ．ガストリ（ｇａｓｔｒｉ）（二つの異なった株から同一の配列）およびＭ．カンサシ（ｋａｎｓａｓｉｉ）の６つの株からのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子の配列アラインメント。Ｍ．ガストリ配列に独特の塩基はボールド体である。

【図４】　図４Ａは、異なったマイコバクテリアからのＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ遺伝子領域の、最初の２８０ｂｐのヘテロ二重鎖分析。種々のマイコバクテリア種からのＤＮＡはＭ．ツベルクローシス　ＤＮＡとハイブリダイズされ、生じた二重鎖は１０パーセントポリアクリルアミドゲルで分離された。レーン１、Ｍ．ツベルクローシスからの対照ＤＮＡ：レーン２、Ｍ．アビウム；レーン３、Ｍ．イントラセルラレ；レーン４、Ｍ．マルモエンス（ｍａｌｍｏｅｎｓｅ）；レーン５、Ｍ．セラツム；レーン６，Ｍ．カンサシ；レーン７、Ｍ．バッカ（ｖａｃｃａｅ）；レーン８、Ｍ．ゼノピ（ｘｅｎｏｐｉｉ）。図４Ｂは、Ｍ．イントラセルラレかまたはＭ．アビウムと信じられている臨床試料から増幅されたＤＮＡのヘテロ二重鎖分析。レーン１、Ｍ．ツベルクローシスからの対照ＤＮＡ；レーン２、３、６、Ｍ．アビウムと疑われているものからのＤＮＡ；レーン４、５、７、Ｍ．イントラセルラレと疑われているものからのＤＮＡ；レーン８、Ｍ．アビウムからの対照ＤＮＡ；レーン９、Ｍ．イントラセルラレからの対照ＤＮＡ。

【図５】　属内の配列変異に基づいた、マイコバクテリアからのＲＮａｓｅＰ　Ｐ１８ループの示唆された構造。配列はＡ）Ｍ．ツベルクローシス（ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）；Ｂ）Ｍ．スメグマチス（ｓｍｅｇｍａｔｉｓ）；Ｃ）Ｍ．マリヌム（ｍａｒｉｎｕｍ）。

【図６】　９つのクラミディア科種、Ｐ．アカントアメーバ（ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａｅ）およびＳ．ネゲベンシス（ｎｅｇｅｖｅｎｓｉｓ）からのｒｎｐＢのＤＮＡ配列比較。点はＣ．トラコマチス（ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）Ａ／Ｈａｒ－１３^{T}配列との同一性を示しており、およびダッシュはアラインメントにおけるギャップを示している。超可変領域Ｐ３、Ｐ１２、Ｐ１７およびＰ１９が示されている。番号付けはＢｒｏｗｎ（３９）に従っている。

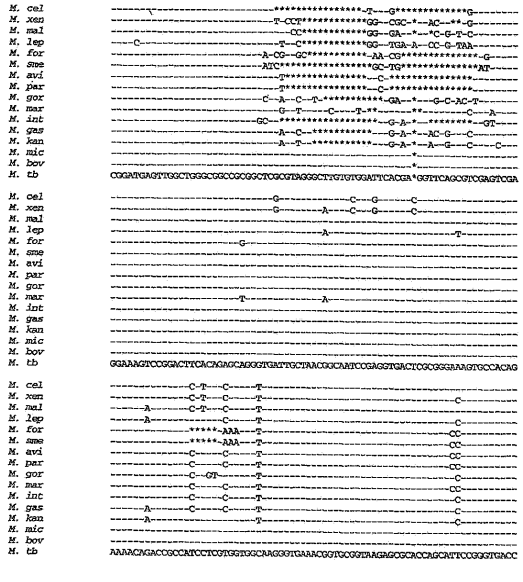
【図７】　Ｃ．シッタシ（ｐｓｉｔｔａｃｉ）、Ｐ．アカントアメーバ（ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａｅ）およびＳ．ネゲベンシス（ｎｅｇｅｖｅｎｓｉｓ）中のＲＮａｓｅ　Ｐ

ＲＮＡの推定された二次構造。プライマー配列中のヌクレオチドはロウアーケース型であり、ｍはアデニン－シトシン混合物を示し、およびｒはこの位置でのアデニン－グアニン混合物を示している。Ｎは最少共通細菌ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡ（３９）に基づいたプライマーの隣接領域においての仮のヌクレオチドを示している。

【図８】　ｒｎｐＢに基づいた隣接結合樹、クラミディア科のメンバー間の関係を示しており、Ｐ．アカントアメーバ（ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａｅ）株Bn_9^TおよびＳ．ネゲベンシス（ｎｅｇｅｖｅｎｓｉｓ）株Z^Tが外群として選択された。節約法およびＭＬ分析は同一の分岐オーダーを生み出した。しかしながら、２つのタクソンはＭＬ樹においてわずかに異なって分岐し、この節はアステリスクで印を付けられている。節でのブーストラップ支持値は、隣接結合および最節約法を使用し、データ組の１０００回の再サンプリングから得られた。縮尺線は１００ヌクレオチド当たり５置換を示している。

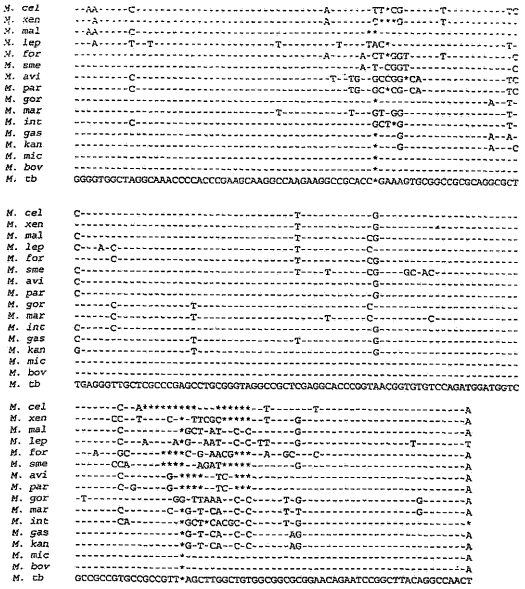
【図１】

Fig. 1



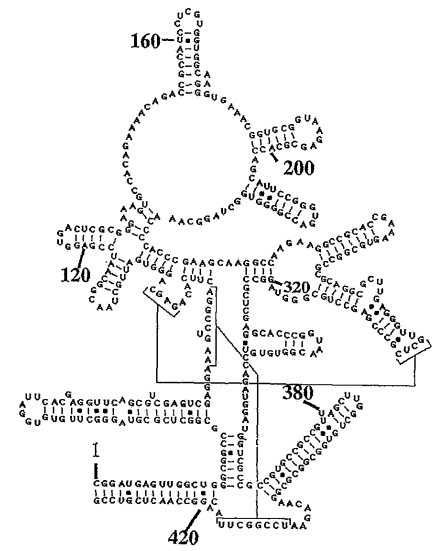
【図１－１】

Fig. 1 cont.



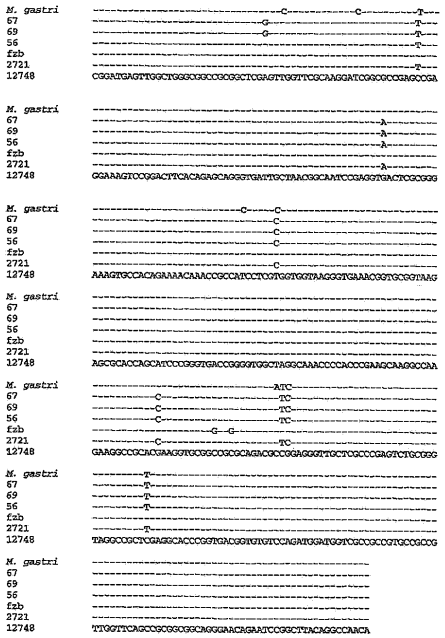
【図２】

Fig. 2



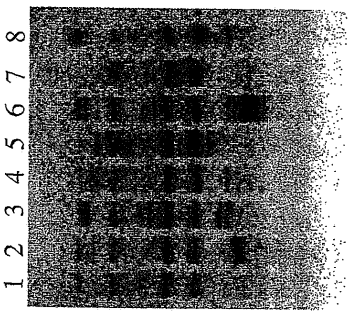
【図３】

Fig. 3



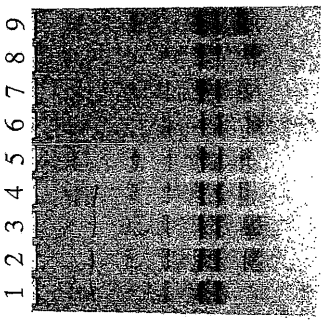
【図４Ａ】

Fig. 4A



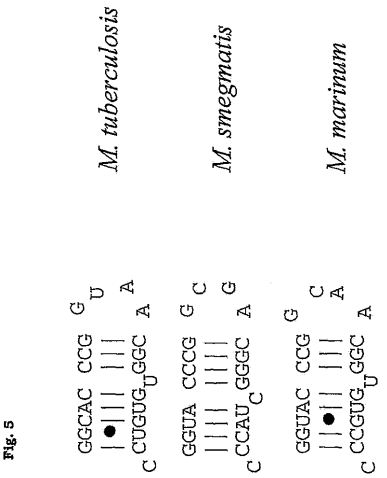
【図４Ｂ】

Fig. 4B



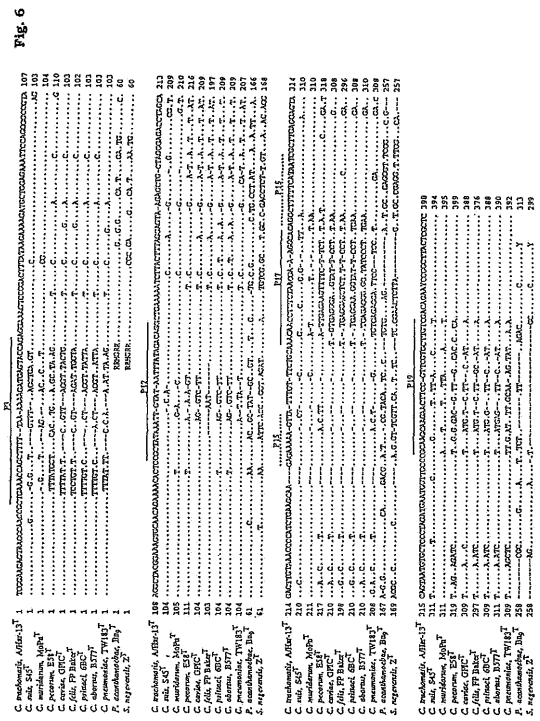
【図５】

Fig. 5



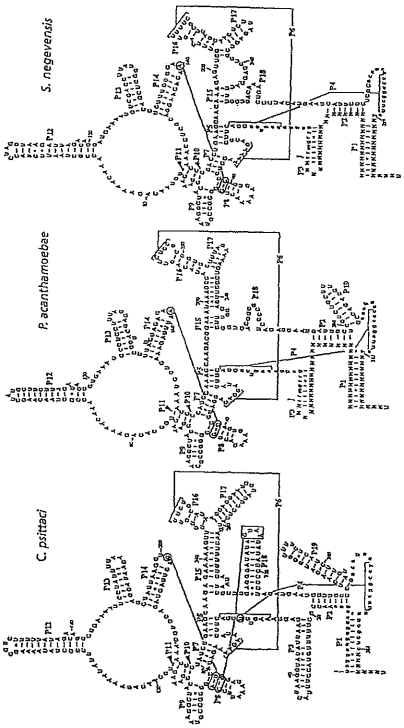
【図６】

Fig. 6



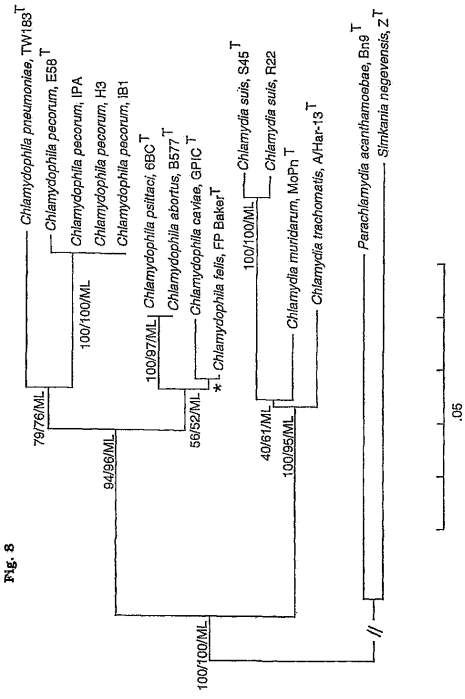
【図７】

Fig. 7



【図８】

Fig. 8



フロントページの続き

(74)代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(74)代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74)代理人 100092967
弁理士 星野 修
(72)発明者 ビョルン・ハーマン
スウェーデン国エス－７５６ ４７，ウプサラ，スクリンドヴェーゲン ２１
(72)発明者 レイフ・キルセボム
スウェーデン国エス－７５５ ９１，ウプサラ，ヴェレタ・ステランドヴェーグ ２０
(72)発明者 ペレ・ストルテ
スウェーデン国エス－７５５ ９１，ウプサラ，ヴェレタ・ステランドヴェーグ ２０，セー／オー・レイフ・キルセボム

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特開平０３－１３００９９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第１９９９／０１１６５３（WO，Ａ１）
Journal of clinical microbiology, １９９６年, Vol.34, p.1897-1902
International journal of systematic bacteriology, １９９８年, Vol.48, p.1223-1230
Nucleic Acids Research, １９９８年, Vol.26, p.4093-4099

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
Ｃ１２Ｑ １／６８
ＣＡ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）