

ミニ・レビュー

*Helicobacter pylori*における細胞分裂関連遺伝子
*cdrA*の同定と解析

竹内啓晃

山口大学医学部微生物学講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : *Helicobacter pylori*, *cdrA* gene, 新規細胞分裂関連遺伝子、分裂抑制機能

「緒 言」

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は、グラム陰性のらせん状桿菌で、胃炎、胃/十二指腸潰瘍をはじめ現在では胃癌との関連性も指摘されている病原微生物である^{1,2)}。本菌は*in vivo*, *in vitro*での感染及び培養過程に、細胞分裂に伴う形態変化を認める。すなわち、短桿菌状、らせん状、U字状そして球状体をライフサイクルにおいて観察することができる。最近、*H. pylori* 26695株の全塩基配列が報告された³⁾。(その後*H. pylori* J99の全塩基配列も報告された。)それによると、大腸菌に対して*ftsK* (HP1090) や*ftsH* (HP1069)⁴⁾を含む12個の細胞分裂関連遺伝子のホモロジーが認められ、複製や細胞分裂機構の基本的メカニズムは大腸菌⁵⁾と類似していると予測された。

大腸菌のFtsK蛋白⁶⁾は細胞分裂時の隔壁合成に必須であり、膜貫通領域とATP/GTP結合領域を有し、部分的に枯草菌のSpoIIIE蛋白と相同性を示すが、SpoIIIE蛋白よりもかなり大きい。枯草菌SpoIIIE蛋白は芽胞形成時の隔壁合成や核酸の分離/移動に関与している^{8,9)}。

今回、臨床分離株HPK 5から新規遺伝子である細胞分裂関連遺伝子(*cdrA*)を明らかにした。本遺伝

子は367アミノ酸をコードしATP結合蛋白に属するものであった。さらにHPK 5と同位置に存在する26695株のHP0066³⁾と相同性を示した。

「材料および方法」

Helicobacter pylori, 大腸菌およびプラスミド: TABLE 1に記載。

培養および条件:*H. pylori*には標準培養液としてDifcoのブルセラブロス(5%馬血清加)とブルセラ寒天プレート(ブルセラブロスに1.4%寒天(nacalai)加)を、また高塩濃度培養液として最終塩濃度1%に調整したものを使用した。必要に応じて各種抗生物質(カナマイシン, 25 μg/ml; クロラムフェニコール5 μg/ml)を添加して使用し、微好気条件(5% O₂, 15% CO₂, 80% N₂)で培養した¹⁰⁾。

*H. pylori*はサブカルチャー後、50 mlフラスコを使用し15 mlの各培養液内で14日間培養し、経時的に吸光度(OD₅₉₀ nm)をスペクトロフォトメーター(Spectronic 20A; Shimadzu)で測定し、増殖曲線を作製した。また、同時にCFU(colony forming unit)の測定と形態観察用にDAPI(4', 6'-diamino-2-phenylindole)染色をHiragaらの方法に従って実施した¹¹⁾。

遺伝子組み換え用に使用した大腸菌は、GIBCO

平成12年8月4日受理

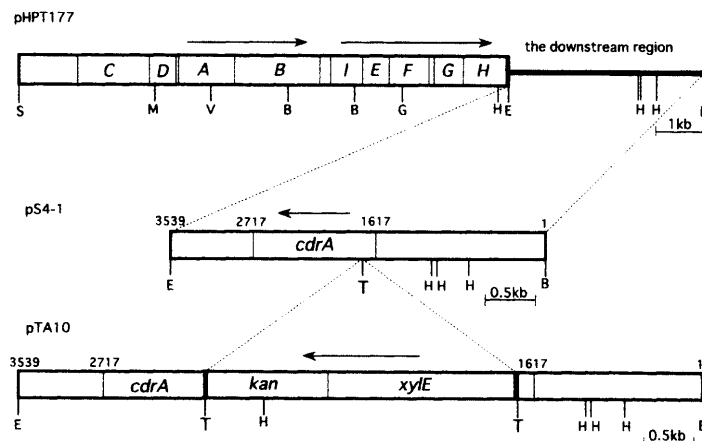


Fig. 1 : Restriction maps of the urease gene cluster and the region downstream of this cluster of *H. pylori* HPK5. Plasmid pHPT177 carries a 12.8-kb *SacI*-*Bam*HI fragment containing the urease operon (*ureA* to *ureH*) and *cdrA*; pS4-1 carries a 3539-bp *Bam*HI-*Eco*RI fragment containing *cdrA*; and pTA10 contains *cdrA* disrupted by a 3.13-kb *xylE*-*kan* fragment inserted at the *Tth111I* site. Arrows above the maps show the direction of transcription. Numbers represent the nucleotide positions starting from the right *Bam*HI site. S, *Sac*I; M, *Msp*I; V, *Eco*RV; B, *Bam*HI; G, *Bgl*II; E, *Eco*RI; T, *Tth111I*; H, *Hind*III.

BRLのL プロスとL プレート (L プロスに1.4%寒天 (nacalai) 加) を用いて, 必要に応じて各種抗生物質 (アンピシリン, 100 μ g/ml; カナマイシン, 10 μ g/ml; クロラムフェニコール5 μ g/ml) を添加して好気条件下で培養した. 遺伝子組み換えおよびサザンハイブリダイゼーションは一般的標準法に従って実施した¹²⁾.

ゲノムライブラリー作製とクローニング: HPK5のゲノムを用いてSuperCos1 (Stratagene)から作製したプラスミドpMT5047を使用し GIGAPACK II XL packaging extracts (Stratagene)により350クローンのライブラリーを得た. 次に*H. pylori* UMAB41株のウレアーゼ遺伝子¹³⁾をプローブにしてコロニーハイブリダイゼーションによりクローニング後, HPK5のウレアーゼ関連遺伝子群 (*ureCD*はウレアーゼ活性に無関係であることが報告されている.)を含む12.8kbをpBR322にサブクローニングし, pHPT177を作製した (Fig. 1). さらにウレアーゼ関連遺伝子群下流領域の*Bam*HI-*Eco*RI断片 (3.5kb) をpBluescript II KS(-)に挿入しpS4-1を作製した (Fig. 1).

塩基配列決定: サブクローニングしたpS4-1から種々のディリーション断片を作製後, シークエンサー (Applied Biosystems; model 373S) にてサンガーらのdideoxynucleotide chain termination 法に従って¹⁴⁾, 全塩基配列を決定した. 塩基配列の解析はGENETYXプログラム (SDC Software Development)

にて実施した.

PCR (Polymerase chain reaction): センスプライマー (P1, P4)とアンチセンスプライマー (P3) (Fig. 2A)を設定し, denature: 96°C, 30 sec; extension: 72°C, 1 min; annealing: 55°C, 30 sec; 40 cycles でhot startにて実施した.

H. pylori 破壊株の作製: *cdrA* 遺伝子の*Tth111I*部位に*kan*-*xylE*断片^{15,16)}を挿入したプラスミドpTA10を作製し (Fig. 1), これを用いて遺伝子相同組み換え法 (allelic exchange mutagenesis)¹⁷⁾によりHPK5の*cdrA*破壊株 HPKT510を作製した. HPKT510はサザンハイブリダイゼーションで確認したのち, 実験に使用した.

「結 果」

下流領域 (3.5kb) の塩基配列解析: ORF (open reading frame)の解析結果, 少なくとも2つのORFが存在し, その1つが細胞分裂に関与する新規遺伝子であり, *cdrA* (cell division-related gene)と命名した. 本遺伝子は367のアミノ酸をコードし予測される分子量は42.5kDでATP結合領域を有し (Fig. 2A), ウレアーゼ遺伝子群とは逆の転写方向であった. 26695株の同部位に位置するORF (HP0066)¹⁸⁾は831のアミノ酸をコードしており, 本遺伝子とのアミノ酸相同性は高かった. 特に, ATP結合領域を含む中心から

1551 AGGAGGTTGGCGTTGGTGAAGCAAGAGTATATAGCCGTGAAGCACAGAGCA 1610
 35 10
 1611 CTTAATATGGAACAATCTCACAAATCAGAAGCTGAATGGGAATTTGTAGACCGCTC 1670
 1 M E T I P T K S E L N W E F V E P L 18
 1671 AATGAAAAGCCGTTGAGTGGTGAATCAATAAAAATGGGGTTGAGCGATCGCTT 1730
 19 N E K A L S G L E Y Q L K M G L S D A F 38
 1731 AAGACTTTGTCAGGCACTCAACTATGTTTATGCAAGTGGCATCTTTATGGTGGC 1790
 39 K D F V K R S N Y G F S Q W R S F M V G 58
 T e n i j i i
 1791 AATAAATCTTACACATCAAACTGTTTGAACCTCAATTTAGTGGCAAGGCTTATTG 1850
 59 N K S Y T F K H V L N F N L D G K G L L 78
 1851 ATTGATTTTACAGATTTAAAGAAATGTTAGACCTGAAGAAATATCTTTGTAAT 1910
 79 I D F M Q S L K E W L E P E E I I F A N 98
 1911 GAGCGGTATGAGCGGTATTATCTTTGAATAGCGCTAGTGTGGTGGCTGTTTATGAC 1970
 99 D G Y E G Y L L N T A S D V V L F L D 118
 1971 ACTGATGATGGCTCAAAATGACCTGTTGACCTTAAATGTTTAAATAAAGGAG 2030
 119 T D D G S K H A L L H L K M F L I K R E 138
 2031 TTGAAAACCTTCAAGAAGAGCAAGATTTTGAACCAAGCTCTCAATTTAAGTGCT 2090
 139 L K D L Q R E Q D F W T K S S Q F K V S 158
 2091 GTCCGGTGGGTGGATATTAACCAAAAAGGCTGTTTGAAGTGGTGAAGCGCAA 2150
 159 V P V G W D I N H K E V C F E I T T G E A Q 178
 2151 AACCAACGCTCATTTGGCGCGACGGGACGGGAATCAATTTGCGATGCTG 2210
 179 N H T L I C G R S G S G K S N F L H V L 198
 2211 ATCGAAATCGGTTCTTACAGCGCTTAAGTGGTCAACTTTTATAGACTAT 2270
 199 I Q N L A F Y Y A P N E V Q L F L L D Y 218
 2271 AAAAGGGGTGGATTAACGCATATACAAACTCAAGCTTTAGAGCTGGAGGTTG 2330
 219 K E G V E F N A Y F N P T I L E H A R L 238
 2331 GTGAGCGTGGGAGTCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 2390
 239 V S V A S S V G F G V S F L S W L D K E 258
 2391 ACGAAAAGAGCAAGCACTGTCAGGCACTTAATGTGAAGCACTTGAGCCATCGCA 2450
 259 T K R R D E L F K Q F N V K D L S D Y R 278
 2451 AAGCATGGTGAATCCGACGCTGCTGCTGATTTGAATTTCAAGTGGTGGTGG 2510
 279 K H G E M P R L I V V I D E F Q V L F S 298
 2511 GACAGCACCAATAAAGAAAGAGAGGATGGAAGCTTATTAACCAACATCTCAAAAA 2570
 299 D S T T K E K E R V E A Y L T N I L K K 318
 2571 GGCAGCGATGCTGGTGGATTTAATTTAGCACTCAACATGCGCGCTGCAATC 2630
 319 G R S Y G V H L I L A T Q T M R G A D I 338
 2631 AATAAAGCTTATGGCTCAATCGCCACCGCATCGTTCCTGCTTGGTGTATGGA 2690
 339 N K S L M A Q I A N R I A L L R F A Y G 358
 2691 TCGAGAGACGACGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 2750
 359 C R R Q R E C F E *
 2751 AGGCAATTTTC

CdrA(Hp) -----
 HP0066 VKPKSMKEKLVKDMMSILNLRKIMDVNGLLEKDDALDKVAKKPEPFLKPIISPIED 60
 CdrA(Hp) -----
 HP0066 YQKSVRQIQAQFTDAPKFNEEGAYPQFLSCGLEETKKGNGASMEFCLPKVYPPFKSLYI 120
 CdrA(Hp) -----METIPT 6
 HP0066 EHEKDGQFLREMLMRLSSAPLVQLEVLVDALSLGGIFNLRRLHKDNDFIYQRIILT 180
 CdrA(Hp) KSELNWEFVEPLNEKALSGLEYQLKMLSDAFKDFVKRS---NYGFSQWRSFMVGNKSY 62
 HP0066 ESKEIEEALKHYEYLKVNQLKLAGYKDFAHYNEEKDRPLKALFSGVDALSQNALY 240
 CdrA(Hp) TFKHVLFNLDGKGLLIDFMQSLKEWLEPEEIIIFANDGYEGYLLNTASDVVLFLOTD- 121
 HP0066 YLEKIMRFGSKNGVLSFVNLSEKNNKSTEDLKQKDEKFWTESSQFKVSVPGWDINHKEVCF 300
 CdrA(Hp) -----GSKHALLHLKMFILKRELKDLQREQDFWTKSSQFKVSVPGWDINHKEVCF 172
 HP0066 IQSKHMKDFADKIKAYEKKAVKRELKDLQKDEKFWTESSQFKVSVPGWDINHKEVCF 360
 CdrA(Hp) EIGEAQNHTLICGRSGSGKSNFLHVLQNLFYAPNEVQLFLLDYKEGVEFNAYTNP 232
 HP0066 EIGNEQNHTLICGRSGSGKSNFLHVLQNLFYAPNEVQLFLLDYKEGVEFNAYTDPNI 420
 CdrA(Hp) LEHARLVSVASSVGFVSLWLDKETKKRDELKQFNVKDLSYRKHGEMPRILVIVDE 292
 HP0066 LEHARLVSVASSVGYGMSFLNWLCKEQRANLKFQFNVKDLSYRKHGEMPRILVIVDE 480
 CdrA(Hp) FQVLFSDSTTKEKERVEAYLTNLIKGRSYGVHILATQTMRGADINKSLMAQIANRIA 352
 HP0066 FQVLFSDNKS--TKAVEGHLNLTLLKGRSYGVHILATQTMRGDINRSIMAQIANRIA 538
 CdrA(Hp) LRFAYGCR---RQRECFE 367
 HP0066 SMDAEDSNLIGDDAACEL 557

Fig. 2 : (A) Nucleotide sequence of the *cdrA* gene. The deduced amino acid sequence is indicated under the nucleotide sequence, and an asterisk marks the stop codon. Both -35 and -10 promoter consensus sequences and a putative Shine-Dalgarno (SD) sequence are indicated. An inverted repeat at the end of ORF is indicated below the sequence (boldface arrows). The arrows above the sequence show the PCR primers (P1, P3 and P4). (B) Alignment of amino acid sequences of *H. pylori* CdrA [CdrA(Hp)] and hypothetical ATP-binding protein HP0066⁴⁾. The C-terminal amino acid sequence of HP0066 is abbreviated. (C) Alignment of partial amino acid sequences of *H. pylori* CdrA [CdrA(Hp)], *C. burnetii* FtsK/SpoIIIE [SpoIIIE(Cb)]¹⁸⁾, *B. subtilis* SpoIIIE [SpoIIIE(Bs)]¹⁹⁾, *H. influenzae* FtsK [FtsK(Hi)]²⁰⁾, and *E. coli* FtsK [FtsK(Ec)]²¹⁾. ATP binding motifs are boxed. In panels B and C, identical amino acids and conserved changes are indicated by asterisks and by dots, respectively; dashes indicate gaps included to optimize the alignment.

Central region
 CdrA(Hp) VSVPGWDINHKEVCFEIGEAQNHTLICGRSGSGKSNFLHVLQNLFYAPNEVQLFLL 216
 SpoIIIE(Cb) LTLALGKDIGGHPVIVDLAKMP-HLLVAGTTGSGKSVSLNAMLSSLKYPQQLRLILI 467
 SpoIIIE(Bs) VLIGLGRNIGSGLAEVLAELNKMPP-HLLVAGTGSKSVGVNAGIITSLMRAKPHVKMMI 498
 Ftsk(Hi) LPIALGKDISGKPIVDLAKMP-HLLVAGTGSKSVGVNMTLSLLYRVQPEDVRFIMI 222
 Ftsk(Ec) LTVVLGKDIAGEPVDLAKMP-HLLVAGTTGSGKSVGVNAMILSMLYKAQPEDVRFIMI 1022
 CdrA(Hp) DYKEGVEFNAYTNPITILEHARLVSVAS 243
 SpoIIIE(Cb) DPKM-LELSVYEG---IPHL-LTPVVT 489
 SpoIIIE(Bs) DPKM-VELNVYNG---IPHL-LAPVVT 520
 Ftsk(Hi) DPKV-VELSVYND---IPHL-LTPVVT 244
 Ftsk(Ec) DPKM-LELSVYEG---IPHL-LTEVVT 1044
 C-terminal region
 CdrA(Hp) EMPRLIVVIDEFQVLFSDSTTKEKERVEAYLTNLIKGRSYGVHILATQTMRGADINKS 341
 SpoIIIE(Cb) ELPQLVVIDEFADLMMVVGK---VETLIVRLAKARAAGIHLIFATQRPVSDVITGL 609
 SpoIIIE(Bs) ELPYIVVIDEADLMMVASSD---VEDSITRLSQMARAGIHLIATQRPVSDVITGV 626
 Ftsk(Hi) KLSYIVVIDEADLMMVAGKQ---IEELIARLAQKARAIGIHLIATQRPVSDVITGL 367
 Ftsk(Ec) KEPYIVVIDEADLMMTVGK---VEELIARLAQKARAIGIHLIATQRPVSDVITGL 1167
 CdrA(Hp) LMAQIANRIA 351
 SpoIIIE(Cb) IKANIPTRVA 619
 SpoIIIE(Bs) IKANIPSRIA 636
 Ftsk(Hi) IKANIPSRIA 377
 Ftsk(Ec) IKANIPTRVA 1178

C末領域では83.6%一致したが、N末領域(1-135アミノ酸)では15%以下の一致率であった。さらに、HP0066のN末の174アミノ酸は本遺伝子上には認められなかった (Fig. 2B)。塩基配列の相同性でもN末領域で49.4%、中心からC末領域では88.2%であり、

両株間においてN末領域に多型性が存在することが示された。

本遺伝子蛋白CdrAは *Coxiella burnetii* (778 aa)¹⁸⁾, *Bacillus subtilis* (787 aa)¹⁹⁾, *Haemophilus influenzae* (529 aa)²⁰⁾, *Escherichia coli* (1329 aa)²¹⁾ のFtsK/SpoIIIE

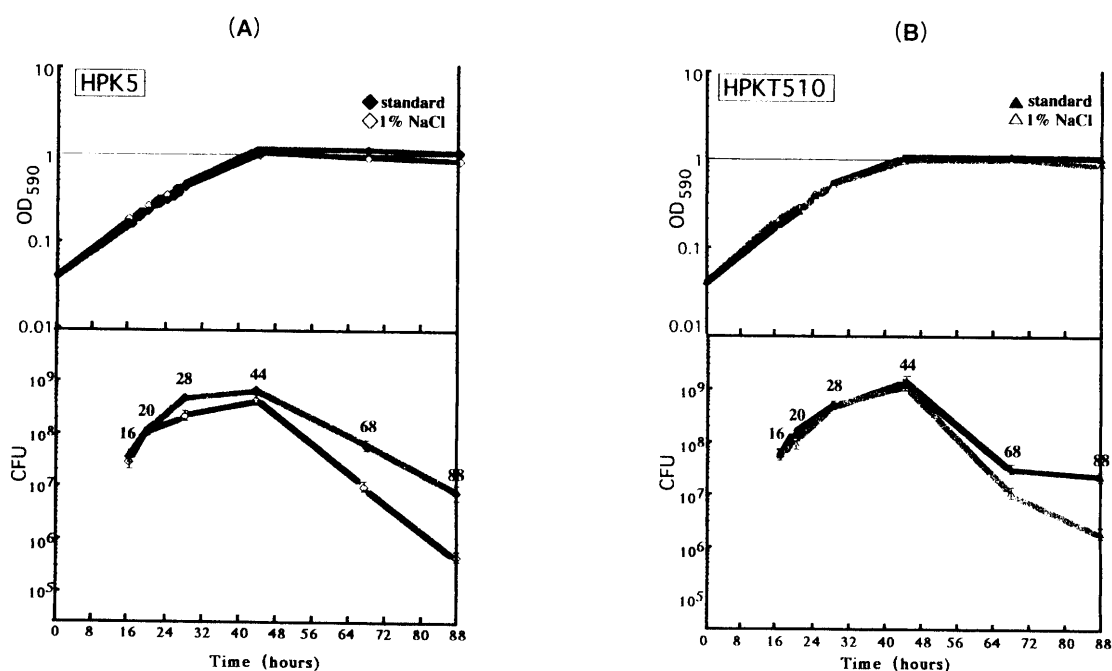


Fig. 3 : Growth curves and CFUs of HPK5 (A) and HPKT510 (B). Bacteria were grown in brucella medium at 37°C under microaerobic conditions, and the OD₅₉₀ values and CFUs were measured. ◆, HPK5 in 0.5% NaCl; ◇, HPK5 in 1% NaCl; ▲, HPKT510 in 0.5% NaCl; △, HPKT510 in 1% NaCl.

family 蛋白にも部分的に相同性を示した。CdrAはこれらの中では一番小さいが、中心からC末領域ではこれらの蛋白に対して50-57%の相同性を示した (Fig. 2C)。また、これらの蛋白に共通して存在するN末の疎水性領域は認められなかった。

cdrA 遺伝子の存在：HPK5と他 *H. pylori* 2株 (CPY3401, CPY2052) の3株からDNAを抽出し、*Hind*III と *Bgl*II-*Bam*HI制限酵素処理後、電気泳動し *cdrA* をプローブにサザンハイブリダイゼーションを実施した結果、サイズは株間で若干異なるが全てにシャープな1本のバンドを認めた。以上より、本遺伝子は他株でも1コピー存在し、多型性が存在すると考えられた (data not shown)。

多型性の解析：プライマーを設定しPCRをHPK5, CPY3401, CPY2052そしてCPY1113の4株について実施した結果、ATP結合領域を含む中心部では株間にサイズの差異は認めなかったが、N末を含む領域では、他の3株ではHPK5より大きなバンドが得られ、3株間でもサイズに差異を認めた。また、3株のPCR産物は *Tth*111Iで消化出来なかった。以上より、特に *cdrA* のN末領域には株間による多型性が存在していると考えられた (data not shown)。

野生株 (HPK5) と変異株 (HPKT510) の増殖特性：HPK5とHPKT510の長期培養に標準 (0.5% NaCl) および高塩濃度 (1% NaCl) 培養液を使用した。 *cdrA* は *E. coli ftsK* に部分的に相同性を示し、大腸菌 *ftsK* 破壊株は0.5% NaClでは分裂不完全な繊維状多核細胞となるが1% NaClでは、正常な細胞形態を呈することが報告されている²¹⁾。ゆえに、2つの条件下で増殖特性を調べた結果、0.04 (OD₅₉₀) から開始し44時間後には条件に関係無く1.0 (定常期) になった (Fig. 3)。しかし、28時間 (対数増殖期後期) と44時間 (定常期初期) の高塩濃度下および44時間の標準液下のHPK5のCFUは同様な増殖曲線を示している同時期のHPKT510よりも有意に低値を示した。これに一致して、44時間の高塩濃度下HPK5は多数の分裂不完全な繊維状多核細胞を形成していたが、HPKT510は短桿菌状であった (Fig. 4A)。しかしながら、繊維状多核細胞の核酸分布などは正常と変化なかった。以上より、 *cdrA* はDNAの複製/分離が終了したのちに、細胞分裂において抑制的に機能していると考えられた。

さらに、正常な *cdrA* 遺伝子を再度相同遺伝子組み換え法によりHPKT510に戻し、HPKT510Rを作製し、

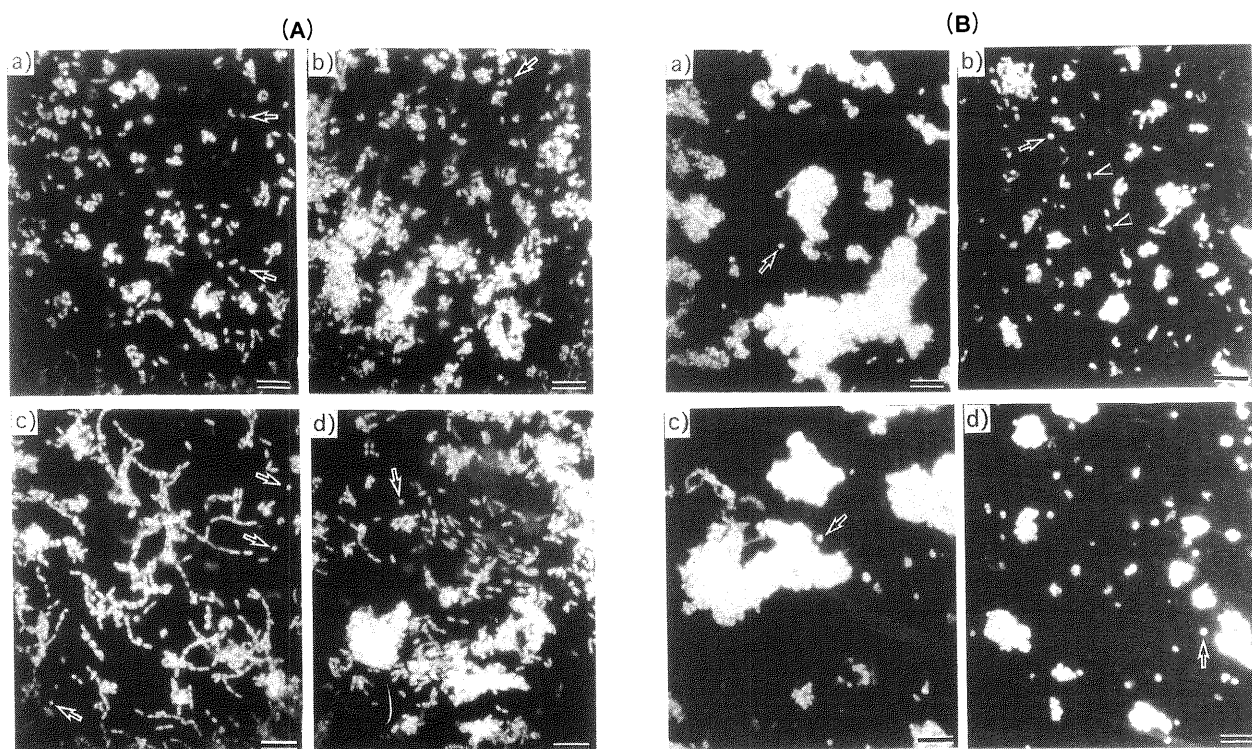


Fig. 4 : Morphology of HPK5 and HPKT510 from the cultures represented in Fig. 3 at 44 h (A) and 88 h (B) as determined by DAPI staining. Arrows indicated coccoid forms, and arrowheads indicate short rods. For both panels, segments are as follows: a), HPK5 in 0.5% NaCl; b), HPKT510 in 0.5% NaCl; c), HPK5 in 1% NaCl; d), HPKT510 in 1% NaCl. Bars, 10 μ m.

確認実験を行なった結果、HPKT510RはHPK5と同様な形態変化を示した。以上より、これらの特性は*cdrA*遺伝子によるものであると考えられた。

また、両株の定常期以降のCFUはHPK5がHPKT510よりも急速に低下し (Fig. 3), 136時間で検出できなかったが、HPKT510では 10^7 のCFUを認めた (data not shown)。88時間 (定常期後期) の形態を観察すると、HPK5の多くは球状体を形成していたが、HPKT510は多くの短桿菌を認めた (Fig. 4B)。以上より、*cdrA*を有する野生株は定常期以降は、球状体を形成し急速にCFUが減少するが、*cdrA*破壊株は短桿菌状で長期間生存可能であった。上記全ての実験は、3回繰り返し実施したが、同様の結果であった。

「考 察」

今回、胃潰瘍患者由来の臨床分離株HPK5を用いてゲノムライブラリーを作製し、クローニング後、細胞分裂に関与する新規遺伝子*cdrA*を明らかにし

た。本遺伝子の機能はDNAの複製や分離には影響せず、その後の細胞分裂過程において抑制的に機能すると考えられた。また、本遺伝子は他株にも1コピー存在し、株間の多型性が認められた。この株間によるN末領域の多型性がその株の細胞分裂、増殖およびviabilityに影響しており、人胃内でも感染した本菌の細胞動態が定着、疾患との因果関係および除菌効果にも影響している可能性が示唆される。さらに、株間の遺伝子タイピングに本遺伝子の多型性は利用可能であるかもしれない。

*H. pylori*の球状体形成については、「生きてはいるが培養不可能」説²²⁻²⁵⁾と「死の形態」説²⁶⁾などの議論がある。今回、野生株に比べて*cdrA*破壊株は球状体形成が遅く、CFUも長期観察できた。今後、本遺伝子のさらなる解析が球状体形成とviabilityの関係において、問題解決の糸口となるかもしれない。

本遺伝子は*H. pylori*固有の遺伝子であり、さらなる詳細な分子メカニズムの解析は細菌の分裂機構を理解する新たな手がかりを与えるとともに、本菌に選択性の高い新規抗菌剤の開発などにも寄与するこ

とが期待されると思われた。

「謝 辞」

本研究に関して、プラスミドを供与して頂きました、Dr. H. Mobley., Dr. D. E. Berg.に感謝いたしますとともに、当微生物学講座の関係緒先生方に深謝いたします。

「参考文献」

- 1) Blaser, M. J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. *Trends Microbiol.* 1993;**1**:255-260.
- 2) Marshall, B.J., and J.R. Warren. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;**1**:1311-1315.
- 3) Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelmann, and G. D. Friedman. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994;**330**:1267-1271.
- 4) Tomb, J.F., O. White, A. R. Kerivage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Eide, M. C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* *Nature* 1997;**388**:539-547.
- 5) Ge, Z., and D. E. Taylor. Sequencing, expression, and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* *ftsH* gene encoding a protein homologous to members of a novel putative ATPase family. *J Bacteriol* 1996;**178**:6151-6157.
- 6) Donachie, W. D. The cell cycle of *Escherichia coli*. *Ann Rev Microbiol* 1993;**47**:199-230.
- 7) Begg, K. J., S. J. Dewar, and W. D. Donachie. A new *Escherichia coli* division gene, *ftsK*. *J Bacteriol.* 1995;**177**:6211-6222.
- 8) Errington, J. *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev* 1993;**57**:1-33.
- 9) Wu, L. J., and J. Errington. *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* 1994;**264**:572-575.
- 10) Mizote, T., H. Yoshiyama, and T. Nakazawa. Urease-independent chemotactic responses to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1997;**65**:1519-1521.
- 11) Hiraga, S., H. Niki, T. Ogura, C. Ichinose, H. Mori, B. Ezaki, and A. Jaffe. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* 1989;**171**:1496-1505.
- 12) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- 13) Hu, L. T., P. A. Foxall, R. Russell, and H. L. T. Mobley. Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by *ureA* and *ureB*. *Infect Immun* 1992 **60**:2657-2666.
- 14) Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;**74**:5463-5467.
- 15) Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:5182-5186.
- 16) Nakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Ebina, and A. Nakazawa. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J Biol Chem* 1983;**248**:2923-2928.
- 17) Tsuda, M., M. Karita, M. G. Morshed, K. Okita, and T. Nakazawa. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 1994;**62**:3586-3589.
- 18) Oswald, W., and D. Thiele. A sporulation gene in

- Coxiella burnetii*? *J Vet Med Sci* 1993;**40**:366-370.
- 19) Wu, L.J., and J. Errington. *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* 1994;**264**:572-575.
- 20) Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, R.A. Clayton, E.F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C.J. Bult, J. F. Tomb, B.A. Dougherty, J.M. Merrick, K. Mckenney, G. Sutton, W. Fitzugh, C.A. Fields, J.D. Gocayne, J.D. Scott, R. Shirley, L.I. Liu, A. Glodek, J.M. Kelley, J.F. Weidman, C.A. Phillips, T. Spriggst, E. Hedblom, M. D. Cotton, T.R. Utterback, M.C. Hanna, D.T. Nguyen, D. M. Saudek, R.C. Brandon, L.D. Fine, J.L. Fritchman, J. L. Fuhrmann, N.S.M. Geoghagen, C.L. Gnehm, L.A. Mcdonald, K.V. Small, C.M. Fraser, H.O. Smith, and J. C. Venter. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995;**269**:496-512.
- 21) Begg, K.J., S.J. Dewar, and W.D. Donachie. A new *Escherichia coli* division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* 1995;**177**:6211-6222.
- 22) Andersen, A.P., D.A. Elliott, M. Lawson, P. Barland, V. B. Hatcher, and E.G. Puszkin. Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:2918-2922.
- 23) Benaissa, M., P. Babin, N. Quellard, L. Pezenec, Y. Cenatiempo, and J.L. Fauchere. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun* 1996;**64**:2331-2335.
- 24) Bode, G., F. Mauch, and P. Malfertheiner. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 1993;**111**:483-490.
- 25) Cellini, L.N. Allocati, E.D. Campi, and B. Dainelli. *Helicobacter pylori*: A fickle germ. *Microbiol. Immunol* 1994;**38**:25-30.
- 26) Kusters, J.G., M.M. Gerrits, J.A.G. Van Strijp, and C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls. Coccoid forms of *Helico-bacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* 1997;**65**:3672-3679.
- 27) Karita, M., T. Kouchiyama, K. Okita, and T. Nakazawa. New small animal model for human gastric *Helico-bacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol* 1991;**86**:1596-1603.

TABLE I. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Genotype or characteristics ^a	Source or reference
<i>H. pylori</i>		
HPK5	Wild type	Gastric ulcer(27)
CPY2052	Wild type	Gastric ulcer(27)
CPY3401	Wild type	Gastric ulcer(27)
CPY1113	Wild type	Duodenal ulcer
HPKT510	HPK5 derivative, <i>xylE-kan</i> in <i>cdrA</i> ; Km ^r	This study
HPKT5L2	HPK5 derivative, <i>xylE-kan</i> in <i>ureF</i> ; Km ^r	This study
HPKT510R	HPKT510 derivative, <i>cat</i> in <i>ureF</i> , intact <i>cdrA</i> ; C m ^r	This study
<i>E. coli</i>		
NM554	MC1061 <i>recA13</i>	Stratagene
DH5 α	F- ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	GIBCO-BRL
XL1-Blue	<i>hsdR17 supE44 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac/F'</i> (<i>proAB⁺ lac^r lacZ</i> Δ M15::Tn10(Tet ^r))	Stratagene
JM105	<i>endA1, supE, sbcB15, thi, rpsL, Δ(lac-proAB) /F'</i> [<i>traD36, proAB⁺, lac^r, lacZ</i> Δ M15]	Pharmacia
Plasmids		
pMT5047	SuperCos1 derivative excluding the 2160-bp <i>NruI</i> fragment; Ap ^r	This study
pHP802	8-kb fragment with the urease gene cluster of strain UMAB41, pACYC184 replicon; Ap ^r	(13)
pHPT177	12.8-kb fragment with the urease gene cluster of HPK5, pBR322 replicon; Ap ^r	This study
pS4-1	3.5-kb fragment with the <i>cdrA</i> , pBluescript II KS(-) replicon; Ap ^r	This study
pMT5074	<i>xylE-kan</i> (3.13 kb), pBR322 replicon; Ap ^r , Km ^r	This study
pTA10	<i>xylE-kan</i> (3.13 kb) in <i>cdrA</i> of pS4-1; Ap ^r , Km ^r	This study
p177L2	<i>xylE-kan</i> (3.13 kb) in <i>ureF</i> of pHPT177; Ap ^r , Km ^r	This study
pTA40	<i>cat</i> (1.1 kb) in <i>ureF</i> of pHPT177; Ap ^r , Cm ^r	This study
pBSC103	<i>cat</i> (1.2 kb) on the pBluescript; Ap ^r , Cm ^r	D. E. Berg
pBluescript	3.2-kb phagemid vector; Ap ^r	Stratagene
pBluescript II KS(-)	2.9-kb cloning vector; Ap ^r	Stratagene
pBR322	4.4-kb cloning vector, ColE1 replicon; Ap ^r , Tc ^r	Takara

^a Abbreviations, Ap^r, ampicillin resistance; Cm^r, chloramphenicol resistance; Tc^r, tetracycline resistance; Km^r, kanamycin resistance.

Nucleotide sequence and characterization of *cdrA*, a cell division-related gene of *Helicobacter pylori*

Hiroaki TAKEUCHI

*Department of Microbiology,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Cell division-related gene *cdrA* in *Helicobacter pylori* HPK5 was identified. The putative gene products, CdrA, is a 367-amino-acid polypeptide that exhibited a high level of homology to conserved hypothetical ATP-binding protein HP0066 of *H. pylori* 26695, except in the N-terminal region, and showed some similarity to the FtsK/SpoIIIE family proteins. We isolated a *cdrA*-disrupted mutant by allelic exchange mutagenesis. A repressive role for CdrA on cell division was suggested by the observations that the wild-type strain formed filamentous cells in a high-salt level medium at early stationary phase, while a *cdrA*-disrupted mutant did not show such an abnormality. In addition, the wild-type strain adopted coccoid forms in the stationary phase, whereas the *cdrA*-disrupted mutant remained mostly as short rods. Furthermore, the *cdrA*-disrupted mutant regained the filamentation phenotype when the intact *cdrA* gene was introduced by allelic exchange. Taken together, these observations show that the *cdrA* gene plays an important role in the cell growth on *H. pylori*.

(Journal of Bacteriology. 180:5263-5268. 1998.)