

## 浅川賞受賞講演

### 細菌感染病理に関わる細菌毒素の作用機序についての研究

堀口 安彦 (大阪大学・微生物病研究所・分子細菌学分野)

#### The molecular mode of action of bacterial toxins

Yasuhiko Horiguchi (Dept. Molecular Bacteriology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

演者らの研究グループは、細菌毒素を「宿主細胞や組織の機能に種々の影響を及ぼす細菌由来因子で、宿主体内を移行して標的細胞に結合し、毒性を発揮するのに必要な全ての機能を分子内に包含するもの」と定義している。細菌毒素の作用メカニズムを分子レベルで解明することによって細菌感染における病態発症に関する知見が得られることは言うに及ばず、新規な毒素機能の発見が契機となって一般の生命科学分野に研究の新領域を提供した例も数多く存在する。感染局所とは異なる遠隔組織に極微量で毒性を発揮する「細菌毒素」は、原因細菌の宿主内における動態とは関係のない、一般症状で見られる炎症や発熱とは全く異なる特異病態を引き起こす。すなわち上述の如く定義される「毒素」は、「毒素」単独で病気を起こしうるのである。演者はこのような細菌毒素に魅了され、まさしく「犬も歩けば棒に当たる」を地で行くように、細菌感染の病態を形成する細菌毒素の機能や構造を追い続けてきた。今回、栄えある浅川賞を頂戴し、また講演の機会をいただいたので、その研究成果の概要を紹介したい。

#### 【ウエルシュ菌エンテロトキシン】

ウエルシュ菌エンテロトキシン (CPE) は本菌食中毒の原因因子として 1970 年初頭に同定された。生化学的解析研究の結果から、本毒素は膜孔形成毒素のひとつと考えられてきたが、詳細な分子構造や作用機序は不明であった。当時は病原細菌の遺伝子操作が普及しておらず、細菌性毒素タンパク質の解析は生化学的手法に拠っていた。つまり毒素の作用機序解析には、毒素タンパク質の機能ドメインを生化学的に単離して個々の作用を調べる方法が有効であったが、CPE の断片化の成功報告はなく、このことから CPE にはドメイン構造は存在せず、標的細胞の細胞膜脂質に直接貫入して縫い針が風船を割るように細胞を破壊すると考えられてきた。一方、演者は、CPE に耐性の培養細胞株が多数存在すること、感受性細胞との結合実験のデータは CPE の受容体の存在を示していること (1)、CPE の細胞への結合は阻害しないが細胞毒性を部分的に阻害するモノクローナル抗体を作出できたこと (2) から、CPE には結合ステップと作用ステップがあることを示唆してきた。さらに 2-ニトロ 5-チオシアノ安息香酸を用いた化学修飾により CPE の C 末端側断片 (これはのちに C-CPE と呼ばれるようになる) の分離に成功し、この断片が受容体への結合ドメインそのものであることを証明し (3)、断片を利用した発現クローニングをさらに展開して CPE の受容体を同定した (4)。この受容体は、のちに京都大学の月田承一郎教授 (2005 年 逝去) のグループが同定したタイトジャンクション (TJ) の構成要素であるクローディン (Cldn) と同一であることが判明した。そこで月田グループとの共同研究のもと、CPE の受容体結合断片 (C-CPE) をツールに用いて Cldn の機能を解析した。C-CPE 自体

に細胞毒性はないが、これを作用させた細胞の TJ は速やかに消失し、同時に TJ のバリア機能も消失した (5)。この結果は C-CPE が結合する Cldn が、TJ の構造形成と機能の両方で役割を果たしていることを示している。この後、C-CPE は細胞間接着を穏やかに破壊するツールとして、薬剤送達やがん治療の研究分野で繰り返し使用されるようになった。

Cldn には 20 種類以上のサブタイプが存在し、その一部のみが CPE 受容体として機能する。そこで CPE の Cldn 認識機構の解析を試みた。その結果、CPE は Cldn の二番目の細胞外ループの C 末端側領域を認識すること、さらにその領域において等電点の高い Cldn のみが CPE の受容体として機能することが判明した。CPE の受容体結合領域には負に荷電したクレフトが存在することから、CPE は静電的引力を介して Cldn との相互作用を果たしていると考えられた (6, 7)。

先述したように、CPE は一般に膜孔形成毒素と考えられてきたが、それを裏付ける膜孔の顕微鏡観察や毒素タンパク質の構造に関する情報は皆無であった。演者らは CPE 全分子の結晶構造解析に成功し、CPE のドメイン構造が多数の点において、グラム陽性菌のコレステロール依存性細胞溶解毒 (CDC) などの  $\beta$  型膜孔形成毒のドメイン構造と類似することを見出した。これを根拠に、すでに解明されている CDC の作用機序から類推して CPE が  $\beta$  型膜孔形成毒素であると結論し、孔を形成する膜貫入ドメインの領域を決定した (8)。

#### 【ボルデテラ壊死毒とブタ萎縮性鼻炎】

ボルデテラ壊死毒 (DNT) はボルデテラ属に分類される百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌が共通して産生するタンパク毒素である。気管支敗血症菌の DNT は、本菌のブタ感染症である萎縮性鼻炎で見られる鼻梁骨の変形に関与すると考えられてきたが、DNT の生物活性がきわめて不安定なため毒素精製の成功例がなく、その実体は全く不明であった。先述のように、当時は病原細菌の遺伝子クローニングの技術は充分ではなかった。演者は DNT の生物活性を安定化する条件を探索し、その条件下で材料を取り扱うことにより DNT の精製に初めて成功した (9, 10)。得られた精製 DNT 標品を使用してさらに研究を進め、DNT の感受性細胞として非癌性の骨芽細胞株 MC3T3-E1 を見出した。DNT は本細胞の骨芽細胞への分化を (細胞を殺滅せずに) 阻害することを見出し (11)、この分化抑制作用による骨形成阻害が鼻梁骨の変形の本態であると結論した (12-14)。さらに、DNT は標的細胞内の Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパク質を脱アミド化あるいはポリアミン化して恒常活性化し、細胞内の Rho 依存性シグナル伝達系を恒常的に刺激することによって毒性を発揮することを明らかにした (15-18)。Rho 依存

性シグナル伝達は造骨系細胞を含めた多種類の細胞の分化の進行を負に制御することが知られている。

さらに、DNTの細胞内侵入経路についても以下の知見を得た。DNTはN末端側30残基の受容体結合ドメインが受容体に結合し、ダイナミン依存性の小胞取り込みによって細胞内に侵入する。小胞内で毒素のArg<sup>44</sup>-Glu<sup>45</sup>の間でFurin様プロテアーゼによる開裂を受け、これをきっかけにC末端側約300残基の酵素活性ドメインが小胞膜を通過して細胞質内に侵入する(19-22)。また後述のように、DNTの特異受容体としてT型電位依存性カルシウムチャンネルCav3.1(およびCav3.2)を同定した(23)。

気管支敗血症菌の単独感染で起こるブタ萎縮性鼻炎は、パストレラ(*Pasteurella multocida*)の混合感染でさらに増悪し、著しく骨病変が進行する。この際、パストレラ毒素(PMT)が増悪因子として知られていたが、その作用本態は不明であった。演者らは本毒素の細胞質内ドメインの結晶構造解析に成功し、そのサブドメインの毒素活性における役割を解明した。さらに、Cys-His-Aspから成るシステインプロテアーゼ様の活性中心を見出した(24, 25)。その後、ドイツのProf. Aktoriesの研究グループにより、PMTは三量体GTP結合タンパク質Gqを標的にする、Cys-His-Aspを活性中心とする脱アミド化酵素であることが明らかにされた。

#### 【百日咳の病態に関与する毒素・病原因子】

ヒトの百日咳は百日咳菌あるいはパラ百日咳菌の感染によって起こるが、パラ百日咳菌の感染は百日咳菌感染に比べて穏やかと報告されている。また両菌と同じボルデテラ属に分類される気管支敗血症菌は広く哺乳動物に感染して、比較的緩徐なあるいは慢性経過をたどる気道感染を起こす。これらの三菌種の産生する毒素や付着因子の多くは共通でそれぞれきわめて相同性が高く、機能的に同一であると考えられてきた。これに対し演者らは、三菌種が産生するアデニル酸サイクラーゼ毒素(ACT)の毒性が、菌種ごとに保存されたアミノ酸置換(百日咳菌はPhe<sup>375</sup>、その他の菌種はSer<sup>375</sup>)によって異なることを発見した。Ser<sup>375</sup>のACTは標的細胞への侵入後にリン酸化を受け、さらに真核細胞のリン酸化シグナル調節因子である14-3-3によって無毒化された。さらに動物感染実験で、Phe<sup>375</sup>ACTが上皮細胞を侵襲する事を示し、百日咳菌の急性で激しい感染経過の原因のひとつにACTの機能的差違があることを示した(26)。

百日咳菌は気管支敗血症菌と同等のDNTを産生する。そこで百日咳におけるDNTの役割を、その受容体同定を通じて検討した。その結果、DNTの特異受容体としてT型電位依存性カルシウムチャンネルのCav3.1を同定することができた。Cav3.1は中枢神経組織で高度に発現しているため、神経系に対するDNTの作用を調べたところ、DNTは神経系の培養細胞に確かに作用し、さらに脳内接種によって、百日咳脳症と同様の神経症状をマウスに引き起こすことを見出した(23)。このことは百日咳の併発症である脳症の細菌側要因のひとつがDNTであることを強く示唆している。

百日咳に代表されるボルデテラ感染には、宿主の発咳という共通の特異病態がある。演者らは発咳のような神経反射には原因菌の液性因子(すなわち細菌毒素)が関与しているとの予想の下、この咳発症機序の解明を試みた。この目的のため、ヒトにしか自然感染しない百日咳菌に代わるモデル細菌として、広範な宿主域を持つ気管支敗血症菌を用いて、感染ラットによる咳モデルを確立し、本菌の抗σ因子のBspRが咳発作に関与することを明らかにした(27)。また本研究の過程で、百日咳菌と気管支敗血症菌は異なるメカニズムで動物に咳を誘導する可能性を示す結果が得られたため、さらに種々の汎用実験動物を用

いて百日咳菌の感染実験を繰り返し検討した結果、C57BL/6系統のマウスが百日咳菌感染あるいは菌体破砕液投与によって特異的に咳発作を起こすことを発見した。このマウス発咳モデルを用いて咳発作の発症機構を解析したところ、百日咳菌の産生する百日咳毒素、エンドトキシン(LOS)およびオートトランスポートタンパク質のVag8が協調して作用して、感覚神経のブラジキニン-TRPV1イオンチャンネルの経路を易活性化し、その結果、感覚神経を容易に興奮させて咳発作応答を惹起することを明らかにした(28)。さらに百日咳毒素を産生しないパラ百日咳菌も宿主に咳発作を起こすことから、パラ百日咳菌に特有の咳原因因子を探索したところ、演者らがDATと名付けた新しい細菌毒素を同定することができた。本講演では、DATの作用機序についても言及したい。

#### 【謝辞】

これまで、様々な時期、様々な方面で演者を支えてくださった全ての諸先生・諸先輩方、共同研究者の方々、研究室仲間、日本細菌学会の皆様にご感謝いたします。とりわけ、演者が研究の世界に踏み込む機会を授けてくださった当時の大阪府立大学農学部獣医学科の阪口玄二先生(当時教授)、小崎俊司先生(当時助手)、一介の研究生に気儘勝手に研究することをお許しくくださった大阪大学微生物病研究所の松田守弘先生(当時教授)に深く感謝いたします。

#### 【引用文献】

1. Horiguchi, et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 28:131-135, 1985.
2. Horiguchi, et al., *Infect. Immun.*, 52:31-35, 1986.
3. Horiguchi, et al., *Infect. Immun.*, 55:2912-2915, 1987.
4. Katahira, et al., *J. Cell Biol.*, 136:1239-1247, 1997.
5. Sonoda, et al., *J Cell Biol.*, 147:195-204, 1999.
6. Fujita, et al., *FEBS Lett.*, 476:258-261, 2000.
7. Kimura, et al., *J. Biol. Chem.*, 285:401-408, 2010.
8. Kitadokoro, et al., *J. Biol. Chem.*, 286:19549-19555, 2011.
9. Horiguchi, et al., *Microb. Pathog.* 6:361-368, 1989.
10. Horiguchi, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 66:39-43, 1990.
11. Horiguchi, et al., *Infect. Immun.*, 59:1112-1116, 1991.
12. Horiguchi, et al., *Infect. Immun.*, 61:3611-3615, 1993.
13. Horiguchi, et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 120:19-22, 1994.
14. Horiguchi, et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 12:29-32, 1995.
15. Horiguchi, et al., *J. Cell Sci.* 108: 3243-3251, 1995.
16. Horiguchi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:11623-11626, 1997.
17. Masuda, et al., *EMBO J.*, 19:521-530, 2000.
18. Masuda, et al., *Infect. Immun.* 70:998-1001, 2002.
19. Matsuzawa, et al., *J. Biol. Chem.*, 279:2866-2872, 2004.
20. Fukui-Miyazaki, et al., *Microbiol. Immunol.*, 55:154-159, 2011.
21. Kashimoto, et al., *Infect. Immun.*, 67:3727-3732, 1999.
22. Matsuzawa, et al., *Infect. Immun.*, 70:3427-3432, 2002.
23. Teruya, et al., *mBio*, 11:e03146-19, 2020.
24. Kitadokoro, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:5139-5144, 2007.
25. Kamitani, et al., *J. Biol. Chem.*, 285:25467-25475, 2010.
26. Fukui-Miyazaki, et al., *mBio*. 9:49-15, 2018.
27. Nakamura, et al., *mSphere*. 4:S119-12, 2019.
28. Hiramatsu, et al., *mBio*. 13:e03197-21, 2022.

## SL

## 特別講演

座長：飯田 哲也（大阪大学）

## Special Lecture

Chair: Tetsuya Iida (Osaka University)

## SL

**Cell density-dependent death triggered by viral palindromic DNA sequences**

William P. Robins, Bradley T. Meader, Jonida Toska, ○John J. Mekalanos (Dept. Microbiol., Harvard Medical Sch.)

Defense systems that recognize viruses have provided not only the tools of molecular biology but also important insights into the mechanisms that can induce immunity to these infectious agents. Several systems that trigger cell death upon viral infection have been previously recognized but the signals that activate these abortive infection systems remain largely unknown. All contemporary pathogenic *Vibrio cholerae* strains have acquired two chromosomal islands termed the *Vibrio* 7th Pandemic Islands I (VSP-1) and II (VSP-2). Gene products encoded by both islands have recently been shown to be capable of restricting phage growth. These conclusions have been largely reached based on the over-expression of VSP-1 or VSP-2 genes in the surrogate bacterial species *E. coli*. Importantly, the signals that activate any anti-phage defense system in *V. cholerae* remain poorly defined.

*V. cholerae* has been documented to be subject to phage predation that correlates with the collapse of cholera epidemics and this observation is postulated to be a factor in the emergence of the 7th pandemic clade. These observations have prompted studies on phage resistance mechanisms in *V. cholerae*, as well as phage-encoded countermeasures that block some anti-phage systems. For example, quorum regulation mediated by autoinducers, molecules that accumulate typically under high-density growth conditions, was reported to promote phage resistance in 7th pandemic *V. cholerae* strains by an unclear mechanism. We recently characterized one anti-phage system that we found was responsible for triggering cell-density dependent death (CDD) of bacterial cells in response to the presence of plasmid-encode phage sequences. The key components of the CDD system include a quorum-regulated components DdmABC and the host factor PriA. Our analysis indicates that the phage signals that trigger CDD were palindromic DNA sequences that are predicted to form stem-loop hairpin structures from single-stranded DNA during stalled replication. Our results further suggest that palindromic DNA and other agents that generate damaged DNA can trigger DdmABC/PriA activation and cell death likely through activation of a nuclease domain present in the DdmA protein and degradation of the two chromosomes of *V. cholerae*. Thus, any infectious process that results in damaged DNA, particularly during DNA replication can in theory trigger cell death through the DdmABC/PriA abortive infection system. We conclude that the emergence of the 7th pandemic clone was likely driven by the acquisition of anti-phage systems encoded by VSP-1 and VSP-2. This provides a strong rationale for how the 7th pandemic El Tor clade became the dominant pandemic cause of cholera worldwide.

## PS1

### 最先端手法を用いた微生物・感染症研究

コンピーナー：飯田 哲也 (大阪大学)  
宮田 真人 (大阪公立大学)  
松岡 悠美 (大阪大学)

### Research on microorganisms and infectious diseases using cutting-edge approaches

Conveners: Tetsuya Iida (Osaka University)  
Makoto Miyata (Osaka Metropolitan University)  
Yumi Matsuoka (Osaka University)

微生物・感染症研究の領域で、最先端の解析方法やアプローチを用いて目覚ましい研究がされている先生方をお招きしご講演いただく。大阪公立大の宮田先生にはスピロプラズマ遊泳能から示唆される細胞運動の進化的起源について合成細菌を用いて行った解析についてお話しいただく。筑波大の野村先生には最新のイメージング解析技術を駆使した細菌の集団性と社会性についての研究を、和歌山県立医大の佐藤先生にはヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の感染モデル系への応用についてご紹介いただく。また、大阪大の松岡先生には全ゲノム解析・全メチル化解析によって病原細菌の環境適応メカニズムを解析した成績をお話しいただく。いずれもエキサイティングな研究であり、参加者にとって大きな刺激になるものと期待される。最先端手法を用いたサイエンスを楽しんでいただければ幸いです。

## PS1-1

### 合成細菌 JCVI-syn3B におけるスピロプラズマ遊泳能から示唆される細胞運動の進化的起源

木山 花<sup>1</sup>, 柿澤 茂行<sup>2</sup>, 笹嶋 雄也<sup>1</sup>, 田原 悠平<sup>1</sup>, 高橋 大地<sup>1</sup>, ○宮田 真人<sup>1</sup> (1阪公大・院理, 2産総研・生物プロセス)

### Origin of motility suggested from *Spiroplasma* swimming reconstituted in synthetic bacterium

Hana Kiyama<sup>1</sup>, Shigeyuki Kakizawa<sup>2</sup>, Yuya Sasajima<sup>1</sup>, Yu-hei Tahara<sup>1</sup>, Daichi Takahashi<sup>1</sup>, ○Makoto Miyata<sup>1</sup> (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ., 2Bio. Res. Inst., AIST)

Motility is one of the most important features of life, but its evolutionary origin remains unknown. In this study, we focused on *Spiroplasma*, commensal, or parasitic bacteria for plants and arthropods (Kiyama H et. al. 2022 SciAdv). They swim by switching the helicity of a ribbon-like cytoskeleton that comprises six proteins, each of which evolved from a nucleosidase and bacterial actin called MreB. We expressed these proteins in a synthetic, non-motile minimal bacterium, JCVI-syn3B, whose reduced genome was computer-designed based on *Mycoplasma mycoides* genome, and chemically synthesized. The synthetic bacterium exhibited swimming motility with features characteristic of *Spiroplasma* swimming. Moreover, combinations of *Spiroplasma* MreBs 4-5 and 1-5, produced a helical cell shape and swimming. These results suggest that the swimming originated evolutionarily from the differentiation and coupling of bacterial actins. This scenario can be applied to other motility systems.

## PS1-2

### 細菌の集団性と社会性

○野村 暢彦<sup>1,2</sup>, 豊福 雅典<sup>1,2</sup>, 尾花 望<sup>2,3</sup> (1筑波大・生命環境系, 2微生物サステナビリティ研究センター, 3筑波大・医学医療系, 4トランスポーター医学研究センター)

### Biofilm and Sociomicrobiology

○Nobuhiko Nomura<sup>1,2</sup>, Masanori Toyofuku<sup>1,2</sup>, Nozomu Obana<sup>2,3</sup> (1Faculty Life Environ. Sciences, Univ. Tsukuba, 2MiCS, 3Faculty Med., Univ. Tsukuba, 4Transborder Med. Res. Cen., Univ. Tsukuba)

微生物は健康・食・環境に深く関わっており、それらの微生物制御は人類の重要な課題でありそのため微生物の理解が益々重要になってきている。近年、微生物は、会話し、群れて集団 (バイオフィーム) になり、バイオフィーム内では微生物はシグナルを介して互いにコミュニケーションし微生物社会を形成していることが明らかになってきた (1)。我々は、今注目されているエクソソームと同様に、微生物も細胞外膜小胞 (MV) により、同種のみならず異種・異属の細菌細胞間でシグナルやさらに遺伝情報等のコミュニケーションシステムが存在することを明らかにしてきた (2-5)。MV は宿主免疫を誘導することから、MV のワクチン応用も期待されてきている (6)。そのような背景から MV の研究は世界で注目されており、2021 年につくばで世界初の MV の EMBO 国際ワークショップを開催した。本講演では、それら MV を含めた微生物社会についてとそれらを解析するための最新イメージング解析技術もあわせて紹介させていただきます (7)。

- 1) Obana N., et al. (2020) NPJ Biofilms and Microbiomes 6.
- 2) Turnbull L., Toyofuku M., et al. (2016) Nature Communications 7.
- 3) Toyofuku M., et al. (2017) Nature Communications 8.
- 4) Toyofuku M., Nomura N., Eberl, L. (2019) Nature Reviews Microbiology 17.
- 5) Nagakubo T., et al. (2021) iScience
- 6) Obana N., et al. (2017) Infection and Immunity 85.
- 7) Yawata Y., et al., (2019) Applied and Environmental Microbiology 85.

## PS1-3

### ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立とその応用

○佐藤 慎太郎<sup>1,2</sup> (1和医大・薬・病態生理, 2大阪大・微研・ウイルス免疫)

### Establishment and application of human norovirus propagation system using hiPSC-IECs

○Shintaro Sato<sup>1,2</sup> (1Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Pharm. Sci. Wakayama Medical Univ., 2Dept. Virol., RIMD, Osaka Univ.)

ヒトノロウイルス (HuNoV) はヒトが唯一の感受性生物であるが、その感染様式や下痢を引き起こすに至るメカニズムはほとんどわかっておらず、ワクチンも存在しない。これは HuNoV の挙動を *in vivo* で解析できる感染モデル動物がないことと、HuNoV の *in vitro* での感染・増殖系が確立されていないことが大きな障壁となっているためである。2016 年にアメリカのグループが、生検検体由来の単層化したヒト腸管上皮細胞に胆汁を添加するだけで HuNoV の感染・増殖が認められることが報告した。この報告では、HuNoV のうち少なくとも GI.1, GI.3, GI.4, GI.17 の亜型が吸収上皮細胞に感染、侵入し、そこで数十倍から千倍程度の増殖が起きているとしている。我々はこれまでに、ヒト iPS 細胞から効率的に小腸様上皮細胞を誘導する方法や、より簡便にその細胞を維持する手法を報告している。ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞 (hiPSC-IEC) は、その使用に際して倫理的障壁がほとんどなく、広く産業応用が可能である。本講演では、前述の先行論文にならない、単層化させた hiPSC-IEC に HuNoV を感染させ、その増殖が起こるかどうかを検討したので、本実験系の応用とあわせて報告させて頂きたい。

## PS1-4

**Staphylococcus aureus の全ゲノム解析・全メチル化解析による新規環境適応メカニズムの同定**

○松岡 悠美 (大阪大・免フロ)

**Identification of novel mechanisms in *S. aureus* environmental adaptation by whole genome analysis**

○Yumi Matsuoka-Nakamura (iFReC, Osaka Univ.)

*Staphylococcus aureus* は、自然界に広く分布しており、ヒトの皮膚や鼻腔、腸内などにも常在している。一方、*S. aureus* はヒトの常在細菌叢として存在する反面、様々な細菌感染症、食中毒、慢性炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎の病態にも関与する。アトピー性皮膚炎は、皮膚バリア破綻、Th2 免疫、環境因子が相互作用し病態が形成されるが、*S. aureus* は環境因子の 1 つとして、Agr クオラムセンシング下流の毒素を介して皮膚炎の発症・増悪に関与する。また、乳児皮膚から経時的に *S. aureus* を単離し全ゲノム解析を行うことにより、アトピー性皮膚炎をその後に発症する乳児皮膚では、Agr クオラムセンシングの遺伝子領域が変異を起こさずに機能が保存され、一方健康な乳児の皮膚ではこの領域に機能喪失型の変異が誘導され、排除されることが明らかとなった。一方、院内感染で問題になる Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) では Agr クオラムセンシング発現陰性株が多く検出されることが報告されている。院内定着株のサブクローン解析を行うと、ゲノム変異に依存しない Agr クオラムセンシングをリパーシブルに陰性化できるサブクローンが定着することがわかった。サブクローンレベルの遺伝子変化の解析には、ショートリードに加え、ロングリードのゲノム解析を行う必要があり、また、変異以外の解析法としてはゲノムメチル化解析が重要であった。異なるヒト環境への *S. aureus* の適応形態について、我々の解析例を解説する。

## PS2

**大型グループ研究プロジェクトの推進**

コンビナー：飯田 哲也 (大阪大学)  
赤池 孝章 (東北大学)

**Driving large-scale group research projects**

Conveners: Tetsuya Iida (Osaka University)  
Takaaki Akaike (Tohoku University)

近年、細菌学会関係者が中心となった大型のグループグラントはあまり多くない。本シンポジウムでは、微生物学や感染症学の関連領域でムーンショットや学術変革、新学術領域等、大型のグループ研究プロジェクトを推進されている先生方にご登壇いただき、それぞれのプロジェクトの内容や組織構成、これまでの研究成果等についてご紹介いただくとともに、プロジェクトを立ち上げるに至った経緯やそのための準備等についてお話しいただく。本シンポジウムが、細菌学会関係者が今後大型グラントを目指す際の道標となることを期待する。

## PS2-1

**微生物による地球冷却：農地由来の温室効果ガスの排出削減**

○南澤 究 (東北大・生命)

**Cool Earth via Microbes: Mitigation of greenhouse gas emissions from agricultural lands**

○Kiwamu Minamisawa (Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

We aim to develop innovative technologies to mitigate greenhouse gases from agricultural soil by 2030, as a part of Moonshot Goal 4 'Cool Earth' and 'Clean Earth'. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is a powerful greenhouse gas with a global warming potential of 265. Agriculture accounts for 50% of global anthropogenic N<sub>2</sub>O emissions. Paddy rice fields are a source of methane (CH<sub>4</sub>) emissions, accounting for 10% of the global anthropogenic CH<sub>4</sub> emissions. Although modern agriculture has succeeded to increase food production using chemical nitrogen fertilizers, N<sub>2</sub>O emission from agricultural soil is increasing rapidly. We will develop mitigation technologies by soil microorganisms. Such microbial processes could be maximized at the field scale. However, the challenging issue is that artificially inoculated microorganisms are usually eliminated due to the robustness of soil ecosystem. Therefore, by integrating modern approaches in different disciplines, we unveil the whole pictures of soil microorganism world and reorganize plant-microbe interactions to achieve our goal. I will introduce several features in our project, including (i) the organizing processes, (ii) interdisciplinary strategies, (iii) fusion of basic research and social implementation and (iv) citizen science for interactive communications.

## PS2-2

パンデミックの脅威から解放された社会の実現にむけて

○松浦 善治<sup>1,2</sup> (1大阪大・感染症総合教育研究拠点, 2大阪大・微生物病研究所)

### Toward the realization of a society free from the threat of pandemics

○Yoshiharu Matsuura<sup>1,2</sup> (1Center for Infectious Disease Education and Research, Osaka Univ., 2Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

人類の歴史は感染症との戦いであったが、誰もが20世紀中には感染症を根絶できると楽観していた。しかし、この目論見は大きく外れ、我々はインフルエンザ、SARS、MERS、ジカ熱等の流行を経験した。そして、2019年に中国武漢で発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、これまでに650万人の命を奪い、我々がいかにウイルス感染症に対して無力であるかを思い知らされた。我々はウイルス学、免疫学、イメージング、数理科学等の多分野融合研究によって、未知のウイルス感染症に対しても有効な検査・治療法を先制的に準備する研究開発基盤の構築を目指したムーンショット型研究計画事業目標2「ウイルス-人体相互作用ネットワークの理解と制御」を進めている。ウイルスがヒトの細胞に感染する際の相互作用の様式や、感染によって生じる個体内での応答の様式は無限ではなく、幾つかのパターンに分類整理出来る筈である。本プロジェクトでは、このウイルスと人体の相互作用ネットワークの解析を行う。これにより、相互作用ネットワークのパターンを分類整理し、各パターンに対して有効な検査・治療の確立の基盤とする。こうして、未知のウイルス感染症に対しても有効な検査・治療を先制的に準備することが可能となる。これらの「先手を打つ」対応によりパンデミックによる世界的な社会経済の破綻を未然に防ぎ、ウイルス感染症の脅威から解放された社会の実現を目指している。本シンポジウムでは、ムーンショットプロジェクトの概要と研究成果について紹介したい。

## PS2-3

未知の微生物とその機能・生態の解明を目指して

○高谷 直樹<sup>1,2</sup> (1筑波大・生命環境系, 2筑波大・微生物サステナビリティ研究センター)

### Post-Koch ecology toward diversity, function, and ecology of microorganisms

○Naoki Takaya<sup>1,2</sup> (1Life Environment. Sci., Univ. Tsukuba, 2Microbiol. Res. Center Sus, Univ. Tsukuba)

地球の生態系では、動植物から微生物に至る多様な生物が地表の環境と複雑に相互作用しているが、環境中の多くの微生物が未知であることが近年のメタゲノム解析により分かってきた。地球の生態を理解するためには、種としてもバイオマスとしても大きな微生物の種の多様性と機能を知ることが重要である。科研費・新学術領域、超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学 (令和元年度～令和5年度) では、国内の微生物学、理工学、情報学の研究者からなるチームを構成し、この壮大な課題に取り組む基礎研究を進めている。微生物を知り生態系を理解するための第一の課題は、従来のコッホの寒天平板培地では分離できなかった未解明な微生物を分離することである。本領域では、微細加工、分光学、顕微イメージング等の最新の工学技術と微生物学を駆使した革新的な微生物の分離・培養・分析・操作等の技術の開発研究や、微生物の新たな種及び機能の解明と、それらの多様性を拡大するための研究を行っている。第二の課題は、既存の知見や新たにわかった微生物に関する知見から、生態系の構成要素やそれらの機能を知ることである。このために、長期に渡って4年8輪作を安定して運営している畑作施肥量試験圃場をモデルとし、新たなバイオインフォマティクス技術の開発や既存技術の新たなアイデアに基づく活用によって、生態系モデルを創出することに取り組んでいる。本講演では、環境微生物の分離と機能解析のための新たな技術開発、新たに解明された微生物の機能、モデル圃場の解析から見えてきた新たな微生物生態系等を中心に、領域の研究成果の概要を紹介したい。

## PS2-4

活性酸素シグナル—酸素生物学—そして硫黄生物学：三つの領域のレドックス生命科学研究から俯瞰される世界

○赤池 孝章 (東北大・院医・環境医学)

### Perspective for a new era of redox biology quickly expanding worldwide via three scientific kingdoms

○Takaaki Akaike (Dept. of Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

レドックス生物学は生物種横断的な視点から大きく展開してきた。本講演では、当該分野を広くカバーし支援してきた文科省科研費の大型研究費 (種目) として、これまで20年にわたり実施されてきた二つの新学術領域研究 (活性酸素シグナルと酸素生物学) と、その発展型の生命科学研究であり、現在運用中の学術変革領域研究 (硫黄生物学) を紹介することで新興学術領域であるレドックス生命科学の黎明と発展の歴史の一端を紹介する。我々のレドックス研究は、活性酸素 (reactive oxygen species, ROS)・一酸化窒素 (nitric oxide, NO)・フリーラジカルによる酸化ストレス応答研究のなかで見出された新規レドックスシグナル分子である8-ニトロ-cGMPの機能・代謝解明が源流となっている。さらに新しい展開として生物種普遍的な超硫黄分子 (supersulfide) の生体内生成とその生理機能のひとつである真核生物の硫黄呼吸 (sulfur respiration) の発見が挙げられる。超硫黄分子は、硫黄分子が複数連結することで化学的反応性が高まったもので、8-ニトロ-cGMPなどのレドックスシグナル分子の代謝・分解を制御している。また、硫黄呼吸の発見に端を発する硫黄生物学研究は、すべての生命科学領域において革新的な波及効果をもたらし、世界の生命科学研究を席巻する大きな潮流として展開することが期待されている。本講演では、活性酸素シグナル—酸素生物学—硫黄生物学の三つの領域研究 (scientific kingdoms) を超えて見えてきた新たなパラダイムの創成を俯瞰したい。

## JRS

## 中・高校生研究発表セッション

コンピーナー：垣内 力 (岡山大学)  
松本 靖彦 (明治薬科大学)

### Research presentations by junior high school and high school students

Conveners: Chikara Kaito (Okayama University)  
Yasuhiko Matsumoto (Meiji Pharmaceutical University)

## JRS-1

## プラスチック分解能の高い酵母菌の探索

○齊藤 姫華, 岩田 悠生, 佐々木 陸 (秋田県立秋田高等学校)

## Search for yeast with high plastic-degrading ability

○Hina Saito, Yuki Iwata, Riku Sasaki (Akita Senior High School)

近年実用化が進んでいる生分解性プラスチックは、分解に時間がかかり、周囲の環境に左右されやすい (西尾, 2008)。先行研究では、イネの葉から生分解性プラスチックの分解を促進する酵母菌を分離している (北本, 2020)。この酵母菌は既に発見された微生物に比べ、より多くの種類の生分解性プラスチックを素早く分解した。我々はこの点に着目し、自然界の植物の葉から他にも生分解性プラスチック分解能の高い酵母菌を発見できるのではないかと考えた。初めに、酵母菌の培養に適する YPD 培養液を用い、2通りの塗布方法 (液を爪楊枝で取って培地表面をなぞるように塗る画線法と、培養液を表面に塗布する方法) で寒天培地に植菌して培養した。その結果、画線法の方がコロニーの分離がしやすいことが分かったが、YPD 培地を用いると生分解性プラスチック分解能の有無に関わらず様々な種類の微生物が増殖してしまいうため、効率が悪いことがわかった。そこで、細菌の増殖を阻害するためにアンピシリンを含む条件で、生分解性プラスチック分解能のある菌を培養と同時に選別するために、グルコースを含まずポリ乳酸樹脂を含む条件で培養することとし、ポリ乳酸樹脂のエマルジョンを作製し、最少寒天培地に添加することとした。エマルジョンを培地上にかける方法ではエマルジョン成分の沈殿が起きてしまい菌の増殖が妨害されたため、エマルジョンを培地に元から混ぜることとした。この方法で、安定した寒天培地の作成に成功した。今後は、作製した培地を用いて採取する植物の数をより多くし、生分解性プラスチック分解能のある菌を見つけないかと考えている。

## JRS-2

## 葉面に付着した糸状菌は生分解性プラスチックを分解する？

○荒谷 心高朗, 大塚 咲季, 守屋 涼香, 宮崎 ゆき (北海道旭川西高等学校)

### Do filamentous fungus on a leaf surface decompose biodegradable plastic?

○Kotarou Araya, Saki Ootsuka, Suzuka Moriya, Yuki Miyazaki (Hokkaido Asahikawanishi High School)

我々は、近年話題にのぼるプラスチック問題に着目し、その問題を解決する方法を考えることにした。イネ科オオムギの葉面に生息する糸状菌がプラスチックを分解することができることを先行研究から知ったため、イネ科以外の植物の葉面に生息する糸状菌でも分解することができるかを研究している。研究方法は、寒天培地の上にイチゴとキュウリの葉面に付着した菌を培養し、そこに生分解性プラスチックをのせ、それを菌が分解するかどうかを調べる実験をしている。まだサンプル数が少なく、生分解性プラスチックは分解されていないため、今後の方針としてはサンプル数を増やし、プラスチックが分解されるかどうかを調べていく。

## JRS-3

## 酢酸ナトリウム培養で水田の泥から得られたメタン生成細菌

○佐藤 友璃, 津藤 禮実, 高橋 苺子, 井村 優奈, 大場 彩加 (宮城県古川黎明中学校・高等学校)

### Cultivation of Methanogens from Mud in Puddy with Sodium Acetate

○Yuuri Sato, Ami Tsuto, Maiko Takahashi, Yuuna Imura, Ayaka Oba (Miyagi Prefectural Furukawa Reimei High School)

再生可能エネルギーとして、廃棄物系バイオマスを原料にして生成したメタンガスを、燃料や発電に利用する方法がある。私達が住む大崎耕土の水田に生息するメタン生成細菌を採取し、廃棄物系バイオマスからのメタン生成に利用したいと考えた。本校の先行研究では、野菜くずを原料に、水田の泥を用いてペットボトル内で可燃性ガスを発生させることができた。本研究では、メタン生成の基質になり得る酢酸ナトリウムを用いることで、メタンを発生させる細菌群の割合を高め、新規のメタン生成細菌を単離することを目的とした。水田の泥 110g, 0.1mol/L 酢酸ナトリウム水溶液 500ml, リポビタン D 0.5ml, 塩化ナトリウム 2g, スクロース 4g を混合し、ペットボトルに入れ、キャップに針とシリンジをつけ、37°Cで保温した。メタンの発生を確認したのちに、上澄み液を水田の土の代わりに同じ比率の材料を加え、10ml ずつシリンジに分注し 37°Cで保温した。ゴム栓で閉じたシリンジは、嫌気状態を保ちやすく、発生した気体の体積はピストンが上がったメモリから測定できた。発生した気体の可燃性は、酸化スズを使用したガスセンサ MQ-4 を用いて検出した。シリンジを用いた培養によって、10,000ppm を超える濃度の可燃性ガスが検出された。培養液を酢酸ナトリウムを寒天で固めた培地に塗布し、その上に 2%寒天を重層して固めて嫌気培養を行ったところ、気泡が生じて 500 $\mu$ m 程度の亀裂が生じたことが観察された。今後、寒天培地に気泡が生じた部分から DNA を抽出し、分子系統解析を行ってメタン生成細菌の検出を行いたいと考えている。

## JRS-4

### 校庭のシラカシのこぶから得られた細菌

○大川 ほのか, 大崎 仁一郎, 伊藤 和花, 松本 華澄 (宮城県古川黎明中学校・高等学校)

### Endophytic Bacteria Obtained from the Knot of Oak in the Schoolyard

○Honoka Okawa, Jinichirou Osaki, Nanoha Ito, Kasumi Matsumoto (Miyagi Prefectural Furukawa Reimei High School)

植物にはしばしば「こぶ」が見られる。ダニ、アブラムシ、タマバエなどが植物に寄生することでできる「虫こぶ」と、アグロバクテリウムが感染することで異常に肥大するものが知られている。樹木の幹や枝に見られるこぶは、アグロバクテリウムの感染によって生じる腫瘍である例が報告されている。

学校の敷地に植えられているシラカシの幹に、多数のこぶを見つけた。シラカシのこぶについて、原因となる細菌や菌類の報告は見当たらず、私たちは学校のシラカシのこぶの原因を突き止めたいと考えた。本研究では、シラカシの幹に見られるこぶはアグロバクテリウムの感染による腫瘍であるという仮説をおき、シラカシの幹のこぶから細菌を単離することを目的とする。

こぶの組織は、形成層より内側が幹と同じように見える木質であった。特に異常に分裂した組織は内部に確認できなかった。こぶの形成層では、通常の幹の細胞分裂よりも速いペースで分裂が進行し、全体的に均一な速さで分裂することで球状のこぶになったものと考えられる。特定の領域が円形に広がりながら内側に組織を追加するように成長した結果、丸いこぶになったと考えられた。

シラカシのこぶを幹から切り離し、エタノールに浸したのちに着火して表面を火炎滅菌し、クリーンベンチでこぶ表面をおろし金ですり、滅菌水で懸濁したものをプレート培地に塗布した。培地はLB培地を2%寒天で固めたものを用いた。菌糸が確認できるコロニーは除外し、細菌のコロニーと考えられるものを新しい培地に塗布し、複数の細菌株を単離できた。今後、得られた細菌のDNA解析を行なって細菌を同定したい。

## JRS-5

### アゾトバクター属の単離と窒素固定の条件に関する研究

○鈴木 香澄, 河原 有沙, 柴田 琉愛 (名城大学附属高等学校)

### Study on the isolation and nitrogen fixation conditions of Azotobacter spp.

○Kasumi Suzuki, Arisa Kawahara, Runa Shibata (Meijo Univ. Senior High School)

現在肥料として用いられる、化学的に合成された窒素肥料は「ハーバー・ボッシュ法」と呼ばれる工業窒素固定で合成されたものである。これは、鉄を主体とした触媒上で水素と窒素を400~600°C、200~1000atmの超臨界流体状態で反応させることによって $N_2 + 3H_2 \rightleftharpoons 2NH_3$ のようにアンモニアを生み出す方法として知られている。しかし、この方法には大量の化石燃料が必要で、工業的窒素固定で排出される二酸化炭素が環境問題の観点から問題視されている。私たちはその方法より簡単に環境にやさしい方法を探すために窒素固定細菌に着目した。窒素固定細菌は「ニトロゲナーゼ」という酵素により $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16MgATP \rightarrow 2NH_3 + 16MgADP + 16Pi$ のように酵素反応で窒素化合物( $NH_3$ )の合成を行うことが知られている。一般に生物的窒素固定の例としてマメ科の植物と共生する根粒菌が行う空気中の窒素固定が挙げられるが、アゾトバクター属も同様に窒素固定を行う菌である。アゾトバクター属は、他のグラム陰性の従属栄養細菌とは違い好氣的生育条件下で窒素固定ができるという特性を持っている。また、どの植物とも共生をしないため、特定の植物に依存せず窒素固定ができる可能性がある。そこで、私たちは、アゾトバクター属を有機肥料として活用することを目標とした。化学肥料を入れた土とアゾトバクターを入れた土で植物を育てて比較し、メリットとデメリット、アゾトバクター属をどう活用すれば肥料として使えるのかを明らかにするために研究を行った。

## JRS-6

### 自然由来の成分の抗菌効果

○松舟 莉子, 三田 さくら, 紅葉 あすか (神奈川県立厚木高校)

### Antibacterial effect of naturally occurring ingredients

○Riko Matsufune, Sakura Mita, Asuka Momiji (Kanagawa Prefectural Atsugi High School)

我々は、トマトの茎と葉から得られた成分が持つ抗菌効果について研究をした。

研究のきっかけは、本校(厚木高校)で昨年度行われた成果発表会にて、「天然由来の農薬の開発」という先輩方の発表を聞いたことである。

ジャガイモの芽から得られるソラニンを利用した研究に興味を持ち、その研究内容を発展させたいという気持ちで、トマチンの研究をするに至った。

本研究の目的は、廃棄されてしまうトマトの茎と葉を活用して、環境に優しい抗菌溶液を作ることである。

本研究では、自分達でトマトを育て、その茎と葉からトマチンを抽出した。抽出方法は、水で抽出する方法とエタノールで抽出する方法の2種類で行った。

それらの溶液に抗菌作用があるのか、ペーパーディスク法を使って実験を行った結果、水で抽出したトマチン含有水溶液に抗菌作用があることがわかった。

トマトの捨てられてしまう非可食部である茎と葉から、抗菌作用のある溶液を生成することができることが示唆された。

自然由来の非可食部を有効利用し、なおかつ高校の化学室レベルで再現可能であるという点から、環境に配慮した安価な抗菌溶液として実用性があると考えられる。

今後は、トマチンの含有率の濃度測定や、抗菌作用の最低濃度について、機器分析を利用して検討していきたい。

## JRS-7

### 植物の抗菌作用

○勝 春香 (名城大学附属高等学校)

### Antibacterial action of plant

○Haruka Katsu (Meijo Univ. Senior High School)

現在、新型コロナウイルス感染症の拡大によって、手洗いや手指消毒をすることで予防することが日常的になっているが、肌の弱い人にとっては肌へのダメージが大きくなるという課題がある。私は、アトピー性皮膚炎などにより、肌が弱い人でも使いやすく、アルコールが原料でない消毒液を作りたいと考え、植物が持つ抗菌性に着目して研究を行うことにした。これが達成されれば、身近な材料から災害時にも作成できる消毒液の実現が期待される。今日まで、薬草は冷や解毒作用、肩こりなどの症状に効果があるとされ使われてきた。先行研究では納豆菌に対してドクダミ、プラタナス、クワの抽出液が効果を示し、納豆菌が増殖していない部分に黄色コロニーが形成されたことや、ドクダミの抽出液が手に常在している細菌である黄色ブドウ球菌に対して抗菌作用を示したことが分かっている。また、この抽出液は大腸菌には効果を示さなかったことから細菌特異性があることも分かっている。黄色ブドウ球菌は食中毒を引き起こす細菌として知られており、これを抗菌することは意義のあることであるが、細菌特異性により、抗菌できる範囲が限られることには課題がある。そこで、本研究では6種類の薬草の抗菌性について調べ、より広範囲な抗菌ができる成分を見つけることを目的とした。合わせて、薬草の組み合わせにより相乗効果が得られないかについても調べた。実験には、シソ、ローズマリー、アロエ、ゼラニウム、ビワの6種類の葉を用い、6種類の葉から成分を抽出し、これらを細菌の培地に与えることでのコロニーの形成にどのような影響が出るかを確認した。



**JRS-8****ペーパーディスク法によるマスクスプレーの口腔細菌におよぼす抗菌効果**

○竹内 愛惺, 川口 秀翔 (山村国際高等学校)

**Antibacterial Effect of Mask Spray on Oral Bacteria by Paper Disk Method**

○Aisei Takeuchi, Syuto Kawaguchi (Yamamurakokusai High School)

生物部の研究テーマはマウスの腸内細菌フローラと微生物(真正細菌)である。コロナ禍でもあり、一日中マスク生活を余儀なくされていることから、新入部員でも容易に扱える口腔細菌をマーカーとしたマスクスプレーによる抗菌効果の研究を目的とした。

このマスクスプレーの商品説明には、抗菌・除菌・消臭の効果があるとあり、また各マスクスプレーの基剤や薬効成分に違いがあることから、口腔細菌におよぼす抗菌効果にも異なる結果が現れると考えた。材料は大手の通販店から購入した16種類のスプレーを「ハーブ系(A~F)」「エタノール系(G~J)」「抗菌剤系(K~N)」「金属イオン系(O~P)」に分類して使用した。

方法は部員が一日着用したマスクから洗い出した口腔細菌を濃度調整して、これを標準寒天培地にスプレッターで塗り広げマーカーとした。その後、それぞれのスプレー液を8φのろ紙に浸透させ、マーカーを塗り広げた培地の中央部に静置させるペーパーディスク(拡散)法により比較検証した。

検証の結果、抗菌効果が現れたのは、成分にアルデヒド基やエーテル基をもつ「ハーブ系(A・B・C)」と、抗菌剤を含有する「抗菌剤系(L・N)」であった。また、Ag<sup>+</sup>を成分として含有する「金属イオン系(O)」にも抗菌効果が現れた。一方「エタノール系」では、揮発してしまうのか全く抗菌効果が現れなかった。

今後の研究としては、抗菌剤系のマスクスプレーに強い抗菌効果が現れたが、部員による官能試験ではハーブ系の爽やかな香りに魅せられた。化学物質に頼ることなく自然のハーブから抽出されたアロマオイルで、手作りの「マスクスプレー」にも挑戦してみたい。

**JRS-9****酸化チタンを用いた光触媒による抗カビ作用**

○吉光 結香, 金谷 寿里, 澤田 百加, 大杉 翼 (石川県立小松高等学校理数科2年生)

**Anti-Mold Function by Photocatalyst with Titanium Oxide**

○Yuka Yoshimitsu, Juri Kanaya, Momoka Sawada, Tsubasa Osugi (Komatsu High School)

紫外線を照射した酸化チタンが光触媒効果があり、メチレンブルー(有機物)を分解することが確認できた。酸化チタンの有機物分解作用より、同様に抗カビ作用もあるのではないかと仮説を立て、酸化チタンの抗カビ作用を確認する実験を行った。

実験より、一定の抗カビ作用がある傾向はつかむことはできた。今後さらに実験を重ねて、カビの繁殖が抑えられる、条件を探っていく。

**JRS-10****粘菌のエサの感知についての研究**

○岡山 太陽, 砂山 真緒, 中村 優子, 本田 裕次郎, 藁谷 昌伸 (石川県立小松高等学校理数科2年生)

**The study about slime mold's feed sensing**

○Taiyo Okayama, Mao Sunayama, Yuko Nakamura, Yujiro Honda, Masanobu Waraya (Komatsu High School)

粘菌のエサであるオートミールの匂いや見た目を変えて、粘菌が何をもとに餌を発見しているのかを調べた。粘菌(モジホコリ, 学名: *Physarum polycephalum*)とは、単細胞生物に分類されるが、環境に応じて複数の個体が一つの細胞になり、役割分担して組織的に行動する生物である。北海道大学の中垣俊之教授は粘菌が迷路を解く研究を知り、私たちは、脳を持たない粘菌が迷路の最短経路を導き出す能力について大変興味を持った。粘菌が迷路のゴールに置いたエサの匂いでエサの場所を感知しているのではないかという仮説を立て、粘菌が様々な匂いのエサに対する反応を、それらのエサと粘菌の距離調べた。その結果、粘菌はオートミールの匂いに向かって増殖し、においてエサを探知していることがわかった。

**JRS-11****冷凍保存における酵母の損傷について**

○緒方 捷悟, 川崎 美幸, 内藤 花菜, 坂下 昊之介, 中野 春奈 (三重県立桑名高等学校)

**Yeast damage in frozen storage**

○Shogo Ogata, Miyu Kawasaki, Hana Naito, Konosuke Sakashita, Haruna Nakano (Mie Prefectural Kuwana High School)

細胞の凍結保存について興味を持った。当初は多細胞生物を実験対象に考えたが、高校での設備・倫理的基準を鑑み、真核生物のモデル生物である酵母を用いて実験を行った。微生物は凍結温度下におかれると、生理機能を全く停止して休眠状態にはいるか、徐々に死滅していく。微生物が凍結に伴い死滅・損傷していくメカニズムの主なものとしては凍結に伴う細胞内の脱水と氷結晶形成にもなる損傷が考えられている。凍結下での微生物細胞は、冷却速度と凍結温度により大きな影響を受ける。本研究では酵母を水中で凍結させた場合における生残率と冷却速度の関係、さらに液体窒素を用いて冷却速度をあげ細胞内氷晶形成による細胞構造の物理的損傷について考察した。

## JRS-12

### EM 菌を使用した水中でのポリ乳酸の分解に関する研究

○水谷 宏輝 (名城大学附属高等学校)

#### Study on decomposition of polylactic acid in water using EM bacteria

○Koki Mizutani (Meijo Univ. Senior High School)

現在、世界中の海には放置されたプラスチックや海に捨てられたプラスチックが大量に発生している。一般的なプラスチックは自然界ではほとんど分解されずとも長い時間が必要であることがわかっている。そこで、本研究では生分解性プラスチックについて注目した。生分解性プラスチックは微生物の働きによって徐々に分解されていき、最終的には水と二酸化炭素にまで分解され自然界へ還元される。しかしながら、生分解性プラスチックも分解されやすいとはいえ、自然界の環境では小さなものでも数十年かかってしまうのが現状である。そのため、この研究では、水中環境で生分解性プラスチックの分解を促進し、分解時間を速くすることを目指した。一般的にはポリ乳酸 (PLA) は水中では分解できないとされているため、水中で分解できる条件を発見できれば、ポリ乳酸 (PLA) の製品への活用や、処理方法に大いに役立つことが期待される。そこで本研究では EM 菌に着目した。EM 菌は農地や水環境の改善に威力を発揮する光合成細菌や、発酵型の乳酸菌、酵母など、自然界にいる人にも環境にもやさしい善玉菌の集合体で、微生物の少ないやせた土地を、微生物を活性化し、病気になりにくい虫にやられにくいよい土壌環境を作ることができる。また、化学物質に汚染された河川などでも、水中の微生物を活性化させて、水中の浄化作用を促進させることが知られている。よって、本研究では EM 菌が水中でのポリ乳酸 (PLA) の分解に関与すると考え、研究方法として、1cm<sup>2</sup>に切り出した農業用の PLA フィルムを用いて、希釈した EM 菌液に試料を浸し、温度を変えて放置して観察した。

## JRS-13

### ビターチョコレートでスキンケア (日焼け予防)

○塩田 はな (山村国際高等学校)

#### Skin Care with Bitter Chocolate (Sun Protection)

○Hana Shiota (Yamamurakokusai High School)

生物部の研究テーマは微生物 (真正細菌) とマウスである。そこで私は、1年生部員の時に先輩方の研究に続けとマウスによるスキンケアの研究を考えた。それは中学生の時に化粧品 (日焼け止め) で肌荒れをしたことから、化粧品を使わない方法でスキンケアを検証してみた。スキンケアにはアウターケアとインナーケアがあり、両者のケアが大切であるが、普通は化粧品によるアウターケアが多い。そこで今回、チョコレートに含有されるカカオポリフェノールの摂取からインナーケアによるスキンケアを研究目的とした。

方法はカカオポリフェノールの含有量が異なる 3 種類のチョコレートをヘアレスマウスに摂取させ、真夏の登下校 30 分間に相当する紫外線量を日焼けマシンで照射した。照射後、皮膚の紅斑 (サンバーン) 状態を目視で観察してから色差計で測定して日焼け予防の効果を検証した。

結果は日焼け予防に一番効果が現われたのはカカオポリフェノール含有量が多いビターチョコレート (127mg/5g) であった。一方、カカオポリフェノール含有量が少ないチョコレート (20mg/5g) では効果は現われなかった。また、ビターチョコレートを摂取していない対照区との比較でも有意に効果を認めることができた。

これらの検証結果から、日焼け予防の効果はビターチョコレートに含有されるカカオポリフェノールの抗酸化作用によるスキンケアではないかと考えている。この効果が、ヘアレスマウスと同じ哺乳動物のヒトにも可能性があれば、私世代の高校生を含めた日焼け予防の手軽なインナーケアになると考える。

## JRS-14

### フラクトオリゴ糖は短鎖脂肪酸を生産する腸内細菌の割合を増加させる

○金子 菜名子 (山村国際高等学校)

#### Fructooligosaccharides Increase Relative Abundance of Gut Microbiota Producing Short Chain Fatty Acids

○Nanako Kaneko (Yamamurakokusai High School)

ディスバイオーシス (dysbiosis) は、「腸内細菌叢の乱れ」あるいは「腸内細菌叢のバランス異常」を指す。腸内細菌叢のバランスに大きな影響を与える要因の 1 つは、食習慣や高脂肪食の摂取であると考えられる。プレバイオティクスは、難消化性であるため、大腸まで消化されずに到達する。腸内細菌にプレバイオティクスが利用されることで、腸内の菌叢のバランスが保たれると考えられている。フラクトオリゴ糖 (FOS; fructooligosaccharides) は、ショ糖のフラクトース残基に 1~3 分子のフラクトースが結合した構造を持つ糖質の混合物である。プロバイオティクスとして乳酸菌とビフィズス菌を摂取すれば、ディスバイオーシスを予防できるだろう。食物繊維を摂取すると酪酸が増え、大腸管腔側は無酸素状態となり、偏性嫌気性菌が増殖する場となる。

本研究では、FOS シロップではなく、FOS 試薬を用いた実験を実施し、次世代シーケンサー解析から分かった腸内細菌叢の変化について報告する。門・綱・目レベルでは、2 種類の細菌 [乳糖と FOS 投与の比較; Bacteroidetes 門菌 1.6 倍増加, Campylobacterota 門菌 3 倍増加; Bacteroidia 綱菌 1.6 倍増加, Campylobacteria 綱菌 3 倍増加; Bacteroidales 目菌 1.6 倍増加 Campylobacterales 目菌 3.3 倍増加] が有意に増加していた。科レベルでは、Clostridiaceae 1 科菌 (4.1 倍), Bacteroidaceae 科菌 (2.1 倍), Odoribacteraceae 科菌 (5.2 倍), Helicobacteraceae 科菌 (3.0 倍) が有意に増加していた。属レベルでは、13 属菌が増加し、2 属菌が減少していた。FOS 投与によりビフィズス菌の増加は検出されなかった。一方で、短鎖脂肪酸を生産する腸内細菌として、Clostridium sensu stricto 属菌, Butyricimonas 属菌, Odoribacter 属菌, Bacteroides 属菌が有意に増加していたことから、FOS はマウス腸内細菌叢のバランスを変化させることが強く示唆された。

## WCB

【共催】細菌学若手コロッセウム  
—未来を拓く若手細菌学研究—

コンピーナー：尾鶴 亮（福岡大学）  
柴田 敏史（鳥取大学）  
若林 友騎（大阪健康安全基盤研究所）

Joint Symposium: Wakate Colosseum for  
Bacteriology —Young bacteriological  
research for the future—

Conveners: Ryo Ozuru (Fukuoka University)  
Satoshi Shibata (Tottori University)  
Yuki Wakabayashi (Osaka Institute of Public Health)

細菌学若手コロッセウムは、今後の細菌学の礎を築く若手研究者が切磋琢磨する場を提供することを目的とした学術集会です。若手コロッセウムでは、学会の枠をこえて"微生物"をキーワードとして集まった専門分野の異なる若手研究者が、率直な疑問・意見をぶつけあいます。参加者の研究者としての成長だけでなく、新しいネットワークの構築や日本の細菌学の裾野拡大が期待されます。「第16回細菌学若手コロッセウム」は日本細菌学会の助成を受け、2022年8月25-27日に札幌医科大学で開催され、感染、生態、ゲノム、一細胞観察などの分野での最先端のトピックスについて熱い議論が交わされました。このワークショップでは、日本細菌学会 会員の皆様へのフィードバックとして、始めて第16回大会の内容を報告させていただき、続いて世話人ならびに第16回大会で特に優れた発表を行った若手研究者にご自身の研究を紹介させていただきます。

## WCB-1

## 出芽酵母を用いた難培養性細菌の全ゲノムクローニング

○水谷 雅希<sup>1</sup>, 宮腰 かおり<sup>1</sup>, 古賀 隆一<sup>1</sup>, 深津 武馬<sup>1,2,3</sup>, 柿澤 茂行<sup>1</sup> (1産総研・生物プロセス, 2東大・院理・生物科学, 3筑波大・院生命環境科学)

## Whole genome cloning of unculturable bacteria in budding yeast

○Masaki Mizutani<sup>1</sup>, Kaori Miyakoshi<sup>1</sup>, Ryuichi Koga<sup>1</sup>, Takema Fukatsu<sup>1,2,3</sup>, Shigeyuki Kakizawa<sup>1</sup> (1Bioproduct. Res. Inst., AIST., 2Dept. Bio. Sci., Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo, 3Grad. Sch. Life. Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

More than ninety-nine percent of environmental microorganisms are proposed to be unculturable, therefore characterizations of these microorganisms from microbial genetical researches through cultivations are difficult. Recently, metagenomics analyses techniques without cultivation have been developed, then we can acquire the huge number of unculturable microorganism genomes. Additionally, the cloning technique for bacterial whole genomes using budding yeast have been available. In the present study, to promote utilizations of unculturable bacterial genomes as research foci and genetic resources, we performed the whole genome cloning of insect symbiotic unculturable bacteria. The bacterial genome extracted from a symbiotic organ of insect was amplified as about 10-30 kb fragments by PCR to cover whole genome region. The products were purified, then introduced into the yeast spheroplast, and assembled using endogenous homologous recombination system. The transformants harboring the assembled bacterial genome were selected by junction PCR targeted sequences across the fragments. The cloned genomes were purified and analyzed next-generation sequencing. In the results, the sequenced reads were mapped whole region of reference bacterial genome, indicating that the whole genome region is successfully cloned in yeast.

## WCB-2

Interaction between *Bordetella bronchiseptica* and  
*Acanthamoeba* as a transient host in the natural environment

○Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>, 西田 隆司<sup>1</sup>, 玉木 優生<sup>1</sup>, 平松 征洋<sup>1</sup>, 山口 博之<sup>2</sup>, 堀口 安彦<sup>1,3</sup> (1阪大微研・分子細菌学, 2北大院・保科・病態解析, 3阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>, Takashi Nishida<sup>1</sup>, Yuki Tamaki<sup>1</sup>, Yukihiko Hiramatsu<sup>1</sup>, Hiroyuki Yamaguchi<sup>2</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,3</sup> (1Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., 2Fac. Health Sci., Hokkaido Univ., 3CIDER, Osaka Univ.)

In addition to infecting hosts, *Bordetella bronchiseptica* (Bb) is considered to persistently survive in the environment which may provide a source of infection; however, the environmental lifestyle of Bb is poorly understood. In this study, we explored the possible interaction between Bb and *Acanthamoeba castellanii* (Ac) as a representative of environmental protozoa. Unlike bacteria that serve as amoeba food sources, phagocytosed Bb resisted amoeba digestion and escaped to the extracellular milieu through contractile vacuoles (CVs), intracellular compartments involved in osmoregulation. Furthermore, Bb survived and proliferated for at least 28 days of coculture with the amoeba. *Bordetellae* harbor the two-component system called BvgAS that controls the reversible phenotypic conversions between an avirulent (Bvg- phase) and a virulent (Bvg+ phase) phenotype. Bb mutant locked in the Bvg- phase but not in the Bvg+ phase survived and proliferated in the coculture with the amoeba. Microscopic analyses revealed that the Bvg+ phase-locked mutant was more efficiently internalized and targeted by the amoeba digestion pathway than the Bvg- phase-locked mutant. After 7 days of coculture, the dead cells of the Bvg+ phase-locked mutant were accumulated in giant food vacuoles (GFVs). By screening variants of the Bvg+ phase-locked mutant in which Bvg+ phase-specific genes were deleted, we found that mutants deficient in bacterial adhesion molecules, FhaB and fimbriae, survived in the coculture with the amoeba similar to the wild-type strain, indicating that the adhesion molecules are targeted for predation by the Ac and that Bb survives from Ac predation by concealing these factors. Overall, we showed that Ac could be a transient host in the natural environment, which supports the propagation of the bacteria. This study also provides a new perspective for understanding the ecology of Bb during the lifecycle outside the mammalian hosts.

## WCB-3

## 緑膿菌ファージを用いた抗菌カプシド構築法の確立

○川口 智史, 渡邊 真弥, 劉 怡, Xin-Ee Tan, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

Establishment of an antibacterial capsid construction method using *Pseudomonas aeruginosa* phage

○Tomofumi Kawaguchi, Shinya Watanabe, Yi Liu, Xin-Ee Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The emergence of drug-resistant bacteria is a worldwide problem. In particular, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections have limited treatment options. Burdened with the stagnation in development of small-molecule drugs, the search for new therapeutic agents is of utmost importance. Recently, phage has attracted attention in EU and US, but its bactericidal activity is limited as it is phage-dependent. In an effort of developing a new phage preparation that doesn't depend on phage-specific bactericidal activity, we have established a basic technology to load a programmed CRISPR-Cas13a on a *P. aeruginosa* phage to generate a kind of sequence-specific antimicrobials. Firstly, CRISPR-Cas13a programmed to target drug resistance gene *bla*<sub>IMP-1</sub> was cloned onto a plasmid containing pac site of a *P. aeruginosa* phage to generate a Cas13a-phagemid. The Cas13a-phagemid was then transformed into *P. aeruginosa* lysogenized with pac site-deleted phage. Next, the transformant was exposed to mitomycin C to induce the production of antibacterial capsid (AB-capsid), which could be harvested about 10<sup>8</sup> TFU/mL. When *P. aeruginosa* with or without *bla*<sub>IMP-1</sub> were infected with the resulting AB-capsids, *P. aeruginosa* carrying *bla*<sub>IMP-1</sub> only were killed. Our study demonstrated the generation of a strong phage-based therapeutic agent which kill drug-resistant *P. aeruginosa* sequence-specifically.

## WCB-4

### 大腸菌ゲノム縮小株群から単離した適応実験室進化株のゲノムシーケンス

○小高 優人<sup>1,3</sup>, 橋本 昌征<sup>2</sup>, 李 謙一<sup>3</sup>, 加藤 潤一<sup>1</sup> (1)都立大・理・生命科学, (2)台湾成功大・分医, (3)感染研・細1)

### Genome sequencing of adapted laboratory-evolved strains isolated from genome-reduced *E. coli*

○Yuto Kotaka<sup>1,3</sup>, Masayuki Hashimoto<sup>2</sup>, Ken-ichi Lee<sup>3</sup>, Jun-ichi Kato<sup>1</sup> (1)Dept. Biol. Sci., Sch. Sci., Tokyo Metropolitan Univ., (2)Natl. Cheng Kung Univ., Inst. Mol. Med., (3)Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis.)

我々はこれまで大腸菌の染色体領域欠失変異を多数作製し、さらにそれらを組み合わせることで野生株ゲノムの約44%までで大規模に欠失させたゲノム縮小株群を作製してきた。作製する過程で新規必須遺伝子を同定し、それらのいくつかについては機能も明らかにしてきた。また機能が重複しているために野生株では解析が難しい生育に重要な遺伝子群の同定、解析も進めて来た。野生株ゲノムの約39%を欠失させたΔ33a株までについてはすでに報告しているが、今回我々はΔ33a株以降の、野生株ゲノムの約44%までを欠失したゲノム縮小株群についてゲノムシーケンスを行ったので解析の結果を報告する。作製したゲノム縮小株の中で生育速度が著しく低下したΔ33a株、Δ37b株の2株については、それらを約2ヶ月間継代培養することによって生育が改善した適応実験室進化(ALE)株、Δ33b株、Δ37c株を単離した。これらを含む9株についてIllumina MiseqおよびOxford MinIONによってゲノムを決定したところ、多くの挿入/欠失変異や塩基変異が同定された。特にALE株であるΔ33b株ではいくつかの必須遺伝子に非同義置換が同定された。またΔ37b株から独立に単離された5株のALE株では、5株に共通して1つの遺伝子のプロモーター領域に一塩基変異が同定され、この突然変異により転写量が増大していることがわかった。これまでの予備実験からはこの遺伝子に関連する遺伝子群が酸化ストレス耐性に関与することを示唆する結果が得られた。これらの結果からゲノムの縮小や適応実験室進化に伴うゲノム縮小株群のゲノムの変化について議論したい。

## WCB-5

### 抗生物質添加下でのプラスミドの定着条件の理論解析

○熊倉 大騎<sup>1,2</sup> (1)北大院・生命科学, (2)理研・数理創造プログラム)

### Theoretical analysis of plasmid fixation condition under antibiotic addition

○Daiki Kumakura<sup>1,2</sup> (1)Grad. Life Sci., Hokkaido Univ., (2)THEMS, RIKEN)

Plasmid relates to the horizontal gene transfer of microbes and contributes to the expansion of new functional genes in the microbial population. Theoretical analysis of plasmid retaining microbe has discussed microbial fitness of plasmid retaining or gaining. However, although the transfer of plasmid or proliferation is caused stochastically, a theoretical analysis is not reached by considering microbial features and environmental conditions. Then, it has not been understood to the establishment condition of plasmid in the microbe-living environments.

In this study, it was made a stochastic modeling process and analyzed which parameter conditions the plasmid-retaining microbes to grow and establish in the environment. When we made the modeling, we used the pharmacodynamic function to consider the relationship between microbial growth and antibiotics. We also calculated the plasmid establishment probability on the antibiotics using *E. coli* growth dataset on several antibiotics and plasmid transfer data. As a result, plasmid establishment probability changes dependent on the plasmid retaining microbe parameters and independent of the plasmid gaining microbe parameters. It is suggested that the plasmid establishment on the addition of the antibiotics depends on the adding antibiotics and retaining plasmid.

## WCB-6

### 細胞内寄生性 Clostridia 綱細菌の発見と進化過程の考察

○高橋 一樹<sup>1</sup>, 桑原 宏和<sup>1</sup>, 堀川 雄太郎<sup>1</sup>, 伊澤 和輝<sup>1</sup>, 稲垣 辰哉<sup>1</sup>, 雪 真弘<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>2</sup>, 本郷 裕一<sup>1,2</sup> (1)東工大・生命理工, (2)理研BRC-JCM)

### Parasitic lifestyle and genome evolution of novel endosymbiotic clostridia of cellulolytic protists

○Kazuki Takahashi<sup>1</sup>, Hirokazu Kuwahara<sup>1</sup>, Yutaro Horikawa<sup>1</sup>, Kazuki Izawa<sup>1</sup>, Tatsuya Inagaki<sup>1</sup>, Masahiro Yuki<sup>2</sup>, Moriya Ohkuma<sup>2</sup>, Yuichi Hongoh<sup>1,2</sup> (1)Dept. Life Sci. Eng., Tokyo Tech., (2)JCM, RIKEN BRC)

The class Clostridia is one of the predominant bacterial taxa in the gastrointestinal tracts of various animals. Most of its gut-dwelling members colonize the gut epithelium or are present in the luminal fluid, and are considered to nutritionally contribute to the animal host. Here, we report the discovery of an endosymbiotic clade in the Clostridia, inhabiting cellulolytic protist cells in the termite gut in a species-specific manner. We obtained the complete or near-complete genome sequences of three endosymbiotic clostridia. The genomes were smaller in size (1.0-1.3 Mbp) and showed signatures of an obligate intracellular parasite such as extremely limited biosynthetic capability and a disrupted glycolytic pathway. In addition, they encoded ATP/ADP translocase that likely imports ATP from the host cytoplasm and several genes generally unique to eukaryotes, such as Rab, possibly used to interfere with host cellular processes. These three endosymbionts' genomes formed a clade with metagenome-assembled genomes (MAGs) derived from the gastrointestinal tracts of humans and ruminants. These MAGs shared the above characteristics and, thus, they are likely the genomes of intracellular parasites. Our analysis showed that the ATP/ADP translocase was acquired in their common ancestor; we suggest that this event was probably the key for the emergence of this parasitic clade.

## WCB-7

### ドロップレット技術を用いたバクテリオファージ単離方法

○星野 美羽<sup>1,2</sup>, 大田 悠里<sup>2,3</sup>, 陶山 哲志<sup>2</sup>, 森下 裕至<sup>3</sup>, 常田 聡<sup>4</sup>, 野田 尚宏<sup>1,2,4</sup> (1)東大・院・新領域, (2)産総研・バイオメディカル, (3)オンチップ・バイオテクノロジー(株), (4)早大・院・先進理工・生命医科)

### Isolation of bacteriophages by segregation into micro-sized water-in-oil droplets

○Miu Hoshino<sup>1,2</sup>, Yuri Ota<sup>2,3</sup>, Tetsushi Suyama<sup>2</sup>, Yuji Morishita<sup>3</sup>, Satoshi Tsuneda<sup>4</sup>, Naohiro Noda<sup>1,2,4</sup> (1)Dept. CBMS, Grad. Sch. Frontier Sci., Tokyo Univ., (2)BMRI, AIST, (3)On-chip Biotechnologies Co., Ltd, (4)Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

バクテリオファージ(ファージ)の発見から100年以上が経過した。近年、薬剤耐性菌の出現によって、その対抗策としてファージセラピーの利用が再度注目を浴び始めている。ファージを用いた微生物制御への期待は臨床応用展開のみでなく、土壌、水圏、および腸内環境等の微生物が存在する環境中の微生物叢制御を目的とした研究への推進も加速しつつある。このように、ファージ研究の勢いが増しているものの、ファージスクリーニングの基盤的手法として用いられる技術は依然としてプラークアッセイである。そこで我々はwater-in-oil(w/o)ドロップレットを用いてファージの効率的なスクリーニングが可能な手法を開発した。w/oドロップレットとは油相に囲まれた微小液滴である。このw/oドロップレット内でファージを宿主細胞に感染させることで増殖させ、ファージを特異的に蛍光染色することによってファージ増殖が起こったドロップレットを分離した。これによって感染性を持つファージ1粒子由来のファージクローンの単離に成功した。w/oドロップレット内でファージと宿主を共培養する際、液体培地を用いた培養が行える。つまり、本手法を用いることで寒天培地上では増殖が困難であるような微生物を宿主にもつファージの獲得を容易に行うことが可能になるとともに、ファージスクリーニングのスケールアップの飛躍的向上も期待される。

## ICD

## 薬剤耐性菌の理解とマネジメント

コンピーナー：明田 幸宏（国立感染症研究所）

## ICD-1

## 薬剤耐性菌の現状

○朝野 和典（大阪健康安全基盤研究所）

日本の院内感染の歴史を振り返ると、2000年以前にはMRSAのまん延が大きな問題となり、2000年代になり、多剤耐性緑膿菌（MDRP）によるアウトブレイクが報告され、社会的にも注目されるようになった。2010年代には多剤耐性アシネトバクター（MDRA）の海外からの持ち込みによる院内感染事例の報告が複数報道され、同時にカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）の世界的な拡散が注目され、国内でもアウトブレイク事例が報告されるようになった。

院内感染対策としては、2012年に感染防止対策加算が診療報酬として認められ、2016年の伊勢志摩サミットに合わせてAMR対策としての抗菌薬の適正使用の推進が始まった。

一方、薬剤耐性菌対策は、国によって必要なアプローチの優先順位が異なっている。特に、CREやVREなどの腸管内の耐性菌が拡散する近年においては、社会全体をマクロの視点でとらえることが必要となる。すなわち、地球全体をひとつの生命体としてとらえるワンヘルスの視点が重要である。

腸内の細菌やウイルスは水系汚染によって食物連鎖に組み込まれ、人を含めた生物と自然界を循環する。加えて抗菌物質の水汚染は、耐性菌の維持、増殖に寄与する。水系汚染の改善には下水処理の普及が必要であるが、途上国においては下水施設の普及率は低く、生活排水、尿尿が直接河川に流入する。このような社会では、薬剤耐性菌対策が、単に院内感染対策や抗菌薬の適正使用によるのではなく、大きく生活インフラの普及によらなければならないことになり、まさに国家プロジェクトからスタートする。

薬剤耐性菌の制御には、細菌側のミクロの視点だけでは解決できず、社会や環境というマクロの視点が必要となっている。

## ICD-2

## 世界における薬剤耐性菌

○明田 幸宏（国立感染症研究所・細菌第一部）

世界的な新型コロナウイルス感染症の蔓延によってグローバルなヒトの移動、物流が滞っているが、様々な施策によりそれも徐々に戻りつつある。一方でヒトに感染症を引き起こす病原体はヒトと動きを共にすることでそのニッチを獲得することから、コロナ禍の行動制限下では報告数の少なかった感染症がまた増加する気配を見せている。グローバルに蔓延する薬剤耐性菌はその例に漏れず、今後改めて世界中に広がっていく可能性を秘めている。一方で2015年のWHO総会における薬剤耐性（AMR）グローバルアクションプランの採択によって世界的なAMR対策が進められており、その成果が生まれつつあるところであるが、未だ対策が困難な課題も多く存在し、継続した対策が必要となっている。

本講演では主にアジアを中心とした薬剤耐性菌状況とともにその蔓延を監視し拡大を防ぐために行われている活動について紹介することで、世界的な薬剤耐性菌の蔓延とその対策について、今後の見通しを含めて議論したい。

## ICD-3

## 抗菌薬適正使用の考え方

○具 芳明（東京医科歯科大学医歯学総合研究科・統合臨床感染症学分野）

抗菌薬適正使用は、薬剤耐性菌の拡散を防ぐ感染予防策と合わせ、医療機関における薬剤耐性（AMR）対策の基本となる。抗菌薬の不適正使用には、本来必要のない抗菌薬を使用する不必要使用と、抗菌薬の必要な場面での選択、投与量、投与期間などが適切でない不適切使用の要素があり、このそれぞれを改善していく必要がある。薬剤耐性（AMR）対策アクションプランが発表された2016年以降は抗菌薬適正使用推進活動（Antimicrobial Stewardship Program: ASP）がとくに注目されるようになり、2018年度からは診療報酬によって評価されるようになっている。

病院においては、抗菌薬適正使用推進チーム（Antimicrobial Stewardship Team: AST）が設置される病院が増え、医師や薬剤師を中心に多職種での活動が行われている。抗菌薬適正使用を推進する上で効果的な手法として、監査とフィードバック、重要な抗菌薬の許可制、ガイドラインの作成などが知られており、これらを中心に各病院のASTのリソースに応じてさまざまな活動が行われている。

日本で使用されている抗菌薬の大部分は外来診療で処方されている。薬剤耐性菌が市中にも広がる中、外来診療における抗菌薬適正使用が注目されている。厚生労働省は外来診療を念頭においた「抗微生物薬適正使用の手引き」を発表した。外来診療における感染症診断の重要性とその診断に基づいた抗菌薬の適応についてまとめられている。

アクションプランに基づいてサーベイランスの仕組みが充実し、地域によって抗菌薬の使用量やその内容に違いがあることが明らかになっている。関係者が地域の課題を共有し、連携して改善を図っていくことが望まれる。

## ICD-4

### 薬剤耐性菌を意識した感染対策

○鍋谷 佳子（大阪大・医・附属病院・看護部）

薬剤耐性菌が感染した場合、感染した患者の不利益だけでなく、他の患者へ感染が広がる可能性がある。アウトブレイクになった場合、入院制限による診療の遅れなど他の患者への影響、経営面への影響など、様々な影響がある。よって、薬剤耐性菌の感染が拡大しないように感染対策を講じることが重要である。

薬剤耐性菌の感染対策は、標準予防策に加え、接触感染予防策を追加する。しかし、薬剤耐性菌の検査結果が判明するには数日を要することから、標準予防策が日常的に実施されていない場合、検査結果が判明した時点で、既に他の患者へ拡大している事もある。感染症の有無にかかわらず実施する標準予防策を、日常的にいかに行っているかが、感染拡大の有無を左右すると考える。

医療現場の標準予防策の遵守が不確実となる要因として、見えない微生物に対する動機付けの弱さや、患者の病態と単純な手指衛生や個人防護具の使用などの対策が結び付けられない、などが考えられる。しかし、微生物は見えないからこそ、意識していなければ、知らない間に広がっている可能性が高い。患者に直接医療やケアを提供する人が、日頃から意識して標準予防策を実践しているかが重要である。

また、医療施設、特に急性期医療施設では、薬剤耐性菌の検出状況をモニターし、薬剤耐性菌の検出を早期に察知し、拡大の有無や感染対策の実施状況を確認するなど、早期に介入することが必要である。

## S1

## 生体防御研究の現状と展望

コンピーナー：中川 一路（京都大学）  
金城 雄樹（東京慈恵会医科大学）

## Current status and prospects of biological defense research

Conveners: Ichiro Nakagawa (Kyoto University)  
Yuki Kinjyo (The Jikei University School of Medicine)

2020年から始まった新型コロナウイルス感染症がパンデミックとなり、生体防御研究の重要性が益々高まっている。予防・診断・治療に関わる研究のみならず、病原体の起源や変異、工学的な手法を用いた創薬など、様々な視点から新たな治療法を模索する必要がある。本シンポジウムでは、外来性の異物や自己成分の一部を処理し、個体の独立性と恒常性を維持する生体防御機構について細菌・真菌だけでなく、ウイルス、寄生虫等各分野で進められている新たな観点から病原体に対する防御機構のメカニズムについて、様々な分野の研究者から最新の知見について紹介する。

共催：日本生体防御学会  
Co-host: Japanese Society for Host Defense Research

## S1-1

## Cholesterol metabolism associated with the innate immune response against viral infection

○押海 裕之（熊大・生命・免疫）

○Hiroyuki Oshiumi (Dept. Immunol. Fac. Sci. Kumamoto Univ.)

Recent COVID-19 pandemic has revealed individual difference in the risk of severity and death; however, its underlying mechanism remains unclear. An accumulating body of evidence has shown that metabolic state affects our immune system. For instance, diabetes and obesity increase the risk of severity of COVID-19, and conversely, treatment with statins ameliorates the risk. The innate immune system is a first line of defense against viral infection, and we found the mechanism of cholesterol metabolism associated with the innate immune response. First, we performed a chemical screening to isolate small chemicals that accelerate antiviral innate immune responses, and found that several statins, which inhibits cholesterol synthesis, augment antiviral innate immune responses. Treatment of cells with statins induced the expression of minor type I interferon genes, such as IFN- $\omega$  and IFN- $\alpha 16$ , even in uninfected cells in a cell-type specific manner. Small amount of IFN- $\omega$  was enough to markedly enhance antiviral innate immune response during viral infection. This augmentation was also observed when cholesterol synthesis was inhibited by knockdown of the HMGCR gene. Our data indicate that intracellular cholesterol metabolism is linked to the expression of minor type I IFNs, leading to the regulation of antiviral innate immune responses.

## S1-2

結核菌 Zmp1 による IL-1 $\beta$  産生抑制の分子機構

○松崎 吾朗<sup>1,2</sup>, 高江洲 義一<sup>1,2</sup> (1琉球大・熱生研・分子感染防御, 2琉球大・医院・生体防御)

Mechanism of mycobacterial zinc metalloprotease (Zmp) 1-mediated suppression of IL-1 $\beta$  production

○Goro Matsuzaki<sup>1,2</sup>, Giichi Takaesu<sup>1,2</sup> (1Mol. Microbiol. Group, TBRC, Univ. Ryukyus, 2Dept. Biodefense, Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus)

Proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is indispensable for protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Zmp1 secreted by Mtb suppresses IL-1 $\beta$  production to escape the protective response. However, the molecular mechanism of the Zmp1-mediated IL-1 $\beta$  suppression was not clarified. To address the issue, we searched host target proteins of Zmp1 by yeast two-hybrid screening and identified several proteins including GRIM-19, a component of the mitochondrial electron transport chain Complex I. The binding of Zmp1 to GRIM-19 was also confirmed in mammalian cells. GRIM-19-deficient mouse macrophage line J774.1 generated by genome editing showed impaired IL-1 $\beta$  production in response to Zmp1-deficient Mtb infection or NLRP3 inflammasome stimulants (LPS + ATP or Nigericin) while AIM2 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  production was not affected. Furthermore, GRIM-19-deficient J774.1 showed impaired NLRP3 inflammasome activation as evidenced by loss of mature IL-1 $\beta$  generation and cleavage of procaspase-1. These results suggest that GRIM-19 is required for NLRP3 inflammasome activation to generate mature IL-1 $\beta$  and Zmp1 binding to GRIM-19 blocks this process. We also identified a RING-finger E3 ubiquitin ligase as the second Zmp1-binding protein and found it required for optimal expression of *Ili1b* mRNA, suggesting the presence of the second mechanism of Zmp1-mediated IL-1 $\beta$  suppression.

## S1-3

Neural control of gut homeostasis through regulation of the microbiota and pathogens in *Drosophila*

○倉田 祥一郎（東北大・院・薬）

○Shoichiro Kurata (Grad. Sch. Pharmaceu. Sci. Tohoku Univ.)

“The mind controls the body.” The nervous system and the immune system are closely connected. Nevertheless, since Metalnikov’s initial experiments in 1924 demonstrating that *Galleria mellonella* larvae lose their resistance against a *Vibrio cholera* challenge after cauterization of the third thoracic ganglion, the relationship between immune responses and the nervous system has remained unexplored. To investigate the role of the nervous system in host-pathogen interactions, we screened for GAL4 enhancer-trap *Drosophila* strains and inhibited neuronal activity by the overexpression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel. We identified an NP3253 line that was susceptible to oral infection by *Erwinia carotovora* (*Ecc15*), a Gram-negative bacteria. The neuronal subset driven by the NP3253 line, named NP3253 neurons, included some of the enteric neurons innervating the anterior midgut. When NP3253 neurons were strongly inhibited, the flies had a low survival rate, even in the absence of infection. The low-survival phenotype was abolished by eliminating gut commensal bacteria. Consistent with this result, the number of commensal bacteria, such as *Acetobacter pernici*, was also dramatically increased by inhibiting NP3253 neurons. These findings suggest that neural control is crucial for maintaining gut homeostasis through regulation of the gut microbiota and infectious pathogens.

## S1-4

### Rab GTPase ネットワークが制御する細胞内膜輸送経路と細菌感染

○野澤 孝志, 村瀬 一典, 中川 一路 (京大・院医・微生物)

#### Rab GTPases network regulates intracellular membrane trafficking and bacterial infection

○Takashi Nozawa, Kazunori Murase, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Rab GTPase は細胞内の様々な膜輸送経路において分子スイッチとして機能する GTPase タンパク質である。GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性型) をサイクルし, 活性型で標的の小胞の脂質二重膜に局在し, エフェクタータンパク質群をリクルートすることで膜輸送を制御する。細菌が感染した細胞においても, 細胞内への菌の取り込み, 殺菌的オートファジー (ゼノファジー), 抗原提示, サイトカイン分泌など, 生体防御に重要な膜輸送経路に関与する。我々はヒト上皮細胞への A 群レンサ球菌感染モデルにおいて Rab タンパク質の網羅的解析を行い, 細菌の侵入過程やオートファジー (ゼノファジー) を制御する Rab タンパク質の機能とメカニズムを明らかにしてきた。今回我々は, 新規のゼノファジー制御因子として Rab41 を同定した。Rab41 をノックダウンした細胞では, 感染後期において細菌を取り囲んだゼノファゴリソーム内の酸性化が消失し, 殺菌活性も低下した。また A 群レンサ球菌が分泌する膜孔形成毒素 (ストレプトリジン O, SLO) 依存的に, 膜修復機能を持つ ESCRT 複合体が膜に局在化すること, また Rab41 は ESCRT 複合体の一つ VPS4 のリクルートに関与することが明らかになった。さらに, Rab41 は GDP/GTP 結合状態に依らず損傷膜に局在化し, VPS4 と結合して VPS4 をリクルートすることが示唆された。また, 相互作用タンパク質のプロテオーム解析とその機能解析から, Rab41 損傷膜へのリクルートを制御する分子としては TOM1L2 を同定した。以上の結果から, Rab が ESCRT を制御することで, 細菌によって傷ついたゼノファジーの膜を修復することが効率的な殺菌作用に重要であることが示唆された。

## S1-5

### 抗酸菌に対する自然免疫と獲得免疫の共働

○山崎 晶 (阪大・微研/IFReC・分子免疫)

#### Innate and acquired immune responses against mycobacterial lipids

○Sho Yamasaki (Dept. Mol. Immunol., RIMD/IFReC, Osaka Univ.)

Mycobacteria possess a variety of tools that enable them to survive within the host. In particular, many mycobacterial species, including *Mycobacterium tuberculosis*, have thick cell walls composed of unique lipids, to prevent attack by conventional innate and acquired immune systems which normally target pathogen-derived nucleic acids or proteins. As a countermeasure, host immunity has developed a "mycobacteria-specific" immune system that targets these unique lipids to attack this life-threatening pathogen. We have previously identified C-type lectin receptors clustered on the genome as an innate immune receptor for mycobacterial lipids. Recently, we identified a novel unconventional T cell subset that recognizes these lipids as antigens. In this symposium, I will introduce our recent findings on the innate and acquired immune systems against mycobacterial lipids, and discuss their potential applications for the prevention of infectious diseases and cancer.

## S2

### ワンヘルスの基礎と実践のフロントランナー

コンピーナー: 三室 仁美 (大分大学)  
井口 純 (宮崎大学)

#### Frontrunners in basic research and practice of One Health

Conveners: Hitomi Mimuro (Oita University)  
Atsushi Iguchi (University of Miyazaki)

ヒトと動物と, それらを取り巻く生態系は相互に連携しており, ヒトの健康を守るためには動物や生態系の健全性を含めた包括的な取り組みが必要であるという「ワンヘルス」の概念は, 近年広く浸透してきている。COVID-19, 狂犬病や新型インフルエンザなど, 動物からヒトに感染する新興・再興人獣共通感染症は, 近年急増している。さらには, 畜産・医療分野における薬剤耐性菌の蔓延や, 野生動物や家畜・家禽を由来とする食中毒原因微生物による事例の頻発も, 依然として社会的な問題となっている。本シンポジウムでは, ワンヘルスに関する基礎研究や実践に関わる研究者にご登壇いただき, それぞれのこれまでの研究成果や取り組みについてご講演いただく。微生物研究者がどのような視点からワンヘルスの実現に関わっていくべきかについて, 考える場になりたい。

共催: 大分大学グローバル感染症研究センター,  
宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター

Co-host: Research Center for GLOBAL and LOCAL Infectious Diseases (RCGLID), Oita University, The Center for Animal Diseases Control (CADIC), University of Miyazaki

## S2-1

### 農環境に潜むヒト病原真菌の薬剤耐性株

○萩原 大祐<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>筑波大・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・MiCS)

#### Drug-resistant strains of human pathogenic fungi in the agricultural environment

○Daisuke Hagiwara<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Fac. Env. Life Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>MiCS, Univ. Tsukuba)

深在性アスペルギルス症は免疫抑制状態の患者にとって脅威で, 治療に難渋する真菌感染症である。主な原因菌のアスペルギルス・フミガタスは環境中に遍在する糸状性真菌であり, 3~5 $\mu$ m の胞子の形態で大気中を環流する。その治療薬となるアゾール系薬剤は, 真菌に必須のエルゴステロール合成経路の酵素 Cyp51A を阻害して卓効を示す。しかし近年, *cyp51A* 遺伝子の制御領域にタンデムリピート (TR) 配列を持つアゾール薬耐性アスペルギルス・フミガタス株 (ARAF) が出現し, 各国で問題視されている。この TR 保有 ARAF は環境中に一定数存在し, 植物残渣のコンポストはホットスポットとして指摘されている。医療用アゾール薬と構造の類似したアゾール剤が農薬として広く用いられ, TR 保有 ARAF はアゾール農薬にも交差耐性を示す。したがって, 農地やコンポストなど農薬アゾールが存在する環境では, ARAF が優先的に生残すると考えられ, 実態の把握が急務である。さらに近年, チューリップ球根から TR 保有 ARAF が分離されたと複数グループが報告し, 輸出入により世界中に拡散されている実態が明らかになった。我が国のホームセンターで入手できる球根にも無視できない割合で TR 保有 ARAF が付着していた。我々は, これらの分離株のゲノム解析を実施し, ゲノム疫学的な知見に加え, 球根に付着するアスペルギルス・フミガタスの交雑状況を明らかにした。また, 当該株はアゾール系以外の農薬に対しても耐性の獲得を示すデータが得られている。以上の解析から, 医療上重要なヒト病原菌の制御に向けて, 農環境における耐性株の動態を把握することが不可欠であり, ワンヘルスの対策の議論につなげていくべきフェーズにあると言える。



**S2-2*****Escherichia* 属細菌の動物適応がもたらすヒト病原性**

○小椋 義俊 (久留米大・医・感染医学)

**Human pathogenesis developed through animal adaptations in *Escherichia* species**

○Yoshitoshi Ogura (Div. Microbiol., Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med.)

*Escherichia* 属細菌はヒトを含む様々な脊椎動物に常在しており、通常は非病原性か日和見感染性であるが、一部は健康なヒトへ明らかな病原性を示す。ヒトへの病原性は、ヒトへの適応進化の結果として発揮されていると推察されるが、我々は動物への適応が二次的要因として本来の宿主とは異なるヒトへ偶発的に病原性を発揮していると解釈できる例も複数確認している。その例として、(1) 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) と腸管病原性大腸菌 (EPEC) の病原性進化と牛への適応、(2) STEC-毒素原性大腸菌 (ETEC) ハイブリッド型 *Escherichia* cryptic clade I の病原性進化と牛への適応、(3) LT 産生性 *E. fergusonii* の病原性進化と鶏への適応、(4) CDT 陽性 *Escherichia* 属細菌の病原性進化と野生動物への適応について、我々の研究結果を中心に紹介し、感染制御において動物も含めた宿主適応進化を研究する重要性について議論する機会とした。

**S2-3****野生動物や自然界における薬剤耐性菌の伝播・拡散**

○浅井 鉄夫 (岐阜大・院・連合獣医学研究科)

**Transmission and spread of antimicrobial-resistant bacteria in wildlife and the natural environment**

○Tetsuo Asai (Dept. Appl. Vet. Sci., Unit. Grad. Sch. Vet. Med., Gifu Univ.)

私たちは細菌感染症の治療や家畜の生産に抗菌性物質を利用しています。抗菌性物質を使用することで出現した薬剤耐性菌は生活排水や畜産関連排水などを経て自然界へ放出されます。私たちの身の回りの家畜やペットが薬剤耐性菌を保有していますが、野生動物も例外ではありません。2013~2017年に野生動物から収集した大腸菌を対象にした調査では、観光地に出没するシカや農場で捕獲したネズミなど人間生活に密接な動物が薬剤耐性菌を保有していました。これらは、餌付けや野生動物の生活環境との関連が示唆されている。その後、抗菌薬含有培地で調査を進めることで、第3世代セファロスポリンやフルオロキノロンに対する耐性菌がわずかではあるが山林に生息する野生動物の間にも浸潤していることが明らかになってきました。大学の建物裏で捕獲したイタチ2頭から CTX-M-14 産生大腸菌 (O59:H34 - ST2640 - fimH63) が分離され、大学の飼育動物由来大腸菌から類似したプラスミドが認められました。また、大学の駐車場に落ちていた糞便から CTX-M-55 産生大腸菌 (O83:H42 - ST1485 - fimH58) や CTX-M-14 産生大腸菌 (O25:H4 - ST131 - fimH30) が分離され、キツネの糞便と同定しました。1980年代には野生のニホンカモシカの糞便からアンピシリン含有培地では大腸菌が分離されませんでした。この様に、自然界への薬剤耐性菌の汚染は徐々に進行し、野生動物が保有する薬剤耐性菌は人間活動との関連が推察されます。私たちは身の回りの野生動物とは適度な距離感で共生していくことが重要です。

**S2-4****ベトナムにおける薬剤耐性菌のワンヘルスアプローチによるサーベイランス**

○春日 郁朗 (東大・先端研)

**Surveillance of antimicrobial resistant bacteria based on One Health approach in Vietnam**

○Ikuro Kasuga (RCAST, UTokyo)

The health hazards caused by antimicrobial resistant bacteria (ARB) are becoming more apparent, and the high rate of ARB carriage among healthy people is also a major problem in Vietnam. One of the factors contributing to the spread of ARB in Vietnam is the release of untreated sewage into the environment. The treatment rate of urban sewage in Vietnam is only 12.5% (2019), and most sewage is released into the environment after simple septic tank treatment. It is concerned that the release of untreated sewage into the environment could circulate ARB in the society. River water polluted by sewage is frequently reused for irrigation. Thus, vegetables and other products can be easily contaminated by ARB. In addition, Vietnamese people eat raw vegetables, resulting in a high risk of oral exposure to ARB. In order to mitigate the circulation of ARB, surveillance based on One-Health approach is indispensable. In 2021, WHO proposed "Tricycle protocol", which focus on ESBL-producing *E. coli* as a single indicator in human, animal, and environment. In addition, wastewater-based epidemiology targeting urban sewage also attracts attention as it can cover not only patients but also healthy carriers. In this presentation, the actual situation of environmental pollution of ARB in Vietnam as revealed through these surveys will be presented.

**S2-5****プリオン病研究の現在**

○新 竜一郎 (宮崎大・医学・微生物)

**Prion Disease Research Today**

○Ryuichiro Atarashi (Dept. Inf. Dis., Fac. Med., Univ. Miyazaki)

プリオン病は伝達性海綿状脳症とも呼ばれ、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病 (CJD) の他、羊のスクレイビー、牛の牛海綿状脳症 (BSE)、シカ類の慢性消耗病 (CWD) などが代表的な疾患である。プリオン病では、異常型プリオンタンパク質 (PrP) が体内で自発的に生成 (孤発性、遺伝性) あるいは外部からのプリオン汚染物質の曝露 (獲得性) によって、中枢神経系に拡散・蓄積し、発病すると考えられている。これらプリオン病に対する有効な予防・治療法は現時点では存在しないのが現状である。本演題では、プリオン病の病態機構の中でも、重要性と関心の高い、プリオン株の分子機構 (病原体特異的な遺伝子を持たないプリオンが病理像や潜伏期の異なる“株”現象を示すことが知られている) や、薬剤耐性プリオンの誘導機構等について我々と国内外の研究の進展並びに今後の課題について発表する予定である。

## S2-6

### ワンヘルスの視点からの狂犬病とその予防

○西園 晃 (大分大・医・微生物学)

#### Rabies and its prevention from One Health

○Akira Nishizono (Dept. Microbiol., Sch. Med., Oita Univ.)

狂犬病は、アジア・アフリカを中心に 150 以上の国々で毎年約 5 万人以上が感染・死亡、3,000 万人近くが曝露後発症予防治療 (PEP) を受け、顧みられない熱帯感染症 (NTDs) の一つに挙げられている。狂犬病撲滅のためには、咬傷曝露を受けたヒトへの対策のみならず、特にイヌの登録、飼育方法の管理・徹底、ワクチン接種などからなる動物の対策との両面から成るワンヘルスの取り組みが欠かせない。関係国際機関は連携して、2030 年までにイヌからの狂犬病による死亡をゼロにする活動を進めているが、いまだその道のりは遠い。

狂犬病は潜伏期が比較的に長いので、ヒトの場合感染動物からの咬傷曝露後でも早期に組織培養不活化ワクチンの複数回接種や抗狂犬病免疫グロブリンの投与による PEP で発症を阻止することが充分可能で、曝露の程度に応じた PEP の対応が国際的に推奨されている。ヒト用狂犬病ワクチンはパスツールの開発した神経由来ワクチンから組織培養型ワクチンへと、他の多くのワクチンに先駆けて開発・実用化された全粒子型の不活化ウイルスワクチンである。ワクチンとしてはほぼ完成された感があるが、接種法の簡略化、より重症な曝露に対する対処法や抗ウイルス剤の併用などによる PEP 法の改善など残された課題もある。一方で発症後に救命することは、ほぼ不可能なので、発症予防がそのカギとなる。ヒトへの最も重要な感染源であるイヌに対しては、行政と飼い主が一体となり mass vaccination を実践することで集団免疫の賦与と、飼育頭数管理・登録、さらに放浪犬対策などが、狂犬病コントロールのカギを握っている。

## S3

### ファージ vs 細菌 その仁義なき？戦い

コンピーナー：氣駕 恒太郎 (国立感染症研究所)  
安藤 弘樹 (岐阜大学・アステラス製薬)

#### The endless war: Phages vs Bacteria

Conveners: Kotaro Kiga (National Institute of Infectious Diseases)  
Hiroki Ando (Gifu University・Astellas Pharma)

ファージ研究がますます熱気を帯びてきた。次々と報告される新しいディフェンスシステムや時空間マルチオミクス解析によって明らかになるファージ-宿主間相互作用の詳細、合成生物学の発展など、ファージの基礎研究・応用研究が急速に進んでいる。また、ファージの持つ特有な殺菌機構を利用した細菌感染症治療は、薬剤耐性問題に対する「切り札」として期待されている。欧米ではファージセラピーがいよいよ現実のものになりつつある。本シンポジウムでは、ファージに関連する研究分野で活躍されている研究者にご登壇いただき、ファージと細菌の攻防戦略、進化系統解析、さらにはファージセラピーへの応用についてお話しただく。ファージと細菌の絶え間ない戦いから、学べるはずだ。

共催：日本ファージセラピー研究会  
Co-host: Japanese Society for Phage Therapy

## S3-1

### 細菌とファージの生存競争

○大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

#### The arms race between bacteria and their phages

○Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Science and Engineering, Saitama Univ.)

ファージは地球上で最も数が多い生物的存在であり、食物連鎖の最下層に位置する細菌の密度に大きな影響を与える。両者の攻防は 30 億年前から始まったと推定されており、細菌は、ファージ感染を回避するためにレセプターの形状を変化させたり、増殖を阻害するために制限酵素や CRISPR-Cas 機構を獲得する等、さまざまな抗ファージ機構を発達させてきた。一方、ファージもこれらの機構に対抗するために新たなしくみを常に獲得してきた。したがって、両者は競い合いながら互いに進化してきた共進化の関係にある。我々はこれまで、大腸菌がもつトキシン-アンチトキシン系 (以下、TA) が抗ファージ作用を有することを見出した。また、一部のファージは TA に対抗するためのしくみを備えていることを明らかにした。本シンポジウムでは、TA をめぐる両者の攻防について、いくつか例をあげて紹介する。また、近年 CBASS や BREX、Retron など、新しい抗ファージ機構の発見が続いている。我々も、大腸菌の機能未知因子群 AbpA-AbpB が広範なファージの増殖を抑えることを見出し、現在その分子機構の解明に取り組んでいる。本シンポジウムでは、これらの結果についても併せて紹介する。

## S3-2

## Endless battle between phage and bacteria: discovery of bacterial defense system and phage anti-defense system

○Aa Haeruman Azam<sup>1</sup>, Kohei Kondo<sup>1,2</sup>, Tomohiro Nakamura<sup>1,3</sup>, Shinjiro Ojima<sup>1</sup>, Azumi Tamura<sup>1,4</sup>, Wakana Yamashita<sup>1,5</sup>, Koichi Watashi<sup>1</sup>, Yoshimasa Takahashi<sup>1</sup>, Longzhu Cui<sup>6</sup>, Kotaro Kiga<sup>1,6</sup> (1)Research Center for Drug and Vaccine Development, The National Institute of Infectious Disease, 2)Antimicrobial Resistance Research Center, The National Institute of Infectious Disease, 3)Lab. Veterinary Biochemistry, Dept. Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen Univ., 4)Dept. Computational Biology and Medical Sciences, Grad. Sch. Frontier Science, The Univ. of Tokyo, 5)Sch. Advanced Science and Engineering, Dept. Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ., 6)Div. Infection and Immunity, Dept. Bacteriology, Jichi Medical Univ.)

The most prevalent organism on the earth, bacteriophages (phages), are viral predators that target bacteria. It would seem that predatory phages are present wherever bacteria are present. In order to withstand the unrelenting attack of phage, bacteria have evolved a variety of defense mechanisms that function at every stage of the phage life cycle. Phages rapidly collaborate to overcome these challenges, resulting in a constant and frequently unanticipated molecular arms race. The development of molecular analysis has allowed us to better comprehend new bacterial defense mechanisms and phage escape mechanisms (anti-defense system). Here, using the bacterial defense library, we describe how the broad-host-range phage vB\_EcoS\_SP015 circumvents bacterial defense. With vB\_EcoS\_SP015 and other genomically identical phages, we infected bacteria carrying defense libraries, and we noticed variations in the phages' infectivity against various defense systems. Extensive studies demonstrate the existence of genes in vB\_EcoS\_SP015 that evade defense systems. The phage could evade the defense system by (1) supplying a large amount of a molecule to replace the molecule in the bacteria that had been damaged by the defense system, and (2) inactivating the defense system via a putative anti-defense protein. This identified anti-defense protein was shown to rescue phage infection from different types of one defense system group. Furthermore, it was determined that 3% of the phages in the database possessed homologs of the identified anti-defense protein. Given the diversity of bacterial defense systems, many phages encode antiphage defense systems in their genomes to bypass the system.

## S3-3

## ウラシル含有 DNA ゲノムを有する巨大ファージの細菌進化への影響

○内山 淳平<sup>1</sup>, 内山 伊代<sup>1</sup>, 後藤 和義<sup>1</sup>, 山本 由弥子<sup>1</sup>, 松崎 茂展<sup>2</sup>, 松下 治<sup>1</sup> (1)岡山大学・医歯薬・病原細菌, 2)高知学園大)

## Implications for bacterial evolution of giant phages with uracil-containing DNA genomes

○Jumpei Uchiyama<sup>1</sup>, Iyo Uchiyama<sup>1</sup>, Kazuyoshi Gotoh<sup>1</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>1</sup>, Shigenobu Matsuzaki<sup>2</sup>, Osamu Matsushita<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., 2)Kochi Gakuen Univ.)

巨大バクテリオファージ (ファージ) とは、200 kbp 以上の長い二本鎖 DNA ゲノムを持つファージである。巨大ファージの中に、核酸塩基のチミンの代わりにウラシルへ完全置換した DNA ゲノムを有する巨大ファージ (以下、dU 巨大ファージ) が報告されている。ファージは、細菌の進化に影響を与えてきたことが知られているが、特定のファージの細菌進化に対する影響の調査は少ない。本研究では、系統的・実験的アプローチで dU 巨大ファージを解析し、細菌進化に対する影響を推察した。

(1) 系統的アプローチ [1]: 分離した dU 巨大ファージ PBS1 と S6 のゲノム配列および下水メタゲノムから近縁ファージゲノムを決定した。既存ファージ (dU 巨大ファージを含む) と遺伝子共有ネットワーク分析を行った結果、dU 巨大ファージは新しいウイルス分類となる可能性が示唆された。dU 巨大ファージの系統と宿主の関係の観察から、dU 巨大ファージはグラム陰性菌と陽性菌が分岐する以前に、単一の祖先ファージから分岐した可能性が示された。

(2) 実験的アプローチ [2]: dU 巨大ファージ S6 を介するブドウ球菌属間の遺伝子水平伝播の可能性を検討した。S6 はブドウ球菌種間で普遍形質導入が行われることが示された。また、同じウイルス分類群である dU 巨大ファージ PBS1 は枯草菌において普遍形質導入を行うことが知られている。このことから、一部の dU 巨大ファージは普遍形質導入を行い、細菌の進化に寄与すると予想された。

以上から、dU 巨大ファージは、太古から残った独立したウイルス群であり、細菌の進化に大きく関わってきた可能性が考えられる。

1. *Virus Research*. 319, 198881, 2022.
2. *ISME Journal*. 8 (9), 1949-1952, 2014.

## S3-4

## 細菌感染症創薬に向けた新規モダリティの創出

○崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

## Development of new modalities for drug discovery against bacterial infections

○Longzhu Cui (Bacteriology, Sch. Med., Jichi Medical Univ.)

我々人類は現在、度重なる耐性菌の出現とその蔓延に直面し、従来とは異なるアプローチによる抗菌治療薬の創成が急を要している。このような状況下で、ファージを利用した抗菌療法 (ファージセラピー) が欧米を中心に模索されている。近年、発表者らもファージを利用した感染症創薬研究を進め、耐性菌を選択的に殺菌するファージ製剤の開発を行ってきた (特許第 6923862 号, 国際特願 PCT/JP2019/16801) (Kiga K. et al. *Nat Commun*. 2020). この過程で様々なファージ技術が生み出され、ファージを自由に改変できるようになった。特に、ファージゲノムを完全もしくは部分的に欠損させることで、非増殖性ファージの合成に成功し、ファージ製剤の生物学的安全性を高めることができた。また、任意の遺伝子・タンパク質を搭載することで、ファージのヒト組織・細胞への指向性、殺菌活性、安定性などを高めることができた。本発表では、令和 3 年度「革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST)」に採択された発表者らの課題とその進捗状況を紹介する。本課題では、上述のファージ技術とファージの創薬モダリティ性能を最大限に利用し、既存の抗菌薬で治療が困難な細菌感染症に対して有効なファージ医薬品を創出するための技術開発を行う。主に、ファージ探索研究と外来性遺伝子搭載技術の開発; 薬剤耐性菌、バイオフィーム形成細菌、細胞内寄生細菌を対象とした抗菌技術の開発; ファージカプシドワクチンの開発などがある。即ち、ファージを新たな創薬モダリティとして、その医学応用における多様な可能性を追求しつつ、社会実装が可能な感染症創薬の実現を目指す。

## S3-5

## バクテリオファージを改変創出する汎用技術及び生物学的封じ込め法の開発

○満仲 翔一<sup>1,2</sup>, 安藤 弘樹<sup>1,2,3,4</sup> (1)岐阜大・医・病原体制御, 2)岐阜大・医・ファージバイオロジクス, 3)岐阜大・G-CHAIN, 4)アステラス製薬・創薬・VU-EPHT)

## Synthetic engineering and biological containment of bacteriophages

○Shoichi Mitsunaka<sup>1,2</sup>, Hiroki Ando<sup>1,2,3,4</sup> (1)Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., 2)Phage Biologics, Grad. Sch. Med., Gifu Univ., 3)G-CHAIN, Gifu Univ., 4)VU-EPHT, DA, Astellas Pharma)

ファージセラピー研究がますます盛んになっているなか、様々な機能を搭載した改変型ファージが創出されている。例えば、バイオフィーム分解酵素や抗菌遺伝子を搭載して殺菌効率を向上させたもの、尾繊維などの改変によって宿主域を再設計したもの、CRISPR/Cas を搭載した塩基配列依存的殺菌性をもつものなどであり、これらを用いた実験的ファージセラピーの有用性も報告されている。実際に、改変型ファージセラピーが実現すれば天然ファージを超える治療効果も期待されるが、それを実現するには二つの大きなハードルがある。一つ目は、ファージの改変が依然として極めて難しいことである。モデルファージや既に改変手法が確立されているごく一部のファージ以外では行われていない。近年では、構築したファージゲノムを宿主細菌に導入することで、ある程度自由に改変を施すことが可能になっているがこれも一部のファージに限定されている。もう一つは、改変したファージが遺伝子組換え生物に該当することである。自然環境などへの拡散流出を防ぐために何かしらの封じ込め法が必要である。

私たちはこれらのハードルを乗り越えるために、汎用性の高いファージ改変創出技術及び生物学的封じ込め法の開発に取り組んできた。本演題では、様々な細菌種及びファージファミリーを対象にしたゲノム設計から機能的なファージの起動までの実例をご紹介します。また、本技術を活用した、化学合成したゲノムからのファージ起動や完全な無細胞起動系についても取り上げたい。さらに、改変ファージを実世界で用いるための生物学的封じ込め法とその応用例についてもご紹介し、新しい改変型ファージセラピーを提案したい。

### S3-6

#### 口腔感染症の予防・治療を目指したファージ探索

○松尾 美樹<sup>1,2</sup>, 小松澤 均<sup>1,2</sup> (1広島大・医系科学研究科・細菌学, <sup>2</sup>広島大・院内感染症プロジェクト研究センター)

#### Phage search for prevention and treatment of oral infections

○Miki Kawada-Matsuo<sup>1,2</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>1,2</sup> (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Project Research Ctr., Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ.)

バクテリオファージ (以下ファージ) は、細菌に特異的に感染するウイルスであり、基本的に宿主細菌が存在する場所に共に存在している。ファージについての報告は近年増えてきたものの、未だに研究領域としては大きくないのが現状である。口腔感染症として主な疾患として、う蝕や歯周病があげられる。う蝕や歯周病の起炎菌は口腔常在細菌であり、元来口腔内に占める割合は非常に低いことから、既存の抗菌薬投与による積極的な治療は行われない。しかし、近年、う蝕・歯周病と全身疾患との関連性が指摘されていることから、既存の歯科治療と併用できる積極的な病原菌排除が求められる。そのためには、既存の抗菌薬のような抗菌スペクトラムの広い薬剤ではなく、う蝕細菌や歯周病関連細菌に特異的に効果を発揮する治療薬が求められる。病原細菌を特異的に排除できるファージセラピーは、口腔細菌叢への影響がない口腔感染症の予防・治療が可能であることから、このニーズに合うと考えられる。私たちは、ヒトから分離したう蝕細菌のゲノム情報からファージが挿入されていることを読み取り、ストレス処理により temperate phage を活性化させ精製することで、う蝕細菌に効果を発揮するファージを分離した。この方法により、う蝕細菌に抗菌作用を持つファージに加え、バンコマイシン耐性腸球菌や *Clostridium difficile* に抗菌作用を持つファージの分離に成功していることから、今回用いた分離方法は効率よくファージを分離できる可能性を持っている。本講演では、口腔感染症に対するファージセラピーに向けて、私たちの研究と将来展望をご紹介させていただきたい。

### S4

#### 細菌感染症創薬の新たな潮流とその分子基盤

コンピーナー：鈴木 仁人 (国立感染症研究所)  
星野 仁彦 (国立感染症研究所)

#### Novel strategies for antimicrobial drug discovery and their molecular basis

Conveners: Masato Suzuki (National Institute of Infectious Diseases)  
Yoshihiko Hoshino (National Institute of Infectious Diseases)

コロナ禍を契機に感染症創薬に向けた新規モダリティの実用化や既存モダリティの最適化、既存の創薬シーズの利活用の気運が高まっている。細菌感染症に対する創薬は長く停滞しており、新たな戦略による予防薬・治療薬の研究開発が必要となってきた。細菌感染症を制御するためには、菌側の病原因子や薬剤耐性因子、細菌-細菌間および細菌-宿主間の相互作用などの分子メカニズムを理解し、その知見に立脚した創薬標的の設定が重要となる。本シンポジウムでは現在国際的な問題となっている薬剤耐性菌や抗酸菌 (結核菌および非結核性抗酸菌) などによる感染症、腸管細菌叢の機能とそのディスバイオーシスに関連した疾患に関して、革新的な技術や最先端の異分野融合によって研究を展開している研究者にご講演いただき、本学会員の多くを占めるアカデミアの研究者でも関わることのできる新たな細菌感染症創薬に向けた取り組みについて議論したい。

後援：国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)  
Supported by: Japan Agency for Medical Research and Development

### S4-1

#### 薬剤耐性グラム陰性病原細菌を標的とした抗菌アジュバントの探索と創製

○平林 亜希<sup>1</sup>, 桑江 朝臣<sup>2</sup>, 阿部 章夫<sup>2</sup>, 柴山 恵吾<sup>3</sup>, 鈴木 仁人<sup>1</sup> (1感染研・AMR, <sup>2</sup>北里大・院・感染制御科学・分子細菌, <sup>3</sup>名古屋大・院医・細菌学)

#### Development of antimicrobial adjuvants targeting gram-negative bacterial pathogens

○Aki Hirabayashi<sup>1</sup>, Asaomi Kuwae<sup>2</sup>, Akio Abe<sup>2</sup>, Keigo Shibayama<sup>3</sup>, Masato Suzuki<sup>1</sup> (1AMR Res. Ctr., NIID, <sup>2</sup>Lab. Bact. Infect., Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ., <sup>3</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

近年、薬剤耐性菌による難治性感染症が世界の公衆衛生上の問題となっている。グラム陰性菌は化合物透過のバリアーとなる外膜を有し、抗菌薬の開発が困難である。ポリミキシン系抗菌薬のコリスチンは、グラム陰性菌の外膜を標的とする強力な殺菌作用を有し、多剤耐性グラム陰性菌による感染症の治療薬として重要な役割を担っている。しかし、獲得性コリスチン耐性遺伝子 *mcr* を有する多剤耐性グラム陰性菌が世界のヒト、動物、環境に拡散していることが報告されている。本研究では、大腸菌を含む腸内細菌目細菌、緑膿菌、アシネトバクター属菌など薬剤耐性で問題となるグラム陰性病原細菌に対しコリスチンの抗菌作用を増強させるアジュバント効果を有する薬剤を既承認薬ライブラリーから同定した。その既承認薬の細菌における新たな作用機序を解明するために、コリスチンと既承認薬の併用に耐性を示す大腸菌自然変異株のゲノム変異部位の解析を行ったところ、グラム陰性菌の外膜形成に関わるタンパク質をコードする遺伝子にアミノ酸置換をもたらす変異を認めた。同遺伝子産物は細菌外膜でβバレル構造を形成し、栄養や老廃物の透過、シグナル伝達などに関わっており、その阻害はコリスチンの抗菌作用を増強することが明らかとなった。本演題では、既承認薬の再配置による抗菌アジュバントの探索、既承認薬と細菌標的分子との相互作用、合成的探索による既承認薬とその類似体の構造活性相関、さらにAIを利用した既承認薬の骨格改変の試みなど、細菌感染症に対する創薬のブレークスルーとなりうる新たな手法について紹介したい。

会員外協力者：竹内 恒, 今崎 剛, 加藤 堯彬, 五十嵐 雅之, 渡辺 匠, 宮崎 智貴

## S4-2

結核菌および非結核性抗酸菌に有効な天然物の革新的な構造改変

○池田 治生 (次世代天然物化学技術研究組合)

### Derivatization and development of potent anti-mycobacterial agents by the next-generation technique

○Haruo Ikeda (Technology Research Association for Next Generation Natural Products Chemistry)

Antibiotics have made tremendous contributions to the treatment of infectious diseases to date. However, there are not many antibiotics that are effective even against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM). Recently, the emergence of drug-resistant bacteria has been pointed out in the treatment of tuberculosis, and there is concern about the emergence of drug-resistant bacteria in NTM as well. We have studied the molecular genetics involved in antibiotic biosynthesis. Among these, thiopeptide compounds were found to be effective against Gram-positive pathogenic bacteria, as well as against NTM. A group of thiopeptide compounds inhibit bacterial protein synthesis, but their target sites are quite different from those of existing drugs used in clinical practice. Therefore, it is expected to be highly effective against bacteria resistant to existing drugs. Since the molecular weight of thiopeptide compounds exceeds 1,000, it is practically difficult to develop derivatives through organic synthesis. We established a system that allows multiple simultaneous substitution of amino acid residues in peptide compounds, and also enables stable supply of the modified compounds by heterologous expression system. Using this technique, we aim to produce a number of novel thiopeptide derivatives and create new anti-tuberculosis and anti-NTM drugs.

## S4-3

細胞内寄生抗酸菌を標的とする新たな抗菌薬スクリーニング手法開発研究

○深野 華子<sup>1</sup>, 山本 健太郎<sup>1</sup>, 松本 靖彦<sup>2</sup>, 星野 仁彦<sup>1</sup> (1国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・感染制御部, 2明薬大・薬・微生物)

### Development of a new screening method targeting intracellular NTM

○Hanako Fukano<sup>1</sup>, Kentaro Yamamoto<sup>1</sup>, Yasuhiko Matsumoto<sup>2</sup>, Yoshihiko Hoshino<sup>1</sup> (1Dept. Mycobacteriol, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 2Dept. Microbiol., Meiji Pharmaceutical Univ.)

近年, 世界的に肺非結核性抗酸菌 (NTM) 症の患者数が増加傾向にあり, 本邦においても国内の罹患率は人口 10 万人あたり 14.7 人 (2014) と結核の罹患率 12.3 人 (2018) を既に大きく上回っており今後も患者数の増加が見込まれる新興感染症である。世界的な感染者数の増加が見られるにも関わらず, NTM 症は決定的な治療法が未だに明らかになっていないため, 根治が困難な感染症である。NTM 症治療にはマクロライドをキードラッグとした多剤併用療法が実施されるが, 治療期間が一年以上必要であることや治療途中に耐性菌が出現することにより根治は極めて困難となることが知られている。NTM 症の中でも特に, *Mycobacterium abscessus* complex (MABC) の亜種である *M. abscessus* subsp. *abscessus* はマクロライドの標的分子のメチル化酵素 erm41 を持っており *in vitro* では僅か 14 日間で高度に耐性化 (MIC>64 ug/mL) することから, “Antibiotic Nightmare”とも呼ばれており, 新規抗菌薬探索やドラッグリポジショニングによる新たな治療手段の開発が世界的急務となっている。NTM に対する抗菌薬治療開発が求められる一方, 抗酸菌に対する抗菌薬治療は, 6 ヶ月から数年に渡るため長期的な投薬が可能で, 細胞障害性の低く, 細胞内寄生細菌である抗酸菌にアプローチするため高い細胞透過性が必要であることから, 開発におけるハードルは決して低くない。本シンポジウムでは, 我々が開発に取り組んでいる *M. abscessus* を中心とした細胞内寄生状態の NTM をターゲットとする新たな抗菌薬スクリーニング手法について紹介する。

## S4-4

感染症に対峙する新規モダリティとしての腸内細菌叢

○金 倫基 (慶應大・薬・創薬研究センター)

### The gut microbiota as a novel modality to overcome infectious diseases

○Yun-Gi Kim (Res. Ctr. Drug Disc., Fac. Pharm., Keio Univ.)

正常な腸内細菌叢は細菌間で非常に安定なコミュニティを形成しており, 外来の病原性細菌の侵入に対して強い抵抗性を示すことが知られている。腸内細菌による病原性細菌の定着・侵入の阻害作用は, コロナイゼーションレジスタンス (Colonization resistance; CR) と呼ばれている。広域スペクトラム抗菌薬は, 多様な細菌感染症に対して効果を期待できる反面, 腸内細菌叢による CR を低下させ, *Clostridioides difficile* などの病原性常在細菌 (Pathobiont) や腸内の抗菌剤耐性 (Antimicrobial Resistance; AMR) 株の増殖を促進させてしまう。生きた生物学的製剤 (LBPs: Live Biotherapeutic Products) は, 腸内細菌叢による CR を回復させ, pathobiont や AMR 株の感染拡大を阻止する, 新たなモダリティとして期待が高まっている。実際に, 便微生物移植 (Fecal microbiota transplantation; FMT) は再発性 *C. difficile* 感染症に対して高い有効性を示すことや, 複数種から構成される腸内細菌カクテルがマウス感染モデルにおいて AMR の腸内での定着を阻害することなどが報告されている。そこで本講演では, pathobiont や AMR 株の定着・増殖阻害のための FMT や LBPs の開発状況や, 腸内環境改善による感染症制御の可能性についてお話ししたい。

## S4-5

ディスバイオーシス関連疾患に対する新規治療法の開発

○植松 智<sup>1,2</sup> (1大阪公立大・医・ゲノム免疫, 2東大・医科研・メタゲノム医学)

### Development of novel therapies for dysbiosis-related diseases

○Satoshi Uematsu<sup>1,2</sup> (1Dept. Imm. & Gen., Grad. Sch. Med., Osaka Metropolitan Univ., 2Div. Metagenome Med., IMS., U Tokyo)

次世代シーケンサーが開発され, 16SrRNA 解析が汎用化し様々な疾患で腸内細菌の構成異常 (dysbiosis) が存在することが明らかになった。そして, dysbiosis が疾患の発症, 増悪に関わることも分かってきた。しかしながら, 菌の構成比を見るだけでは中々創薬のポイントは見出しにくい。腸内細菌叢の全ゲノムシーケンセスを行い, 遺伝子バスクエ解析を行うことによって, 腸内細菌叢の臓器機能を評価でき, 創薬ポイントを見出すことができる。最近の報告では, 炎症性腸疾患や糖尿病など疾患の発症の直接原因となる pathobiont が次々に発見されている。疾患の発症との関連が証明された菌では, 将来的に除菌が望まれる。しかし, 広域スペクトラムの抗生剤による排除では dysbiosis を悪化させ推奨されない。pathobiont を特異的に制御する方法が望まれる。本講演では, 構築した超高速パイプラインの概要, それを用いた腸内細菌解析, さらに腸内ウイルス叢の解析を紹介する。さらに, dysbiosis の是正と pathobiont の特異的排除を目的とした粘膜ワクチンの開発及びファージ治療の基盤構築に関しても報告する。

## 食中毒研究の最前線

コンピーナー：山崎 伸二（大阪公立大学）  
河合 高生（大阪健康安全基盤研究所）

### Front line of food poisoning research

Conveners: Shinji Yamasaki (Osaka Metropolitan University)  
Takao Kawai (Osaka Institute of Public Health)

我が国の食中毒事例はコロナ禍でやや減少したものの、最近再び増加傾向にある。依然として患者数・発生件数が多い病因物質としてノロウイルス、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌が挙げられる。一方、新興・人獣共通感染症起因菌であるエッシャーキア・アルバティイによる集団食中毒事例も散見される。本菌は、細菌学的性状や保有病原因子が下痢原性大腸菌、特に腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌と酷似しており、誤同定も多く、本菌による食中毒の実態は十分に明らかとなっていない。近年、エッシャーキア・アルバティイの選択増菌培養法が開発され、食品汚染の実態が明らかとなりつつある。また、黄色ブドウ球菌とされていた一部が新種の *Staphylococcus argenteus* であることが明らかとなり、新たな食中毒起因菌として注目を集めている。本シンポジウムではこれら食中毒の原因となる細菌やウイルスを最前線で研究している研究者に、最新の研究成果と今後の課題について発表してもらう予定である。本シンポジウムが、普段あまり触れることのないノロウイルスの最先端の情報を含め、日本細菌学会で研究している若手研究者への情報提供となり、日本食品微生物学会と日本細菌学会のコラボレーションの新たな扉が開かれることを期待する。

共催：日本食品微生物学会  
Co-host: Japanese Society of Food Microbiology

## S5-1

### ノロウイルス感染症：現状と将来の展望

○左近 直美（大阪健康安全基盤研究所・微生物部）

### Norovirus Infection: current and future prospects

○Naomi Sakon (Dept. Microbiol. Osaka Institute of Public Health)

ノロウイルスによる胃腸炎は世界で毎年7億人が罹患し、22万人が死亡すると推計され、それによる医療コストは42億ドル、社会経済的損失は603億ドルにのぼると試算された（Bernard H et al. PloS one. 2016）。ウイルス性胃腸炎の原因としてノロウイルスは全年齢層に感染し、再感染もあること、ワクチンがないことから主要原因となっている。例えば、食中毒事件における約4分の1の事例、患者数の約半数がノロウイルスによるものである。加えて、保育所や高齢者施設における集団胃腸炎は毎年数多く発生している。ノロウイルスは発見以降（1968年）分離培養が試みられ、ようやく2016年Estesらのグループによって幹細胞を分化増殖させたエンテロイドを用いることで初めて実験室内増殖が可能となった。これにより直接ノロウイルスを用いた各種評価が進むことと思われる。私たちはノロウイルスの感染防止のため食中毒をはじめとする集団胃腸炎の事例および散発事例ウイルスの特徴や性状解析を行ってきた。これらは地方行政、地方衛生研究所のデータの蓄積の上に成り立っている。これら長期にわたるノロウイルス疫学調査から、再感染における遺伝子型と免疫、発症期間と年齢の逆相関関係、集団免疫の存在、ノロウイルスの感染性の維持を示すことができた。また最近ではノロウイルスを含むvesicleの存在なども明らかになっており、現在ノロウイルスの感染実態解明に向けて取り組んでいる内容もあわせて紹介したい。

## S5-2

### 新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*

○工藤 由起子, 新井 沙倉, 廣瀬 昌平（国立衛研衛微部）

### An emerging foodborne bacterial pathogen, *Escherichia albertii*

○Yukiko Hara-Kudo, Sakura Arai, Shouhei Hirose (Div. Microbiol., NIHS)

*Escherichia albertii* は、1991年にバングラディッシュの小児下痢症患者から初めて分離され、当初 *Hafnia alvei* として同定されていたが、*H. alvei*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 属の他菌種などとの遺伝学的解析・生化学的性状試験結果の比較によって2003年に新種として命名された下痢症原因菌である。日本では *E. albertii* による集団食中毒事例が報告されており、100人以上の事例も発生していることから新興食中毒細菌として注目されている。食中毒の原因食品については、食事は判明しても原因食材が不明な場合がほとんどである。しかし、これまでの食品汚染状況の調査では、鶏肉、豚肉、レタス、カキなどから *E. albertii* が検出されており、国内で消費されている身近な食品が原因となる可能性が考えられている。また、鶏や豚などの家畜、野鳥など多種の鳥やアライグマなど野生動物、環境水や下水など環境からの *E. albertii* 検出の報告があることから、動物と環境が本菌の食品汚染に関与することが推察されている。一方で、食中毒原因食品調査には *E. albertii* の効率的な検査法が必要である。これまでに、*E. albertii* の細菌学的特徴や薬剤耐性を利用した増菌培地や分離培地が報告されており、また、本菌特異的遺伝子配列を利用したNested PCR法やリアルタイムPCR法も食品の増菌培養液からの検出や分離培地上コロニーの同定の方法として知られている。本講演では、以上のような *E. albertii* 食中毒を取り巻く食品に関連する情報について紹介したい。

## S5-3

### 重症例由来腸管出血性大腸菌の細菌学的特徴について

○伊豫田 淳, 李 謙一（感染研・細菌I）

### Characterization of enterohemorrhagic *E. coli* isolated from severe cases

○Sunao Iyoda, Ken-ichi Lee (Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infec. Dis.)

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) の国内での感染者数は年間3,000-4,000例程度で推移している。Covid-19パンデミック発生以降、2020-2021年は2011-2019年までの平均数と比較しておよそ80-85%の感染者数が報告されており、2022年はこれを上回る数が報告されている（2022年10月現在）。国内における重症者（ここでは血便、急性腎不全、溶血性尿毒症症候群 [hemolytic uremic syndrome: HUS]、脳症、死亡例等と定義する）由来のEHECとして主要な血清群はO157, O26, O111, O121, O103, O145, O165の7つであり、これらのEHECに共通な病原性遺伝子として、志賀毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) および3型分泌装置や接着因子をコードするLEE遺伝子群が知られている。一方、これら7血清群以外のO群に属するEHECのうち、LEEを保有しないEHEC (LEE-negative EHEC) による重症例も数多く報告されており、重症例由来のLEE-neg EHECではStxに加えて第2のベロ細胞毒素であるサチラーゼ毒素 (Subtilisin toxin: Sub) を産生することが知られている。HUS症例は国内で年間50-100例程度報告されているが、このうちの約30%はEHEC不分離の症例であり、HUS患者便中のStxの検出またはHUS患者血清中の抗大腸菌凝集抗体の検出 (血清診断) でEHEC感染によるHUS症例 (EHEC-HUS) の確定診断となる。本発表では、HUS症例におけるEHEC分離および血清診断から我々がEHEC-HUSと確定診断した事例を中心に、重症例から分離されたEHECの細菌学的特徴について述べたい。

## S5-4

新興食中毒起因菌 *Staphylococcus argenteus* の分子疫学

○若林 友騎 (大安研・微生物)

Molecular epidemiology of *Staphylococcus argenteus*, an emerging foodborne pathogen

○Yuki Wakabayashi (Div. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health)

ブドウ球菌食中毒は、食品中で産生されたブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を摂取することで発症する食品内毒素型の細菌性食中毒であり、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) がその主要な原因菌として知られている。我々は、2014年と2015年に大阪府内で発生したブドウ球菌食中毒事例の原因菌について詳細に解析し、これら2事例が、B型SEを産生する *S. argenteus* によるブドウ球菌食中毒であったことを明らかにした。また、東京都と秋田県でも *S. argenteus* によるブドウ球菌食中毒事例がそれぞれ報告されており、*S. argenteus* はブドウ球菌食中毒の新たな原因菌として注目されている。

*S. argenteus* は、2015年に正式に新種登録された新興病原細菌である。本菌は、*S. aureus* と遺伝系統学的に近縁であり、通常の検査法ではしばしば *S. aureus* として誤同定される。そのため、本菌の正確な分布状況やその細菌学的特徴については、日本を含む多くの国で不明な点が残されている。本発表では、細菌検査における本菌同定上の課題について議論するとともに、我々がこれまでに分離・同定した日本の *S. argenteus* 株の分子疫学解析結果について報告する。

## S5-5

## カンピロバクター食中毒制御に向けて

○朝倉 宏<sup>1</sup>, 中村 寛海<sup>2</sup>, 川瀬 遵<sup>3</sup>, 中馬 猛久<sup>4</sup> (<sup>1</sup>国衛研・食品衛生管理, <sup>2</sup>大安研・微生物, <sup>3</sup>島根県保健科・細菌, <sup>4</sup>鹿児島大・獣医公衆衛生)Toward regulation of *Campylobacter* food poisoning○Hiroshi Asakura<sup>1</sup>, Hiromi Nakamura<sup>2</sup>, Jun Kawase<sup>3</sup>, Takehisa Chuma<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Div. Biomed. Food Res., Natl. Inst. Health Sci., <sup>2</sup>Dept. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, <sup>3</sup>Dept. Bacteriol., Shimane Pref. Inst. Public Health Environ. Sci., <sup>4</sup>Dept. Vet. Public Health, Kagoshima Univ.)

Thermophilic *Campylobacter* is involved in gastrointestinal illness in humans via intake of contaminated foods. Chicken meat is known as one of the main sources for human campylobacteriosis. Recent trend for favoured consumption of chicken sashimi increases potential risk for infection in Japan, because most of which served at restaurants are made from normally slaughtered and processed chicken carcasses or meats. Thus, it is socially required to establish particular control program for this type of meat dish. It is also unclear on how this pathogen establishes chicken colonization at farm. Wild bird is recognized as possible transmission vector, while most of the wild bird isolates show distinct phylogenetic lineage from human isolates. Representative wild bird isolates exhibited less property for chicken colonization than human isolates, but one of which can increase its property after passage through chicken gut, suggesting possible transmission routes from wild bird to chicken, thereby leading to cause human infection. As it is currently required to accumulate quantitative data for bacterial kinetics throughout the food chain, especially chicken meat. Toward comprehensive understanding of the bacterial kinetics, it is essential to standardize the testing method. We will finally introduce current situation to establish and validate standardized protocol.

## S6

## 「内なる外」から健康に～食品・消化管内に棲む細菌の健康への貢献と応用～

コンピーナー：長谷部 晃 (北海道大学)  
小松澤 均 (広島大学)

## Health from “inner outside”: Contribution and application of bacteria in foods and digestive tract to health

Conveners: Akira Hasebe (Hokkaido University)  
Hitoshi Komatsuzawa (Hiroshima University)

「内なる外」と称される口腔から結腸に至るまでの消化管には、無数の細菌が息息しており、普段摂取する食品中の微生物に加えて、これら微生物群集が我々の健康を左右することが知られている。しかしこれらの働きと健康への影響のメカニズムについてはまだ分からないことも多く、現在世界中で盛んに研究が行われている。そこで本シンポジウムでは、この分野で基礎から応用まで幅広い研究を進めている日本農芸化学会所属の研究者をお呼びし、ストレスと腸内環境ならびに腸内細菌との関係とプロバイオティクスによる改善、腸内細菌と食習慣の関連を中心に健康との関連も含めた研究成果、バクテリオシンの機能とオーラルケアへの応用、腸内細菌叢を介したアンドロゲンのエネルギー代謝調節、腸内細菌による食事脂質代謝物の開発など、基礎研究ならびに応用への展開例をご紹介いただき、消化管内細菌について異なる観点を持つ本学会所属研究者と議論を進めたい。

共催：日本農芸化学会  
Co-host: The Japan Society for Bioscience, Biotechnology,  
and Agrochemistry

## S6-1

## 腸内細菌が産生する第四世代脂質メディエーター HYA について

○岸野 重信 (京大・院農・応用生命)

## Next-generation lipid-mediator (HYA) produced by gut microorganisms

○Shigenobu Kishino (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

食品として摂取した脂質は、胆汁リパーゼなどの作用により脂肪酸と2-モノアシルグリセロールとに分解され、小腸で吸収される。吸収された脂肪酸と2-モノアシルグリセロールはトリアシルグリセロールに再合成され、エネルギー源として利用されるだけでなく貯蔵脂肪として蓄えられるほか、ヒトの脂肪酸関連酵素により鎖長延長、不飽和化などを経て様々な脂肪酸へと変換される。例えば必須脂肪酸であるリノール酸は炭素数20のアラキドン酸 (ARA) へ、 $\alpha$ -リノレン酸は炭素数20のエICOSAペンタエン酸 (EPA) や炭素数22のドコサヘキサエン酸 (DHA) などに変換される。さらにARAやEPA、DHAは、ヒトの酸化酵素により様々な生理機能を有する脂質メディエーターへ変換する。このようにヒトにとって大事な脂質は、三大栄養素として知られているが、吸収されなかった脂肪酸が消化管内に棲む細菌によってどのように代謝されるかの研究はほとんどされていない。演者は、食事由来脂肪酸が、腸内細菌によりどのように代謝され、その代謝物がヒトに対しどのような生理機能を有するかに興味を持ち、腸内細菌の不飽和脂肪酸代謝について評価してきた。その結果、不飽和脂肪酸の飽和化代謝や、水酸化代謝など様々な代謝を見出し、さらにその代謝物が、腸管バリア保護機能、脂肪酸合成・脂質代謝制御、免疫制御、炎症抑制、抗酸化、血糖値抑制などの生理機能を有することを見出した。本講演では、腸内細菌の一種である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の不飽和脂肪酸飽和化代謝を中心に、腸内細菌が作る第四世代脂質メディエーターについて紹介する。

## S6-2

### L. パラカゼイ・シロタ株によるストレス緩和および睡眠の質改善作用

○須田 一徳 ((株)ヤクルト本社・中央研究所・食品研究所)

#### Effect of *Lactocaseibacillus paracasei* Shirota on stress and stress-associated sleep disturbance

○Kazunori Suda (Food Res. Dept., Yakult Central Institute)

現代人の健康を害する要因の一つとしてストレスが挙げられる。過度なストレスを受け続けると、自律神経の乱れや免疫機能の低下による様々な不調が引き起こされ、うつ病や睡眠障害、心身症などの発症リスクが高まることが知られる。一方近年の研究から、ストレスに反応して活性化する視床下部-下垂体-副腎系に対して、腸内細菌が作用することが明らかにされつつある。このような知見を背景に実施した基礎研究を通じて、我々はL. パラカゼイ・シロタ株 (LcS; 旧名称はL. カゼイ・シロタ株) が神経系に作用すること、本作用は菌の密度依存的に高まることを見出した。そこで、全国共通進級試験 (学術試験) を控えた医学部4年生を対象として、高菌数・高密度に摂取したLcSがストレス応答や睡眠に及ぼす効果を検証するプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施した。その結果、学術試験が近づくにつれてストレス体感の増大や生理的なストレス指標である唾液中コルチゾール濃度の上昇が見られたが、プラセボ飲用群に比べてLcS飲用群ではそれら変化が有意に抑制された。また、プラセボ飲用群では学術試験が近づくにつれて風邪様症状や腹部症状の発症率が増加したのに対して、LcS飲用群ではそれが有意に抑制された。さらに、OSA睡眠調査票や睡眠時脳波の解析では、入眠時間や深い睡眠などの指標において、プラセボ群よりもLcS飲用群で有意に良好な結果が認められた。以上より、LcSの継続的な摂取は、一時的な精神的ストレスがかかる状態におけるストレス応答を低減させ、それに伴う体調不良や睡眠の質悪化を軽減させることが示唆された。

## S6-3

### 乳酸菌が生産する抗菌ペプチド・バクテリオシンの探索と利用

○善藤 威史 (九州大・農・生機科)

#### Characterization and applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria

○Takeshi Zendo (Dept. Biosci. Biotechnol., Fac. Agr., Kyushu Univ.)

A wide variety of bacteria including lactic acid bacteria (LAB) have been found to produce ribosomally synthesized antimicrobial peptides, bacteriocins. LAB bacteriocins inhibit the growth of gram-positive bacteria and are thought to contribute to preservation of fermented foods. LAB bacteriocins generally exert antibacterial activity through quick action on bacterial cell membrane and can be degraded easily by intestinal digestive enzymes without leaving residues to the environment, which lets them considered as safe antimicrobial agents. In particular, nisin A, the most representative bacteriocin produced by some strains of *Lactococcus lactis*, has been utilized as a food preservative in more than 50 countries including Japan. Based on its safety, we have applied nisin A for non-food uses and developed oral care agents. For further extensive applications of LAB bacteriocins, we are screening new LAB isolates for novel bacteriocins from various sources. The bacteriocins discovered are being characterized for structure, activity and biosynthetic mechanisms. Some bacteriocins were found to possess unique structures. In addition, some LAB isolates were found to produce more than two bacteriocins. Various bacteriocins and bacteriocin-producing LAB strains allow us to select suitable ones, according to their characteristics to satisfy our varied purposes.

## S6-4

### 食・栄養と健康の関わりを細菌学の視点から理解する

○細見 晃司 (医薬健康研・ワクチンマテリアル)

#### Understanding the relationship between dietary nutrition and health from bacteriology

○Koji Hosomi (Lab. Vaccine Materials, NIBIOHN)

健康に対する社会的関心が高まる中、食品の健康効果が注目されている。しかし、食品の健康効果には個人差があり、この個人差を理解する1つの鍵が腸内細菌であると考えられている。このような背景のもと、私たちは日本人の食習慣や生活環境と健康に関するコホート研究や基礎研究を行い、食品や腸内細菌などの腸内環境を基軸とし健康との関わりを理解するための研究を遂行している。一例として、一般に健康に良い食品成分として認識されている食物繊維が健康効果を発揮するメカニズムの1つとして、腸内細菌によって代謝され、生理活性を有する酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸へと変換されることが必要であることが挙げられる。しかし、その変換能力は腸内細菌の違いにより個人差があることが知られている。これに関し、私たちの最近の研究から、「食物繊維の摂取量と短鎖脂肪酸の量の相関は低いこと」、「食物繊維を摂取することに加えて、代謝できる菌が存在し、かつ、代謝機能が十分に発揮されるための環境を整えておく必要があること」が分かってきた。他にも、日本人の肥満や糖尿病を改善できる有用な腸内細菌としてブラウティア菌 (*Blautia*) を同定したが、その作用メカニズムとしてブラウティア菌が代謝促進や抗炎症、腸内環境の改善などに関わる複数の代謝物を産生することを見だし、菌の存在だけでなく、菌による食品成分の代謝が重要であることが示されている。そこで本シンポジウムでは、食品成分を材料に腸内細菌が代謝・産生し、生体に対して有益な生理活性をもつポストバイオティクスなど、「菌の代謝」に着目し、細菌学の視点から食と健康、さらには個別化栄養の可能性について考えてみたい。

## S6-5

### 男性ホルモンによる腸内細菌制御とメタボ予防

○原田 直樹 (大阪公大・農・生命機能)

#### Regulation of gut microbiota and prevention of metabolic disorders by androgens

○Naoki Harada (Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agric., Osaka Metropol. Univ.)

近年、腸内細菌叢にも性差が存在することが明らかになってきた。腸内細菌叢の性差を形成する要因としては、やはり性ホルモンの関与が挙げられる。男性ホルモンであるテストステロンは、雄の性分化や性成熟を促す。一方で、加齢に伴うテストステロンの減少は、男性の更年期障害である加齢性腺機能低下症 (LOH 症候群) の原因となり、認知症やメタボリックシンドロームの発症など心身の健康に影響することも認知され始めた。このようなテストステロンによる生理作用に腸内細菌の変化が関係することが分かってきた。

性成熟後のマウスにおいて、去勢によるテストステロン減少は、高脂肪食摂取時に食餌効率 (体重増加/摂取エネルギー) を上昇させて内臓脂肪蓄積を伴う肥満、血糖上昇や大腿筋減少、脂肪肝を生じさせるとともに、腸内細菌叢 (*Turicibacter* 属と *Lactobacillus reuteri* の増加) を変化させた。これらの代謝異常はすべて抗生物質投与時には消失した。さらに、雄性アンドロゲン受容体ノックアウトマウスでも同様の結果が認められ、寿命を短縮させた。アンドロゲン作用低下と高脂肪食の相互作用によって腸内細菌叢を変化させて代謝異常を生じさせたと考えられる。

1型糖尿病のモデルであるNODマウスの発症性差においてもアンドロゲンに依存した腸内細菌叢の性差が関係することが判明している。このように、性ホルモンが腸内細菌叢を調節する因子として機能すること、腸内細菌叢の性差が発症性差のある疾患を制御する一因となっていることが明らかになりつつある。本シンポジウムでは、男性ホルモンのエネルギー代謝における役割と腸内細菌の関与に関して、私どもの研究成果を中心に紹介する。



## S7

## 海外拠点からの報告：世界各地で生の感染症に立ち向かう

コンビーナー：藤永 由佳子（金沢大学）  
鈴木 敏彦（東京医科歯科大学）

## Reports from overseas bases: The fight against infectious diseases on site

Conveners: Yukako Fujinaga (Kanazawa University)  
Toshihiko Suzuki (Tokyo Medical and Dental University)

国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）による新興・再興感染症研究基盤創生事業（海外拠点研究領域）が感染症流行地あるいは流行が想定される海外 10 拠点で展開されている。地球規模で COVID-19 など様々な新興・再興感染症が脅威となっている現在、海外拠点で行なわれている感染症についての基礎的研究の重要性が益々高まっていると言える。本シンポジウムでは、フィリピン、コンゴ民主共和国、ミャンマー、ガーナ、インドネシア拠点の各研究開発代表者に、現地の細菌、ウイルス、寄生虫感染症についての最新の研究成果を紹介していただき、今後の拠点をベースにした研究の展望について議論する。

## S7-1

## フィリピンとの感染症に関する国際共同研究

○押谷 仁（東北大・医学系研究科・微生物学分野）

## International collaborative research on infectious diseases in the Philippines

○Hitoshi Oshitani (Dept. Virology, Tohoku Univ. Grad. Sch. Medicine)

The RITM-Tohoku Collaborating Research Center on Emerging and Reemerging Infectious Diseases was established in 2008 between the Tohoku University Graduate School of Medicine and the Research Institute for Tropical Medicine (RITM) of the Philippines with the support of the Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID) project. We have been conducting research on various infectious diseases with special focuses on respiratory viruses such as RSV, influenza virus, and SARS-CoV-2 and diarrheal viruses such as Norovirus and Sapovirus. We have two main field sites in the Philippines, Biliran province in Eastern Visayas Region and Tarlac in Central Luzon. In both sites, cohort studies are being conducted to analyze the transmission patterns, molecular evolution, and risk factors for severe diseases. After the emergence of SARS-CoV-2, we are also conducting research on SARS-CoV-2, including whole genome analysis SARS-CoV-2.

## S7-2

## インドネシア海外拠点における新型コロナウイルスに関する研究

○森 康子（神戸大・医・臨床ウイルス学分野）

## Investigation of SARS-CoV-2 in Indonesia

○Yasuko Mori (Div. Clinical Virology, Grad. Sch. Med., Kobe Univ.)

インドネシアは東南アジア南部に位置し、面積はわが国の 5 倍、1 万 7,500 の島々からなる世界最多の島嶼国であり、人口は約 2 億 4000 万（世界第 4 位）、約 500 の民族から成る多民族国家である。

神戸大学は、インドネシアと長い交流の歴史をもち、神戸大学新興・再興感染症国際共同研究拠点は、インドネシア第 2 の都市であるスラバヤの国立アイルランガ大学熱帯病研究所に設置されている。国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「新興・再興感染症研究基盤創生事業 海外拠点研究領域」の支援を受け、「インドネシアにおける新興・再興感染症の国際共同研究拠点形成に関する研究」と題し、現地研究者とともに研究を行っている。

その拠点を基盤として、新規病原体の探索、新型コロナウイルス、下痢症ウイルスおよびデングウイルス感染症、そして薬剤耐性菌に関する研究を行っている。

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、パンデミックを引き起こした。インドネシア国内においても大流行を引き起こした。そこで、今回は、インドネシア拠点の紹介に加えて、インドネシア拠点において行われた新型コロナウイルスに関する研究について紹介したい。

## 【血清疫学調査】

東ジャワ州における COVID-19 の流行の程度を把握するために、SARS-CoV-2 に対する抗体検査を行った。

## 【ウイルスゲノム解析】

2021 年 3 月までに SARS-CoV-2 の全ゲノム配列を決定した。

## S7-3

## ミャンマーにおける呼吸器ウイルス疾患の研究—新潟大学研究拠点

○齋藤 玲子（新潟大・院・医歯学・国際保健学分野）

## Japan and Myanmar Joint Research Project on Influenza and Other Respiratory Virus Infections

○Reiko Saito (Div. International Health, Grad. Sch. Medical and Dental Sciences, Niigata Univ.)

Since 2015, researchers in Niigata University have been conducting molecular epidemiological studies on influenza, SARS CoV-2, and respiratory syncytial virus in Myanmar.

From October 2020 through September 2022, 252 samples were collected from patients with ILI in Yangon region. In 2020, the collected samples were only 28, and RS virus was detected in 8 cases. In 2021, the number of collected samples were 147, and the majority (114, 77.6%) were tested positive for RS virus, whereas the remaining samples were positive by BioFire FilmArray for influenza A (26, 17.7%) and influenza B (4, 2.7%), respectively. Full genome sequencing of influenza A/H3N2 and B/Victoria collected in 2021 were performed and compared to the Southern Hemisphere influenza vaccine strain, which showed that all 13 A/H3N2 samples were classified as 3C.2a1b.2a.2 clade and had 5 amino acid substitutions in HA segment compared to the southern hemisphere influenza vaccine strains for 2021, and all 3 B/Victoria samples were classified as V1A.3a.2 clade and had 2 amino acid mutations in HA segment compared to the vaccine strain for the year. In addition, both influenza A and B were closely related to strains from India, Bangladesh, the Middle East countries, and Australia that circulated almost at the same time.

## S7-4

### Translational Research Collaboration on Infectious Diseases in Democratic Republic of the Congo

○城戸 康年 (大阪公大・院医・ウイルス学寄生虫学)

○Yasutoshi Kido (Dept. Virology & Parasitol., Grd. Sch. Med., Osaka Met. Univ.)

Democratic Republic of the Congo (DRC) suffers from one of the world's highest prevalence of emerging and re-emerging infectious diseases, represented by malaria, neglected tropical diseases (NTDs), Ebola virus disease (EVD), Coronavirus disease of 2019 (COVID-19) and Monkey pox and so on. As the recent epidemic of EVD and Monkey pox have not yet receded and there remains significant potential threat, DRC may become the epicenter of a global epidemic. Thus, the national burden of infectious diseases is not only a significant concern for DRC citizens, but also a target of continuous watchfulness and early warning systems for interacting countries, such as we, Japan.

In 2017, the collaborative research was launched between Osaka City University and the Institute National Recherche Biomedical of DRC. We have conducted the sero-epidemiological studies for malaria, COVID-19 and Monkey pox, as well as the drug development research for Human African Trypanosomiasis of NTD. We also undertake the integral Academia-Industry collaboration that would contribute to reduce the disease burdens. Here, we introduce the current joint partnership on the front lines, facing with emerging and re-emerging infectious diseases.

## S7-5

### 西アフリカガーナ拠点における感染症基盤研究

○鈴木 敏彦 (東京医科歯科大・医学学総合研究科・細菌感染制御)

### Advanced collaborative research in infectious diseases in Ghana

○Toshihiko Suzuki (Dept. Bacterial Pathogenesis, Grad. Sch. Med, Dent. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.)

西アフリカは新興・再興感染症による被害を世界で最も深刻に受ける地域であり、病原体の種類および罹患者数は他の地域と比較して突出している。同地域中心に位置するガーナにおいても、感染症の被害は甚大であり全死亡原因の約 1/5 を占める。特に小児においてはマラリア、下痢症による被害は大きく、その克服は公衆衛生上の重要課題である。また近年、世界規模で流行するデングウイルスが西アフリカに侵入し、小規模のアウトブレイクを繰り返しながらその分布を拡大している。さらに世界中に爆発的に増加している薬剤耐性菌は、西欧およびアジア諸国では詳細に調査されている一方で、アフリカではその種類や出現頻度が正確に把握されていない。近年、日本でも患者が増加しているブルリ潰瘍の発生もガーナを含む西アフリカの小児に集中している。このような現状から、西アフリカにおける感染症研究は地球規模での対策を進める上で極めて重要である。我々は、ガーナ大学野口記念医学研究所との共同研究によってのみ得ることができる流行地の貴重な臨床検体、環境試料を用いた感染症基盤研究を実施・展開している。

## S8

### 見える化で解き明かす微生物学の謎

コンピーナー：杉本 真也 (東京慈恵会医科大学)  
田岡 東 (金沢大学)

### Microbial mysteries uncovered by innovative imaging technology

Conveners: Shinya Sugimoto (The Jikei University School of Medicine)  
Azuma Taoka (Kanazawa University)

クライオ電顕、大気圧走査電子顕微鏡、高速 AFM、超解像顕微鏡、組織透明化技術、顕微ラマンなどの革新的なバイオイメーキング技術の開発とそれらの応用により、「見える」生命現象やその領域が拡大することで、生物学全般において眼から鱗の新知見が続々ともたらされている。細菌学においても、これらのバイオイメーキング技術と分子生物学的・細菌学的解析の融合により、観察が困難であった結晶化しにくいタンパク質や複合体の構造、そしてその生理的な環境中での構造動態を観察・解析できるようになった。さらに、細菌叢と宿主の相互作用や細菌-真菌間相互作用、バイオフィルムの形成機構と薬剤耐性、パーシスターなどの複雑な生命現象を 1 細胞・サブ細胞レベルで理解することが可能になりつつある。本シンポジウムでは、これらの最先端のバイオイメーキング技術を駆使して生命現象を理解しようとする研究者を一堂に集め、細菌学研究の新しい潮流を生み出す契機としたい。

## S8-1

### バイオフィルムの透明化ライブセルイメージングを可能にする iCBiofilm 法の開発と応用

○杉本 真也<sup>1,2</sup>, 金城 雄樹<sup>1,2</sup> (1慈恵医大・医・細菌, 2慈恵医大・バイオフィルム研究センター)

### Development and applications of iCBiofilm for live-cell and dynamic imaging of biofilms

○Shinya Sugimoto<sup>1,2</sup>, Yuki Kinjo<sup>1,2</sup> (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med.)

多くの微生物は固体表面などに付着し、菌体外マトリクスに覆われながらバイオフィルムを形成する。バイオフィルムの形成メカニズムや外的ストレス(抗菌薬や免疫系の作用)に対する抵抗性などを理解するためには、バイオフィルムを高い空間・時間分解能で可視化することが重要である。バイオフィルムの厚さは時に数百  $\mu\text{m}$  に達するが、従来の顕微鏡法では表面から 20  $\mu\text{m}$  程度までの深さしか観察できないため、バイオフィルムの全体像と内部の微生物の動態を把握することは困難であった。そこで我々は、バイオフィルムの透明化技術 iCBiofilm 法 (instantaneous Clearing of Biofilms) を開発した。従来の組織透明化法の場合、光の屈折や散乱の原因となる物質を除去するのに数日から 1 週間程の時間を要するが、iCBiofilm 法は独自に開発した透明化試薬を用いてバイオフィルムの周囲の屈折率をバイオフィルムの屈折率に近づけるだけで、瞬時にバイオフィルムを透明にすることが可能である。本手法を用いることで、500  $\mu\text{m}$  以上の分厚いバイオフィルムでも内部の菌や菌体外マトリクスの成分(多糖, DNA, タンパク質)を 1 細胞レベルの空間分解能で可視化することが可能になった。また、iCBiofilm 法はブドウ球菌・腸球菌・大腸菌・緑膿菌などの細菌のみならず、真菌 (*Candida albicans*) のバイオフィルムの観察にも応用できる。さらに、透明化試薬の種類と濃度を最適化した結果、菌が生きたままの状態バイオフィルムを透明にしなが、バイオフィルムの形成過程や抗菌薬 (バンコマイシンや Nisin A) の作用を 3D 動画として捉えることが可能になった。本講演では、iCBiofilm 法の開発の経緯と応用例について紹介する。

## S8-2

## 細菌と菌類の空間的代謝相互作用

○竹下 典男 (筑波大・MiCS)

## Spatial-metabolic interaction between bacteria and fungi

○Norio Takeshita (MiCS, Univ. Tsukuba)

Exclusivity in physical spaces and nutrients is a prerequisite for survival of organisms, but a few species have been able to develop mutually beneficial strategies that allow them to co-habit. We discovered a mutualistic mechanism between filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*, and bacterium, *Bacillus subtilis*. The bacterial cells co-cultured with the fungus traveled along mycelia using their flagella and dispersed farther with the expansion of fungal colony, indicating that the fungal mycelia supply space for bacteria to migrate, disperse, and proliferate. Transcriptomic, genetic, molecular mass, and imaging analyses demonstrated that the bacteria reached the mycelial edge and supplied thiamine to the growing hyphae, which led to a promotion of hyphal growth. The thiamine transfer from bacteria to the thiamine non-auxotrophic fungus was directly demonstrated by stable isotope labeling. The simultaneous spatial and metabolic interactions reveal a mutualism that facilitates the communicating fungal and bacterial species to obtain an environmental niche and nutrient, respectively. Analyses of co-cultures of various fungi and bacteria combinations found high affinity or low affinity among the combinations, indicating selectivity in the interaction. We are searching for factors involved in selectivity by comparing transcriptomes, metabolomes, and genomes.

## S8-3

## Bacterial growth, competition, and antibiotic resistance in structured habitats

○若本 祐一 (東大・院・総合文化)

○Yuichi Wakamoto (Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. of Tokyo)

Bacterial cells in the wild often reside in spatially-structured habitats. Habitat structures may impose physical constraints on population dynamics as boundary conditions and affect long-term cellular gene expression and metabolic profiles. However, analyzing bacterial cell populations directly in the wild is usually challenging due to extreme structural diversity and the uncertainties of biochemical conditions. We developed several microfluidic devices to understand the influence of habitat structures on the long-term fitness, competition, and antibiotic resistance of bacterial cell populations. We monitored 100-10000 bacterial cells in the chambers with defined geometries and medium conditions for prolonged periods. We find that habitat structures can qualitatively alter the competition dynamics of two neutral bacterial strains between the fixation of one strain and the coexistence of the two strains. Furthermore, structured habitats allow the strain with a lower growth rate to coexist or even outperform a faster-growing strain. We also reveal slow expression dynamics that occur in the timescale of weeks and promote antibiotic resistance. These results demonstrate that habitat structures can shape bacterial population dynamics and imply their roles in competition and evolution in the wild.

## S8-4

## 腸内細菌と細菌培養系の親水環境での観察：クライオ電顕と水中観察電顕

○佐藤 主税<sup>1,2,3,4</sup>, 佐藤 真理<sup>1,4</sup>, 納谷 昌実<sup>1</sup>, 佐藤 啓子<sup>5</sup>, 杉本 真也<sup>6</sup> (1産業技術総合研究所, 2筑波大・グローバル教育院, 3青山学院大・理工, 4日本大医・微生物学, 5長崎大・医歯薬学総合, 6慈恵医大・細菌学)

## Observation of gut-bacteria ecosystem using Cryo-TEM and liquid-phase electron microscopy ASEM

○Chikara Sato<sup>1,2,3,4</sup>, Mari Sato<sup>1,4</sup>, Masami Naya<sup>1</sup>, Keiko Sato<sup>5</sup>, Shinya Sugimoto<sup>6</sup> (1Natl. Inst. Adv. Indust. Sci. Tech., 2SIGMA, Tsukuba Univ., 3Biol. Sci., Aoyama Gakuin Univ., 4Div. Microbiol., Nihon Univ. Sch. Med., 5Dept. Front. Oral Sci., Nagasaki Univ., 6Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med.)

腸内細菌は、腸内において互いに相互作用し、さらに宿主腸管の粘液層や細胞群との相互作用などを通じて複雑な生態系を構築している。その相互作用は、我々の免疫系を成熟させ、さらには我々の健康に様々な恩恵をもたらしている。この生態系は、食事や抗生剤の使用などが引き金になって乱れると、様々な疾患へとつながることが知られている。その機構を理解するためには、高分解能での観察が必須である。しかし、腸上皮を守る粘液層や細菌群が集団を守るために構築するバイオフィームは、水分を多く含む構造であるため、従来の方法では限界があった。そこで、ここでは、クライオ電顕と水中観察電顕を駆使して、親水環境のままその構造観察を行った。クライオ電顕は急速凍結により、水中観察法は超薄膜利用により、親水環境中でのサンプル観察を可能にする。これらの方法を用いることで、腸上皮からの抗菌ペプチドを含む粘液の分泌や腸上皮での細菌によるバイオフィーム形成などを自然な状態で観察できた。ここで観察された腸内細菌の複製するコロニーは、多くが異なる種類の細菌から構成されていた。細菌間には、様々な相互作用や情報伝達が行われていることが期待され、これら相互作用の研究が待たれる。また、細菌の培養系を用いた観察への応用例も紹介したい。クライオ電顕と水中観察電顕は、今後腸内細菌と腸のクロストークや関連する病理研究などに幅広く応用されることが期待される。

## S8-5

## 高速原子間力顕微鏡による生きた細菌表面の見える化

○田岡 東<sup>1,2</sup> (1金沢大・理工・生命理工, 2金沢大・ナノ生命研)

## Visualizations of living bacterial cell surfaces using high-speed atomic force microscopy

○Azuma Taoka<sup>1,2</sup> (1Fac. Biol. Sci. and Tech., Kanazawa Univ., 2WPI-Nano Life Sci. Inst., Kanazawa Univ.)

高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) は、試料と探針の間に働く力を検出し、試料表面の 3 次元画像を得る。液体培地中で基板に固定した細菌を観察すれば、生きた細菌の表面構造動態をナノメートルの空間分解能とサブ秒の時間分解能で動画記録できる。例えば、大腸菌などのグラム陰性細菌をマイカ基板に固定し、高速 AFM でその表面を観察すると、外膜上を動的に拡散するポーリン分子のクラスターを観察できる。本発表では、高速 AFM の観察モードの一つである位相像を用いた細菌表面の物性イメージングについて紹介する。位相像では、試料表面の局所的な物性分布 (特に疎水相互作用による吸着性) とその変化をマッピングできる。本研究では、細胞外膜小胞 (MVs) が、受容細菌に結合する過程を観察した。MVs は、細胞間での分子の運び手として情報伝達を担うと考えられている。本研究では、高速 AFM の位相イメージングを用いて、1 粒子の MVs が *Paracoccus denitrificans* 細胞にどのように結合し情報伝達を行うのか、を観察した。*P. denitrificans* 細胞をマイカ上に固定し、チャンネルに MVs を添加すると、時間経過とともに細胞表面に MV 粒子が結合した。MVs の位相値は、細胞表面より大きく、探針への吸着性がより大きいことが示された。細胞表面に結合した MVs の位相像をタイムラプス観察したところ、細胞表面で MV 粒子の位相値が不可逆的に減少することがわかった。この結果は、細胞表面で MV の疎水性が変化することを示しており、外膜に融合した MV から疎水性分子が細胞表面へ拡散し、MV の組成が変化したことが推測でき、MV から細胞への疎水性分子の伝達を示唆された。

## 合成ゲノム生物のもたらすサイエンスと安全性

コンピーナー：柳原 格（大阪母子医療センター）  
高屋 明子（千葉大学）

### Synthetic Genome Organism; Science and its safety

Conveners: Itaru Yanagihara (Osaka Women's and Children's Hospital)  
Akiko Takaya (Chiba University)

長鎖 DNA の革新的な合成技術は、合成ゲノム細菌を生み出した。米国ペンター研究所から *Mycoplasma mycoides subsp. capri* をベースとし、ゲノムサイズを約半分にしたミニマルセル (JCVI-syn3.0) が報告された。JCVI-syn3.0 は主要な病原因子遺伝子を持たず、ゲノムサイズは親株の半分程 531kb (473 遺伝子) にまで削られた。この最小モデル細菌は、細菌の分裂、代謝、回転遊泳運動や、病原性の解析に利用され始めている。一方、合成ゲノム生物利用については安全性などの議論は十分に尽くされていない。本シンポジウムでは、合成ゲノム細菌が人類の幸福の為にのみ使われるよう、本分野を牽引されている方々にご登壇いただき、最新の研究、安全性を担保するための工夫、デュアルユースの抑止のために知っておくべき事柄を広くご講演いただき、また、研究者間で自由に議論するための時間も設ける。

後援：国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)  
Supported by: Japan Agency for Medical Research and Development

協賛：旭化成ファーマ株式会社、株式会社ヤクルト本社、株式会社アズバイオ、株式会社ユヤマ医理科

Sponsored by: Asahi Kasei Pharma Corporation, Yakult Honsha Co., Ltd., AZBIO CORP., YUYAMA Medical & Scientific Co., LTD.

## S9-1

### 合成生物学におけるゲノム合成の課題と展望

○田端 和仁（東大院・工・応用化学）

#### Genome Synthesis in Synthetic Biology: Issues and Perspectives

○Kazuhito Tabata (Dept. App. Chem., The Univ. of Tokyo)

近年における分子生物学的なツールの発展や DNA 合成価格の低下に伴い、長鎖 DNA 合成技術の発展が著しい。すでに、機能する生物ゲノムの合成にも成功しており、まさにゲノムから生物を作る時代の幕開けといった感がある。また、日本政府や世界的に見ても長鎖 DNA 合成技術はバイオテクノロジー分野の基幹技術として挙げられており、各国で莫大な研究資金が投じられている。このようにゲノムレベルの長鎖 DNA 合成技術は今後の合成生物学の基盤と言える技術といえる。将来的には、本技術が食品や化学品、バイオ燃料、医薬品などの物質生産を飛躍的に高めることが期待されており、数兆円規模の市場を形成すると予測されている。このように、ゲノムレベルの DNA 合成技術が一般化してくると大きなメリットとともに問題点も浮き上がってくる。普段我々が実験室でプラスミドを構築するのと同じ感覚でバクテリアやウイルスのゲノムを構築出来るようになると、当然そこから作り出される人工のバクテリア・ウイルスの漏洩（バイオセーフティ）や悪用（バイオセキュリティ、デュアルユース）されることを考えた対策が必要になるだろう。これからの人工ゲノム合成時代に向けたバイオセキュリティ・バイオセーフティ問題やデュアルユース問題を考え、研究者自らが研究のメリットとリスクを積極的に情報発信し、研究の意義や正当性について一般社会を含めて議論していく必要があるだろう。そこで、本発表においてはこれら問題の実例や解説を含め、ゲノムレベルの長鎖 DNA 合成技術の展望を述べたい。

## S9-2

### ゲノム合成の技術進展

○末次 正幸（立教大・生命理）

#### Technological advancements in genome synthesis

○Masayuki Su'etsugu (Dept. Life Science, Rikkyo Univ.)

生命の設計原理を突き詰めると、ソフトウェアとしての DNA とハードウェアとしての細胞とみなすことができる。ゲノムシーケンス技術の進展により、あらゆる生命のゲノム情報がデータベースに蓄積し、いまや DNA は物質というよりもデジタルな情報としてやり取りされる時代である。そして、生体試料を入手せずともデータベース上の情報のみからフルスクラッチで長鎖 DNA を合成して利用する潮流が進みつつある。ソフトウェアのコードと同じように DNA 情報を改変したり組み合わせたりすることも自在である。すでに創薬産業では、このようなソフトウェア化の兆しが出てきている。新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンは、公開されたウイルスゲノム情報を基に即座に抗原遺伝子の長鎖 DNA がデザイン・合成され、mRNA ワクチン生産プラットフォームに乗せることで 1 年足らずで上市された。情報のデザインしだいで新たな感染症ワクチンやがん治療薬などの創薬も可能である。一方サイエンスとしては、ゲノム DNA をまるごとデザイン・合成して細胞にインストールすることで、人工的な細胞を創生することができるのだろうか、という点に興味を惹かれる。実際、細菌のレベルでは、このような実験が 2010 年に成功しており合成細胞が誕生している。その技術的なブレイクスルーとなっているのがゲノムスケールの長鎖 DNA 合成技術とゲノム移植技術である。ただし、合成細菌を創生する技術はまだ課題があり、コストと時間がかかるものである。本演題では、長鎖 DNA 合成とゲノム移植の最新技術とそれによる合成細胞創生の可能性について紹介する。

## S9-3

### 合成ゲノム細菌の特徴と安全性

○柿澤 茂行（産総研）

#### Bacteria with synthetic genome and their biosafety

○Shigeyuki Kakizawa (AIST)

ゲノムをすべて人工合成した「合成ゲノム細菌」が米国ペンター研究所において作成された。加えて、この細菌の遺伝子を限界まで削減し、必須遺伝子のみを持つように設計された「最少ゲノム細菌：ミニマルセル」も作製され、日本も含めた世界中の研究者が利用している。本発表では、その作成の経緯、特徴、将来性、安全性などについて論じたい。合成ゲノム細菌の安全性については、カルタヘナ法に沿った扱いが可能であり、それにより安全性は十分に確保できると考えている。なお、合成ゲノム細菌の安全性についての「共同提言」を多くの研究者の協力のもと作成し、関係各所に提出した。本発表ではこの共同提言についても紹介したい。

**S9-4****遺伝子組換え技術、合成生物学的手法、ゲノム合成のリスク・ベネフィット感と社会受容**

○木賀 大介 (早稲田大・先進理工・電気情報生命)

**How risk and benefit viewpoints affect social acceptance of synthetic biology, and genome synthesis**

○Daisuke Kiga (Dept. Elect. Eng. and Biosci., Waseda Univ.)

生物のゲノムや遺伝子に対する操作の拡大が、組換え DNA 技術から合成生物学・ゲノム合成手法への技術進展によって達成されてきた。生物分野に限らず、どのような技術進展も、社会に対してリスクとベネフィットを持ちうるという認識のもと、合成生物学分野ではその黎明期から、社会との対話やリスク軽減技術の開発が重視されている。本講演では、私が直接かかわった研究以外にも、私が学生チームを指導してきた合成生物学の国際学生コンテスト iGEM について紹介したい。このコンテストでは、種々の社会的課題を合成生物学で解決することを各学生チームは目標とし、生物学実験のみならず、ステーキホルダーへのインタビュー、目標に対する一般社会への反応調査を評価対象としている。このため、社会とのかかわりや、安全性評価などの専門委員会がコンテスト内に設置され、コンテストのルール策定や大会中のワークショップ開催などによる、学生の誘導を行っている。新技術を活用したプロジェクトを進めるこのコンテストで一連のプロセスは、今後のゲノム合成の拡大に先駆けて種々の考察を進める参考となると考えている。また、コンテスト以外にも私がこれまでに機会をいただいた、人文社会系の研究者の方々との協働、一般社会向けの講演事例などを話題提供し、本講演後の会場の皆様との総合討論の種を提供できれば、と考えている。

**S9-5****合成ゲノム細菌の安全な利用を目指した取り組みについて**

○柳原 格 (大阪母子医療センター・研・免疫)

**Initiatives for the Safe Use of Synthetic Genome Bacteria**

○Itaru Yanagihara (Dept. Dev. Med., Osaka Women's and Children's Hospital)

長鎖 DNA の革新的な合成技術は、合成ゲノム細菌を生み出した。米国ベンター研究所から *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* をベースとし、ゲノムサイズを約半分に削ったミニマルセル (JCVI-syn3.0) は主要な病原因子遺伝子を持たず、ゲノムサイズは親株の半分程 531kb (473 遺伝子) にまで削られた。この最小モデル細菌は、細菌の分裂、代謝、回転遊泳運動や、病原性の解析に利用され始めている。一方で、合成ゲノム生物利用については安全性などの議論は十分に尽くされていない。合成ゲノム細菌が人類の幸福の為にのみ使われるよう、安全性を担保するための工夫、デュアルユースの抑止のために知っておくべき事柄について整理したい。

**S10****微生物バイオインフォマティクスの最前線**

コンピーナー：高橋 弘喜 (千葉大学)  
森 宙史 (国立遺伝学研究所)

**Frontiers of Microbial Bioinformatics**

Conveners: Hiroki Takahashi (Chiba University)  
Hiroshi Mori (National Institute of Genetics)

細菌学のみならず生物学において、配列相同性解析やデータベースなどのバイオインフォマティクス技術はなくてはならない存在となっている。例えば、データベースを利用することで、我々は多岐に渡る情報を短時間で収集できるのみならず、データ間の繋がりについて気付きを得ることができる。また、膨大なゲノム情報を活用することで、微生物の群集構造解析や、微生物の進化、さらには代謝経路の全容解明に繋がることが期待されている。本シンポジウムでは、インフォマティクス技術を駆使して解析ツールの開発研究を進めている研究者に、最新の解析ツールの紹介とその応用について紹介していただくとともに、細菌学におけるバイオインフォマティクスの役割やその可能性を紹介いただくことで、これからの細菌学の展開を議論する場としたい。

**S10-1****微生物培養培地データベース TogoMedium の開発およびその応用**

○川島 秀一, 片山 俊明, 岡本 忍 (DBCLS・DS施設・ROIS)

**Development of a database for microbial growth media (TogoMedium) and its application**

○Shuichi Kawashima, Toshiaki Katayama, Shinobu Okamoto (DBCLS, DS, ROIS)

ライフサイエンス統合データベースセンター (DBCLS) では、様々な生命科学データベース (DB) を Resource Description Framework (RDF) として記述することで、DB を統合して利用するための技術開発に取り組んでいる。細菌についても、ゲノム、メタゲノム、タンパク、疾患など様々な対象に関して、すでに様々な DB が RDF 化されているが、培養培地に関する RDF は存在しなかった。そこで既存の培地情報を RDF 化し、それらを様々な観点から検索・閲覧できる DB である TogoMedium の開発を始めた。本 DB には、理化学研究所 JCM と製品評価技術基盤機構 NBDC から提供されたもの、および文献などから収集した 2,000 以上の培地情報が収録されている。培地成分には、化学化合物以外にも、エキスやペプトン等多岐に渡るものが含まれるが、これらには標準的なオントロジーが存在しなかった。そこで、培地に関する様々な概念を階層的に整理したオントロジーである Growth Medium Ontology (GMO) を開発した。GMO は、例えばペプトンであれば、その下位にはカゼイン由来や肉由来のもの等が、さらにカゼイン由来ペプトンの下位には、酸による加水分解物やトリプシン消化物等が配置されるといった階層構造をしている。この特徴により、培地成分について用途に応じて解像度の異なる記述に対応でき、従来は難しかった機械的な培地の類似性検索等も可能となった。本発表では、TogoMedium のコンテンツの紹介、ツールの利用方法などについて紹介する。

## S10-2

**NITE** の提供する微生物有害情報データベースについて～微生物の安全で適切な利用をめざして～

○市川 夏子, 黄地 祥子, 宮澤 せい, 藤田 真澄, 魚原文, 中谷 諒介, 山本 美佳, 木村 明音, 藤田 信之, 加藤 慎一郎 (製品評価技術基盤機構・バイオセンター)

### Microbial risk information database ~Aiming for safe and appropriate use of microorganisms

○Natsuko Ichikawa, Syoko Ohji, Seiha Miyazawa, Masumi Fujita, Aya Uohara, Ryosuke Nakatani, Mika Yamamoto, Akane Kimura, Nobuyuki Fujita, Shinichiro Kato (Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation)

研究者が新しく微生物を取り扱おうとした場合、直面する問題の一つが微生物の安全性の評価である。NITE では微生物のリスクを評価し、リスクに応じて微生物を適切に取り扱うことを支援するため2つのデータベースを提供している。「微生物有害性遺伝子情報データベース (MiFuP Safety)」は、ゲノム情報から毒素や抗生物質耐性等の有害性に関連する遺伝子の有無を検索することができる。既知の毒素の遺伝子配列が検出できる閾値をキュレーションにより遺伝子毎に設定しているため、BLAST などの同源性検索結果を個々のユーザーが解釈する必要がない。さらに、毒素となるタンパク質のサブユニット構成や発現経路にバリエーションがある等の条件を網羅しており、有害性が発現するために必要な遺伝子が揃っているかを判定することができる。実際の *in vivo* の安全性については別途確認する必要があるものの、ゲノム配列が容易に得られるようになった近年において *in silico* でのファーストスクリーニングとして活用できるものと考えている。「微生物有害情報リスト」は日本細菌学会 BSL をはじめ細菌及び真菌の危険度分類や法規制情報を一元化したデータベースである。微生物の系統分類学的位置が見直され、学名の変更が多い近年の状況を踏まえて、より使いやすくわかりやすくするために細菌のリストのレイアウトや記載方法を一新したりリニューアルを10月に行った。本講演ではリニューアルした微生物有害情報リストでの情報の確認方法についても紹介する。いずれも配列同源性解析やキュレーションによって提供される地道なサービスであるが微生物を実際に利用する現場で役に立つことを目指して提供している。

## S10-3

マイクロバイオーム研究を先導するハブを目指した **Microbiome Databuh** の開発

○森 宙史<sup>1</sup>, 藤澤 貴智<sup>1</sup>, 東 光一<sup>1</sup>, 中村 保一<sup>1</sup>, 山田 拓司<sup>2</sup>, 松井 求<sup>3</sup>, 内山 都夫<sup>4</sup> (1遺伝研・情報系, <sup>2</sup>東工大・生命理工, <sup>3</sup>東大・新領域, <sup>4</sup>基生研)

### Development of an integrated microbiome database: Microbiome Databuh

○Hiroshi Mori<sup>1</sup>, Takatomo Fujisawa<sup>1</sup>, Koichi Higashi<sup>1</sup>, Yasukazu Nakamura<sup>1</sup>, Takuji Yamada<sup>2</sup>, Motomu Matsui<sup>3</sup>, Ikuo Uchiyama<sup>4</sup> (1Dept. Informatics, NIG, <sup>2</sup>Dept. Life Sci. Tech., Tokyo Tech., <sup>3</sup>Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo, <sup>4</sup>NIBB)

微生物群集をメタゲノム解析等で培養することなく解析するマイクロバイオーム研究は、新型シーケンサーの普及によって爆発的な勢いで研究が行われている。特に、バイオインフォマティクス技術の発展によってメタゲノム配列から各菌のドラフトゲノム配列を再構築する Metagenome Assembled Genome (MAG) 解析手法が洗練され普及したため、微生物の系統やゲノムの多様性の記述はここ数年で大きく進んだ。これまで我々は微生物のエンサイクロペディアを目指して微生物統合データベース MicrobeDB.jp を開発してきた。MicrobeDB.jp は微生物の生息環境に注目してデータを整理してきており、本研究では、MicrobeDB.jp で培った微生物に関するデータの統合化技術を生かしマイクロバイオーム研究に特化した国際的なデータハブ Microbiome Databuh として再構築する。具体的には、マイクロバイオームデータはもちろんのこと、微生物の表現型や MAG などの新しいデータを統合するとともに、マイクロバイオーム関連のデータ検索・解析機能を大幅に強化し、自由度の高い検索・データ取得を実現する。本発表では、現在開発中の Microbiome Databuh の概要と、公開されている MAG データの量や精度などの現状について紹介する。

## S10-4

ゲノム・メタゲノムデータの可視化手法の開発

○山田 拓司 (東京工業大学)

### Functional visualization for genome and metagenomic data

○Takuji Yamada (Tokyo Institute of Technology)

ゲノム配列・メタゲノム配列に由来する遺伝子の機能アノテーションは、その配列類似性などを用いて KEGG や eggNOG に格納される遺伝子オーソログにアサインされることによって実現される。遺伝子オーソログには特定の代謝機能などが紐付けられており、そこから遺伝子は特定の機能にアノテーションすることができる。しかしながら、ゲノムスケール・メタゲノムデータ全体の機能アノテーションになると遺伝子数が膨大になるため、全体を表す機能を俯瞰的に可視化することは非常に困難である。例として、ヒト腸内環境にどのような機能が存在するか、特定の生物種はどのような遺伝子機能をもっているか、などをひと目で俯瞰することは既存のデータベースやツールでは難しい。そのため、我々の研究グループではこれらの機能アノテーションを俯瞰的に可視化するためのデータベース及び web tool の開発を行っている。ここでは、1) 遺伝子機能を樹形図で表現する Functree, 2) 代謝パスウェイ全体を網羅的に表現する iPath3.0, そして、3) 腸内細菌代謝機能に特化した代謝経路データベース enteropathway, の3つのプラットフォームを紹介する。

## S10-5

バクテリアゲノム設計原理のバイオインフォマティクス

○岩崎 渉<sup>1,2,3,4,5</sup> (1東大・新領域・先端生命, <sup>2</sup>東大・理・生物科学, <sup>3</sup>東大・大海研, <sup>4</sup>東大・定量研, <sup>5</sup>東大・微生物イノベ)

### Bioinformatics to reveal rules behind bacterial genomes

○Wataru Iwasaki<sup>1,2,3,4,5</sup> (1Dept. Integrated Biosci., Grad. Sch. Frontier Sci., UTokyo, <sup>2</sup>Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., UTokyo, <sup>3</sup>Atmos. Ocean Res. Inst., UTokyo, <sup>4</sup>Inst. Quant. Biosci., UTokyo, <sup>5</sup>Collab. Res. Inst. Innovative Microb., UTokyo)

いま、私たちの目の前に広がるバクテリアゲノムデータの世界は、爆発的な速度で拡張が続いている。大規模プロジェクトに限らず、生物学系の個々の研究室において行なわれる日常的な研究においても、バイオインフォマティクスは必須のキーワードとなった。こうした大きな流れは現在も定常状態に達することがなく、2022年現在でもシーケンシング技術の急速なロングリード化・高速化・低コスト化が進んでいる。例えば、薄膜フィルム上の反応による蛍光試薬の極微量化など、近い将来にシーケンシングコストを現状の10分の1から100分の1にさらに低下することを予感させる技術も報告されつつある。こうした大量のバクテリアゲノムデータの蓄積は「バクテリアゲノムの設計原理」を、分子生物学的な知識の積み上げ(ボトムアップ)ではなく、バイオインフォマティクスによるパターン解析(トップダウン)によって明らかにすることを可能にしている。そして、こうした得られたバクテリアゲノムが従うパターンを用いることで、バクテリアゲノム上に大量に存在する機能未知遺伝子の機能に迫ることも可能になりつつある。本講演では、こうした研究に関する私たちの最近の成果を紹介する。

## S11

## 細菌の遺伝子発現制御の新展開

コンピーナー：宮腰 昌利（筑波大学）  
森田 鉄兵（慶應義塾大学）

## New concepts of regulation of gene expression in bacteria

Conveners: Masatoshi Miyakoshi (University of Tsukuba)  
Tepei Morita (Keio University)

細菌は環境の変化に応答して遺伝子発現を制御する巧妙なシステムを有している。これまで遺伝子発現は主に転写開始の段階で制御されていると理解されてきたが、インプット（情報受容）からアウトプット（性状変化）に到るまで、生体分子の間でどのように情報が伝達されていくのか、その全体像を捉えるには至っていない。実際には転写伸長、転写終結の制御や、mRNAの上で起こる転写後制御、翻訳制御が関与しており、新規制御因子が続々と発見されてきている。本シンポジウムでは、国内外で活躍する若手研究者の最近の研究成果を紹介し、細菌の多様な遺伝子発現制御機構に関して理解を深めるとともに、細菌感染の新しい制御法の可能性について議論したい。

## S11-1

## 腸内細菌科細菌における mRNA から生成する small RNA による転写後調節

○宮腰 昌利（筑波大・医・生命医科学）

Post-transcriptional regulation by mRNA-derived small RNAs in *Enterobacteriaceae*

○Masatoshi Miyakoshi (Dept. Biomed. Sci., Fac. Med., Univ. Tsukuba)

原核生物における遺伝子発現制御は大腸菌やサルモネラをはじめとする腸内細菌科細菌において詳細に研究され、特に近年の RNA-seq 解析によって、RNA による遺伝子発現制御ネットワークの研究が広がりを見せている。演者らは、グラム陰性細菌の主要な RNA シャペロンである Hfq に依存する従来型の small RNA (sRNA) と同様に、mRNA から生成する sRNA が転写後調節に関与し、生体内で重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本発表では、一例として、窒素同化の鍵となるグルタミン合成酵素をコードし、サルモネラの宿主細胞内での増殖に必須な遺伝子 *glnA* の 3'UTR から生成する sRNA GlnZ について紹介する。腸内細菌科細菌において *glnA* は高く保存されているが、3'UTR の塩基配列は多様性に富み、大腸菌でも K12 株、O157 株、O111 株に代表される 3 つのグループに分類された。*glnA* の 3'UTR は RNase E によってプロセッシングされ、異なる長さの GlnZ を生成することがノーザンブロット解析で示された。GlnZ は部分的に保存されているシード配列を用いて、2-オキシグルタル酸脱水素酵素をコードする *sucA* と塩基対形成することで、その発現を抑制する。GlnZ は窒素飢餓状態で誘導されることから、TCA サイクルの一部にボトルネックを設けることで、グルタミンやグルタミン酸の炭素骨格である 2-オキシグルタル酸を窒素同化経路に代謝フローを切り換える生理学的役割があると考えられる。

## S11-2

## 百日咳菌はべん毛を介した small RNA の発現増加により宿主感染を促進する

○平松 征洋<sup>1</sup>、西田 隆司<sup>1</sup>、Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>、堀口 安彦<sup>1,2</sup>（<sup>1</sup>阪大・微研・分子細菌学、<sup>2</sup>阪大・感染症総合教育研究拠点）

*Bordetella pertussis* mechanosensing upregulates small RNA contributing to bacterial colonization

○Yukihiro Hiramatsu<sup>1</sup>、Takashi Nishida<sup>1</sup>、Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>、Yasuhiko Horiguchi<sup>1,2</sup>（<sup>1</sup>Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., <sup>2</sup>CiDER, Osaka Univ.）

The virulence of *Bordetella pertussis* had long been considered to be regulated by the BvgAS two-component system; however, recent studies indicated that the profiles of BvgAS-regulated genes differ significantly between *in vitro* and *in vivo* conditions, suggesting complex mechanisms that regulate *in vivo* gene expression. Here, we identified 9 types of novel small RNAs (sRNAs) designated Bpr1-9 that were highly expressed upon the bacterial colonization of mouse tracheas. Among them, 8 sRNAs were transcribed independently of the BvgAS system. We found that Bpr4, the expression of which is 118-fold higher *in vivo* than *in vitro*, contributes to *B. pertussis* infection by post-transcriptionally upregulating filamentous hemagglutinin (FHA), a major adhesin of the bacteria. Bpr4 bound to the 5'-untranslated region of *fhaB* mRNA encoding FHA and inhibited its degradation mediated by RNaseE. Our results also demonstrated that Bpr4 upregulation is triggered by the interference of flagellar rotation after the interaction of flagellin and gangliosides on the host cells. Subsequently, MotA, a flagellar stator, was disengaged from the flagellar complex and activated a diguanylate cyclase to generate cyclic di-GMP, which induces Bpr4 upregulation through the RisK/RisA two-component system. Our findings indicate that a flagellum-triggered sensory system contributes to *B. pertussis* infection.

## S11-3

## Global profiling of RNA-protein complexes in bacteria

○千原 康太郎<sup>1</sup>、Joerg Vogel<sup>1,2</sup>（<sup>1</sup>Helmholtz Inst. RNA-Based Infect. Res. (HIRI), Helmholtz Cent. Infect. Res. (HZI), <sup>2</sup>Inst. Mol. Infect. Biol. (IMIB), Univ. Wuerzburg）

○Kotaro Chihara<sup>1</sup>、Joerg Vogel<sup>1,2</sup>（<sup>1</sup>Helmholtz Inst. RNA-Based Infect. Res. (HIRI), Helmholtz Cent. Infect. Res. (HZI), <sup>2</sup>Inst. Mol. Infect. Biol. (IMIB), Univ. Wuerzburg）

Diverse biological processes depend on stable cellular protein complexes, often mediated with RNAs. In bacteria, RNA-binding proteins (RBPs) function as both structural components of ribonucleoproteins and post-transcriptional regulators. Modern interactome techniques allow us to globally profile RNA-protein complexes and have led to greater recognition of the abundance and importance of RBPs in bacteria. In this talk, we will introduce two such approaches: glycerol gradient coupled to sequencing (Grad-seq) and its complementing method using size exclusion chromatography (SEC-seq). In Grad-seq, cellular RNA and protein complexes of a bacterium of interest are separated in a glycerol gradient, followed by RNA-sequencing and mass spectrometry analyses of individual gradient fractions. New RNA-protein complexes are predicted based on the similarity of their sedimentation profiles. In SEC-seq, we have replaced the glycerol gradient with separation by size exclusion chromatography, which shortens operation times and offers greater potential for automation. Applying Grad-seq and SEC-seq to *Escherichia coli*, we show that the cross-comparison permits a fine-grained analysis of cellular complexes not to be confined to specific molecular size. We will also present use cases for these resources to be exploited for the identification of un-yet-recognized RBPs and their binding RNAs.

## S11-4

### RNA binding protein CspD disrupts RNA structural elements that modulate transcription termination

○森田 鉄兵<sup>1,2</sup> (1慶大・先端生命研, 2慶大・院政メ)

○Tepei Morita<sup>1,2</sup> (1Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., 2Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.)

At the stage of transcription elongation, transcriptional arrest and/or termination happen by various factors. RNA structure is an element that causes transcriptional arrest; An RNA hairpin structure allosterically modulates RNA polymerase. As another role of RNA structure, an RNA hairpin followed by a U-rich tail functions as a terminator, which is known as an intrinsic termination. We previously found that proper termination is necessary for function of small RNAs (sRNAs). Here, we carried out a multicopy screen developed with the terminator of sRNA SgrS to identify factors that attenuate the SgrS termination in *Escherichia coli*. One of the isolated factors is CspD that is a member of the cold-shock protein family. We showed that overproduction of CspD resulted in more frequent readthrough at the SgrS terminator and reduced the regulation by SgrS. We also found CspD had global effects, promoting transcription extension across some termination sites within operons or internal to genes. These data suggest co-transcriptional binding of CspD may affect proper formation of RNA secondary structures. We further demonstrated effects of endogenous CspD under slow growth conditions in which cspD is highly expressed. Discussion will focus on CspD-facilitating transcription elongation for an understanding of bacterial physiology.

## S11-6

### Antibiotic resistance mediated by ribosome-associated ABCF ATPase

○高田 啓<sup>1,2</sup>, Gemma C Atkinson<sup>2</sup>, Vasili Haurlyuk<sup>2</sup> (1京産大・生命科学, 2 Lund 大・実験医科学)

○Hiraku Takada<sup>1,2</sup>, Gemma C Atkinson<sup>2</sup>, Vasili Haurlyuk<sup>2</sup> (1Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo Univ., 2Dept. Exp. Med. Sci., Lund Univ.)

*B. subtilis* antibiotic resistance factor VmlR belongs to the F family of the ABC ATPase protein superfamily. Since resistance factors belonging to the ABC family commonly act as molecular pumps excreting antibiotics out of the cell, VmlR, despite lacking the intermembrane domains, was previously also classified as a pump. Using a combination of genetics, molecular biology and cryo-electron microscopy, we show that VmlR is, in fact, a ribosomal protection protein which allosterically dissociates antibiotics from the ribosomal peptidyltransferase center. In addition, we show that vmlR expression is regulated by translation attenuation and transcription attenuation mechanisms. Antibiotic-induced ribosome stalling during translation of an upstream open reading frame in the vmlR leader region prevents formation of an anti-antiterminator structure, leading to the formation of an antiterminator structure that prevents intrinsic termination. Thus, transcription in the presence of antibiotic induces vmlR expression. Our results provide crucial insights into the molecular mechanism of antibiotic resistance conferred by closely related and highly clinically relevant Enterococcal (OprA) and Staphylococcal (Vga, Lsa and Sal) ABCF ATPases.

## S11-5

### ビブリオ属細菌における翻訳アレストを介した遺伝子発現制御

○石井 英治<sup>1</sup>, 松田 重輝<sup>1</sup>, 飯田 哲也<sup>1,2</sup>, 秋山 芳展<sup>3</sup>, 森 博幸<sup>3</sup> (1阪大・微研, 2阪大・CiDER, 3京大・医研)

### Translation arrest-mediated gene regulation in *Vibrio* species

○Eiji Ishii<sup>1</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>1</sup>, Tetsuya Iida<sup>1,2</sup>, Yoshinori Akiyama<sup>3</sup>, Hiroyuki Mori<sup>3</sup> (1RIMD, Osaka Univ., 2CiDER, Osaka Univ., 3LiMe, Kyoto Univ.)

近年、合成途上のポリペプチド鎖（新生鎖）が遺伝子発現を制御している例が報告されており、我々がビブリオ属細菌で発見した VemP もこの一例である。「VemP は、*vemP-secD2-secF2* (*secDF2*) オペロンにコードされる分泌タンパク質であり、自身の翻訳伸長の停止（翻訳アレスト）を介した転写後調節機構により *secDF2* の発現を制御している」とのモデルを我々は提唱している。VemP の C 末端近傍には翻訳途上でリボソーム排出トンネル内壁と特異的に相互作用するモチーフが存在し翻訳アレストを引き起こすが、その安定性は VemP の分泌時に生じる物理的引っ張り力により変化する。分泌能の低下に伴う翻訳アレストの安定化は、*vemP-secD2* 間非コード RNA 領域の二次構造の再形成を阻害し、結果的に *secD2* の SD 配列を露出させることで *SecDF2* の合成を促すと考えられるものの、これは *in silico* 予測二次構造に基づいた作業仮説であり、実験的な検証が必要であった。そこで、*vemP-secD2* 間非コード RNA 領域の二次構造を RNA の化学修飾法により検証し、得られた結果に基づいた変異解析を進めることで、*in silico* 予測構造の妥当性を示した。加えて、翻訳アレストが速やかに解除される等の *SecDF2* が発現しない条件では、エンドヌクレアーゼである RNase E による分解により *secDF2* RNA の安定性が低下することも見出した。一方で *vemP-secDF2* 領域からは *vemP* と非コード RNA 領域の一部を有する短い RNA 分子の産生も確認されており、その産生機構と *SecDF2* 発現における役割についても議論したい。これらの結果はビブリオ属細菌が翻訳アレストを利用し RNA レベルの量的・質的制御を行うことでタンパク質の厳密な発現制御を行っていることを示している。



## S12

細菌感染症の治療薬創出に挑む  
—細菌学者は何ができるのか?—

コンピーナー：港 雄介（藤田医科大学）  
平川 秀忠（群馬大学）

Challenges in antibacterial drug development  
—How can bacteriologists make crucial  
contributions to drug discoveries?—

Conveners: Yusuke Minato (Fujita Health University)  
Hidetada Hirakawa (Gunma University)

薬剤耐性菌の拡大による細菌感染症の難治化が深刻な問題となっており、新規抗菌薬が切望されている。わが国は、世界トップレベルの創薬化学分野のアカデミア研究室と高い創薬力を持つ製薬企業を複数有しているため、世界でも数少ない抗菌薬を開発することができる国である。しかし、新規抗菌薬の開発は未だに停滞している。本シンポジウムは、これまで世界の最先端をリードしてきた日本の細菌学者が、抗菌薬開発にどのような貢献ができるのかを議論する。シンポジストには細菌学者、創薬科学者、製薬企業研究者、研究資金提供機関の担当者らを迎え、最新の研究知見やこれまでの抗菌薬開発に向けた様々な取り組み、これから細菌学者に期待する研究分野についてお話しいただく。本シンポジウムが、私たち細菌学者がより積極的に抗菌薬開発に参画するきっかけとなることを期待している。

## S12-1

## 細菌学者が抗菌薬創薬研究に使える最新の手法

○港 雄介（藤田医大・医・微生物）

## Novel tools for bacteriologists to develop new antimicrobials

○Yusuke Minato (Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ.)

世界三大感染症の一つである結核により、現在でも世界で年間約160万人が命を奪われている。結核は主に発展途上国で猛威を振るっている感染症であるが、わが国を含む先進国でも結核菌の類縁菌である非結核性抗酸菌 (NTM) による感染症が増加傾向にあり問題となっている。結核や NTM 感染症の治療は容易ではない。その主な要因として、これらの菌は多くの抗菌薬に対して抵抗性を示すため、治療期間が長期間を要する点が挙げられる。加えて、薬剤耐性抗酸菌の世界的な拡大によってさらに長期間の治療が必要な症例や、治療不可能な症例が増加している。そこで、より効果の高い新規治療薬の開発が望まれている。我々はこれまで結核菌と NTM を対象に、新規治療薬の開発を目指した細菌学基礎研究を行ってきた。我々は特に、近年目覚ましく進歩している細菌学手法を用いることで、有望性の高い新規創薬標的の同定を目指している。本発表では、我々がこれまで得てきた知見と世界の最新研究を合わせて紹介させていただき、皆様と議論させて頂ける場としたい。

## S12-2

## Advancing Japan's innovation for global health - GHIT's catalytic role

○鹿角 契（公益社団法人グローバルヘルス技術振興基金・投資戦略 兼 ビジネスディベロップメント）

○Kei Katsuno (Investment Strategy & Business Development, Global Health Innovative Technology Fund)

The global fight against infectious diseases, both emerging and re-emerging, endures as is clear from the COVID-19 pandemic. Japan's commitments and responsibility to uphold domestic and international human security mean that it is in Japan's best interest to leverage its innovative and technological capabilities for global infectious disease prevention and control. The Global Health Innovative Technology Fund (GHIT Fund), an international non-profit organization based in Tokyo, Japan, was established by the Japanese government, multiple Japanese pharmaceutical companies, and the Bill & Melinda Gates Foundation as the first fund of its kind, with an aim to tackle the global burden of infectious diseases by facilitating and funding global health R&D of drugs, vaccines, and diagnostics. Since its inception in 2013, the GHIT Fund has invested approximately 276 million USD in 114 projects (as of March 2022), which consist of collaborations among Japanese and non-Japanese entities. To date, over ten GHIT development partnerships have conducted clinical programs worldwide. The GHIT Fund will continue to play an important role in the global health arena by further advancing R&D innovations for infectious diseases.

## S12-3

## 抗感染症薬としての吸着剤の可能性

○平川 秀忠<sup>1</sup>, 富田 治芳<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>群馬大・医・細菌, <sup>2</sup>群馬大・医・薬剤耐性)

## Antimicrobial potency of adsorbents

○Hidetada Hirakawa<sup>1</sup>, Haruyoshi Tomita<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ., <sup>2</sup>Lab. Drug Resist., Sch. Med., Gunma Univ.)

薬剤耐性菌の蔓延が大きな問題となっている一方で、腸管出血性大腸菌感染症のように根本的治療法が確立されていない細菌感染症も存在している。このような背景から、これらの細菌感染症に対して新たな抗菌薬を含めた治療法の創出が切望されている。私たちは、細菌感染症の治療、予防するための新たなオプション候補として吸着剤に着目している。吸着剤には、活性炭に代表される吸着炭やイオン交換樹脂などが知られている。その多くが、電極や水質、大気浄化などの工業目的で使用されてきたが、一部は経口薬として医療目的で使用されているものもある。例えば、活性炭製剤として知られているクレメジン<sup>®</sup>は、進行性慢性腎機能障害の遅延薬として使用されている。一方で、イオン交換樹脂製剤のコレスチラミンは、高コレステロール血症の治療薬やレフルノミド除去薬として用いられている。最近私たちは、ある吸着炭が腸管出血性大腸菌の産生するインドールシグナルや志賀毒素といった病原性分子を吸着することで、本菌を弱毒させることを発見した。当吸着炭をマウスに経口投与した場合において、腸管出血性大腸菌の感染に対して抵抗を示す一方で、消化管の損傷やその他細胞毒性は示さなかった。さらに当吸着炭は、腸管出血性大腸菌に限らず、多剤耐性緑膿菌が産生するピオシアニンや細胞外プロテアーゼをはじめとする病原性因子も吸着することが可能であり、当菌を弱毒化することも確認している。本講演では、難治性の細菌感染症に対する新たな治療、予防オプションとしての吸着剤の可能性について私たちの研究を含めた最新の知見について紹介し、討論を行いたいと考えている。

## S12-4

### 活性天然物を活用する新規創薬標的の開拓

○荒井 雅吉 (阪大・院薬)

#### Exploring of new drug targets utilizing bioactive natural products

○Masayoshi Arai (Grad. Sch. Pharma. Sci., Osaka Univ.)

天然薬用資源から見出される二次代謝産物（活性天然物）の化学構造多様性は非常に広い。このことは、活性天然物が生体内の様々な分子に選択的に結合できることを示唆しており、活性天然物の医薬シーズや創薬標的を開拓するツールとして有用性は非常に高い。我々の研究グループは、薬用植物や陸棲微生物に加え、海綿などの底生海洋生物の抽出物や海洋由来微生物の培養抽出物を探索資源として、活性天然物の探索を進めている。また、見出した活性天然物の標的分子を、活性天然物に対して耐性を付与する遺伝子（タンパク質）を同定して明らかにする、ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を用いる方法、活性天然物の合成アナログによる構造活性相関の知見をもとに、活性天然物のプローブ分子化を行い、細胞や菌体破砕物から結合タンパク質を同定する方法などを用いて解析し、さらに標的分子解析の結果をもとに新たな創薬標的を開拓する研究を行っている。本講演では、これまでの活性天然物の探索研究で見出した、潜在状態を誘導した *Mycobacterium* 属細菌に対して抗菌活性を示す、海洋由来放線菌の二次代謝産物 nybomycin、インドネシア産海綿 *Aaptos* sp. から見出した 3-(phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA) などを例として、我々の活性天然物を活用する標的分子の同定と創薬標的の開拓研究を紹介したい。

## S12-5

### 抗菌薬創製における基礎研究の重要性

○竹村 美紀 (塩野義製薬株式会社・創薬疾患研究所)

#### Importance of basic research in antimicrobial drug discovery

○Miki Takemura (Laboratory for Drug Discovery and Disease Research, SHIONOGI & CO., LTD.)

The global spread of the COVID-19 infection in recent years has threatened the lives of humankind. Infections caused by bacteria with antimicrobial resistance (AMR) are considered to be silent pandemic as this is spreading steadily but more slowly than the COVID-19. There is a lack of effective treatment options against AMR, and the discovery of new drugs against AMR is urgently required by WHO. Innovative new drugs, such as antibiotics with unique mechanisms of action and drugs with new concepts, are needed to combat AMR. In recent years, Shionogi & Co., Ltd. has developed unique antibacterial agents such as cefiderocol, siderophore cephalosporin that enters bacteria via the bacterial iron uptake system, and humanized monoclonal antibody COT-143 (RESP-X), which targets the PcrV protein involved in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. These products are based on the results of basic research that has been accumulated by various researchers from not only industry but also academia. In this presentation, I would like to show the importance, difficulty, and interest of basic research through the episodes of the discovery of these products. I hope that this will be an opportunity to think about the ideal form of industry-government-academia collaboration and the importance of continuous funding in order to continue to produce innovative antibacterial drugs from Japan.

## S13

### 数字で彩る細菌学

コンピーナー：中村 修一 (東北大学)  
アンドリュー・ウタダ (筑波大学)

#### Bacteriology by the numbers

Conveners: Shuichi Nakamura (Tohoku University)  
Andrew S. Utada (University of Tsukuba)

「数字」を使うと、異なる時空間スケールで起こる生物や物質の現象を比較することができます。これは、細菌が生きるマイクロな世界でも大いに役立ちます。例えば、ナノスケールで動く分子は、細菌の大きさ程度の範囲であれば1秒足らずで拡散しますが、真核細胞を横切るには数時間かかってしまいます。そのため、真核細胞には能動的な輸送システムが備わっています。このような簡単な定量的考察を通して、私たちは複雑な生体システムの可能性や限界、そして意義を知ることができます。このシンポジウムでは、演者がそれぞれの研究を特徴づける「数字」を使い、力学的特性（速度、力、剛性）や界面特性、時間的特性（化学反応、拡散、シグナル伝達）といった観点で様々な細菌学的現象を議論します。このような定量的アプローチは、細菌の生態系における役割や病原性発揮機構について新たな側面を見出します。さらに、感染症診断における恣意性を減らす、従来の経験的手法にとってかわるようなコンピュータビジョン技術の応用についても紹介します。

## S13-1

### How fast? How flexible? Numbers gain our interest in bacteriology

○中村 修一 (東北大・院工・応物)

○Shuichi Nakamura (Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

This symposium highlights numbers that make us realize the tangible meaning of a range of phenomena in bacterial activity. In the opening remarks, I will explain the concept and then discuss bacterial motility as an example of physical parameters. Though diverse ways of bacterial motility are known, I will focus on flagella-driven swimming and spirochetes' motility over surfaces called crawling. I will present our recent results on characterizations of bacterial motility in various conditions (e.g., in a liquid, on cultured cells) and measurements of the cell-body stiffness. These deepen our understanding of the mechanism that motility machinery propels bacteria and also gain insight into its significance as a virulence factor.

**S13-2****Seeing is believing: Making Agglutination Tests from Qualitative to Quantitative with Deep Learning**

○尾鶴 亮<sup>1</sup>, 中野 里咲<sup>2</sup>, 小山田 雄仁<sup>2</sup>, 宮原 敏<sup>3</sup>, 吉村 芳修<sup>1</sup>, 廣松 賢治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福岡大・医・微生物免疫, <sup>2</sup>鳥取大・工・電気情報, <sup>3</sup>産業医科大・医・微生物)

○Ryo Ozuru<sup>1</sup>, Risa Nakano<sup>2</sup>, Yuji Oyamada<sup>2</sup>, Satoshi Miyahara<sup>3</sup>, Michinobu Yoshimura<sup>1</sup>, Kenji Hiromatsu<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ., <sup>2</sup>Dept. EECS., Fac. Eng., Tottori Univ., <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Sch. Med., UOEH)

We are developing new quantitative testing techniques by "showing" computers images of conventional microbiological tests, especially qualitative tests such as agglutination tests (Oyamada et al., PLoS ONE 2021). Human vision is the competent system that can identify various images and to recognize complex information. However, visual recognition has its own limits that subtle differences have to be inspected with very-time consuming manner. Our research seeks to solve these problems by introducing machine learning. We developed a deep learning algorithm to automate the cohesion estimation performed by the microscopic agglutination test (MAT). MAT is a necessary but complicated test for diagnosing leptospirosis, a bacterial zoonosis. There are more than 250 serovars of leptospires, and current vaccines are serovar-specific. Therefore, a rapid and straightforward determination is essential to identify serovars prevalent in a region. Our experiments on small-scale datasets suggested that the algorithm is able to estimate the agglutination rate as accurately as that performed by humans, and it may also recognize differences in serotypes in microscopic images. This quantification and subsequent visualization of image data have made the previously qualitative MAT to be quantitative and visually confirmable.

**S13-3****腸管出血性大腸菌の志賀毒素の新たな宿主標的分子の検索**

○小幡 史子<sup>1</sup>, 尾鶴 亮<sup>2</sup>, 藤井 潤<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鳥取大・医・医学科感染制御学講座細菌学分野, <sup>2</sup>福岡大・医・微生物・免疫学講座)

**Finding unexpected host target molecules of Shiga toxin from Enterohemorrhagic *Escherichia coli***

○Fumiko Obata<sup>1</sup>, Ryo Ozuru<sup>2</sup>, Jun Fujii<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Div. Bacteriol, Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med. Fac. Med., Tottori Univ., <sup>2</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ.)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection causes not only bloody diarrhea but also severe kidney- and brain-associated symptoms, hemolytic uremic syndrome (HUS) and encephalopathy, respectively. However, there has not yet been a specific therapy for this infectious disease. The major cause of the symptoms is Shiga toxin, especially type 2 toxin (Stx2)-producing EHEC is often found in severe cases. To screen common gene targets in both human and mouse kidneys, Stx2-associated differentially expressed genes (DEGs) were analyzed from human proximal tubular epithelial cells (RPTECs) and mouse kidney using microarray. We found several unexpected DEGs that have not been linked to Stx2 before. But the timing of an increase or decrease in DEGs could explain the phenomena that have been observed in the mouse model. For example, Stx2-associated weight loss starts at 48 h post-injection, before the hind limb paralysis, meaning they can reach food but somehow stop eating. This seems to be explained by an increase of an appetite influencing factor GDF15 from earlier hours. Moreover, we detected several circadian-related genes as DEGs, which is suggestive of Stx2-induced renal circadian rhythm disturbance. These DEGs may serve as novel molecular targets of Stx2 in both mouse and human kidneys that shed the light to a therapy against the infectious disease.

**S13-4****Holographic microscopy and artificial intelligence for the study of bacterial motility**

Sam A. Matthews<sup>1,2</sup>, Carlos Coelho<sup>1</sup>, Erick E. Rodriguez Salas<sup>1</sup>, Emma E. Brock<sup>1</sup>, Victoria J. Hodge<sup>2</sup>, James A. Walker<sup>2</sup>, Laurence G. Wilson<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Sch. Physics, Engineering and Technology, Univ. York, <sup>2</sup>Dept. Computer Science, Univ. York)

The interactions between physics, biology and computer science have been a rich area for scientific advances. Studies of cellular motility are a key example of these interactions. Motility is an ancient trait, ubiquitous across phyla with roles in predator avoidance, resource access, and competition. Flagellar motility is seen in a wide range of bacterial phyla, and it plays a critical role in infection and colonisation of new niches. We have developed a unique implementation of holographic microscopy to image and track swimming cells in three dimensions, and at rates of 1,000 volumes per second or more. We have employed this method to study (among other things) the flagellar dynamics of *Shewanella putrefaciens*, and predator-prey interactions in mixed populations of *E. coli* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. The recent revolution in artificial intelligence and machine learning offers new opportunities to expand and deepen our studies in these areas: we have raw data (our holographic movies) and the annotations required to 'train' algorithms (our holographic analysis). After training a convolutional neural network, we can use it in 'inference mode' to track cells in three dimensions and in real time, with modest hardware such as an Nvidia Jetson single-board computer. This offers the possibility of studying cellular dynamics with instant feedback, allowing us to probe the response of a population to stimulus and to maintain it 'out of equilibrium' for the purposes of obtaining high-value chemical products. In my presentation, I will explain the process of our data collection and the training of artificial intelligence routines and outline some future directions that will become accessible using this technology.

**S13-5****Looking at populations as they exist as composites of metabolically unique individuals**

○Shawn Erin McGlynn<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>Earth Life Science Inst., Tokyo Inst. Technology, <sup>2</sup>Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, <sup>3</sup>Blue Marble Space Inst. Science)

Cells in an axenic culture may have identical genomes, but individuals within populations can vary significantly between one-another. Until we understand the extent and types of this variance, we will not fully understand populations. Furthermore, population control will not be completely achieved until we reconcile bulk data with individual cell variability. Here I will describe the observation of individual-cell anabolic activities using stable isotope labeling and nanoSIMS. I will present data from diverse microbe types including *Pseudomonas aeruginosa*, *Synechocystis* sp. PCC6803, and a number of methanogenic archaea. Using multiple isotopes simultaneously, we can start to see that different elements are cycled and re-cycled in different ways, depending on the growth condition. By integrating our empirical results with models describing cellular metabolism, we can start to understand how cellular individuals in populations are metabolically unique.

## S13-6

### Biofilms on High Fat Diets Cooperate to Stay Fit

○Andrew S. Utada (Dept. Life and Environmental Sciences & MiCS, Univ. Tsukuba)

Obligately hydrocarbonoclastic bacteria (OHCB) are cosmopolitan marine bacteria that can survive by consuming hydrocarbons as a sole energy and carbon source. In the ocean, these bacteria are typically found at very low densities but bloom to become the dominant bacteria at the site of oil spills. These organisms have likely evolved to directly utilize hydrocarbons around the various natural oil-seeps found on the sea floor around the world. They are thought to degrade a significant amount of the worldwide spilled oil, which is why they have been organisms of interest for use as agents of bioremediation.

*Alcanivorax borkumensis* was the first OHCB sequenced in the mid-2000s. Like most bacteria, it is thought to transition between planktonic and biofilm states. Biofilms are 3D communities of densely packed bacteria encased in a self-secreted matrix of extracellular polymeric substances (EPS) that both protect and help the community remain attached to a surface. However, unlike most environmental bacteria, which typically absorb their carbon (and energy) directly from nutrients in the surrounding water, *A. borkumensis* biofilms must form on the oil-water interface. Although formation of a biofilm at fluid-fluid interface is not unique and, in some ways, shares some similarity to pellicle formation at the air-liquid interface, the similarities diverge there. Biofilms can generate gradients in the nutrients between the internal and external environments. In the case of an *A. borkumensis* biofilm surrounding an oil droplet, only the cells at the interface have access to the carbon/energy, while the outward facing cells have access to micronutrients. It is not clear how the obvious nutrient gradients and the fluid interface affects *A. borkumensis* biofilm formation.

Due to the difficulty in tracking individual droplets over time, biofilm dynamics of this interesting organism have largely been conducted through bulk methods. From an applied ecology perspective, clarifying the microscopic mechanisms of biofilm formation for this and similar OHCB organism may reveal features to be exploited in the management of oil spills in the natural environment. From the active-matter physics perspective, the behavior of self-driven layer at the interface may reveal new physics.

We introduce a microfluidic platform that can trap and store oil microdroplets for weeks. This platform greatly facilitates imaging and analysis of biofilm formation at the oil-water interface. We demonstrate unresolved biofilm dynamics by *A. borkumensis*, showing its ability to explode oil drops. We analyze various physical aspects of this organism and correlate them to its ability to align and cooperate at the interface to drive a rapid and large-scale remodeling of the interface. This remodeling appears to be the most egalitarian and efficient distribution of resources.

## W1

## 進化する肺炎球菌：診断，病原性，次世代ワクチン

コンピーナー：大石 和徳（富山県衛生研究所）  
山口 雅也（大阪大学）

## Evolving pneumococcus: diagnosis, pathogenesis and next generation vaccine

Conveners: Kazunori Oishi (Toyama Institute of Health)  
Masaya Yamaguchi (Osaka University)

小児結合型肺炎球菌ワクチン導入後により，世界レベルでの小児侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）は全体の60～80%が減少し（直接効果），成人IPDは10～30%が減少した（間接効果）ことが明らかになった（12th ISPPD, June 2022, Toronto）．一方，非ワクチン血清型によるIPDは全年齢を通して2～3倍増加したとされている．本ワークショップでは，侵襲性ポテンシャルの概念，国内の成人IPDの血清型による病型の特徴，加齢の致命率への影響を示し（大石），*in vitro*細胞培養系での菌の細胞間移動能から血清型による侵襲性ポテンシャルを解析し（金谷），細菌学的解析から検査診断の課題を提起する（常）．また，非ワクチン血清型の課題を克服するPspAワクチンの有用性を提示する（金城）．さらに，疫学所見で確認されている加齢と重症化の関係についても基礎的研究から検証する（山口）．

## W1-1

わが国の成人の侵襲性肺炎球菌感染症サーベイランスから判ったこと

○大石 和徳（富山衛研・細菌部）

## What we learned from invasive pneumococcal disease surveillance in adults, Japan

○Kazunori Oishi (Dept. Bacteriol. Toyama Institute of Health)

**Background:** *Streptococcus pneumoniae* invades through the nasal epithelium into the submucosal tissues and translocates across the capillary endothelium into the bloodstream, where it can lead to bacteremia. Once in the bloodstream, this pathogen can penetrate the blood-brain barrier to cause meningitis. The invasiveness of *S. pneumoniae* differs widely between different serotypes and clones, although this reason remains uncertain. **Methods/Results:** We conducted nation-wide invasive pneumococcal disease surveillance in adults, 2013-19, Japan. **Results and Discussion:** Our data on the serotype distribution support an indirect effect from pediatric use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13), and no significant change in the proportion of 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPSV23)-nonPCV13 in older adults. Age and case fatality rate were significantly lower in patients with meningitis than in those without meningitis. The odds of developing meningitis were higher for serotypes 10A or 23A, but lower for those age older than 65 years. We found significant decreases in the case-fatality rate in both young and older adults. The accumulated findings prompt us to implement the public health measures for vaccination in older adults, and also lead us to clarify the mechanisms on invasive disease and to find differences in the invasive potential by serotype.

## W1-2

肺炎球菌の経細胞間移動能および細胞内侵入能の評価

○金谷 潤一，前西 絵美，田村 恒介，磯部 順子，大石 和徳（富山衛研・細菌）

Bacterial transcytosis and invasion of *Streptococcus pneumoniae* across the host cells

○Jun-ichi Kanatani, Emi Maenishi, Kosuke Tamura, Junko Isobe, Kazunori Oishi (Dept. Bacteriol., Toyama Institute of Health)

**Background:** The invasiveness of *Streptococcus pneumoniae* for human differs between serotypes, although the reasons for these differences remain uncertain. In this study, we investigated bacterial transcytosis (BT) and invasion (BI) of *S. pneumoniae* using cell lines representing human mucosal barrier cells to elucidate the invasive potential of certain serotypes. **Methods:** Three human cell lines were seeded in the upper chamber of the insert or plate. *S. pneumoniae* isolates (serotypes 3, 10A, 12F, 19A, and 23A) were inoculated onto the monolayer cells of the insert or plate. Bacterial counts were measured in the lower chamber (BT) or in the cells (BI). **Results and Discussion:** BT differed between cell lines; the lowest was human brain microvascular endothelial cells (0.24%). This finding may support a notion that the threshold of blood-cerebrospinal fluid barrier is high in human brain microvascular endothelial cells. BT of serotype 3 strains was the lowest in all cells, suggesting a low invasive potential of this serotype. A positive correlation was observed between BT and BI ( $r = 0.77$ ). This indicates that BI may play an important role in BT. Furthermore, BT was about 100-fold higher than BI (0.003%), indicating that most of BT may occur through paracellular route. An *in vitro* BT and BI assays may be useful tools for analyzing the invasive potential of pneumococcal serotypes.

## W1-3

ゲノム解析技術の進歩で見えてきた肺炎球菌の同定および臨床診断の課題

○常 彬（感染研・細菌一）

Prospects for identification of *Streptococcus pneumoniae* by genome analysis technology

○Bin Chang (Dept. Bacteriol. I, NIID)

肺炎球菌は，健康人の鼻咽頭に常在するα溶血性双球菌である．小児，高齢者，免疫低下患者において，肺炎，敗血症，髄膜炎などの重篤な感染症を引き起こす．肺炎球菌の莢膜は，食細胞による貪食に抵抗する重要な病原因子であり，ワクチンの標的分子である．莢膜の抗原性により，肺炎球菌は約100種類に分類される．従来，肺炎球菌の菌種同定は，培養性状，グラム染色所見，生化学的性状などの結果を組み合わせて総合的に判断する．しかし，肺炎球菌は他のα溶血性レンサ球菌とコロニー形態，生化学的性状，16S rRNA シークエンスが類似しているため，その区別が困難な場合がしばしばある．近年のゲノム解析技術の進歩により，細菌の全ゲノムシークエンスの解読が安価に行えるようになった．そこで，我々は，臨床現場では肺炎球菌と同定されたが，その同定に疑問のあるα溶血性レンサ球菌の全ゲノムシークエンスを決定し，菌種の同定を試みた．本発表では，肺炎球菌を含むα溶血性レンサ球菌の全ゲノムシークエンスによる菌種同定の結果を報告し，その有用性について考察する．また，解析の過程で見出された肺炎球菌をはじめとするα溶血性レンサ球菌の菌種同定に関する問題点を見出し，その対策について検討する必要があると考える．

## W1-4

### 加齢による宿主応答の変化が肺炎球菌感染症の重症化に及ぼす影響の解明

○山口 雅也 (阪大・院歯・バイオインフォ)

#### Elucidating the effects of age-related changes in host responses on pneumococcal infections

○Masaya Yamaguchi (Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

肺炎球菌は肺炎や敗血症の主要な起因菌の一つである。肺炎球菌感染症においては、高齢者の罹患率、重症化率ならびに致死率が高い。しかし、加齢が肺炎球菌感染症の重症化におよぼす機序は十分に明らかになっていない。本研究では、加齢が病態におよぼす影響について解析を行った。

若齢群 (約 2 ヶ月齢)、中年群 (約 12 ヶ月齢)、高齢群 (約 18 ヶ月齢)、後期高齢群 (約 24 ヶ月齢) のマウスに対して、肺炎球菌 TIGR4 株を用いた経鼻感染を行った。その結果、中年群マウスは若齢群と同等の生存率を示したが、高齢群と後期高齢群は有意に生存率が低下し、マウスの加齢が肺炎球菌感染症のリスクファクターとなることが示された。次に若齢群と高齢群のマウスについて、感染 24 時間後の鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および血液中の菌数を比較したところ、高齢群の肺胞洗浄液中の菌数が有意に高いことが示された。肺胞洗浄液の細菌シングルセル解析を行ったところ、検出された肺炎球菌は遺伝的に均一な集団ではなく、菌体により異なる変異が生じていた。また、感染後の肺組織について病理組織学的評価を行ったところ、高齢群における好中球エラスターゼ陽性細胞の割合が有意に高いことが示された。さらに高齢群の肺胞洗浄液では、慢性的に IL-1 $\alpha$  や IL-22 などが高発現している一方で、若齢群では感染時に MMP-8 が高発現することが示された。腹腔好中球を分離して殺菌試験を行ったところ、高齢由来群と混和した肺炎球菌の生存率が有意に高いことが示された。

以上の結果から、加齢により肺炎球菌感染時の好中球の表現型が変わるとともに殺菌能が低下し、病態の重症化が引き起こされる可能性が示された。

## W1-5

### 2 価 PspA 融合タンパク質ワクチンによる肺炎球菌感染防御効果の解析

○金城 雄樹<sup>1</sup>、中山 大輝<sup>2</sup>、古泉 ゆか<sup>2</sup>、黒田 英介<sup>3</sup>、常 彬<sup>4</sup>、林崎 浩史<sup>1</sup>、竹河 志郎<sup>2</sup>、明田 幸宏<sup>3</sup>、大石 和徳<sup>5</sup> (1)慈恵医大・細菌学、2)BIKEN財団、3)阪大微研、4)感染研・細菌第一部、5)富山衛研)

#### Protective effects of bivalent recombinant fusion proteins of PspA against pneumococcal infection

○Yuki Kinjo<sup>1</sup>, Hiroki Nakayama<sup>2</sup>, Yuka Koizumi<sup>2</sup>, Eisuke Kuroda<sup>3</sup>, Bin Chang<sup>4</sup>, Koji Hayashizaki<sup>1</sup>, Shiro Takekawa<sup>2</sup>, Yukihiko Akeda<sup>3</sup>, Kazunori Oishi<sup>5</sup> (1)Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2)Res. Found. Microb. Dis. Osaka Univ., 3)Res. Inst. Microb. Dis., Osaka Univ., 4)Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., 5)Toyama Inst. Health)

肺炎球菌は市中肺炎の主な起炎菌であり、菌血症や髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) をひきおこす。肺炎球菌は莢膜ポリサッカライドの構造の違いで約 100 種類の血清型に分類される。現行肺炎球菌ワクチンはポリサッカライドを用いており、23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチンと 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) が定期接種に用いられている。しかし近年、非 PCV13 血清型による IPD が増加している。私達は非 PCV13 などの非ワクチン血清型を含めた幅広い肺炎球菌に対して感染防御効果をもたらすワクチンの開発を目指し、pneumococcal surface protein A (PspA) タンパク質を用いた新規ワクチンを開発した。PspA は clade 1-6 に分類されるが、大部分は clade 1-4 である。そこで、PspA clade 3 と clade 2 の融合タンパク質および PspA clade 4 と clade 1 の融合タンパク質の 2 価 PspA 融合タンパク質ワクチンを用いた。本ワクチンをアラムアジュバントと共に免疫したマウスやウサギの免疫血清を用いて、1) 肺炎球菌株に対する IgG 抗体の結合性、2) 抗体依存性補体沈着活性、3) オプソニン化食生活性 (OPA)、4) 免疫血清移入マウスでの肺炎球菌感染防御を評価した。

2 価 PspA 融合タンパク質ワクチン免疫血清中の IgG 抗体は、非 PCV13 血清型を含む種々の肺炎球菌株に結合し、菌への補体沈着を増強した。また、本ワクチン免疫血清を用いて各 clade の肺炎球菌株に対する OPA 活性の評価系を構築すると共に、免疫血清移入による感染防御効果と OPA 活性が正の相関を示すことを明らかにした。以上より、2 価 PspA 融合タンパク質ワクチンは血清型に依存しない肺炎球菌感染防御効果をもたらす可能性が示唆された。

## W2

### 感染・共生を突き進む細菌のドリル戦車

コンピーナー：中根 大介 (電気通信大学)  
菊池 義智 (産業総合技術研究所)

#### Bacterial drill tanks pushing forward infection and symbiosis

Conveners: Daisuke Nakane (The University of Electro-Communications)  
Yoshitomo Kikuchi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

細菌は水中を自由自在に泳ぎまわることができる。べん毛というらせん繊維構造を根元のモーターが回転させることで推進力を発生させている。これまで何十年もの間、細菌はべん毛繊維を水中にたなびかせてスイスイと動くのだと考えられてきた。ところが、本当はちょっと違った遊泳様式をとるものもいる。カンピロバクターやバークホルデリアなどはべん毛繊維を体に巻き付けて、まるでトンネル掘削機のように進むのである。ドリル戦車運動は病原細菌・共生細菌に広く見られることから、新たな治療法や害虫防除法に向けた基盤的知見を提供することができる。本シンポジウムでは、ドリル戦車の「うごき」と「かたち」から見えてきた新しい細菌の世界について議論する。

共催：学術変革領域研究 (B) 微生物が動く意味  
Co-host: Grant-in-Aid for Transformative Research Areas (B)  
The reason why microbes are moving

## W2-1

### 共生成立における細菌の動き的重要性

○菊池 義智 (産総研・生物プロセス)

#### Importance of bacterial motility in the establishment of symbiosis

○Yoshitomo Kikuchi (BPRI, AIST)

病原性細菌について感染に関わる遺伝子群を解析すると、多くの場合べん毛のような運動装置が必須の感染因子として取れてくる。これは共生細菌においても同様であり、共生や感染の成立において、如何に細菌の「動き」が重要であるかを物語っている。宿主体内は粘性の高い環境がほとんどであり、その中を効率的に進むことが重要であることは想像に難くない。また、宿主体内には共生相手を選別するために、あるいは病原細菌を排除するために、様々な関門が用意されている場合もある。このように、共生や病気の成立における細菌の動きの重要性は認識されてはいる一方、ほとんどの場合、宿主体内における細菌の動きを視て解析することは難しい。加えて、それら動きの進化が、どのように共生や病原性の進化において重要な役割を果たしてきたのか、ほとんど分かっていないのが現状である。ダイズの害虫として知られるホソヘリカメムシは *Burkholderia* (近年 *Caballeronia* 属に再整理) を土壌中から取り込み、消化管の後端に発達する盲嚢に共生させている。土壌中には数 10 万種もの細菌が生息しているが、このカメムシは消化管に発達する狭窄部によって *Caballeronia* の選別を行う事が明らかとなってきた。この狭窄部は、直径数  $\mu\text{m}$  の管状構造をしており、その内腔は粘液で満たされている。面白いことに、この狭窄部を突破するために、共生細菌はべん毛をその体に巻き付け、あたかもドリルのような狭窄部内を突き進むことが分かってきた。本講演では、両者の共生成立において宿主昆虫と共生細菌それぞれにどのような進化が起こってきたのかについて紹介し、共生進化に果たす細菌の動きの重要性について議論する。

## W2-2

細菌のドリル戦車運動が宿主環境内における狭小空間での移動を可能にする

○中根 大介 (電通大・基盤理工)

**Bacterial flagella wrapping allows movement through narrow spaces within the host environments**

○Daisuke Nakane (Dept. Eng. Sci., UEC)

細菌という小さな生命体は、べん毛というらせん繊維を回転させ、水中になびかせることでスイスイと泳ぐ。ところが、一部の細菌はちょっと変わった遊泳様式をとることがここ数年で明らかになっている。なんと、べん毛の逆回転をきっかけに繊維が体に巻き付いて、トンネル掘削機のように高粘性中を掘り進むようだ。これは Wrapping と呼ばれる運動様式で、*Shewanella putrefaciens* という細菌で 2017 年に初めて報告されている。まるでトンネルの掘削機のように、自身の体を使ってグリグリと掘り進むように見えるため、ここでは「ドリル戦車運動」という名前で呼ぶことにする。このドリル戦車の遊泳様式は、ここ数年で多数の細菌から報告されている。例えば、*Pseudomonas putida* や *Burkholderia insecticola*, *Vibrio fischeri*, *Helicobacter suis*, *Campylobacter jejuni* などが挙げられる。いずれの細菌においても、菌体の極からべん毛が生えている。このドリル戦車運動は本当に効率的な運動なのか、微小流体デバイスを用いて光学顕微鏡下で計測した結果をもとに「かたち」と「動き」について考えてみたい。

## W2-3

環境との物理的な相互作用から探る共生細菌のドリル運動のしくみ

○和田 浩史, 片岡 拓郎 (立命館大・理工・物理)

**Understanding the bacterial drilling motility from the physical interaction with environment**

○Hirofumi Wada, Takuro Kataoka (Dept. Phys. Ritsumeikan Univ.)

近年、いくつかの共生細菌・病原性細菌において、べん毛繊維を菌体に巻きつけてドリルのように推進するようすが観測されている。これらの細菌は、水中では、極から突き出たべん毛を回転させて泳ぎ回る。一方、細菌が「動きにくい」環境におかれると、ドリル運動モードが支配的になることが報告されている。動きにくい環境とは、ゲル状に構造化された空間や狭い空間など、そのなかを細菌が運動すると細菌に大きな抵抗力が作用するような物理的環境のことを指す。これらはまさに、共生細菌や感染性の細菌にとっての自然な生息環境である。本発表では、この新しいべん毛運動の動作原理を、数理モデル、計算機シミュレーション、マクロ模型による物理実験、という三つの異なる手法を組み合わせて明らかにする研究について紹介する。高い粘性環境においては、ドリル運動は明らかなアドバンテージを持つようである。このことから、ドリル運動性には、細菌の種の違いやその運動の目的の違いを超えて、共通する原理と意味があることが期待される。そこで我々は、生き物の個性には目をつむって、力学的に興味深い要素だけを残した「メカニカルモデル」を構築し、研究を進めている。発表では、理論、シミュレーション、物理実験の三つのアプローチにおいて、これまでに得られた成果について紹介する。

## W2-4

**Microfluidic Devices for Analyzing Bacterial Behavior**

○菅 哲朗 (電気通信大・院・情報理工学研究科・機械知能システム学専攻)

○Tetsuo Kan (Dept. Mechanical and Intelligent Systems Engineering, Grad. Sch. Informatics and Engineering, The Univ. of Electro-Communications)

It is challenging to study bacterial behavior in the insect gut reproducibly. In what size intestinal tracts do characteristic behaviors occur? What kind of environment in the intestinal tracts generates dynamic behavior? This study plans to artificially construct a bacterial behavioral environment and conduct a detailed behavioral analysis to conduct such quantitative behavioral research. Since the size of bacteria is very small (~ 1\_μm), MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) semiconductor fabrication technology is used to create microfluidic channels, which are the behavioral environment. Long lines about 1 μm wide are currently shaped using photoresist with lithography technology. On top of this, an elastomer is poured into molding the long lines. Finally, the resin structure is placed on a glass slide to form microfluidic channels, which act as running tracks for bacteria. In this study, we aim to develop channel structures with various functions by this method and analyze multiple motions and behaviors of bacteria.

## W2-5

微生物に分解される環境に優しいロボット

○新竹 純 (電通大)

**Environmentally friendly robots degraded by microorganisms**

○Jun Shintake (Univ. Electro-Comm.)

ロボットの利用は拡大を続けており、将来的に自然環境を含む様々な場面での活動が期待される。その一方で、ロボットを構成する材料の多くは再利用が難しいため、ロボットの普及に比例して環境負荷が高まることが懸念される。また、自然界においてロボットが故障などで回収不能になると、環境破壊を招く恐れがある。これらの問題を解決する手段のひとつに、微生物に分解され土に還る特性である、生分解性を持つ材料をロボットに導入することが挙げられる。生分解性材料には自然由来のものが多く、ロボットに持続可能性も持たせることができ、種類によっては再利用すら可能となる。本発表では、これまで取り組んできた生分解性材料に基づくロボットとその要素の研究事例について紹介する。

## 選抜ワークショップ 1: 分類・疫学・感染症

コンピーナー: 広瀬 雄二郎 (大阪大学)  
日根野谷 淳 (大阪府立大学)

### Selected from general presentations 1: Taxonomy / Epidemiology / Infectious diseases

Conveners: Yujiro Hirose (Osaka University)  
Atsushi Hinenoya (Osaka Prefecture University)

## W3-1/P1-002

#### Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic marker based on whole-genome sequencing

○森田 昌知<sup>1</sup>, 児玉 年央<sup>2</sup>, 岡田 和久<sup>3</sup>, 泉谷 秀昌<sup>1</sup>, 荒川 英二<sup>1</sup>, 飯田 哲也<sup>3</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup> (<sup>1</sup>感染症・細菌第一部, <sup>2</sup>長崎大・熱帯医学研究所, <sup>3</sup>大阪大・微生物病研究所)  
○Masatomo Morita<sup>1</sup>, Toshio Kodama<sup>2</sup>, Kazuhisa Okada<sup>3</sup>, Hidemasa Izumiya<sup>1</sup>, Eiji Arakawa<sup>1</sup>, Tetsuya Iida<sup>3</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol. I, NIID., <sup>2</sup>Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., <sup>3</sup>RIMD, Osaka Univ.)

Although various serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* have been reported, O3:K6, O1:KUT, and O4:K68 are the major serotypes among pandemic clone that emerged in 1996 and onward. Here, to identify specific genomic islands in pandemic clones, we performed a comparative genomic analysis of *V. parahaemolyticus* strains before 1995 and after 1996 to investigate the differences in genomic characteristics. A total of 121 *V. parahaemolyticus* strains were used for whole-genome sequencing, which belong to O3:K6, O1:KUT, or O4:K68. We generated draft genome contigs of each strain from paired-end short reads and performed genome annotation. Then, we carried out a pan-genome analysis using the 121 *V. parahaemolyticus* strains and the reference genome of strain RIMD2210633. Core genes were extracted from the pan-genome profiles, and the regions more than 10 kb length between the two core genes in the reference genome (RIMD2210633) were defined as the genomic island. We identified 16 genomic islands, which included the previously reported *V. parahaemolyticus* islands (VPais), O-antigen biosynthetic gene clusters, K-antigen biosynthetic gene clusters, and type VI secretion system genes. Phylogenetic analysis constructed from single nucleotide variations on the core genes and the distribution of each genomic island revealed that VPai-5 is specific to the pandemic clade.

## W3-2/P1-026

#### 下水中病原微生物 DNA・RNA の高感度・高スループット検出法 (COPMAN 法) の開発

○片山 夕花<sup>1</sup>, 早瀬 晋<sup>1</sup>, 安藤 良徳<sup>1</sup>, 黒板 智博<sup>1,2</sup>, 岡田 和也<sup>1</sup>, 岩本 遼<sup>1,2</sup>, 柳本 徹<sup>1</sup>, 奥田 智彦<sup>1</sup>, 北島 正章<sup>3</sup>, 真砂 有作<sup>1</sup> (<sup>1</sup>塩野義製薬株式会社, <sup>2</sup>株式会社 AdvanSentinel, <sup>3</sup>北大院・工)

#### COPMAN: A method for automated and sensitive detection of DNA/RNA of various pathogens in wastewater

○Yuka Katayama<sup>1</sup>, Shin Hayase<sup>1</sup>, Yoshinori Ando<sup>1</sup>, Tomohiro Kuroita<sup>1,2</sup>, Kazuya Okada<sup>1</sup>, Ryo Iwamoto<sup>1,2</sup>, Toru Yanagimoto<sup>1</sup>, Tomohiko Okuda<sup>1</sup>, Masaaki Kitajima<sup>3</sup>, Yusaku Masago<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shionogi & Co., Ltd., <sup>2</sup>AdvanSentinel Inc., <sup>3</sup>Fac. Eng., Hokkaido Univ.)

下水疫学調査 (WBE) は、下水中に存在する病原体を検出することで市中の感染動向を効率的に把握する手法である。しかし、既存手法には病原体の検出感度およびスループット性の向上、様々な病原体に対する汎用性の改善等の課題があった。本研究では、WBE の社会実装に向けこれらの課題を解決可能な COPMAN 法 (COagulation and Proteolysis method using MAGnetic beads for detection of Nucleic acids in wastewater) を開発した。まず、自動化可能な高感度核酸検出系を新規に構築した。3つの工程 (凝集剤を用いた下水中微生物濃縮, 磁性ビーズによる核酸抽出, および阻害物質耐性酵素を用いた (RT-前増幅-) qPCR) を組み合わせることで、汎用ロボットで操作可能かつ高感度で下水中微生物核酸を検出可能であった。構築した COPMAN 法を既存手法 (PEG 沈殿-qPCR 法, 限外ろ過-qPCR 法, EPISENS-S 法) と比較するために、下水中に段階希釈した SARS-CoV-2 を添加および検出した結果、COPMAN が4手法の中で最も低い濃度まで検出することができた。続いて、特性の異なる10種類の微生物の都市下水からの検出効率を既存の RNA/DNA 抽出法 (AllPrep PowerViral DNA/RNA Kit 使用) と比較した結果、COPMAN は既存法よりウイルス RNA (PMMoV) を39~97倍、グラム陽性細菌 DNA (Lachnospiraceae 16S rRNA 遺伝子) を7.7~13倍、および真菌 DNA (Candida albicans) を34~894倍の濃度で検出し、実際の下水疫学調査でも COPMAN が非常に有効な下水中核酸検出系であることを示した。COPMAN は高感度・自動化・幅広いターゲットの検出が可能な手法として、WBE の社会実装に大きく貢献することが期待される。

## W3-3/P1-032

#### Longitudinal alterations of the gut microbiota and mycobiota on COVID-19 severity

○元岡 大祐<sup>1</sup>, 前田 悠<sup>2,3</sup>, 沖大也<sup>1</sup>, 田中 健太郎<sup>1</sup>, 猪頭 英里<sup>3</sup>, 平田 晴彦<sup>3</sup>, 木田 博<sup>4</sup>, 熊ノ郷 淳<sup>3</sup>, 中村 昇太<sup>1</sup>, 竹田 潔<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大・微研・感染症メタゲノム, <sup>2</sup>阪大・医・免疫制御, <sup>3</sup>阪大・医・呼吸器内科, <sup>4</sup>大阪刀根山医療センター)  
○Daisuke Motooka<sup>1</sup>, Yuichi Maeda<sup>2,3</sup>, Hiroya Oki<sup>1</sup>, Kentaro Tanaka<sup>1</sup>, Eri Igashira<sup>3</sup>, Haruhiko Hirata<sup>3</sup>, Hiroshi Kida<sup>4</sup>, Atsushi Kumanogoh<sup>3</sup>, Shota Nakamura<sup>1</sup>, Kiyoshi Takeda<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Metagenomics, RIMD, Osaka Univ., <sup>2</sup>Lab. Immune Regulation, Grad. Sch. Medicine, Osaka Univ., <sup>3</sup>Dept. Resp. Med., Grad. Sch. Medicine, Osaka Univ., <sup>4</sup>National Hospital Organization Osaka Toneyama Medical Center)

我々の常在細菌叢は、遺伝的背景、食事などの生活環境や免疫機能などと密接に関わっていることがわかっており、宿主免疫系や様々な疾患との関連に対する研究が急速に進んできている。我々は、常在細菌叢の獲得・消失過程と健康状態との関連に注目しており、腸内のみならず、鼻腔、口腔、皮膚や各種消化管部位についての細菌叢解析を行ってきた。一方、腸内には細菌のみならず、多様な真菌も存在している。その絶対数は腸内全微生物の約0.1%と非常に少ないが、アレルギー性疾患や自己免疫疾患と関与していることが報告されている。それ故、種々の疾患と常在微生物の関係性を明らかにする上では、腸内細菌のみならず、腸内真菌叢の役割も重要であると考えられる。今回、我々は COVID-19 重症度と腸内細菌および真菌叢の関係性について解析を行った。本研究では、COVID-19 の重症・軽症患者および健康者を対象に、腸内細菌叢、真菌叢とその相関について解析した。その結果、重症群および軽症群の真菌叢は健康群に比べ多様性が低く、一部では単一の真菌種である *Candida albicans* に専有された特徴的なパターンが検出された。細菌の多様性は重症群では低いことが確認されたが、軽症群と健康群との間には検出されなかった。重症群の細菌叢では、*Enterococcus* と *Lactobacillus* が増加し、*Faecalibacterium* や *Bacteroides* が減少していることが特徴的であった。細菌と真菌の相関解析では、*Candida albicans* が *Enterococcus* と正の相関を示した。また回復後の変化を観察するために回復6ヶ月後のフォローアップ解析も行った。その結果、重症患者は回復後6ヶ月を経過してもなお、細菌叢が元に戻っていないことがわかった。



**W3-4/P1-001****パーキンソン病患者便から単離した 4 種類の新規候補細菌**

○関口 恭平<sup>1</sup>, 浜口 知成<sup>3</sup>, 伊藤 美佳子<sup>3</sup>, 西脇 寛<sup>3</sup>, 上山 純<sup>2</sup>, 大野 欽司<sup>3</sup>, 平山 正昭<sup>2</sup> (<sup>1</sup>名古屋大学・医・総合保健学, <sup>2</sup>名古屋大学・医・オミックス医療科学, <sup>3</sup>名古屋大学・医・神経遺伝情報)

**Four new microbes isolated from feces of Parkinson's disease patients**

○Kyoei Sekiguchi<sup>1</sup>, Tomonari Hamaguchi<sup>3</sup>, Mikako Ito<sup>3</sup>, Hiroshi Nishiwaki<sup>3</sup>, Jun Ueyama<sup>2</sup>, Kinji Ohno<sup>3</sup>, Masaaki Hirayama<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Comprehensive Health Sci., Sch. Med., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Dept. Omics Medical Sci., Sch. Med., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Dev. Neurogenetics., Sch. Med., Nagoya Univ.)

【背景・目的】近年、腸内細菌がパーキンソン病 (PD) の病態に関わっていることが明らかになっている。PD 運動症状発症の 20 年前に慢性便秘症を患うことが知られている。今回、PD 患者便から新規細菌の単離を試みた。【方法】4 種類の寒天培地を用いて単離培養を行った。単離細菌の 16S rRNA をサンガーシークエンス解析した。そして、既存菌との同源性を比較した。SEM で観察した。【結果】PD 患者凍結便より 4 種類 (13-1G, 13-11C, 13-8C, 13-18C) の新規細菌の単離培養に成功した。各種細菌の形態観察と 16S rRNA シークエンス解析を行った。NCBI と SILVA のデータベースを参照した。・13-1G グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Ruthenibacterium lactatiformans* と 95% の同源性が確認された。本菌は新属の可能性が高い。・13-11C グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Porphyromonas circumdentaria* と 90% の同源性が確認された。本菌は新属の可能性が高い。・13-8C グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Desulfovibrio intestinalis* と 98% の同源性が確認された。本菌は新種の可能性が高い。・13-18C グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Ruminococcus torques* と 95% の同源性が確認された。本菌は新属の可能性が高い。【結論・今後の予定】PD 患者便から 4 種の新規候補細菌を単離培養した。今後、Whole genome 解析と TEM, 生化学性状分析を行う。

**W3-5/P1-004****劇症型連鎖球菌感染症原因菌のデータベース構築**

○秋山 徹<sup>1</sup>, 奥野 ルミ<sup>2</sup>, 山口 雅也<sup>3</sup>, 広瀬 雄二郎<sup>3</sup>, 大野 誠之<sup>3</sup>, 池辺 忠義<sup>4</sup> (<sup>1</sup>国立国際医療研究センター, <sup>2</sup>東京都健康安全研究センター, <sup>3</sup>大阪大学歯学部, <sup>4</sup>国立感染症研究所)

**Database construction of streptococcal toxic shock syndrome-causing bacteria**

○Tohru Akiyama<sup>1</sup>, Rumi Okuno<sup>2</sup>, Masaya Yamaguchi<sup>3</sup>, Yujiro Hirose<sup>3</sup>, Masayuki Oono<sup>3</sup>, Tadayoshi Ikebe<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Nat. Cent. Global Health Med., <sup>2</sup>Tokyo Metro. Inst. Pub. Heal., <sup>3</sup>Osaka Univ. Grad. Sch. Dentis., <sup>4</sup>Nat. Inst. Infect. Dis.)

The whole genome information of streptococci was put into a database by adding original virulence factor information. We constructed a database (named GAS-J) that includes information on over 10,000 types of virulence factors, which enables comparison of whole genome information of strains derived from streptococcal toxic shock syndrome (STSS) cases and strains derived from non-STSS cases as the control. Since the definition of STSS varies depending on the country and research, only Japanese isolates for which diagnostic criteria have been clarified will be used, and registration in the database will be done by a curator. The system was designed so that strains that do not meet the requirements are not registered. Registration of strains in the database is currently underway, and about 400 strains isolated since 2011 are scheduled to be registered, and the initial registration work has already been completed for 386 strains.

**W3-6/P1-024****MALDI 法を用いた質量分析による O 抗原の迅速同定**

○浦上 彰吾, 比能 洋 (北大・生命科学院)

**O antigen identification by MALDI-MS**

○Shogo Urakami, Hiroshi Hinou (Grad. Sch. Life. Sci., Hokkaido Univ.)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI 法) による質量分析は生体高分子を測定する手法として開発された。ここ十年、MALDI 法による微生物の菌種同定法が開発され、迅速さと簡便さから世界中の臨床現場において普及している。この手法はワンチューブ内の簡単な操作を行うことで、菌種同定に必要なマスペクトルを迅速に検出することが出来る。しかし、現在活用されている菌種同定法はリボソームタンパク質を標的とした測定法であり、血清型の同定は困難である。血清型は同一種内を区別するとき利用され、集団感染時に感染源を特定するための疫学調査に活用される。血清型の中でも特にグラム陰性菌の O 抗原は多様な構造を有し、血清型同定における重要な標的となっている。従来の O 抗原の同定では、抗原抗体反応や生化学実験、PCR 法などが用いられており、これらの手法はそれぞれの型に対応した試薬を事前に準備しスクリーニングすることで同定に繋がる。しかし、O 抗原は多様性を有するが故に、その絞り込み操作は極めて煩雑となる。疫学調査の遅れに伴い感染拡大へと繋がる可能性が高く、迅速性と正確性を有する O 抗原同定法の開発が求められる。本研究では、カラムや HILIC などの煩雑な分離操作を行うことなく、大腸菌の菌株から 1 時間以内に O 抗原を同定する手法を開発した。複数の菌株が混合した寒天培地から、それぞれのコロニーが有する O 抗原の同定が可能となった。また、本手法は従来法と組み合わせることにより、1 コロニーから種の同定と O 抗原の同定、その両方が実施可能であることを実証した。

**W3-7/P1-025****CRISPR-Cas12a を用いた多剤耐性アシネトバクターのカルバペネマーゼ遺伝子検査**

○古賀 美沙希<sup>1</sup>, 西田 智<sup>1</sup>, 永川 茂<sup>1</sup>, 上田 たかね<sup>1</sup>, 佐藤 義則<sup>1</sup>, 斧 康雄<sup>1,2</sup>, 吉野 友祐<sup>1</sup> (<sup>1</sup>帝京大・医・微生物, <sup>2</sup>帝京平成大・健康メディカル)

**CRISPR-Cas12a system for carbapenemase gene detection of multidrug-resistant *Acinetobacter***

○Misaki Koga<sup>1</sup>, Satoshi Nishida<sup>1</sup>, Shigeru Nagakawa<sup>1</sup>, Takane Ueda<sup>1</sup>, Yoshinori Sato<sup>1</sup>, Yasuo Ono<sup>1,2</sup>, Yusuke Yoshino<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., <sup>2</sup>Fac. Health. Med. Sci. Teikyo Heisei Univ.)

【目的】カルバペネマーゼ産生アシネトバクター (CRAB) は、しばしば多剤耐性を獲得して MDRA となり、コリスチンやチゲサイクリンなど利用可能な治療薬の選択肢が限られる。そのため予後が悪く、特に ICU における日和見感染を多く引き起こすため重大な問題となっている。本研究では、カルバペネマーゼ遺伝子のうち *bla<sub>OXA-23</sub>* に焦点を当て、DETECTR 法により迅速で簡便な検出法を確立することを目的とした。

【方法】*bla<sub>OXA-23</sub>* は PCR 法により増幅した。検出には CRISPR-Cas12a を利用した DETECTR 法を用いた。臨床分離株として *bla<sub>OXA-23</sub>* 産生 CRAB を 2 株、*bla<sub>OXA-23</sub>* 非産生 CRAB を 9 株用いた。【結果】*bla<sub>OXA-23</sub>* をターゲットとした PCR 増幅で得られたアンプリコンに、ガイド RNA, Cas12a, 蛍光 ssDNA プロローブを加え 37°C で反応を行ったところ、コラテラル ssDNase 活性により反応時間依存的に蛍光が検出できた。また、アンプリコンの用量依存的な蛍光増強も見られた。この蛍光は PCR 法によって増幅されたアンプリコンを用いることで 1 分以内に検出できた。陰性コントロールでは検出されなかった。

【考察】PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出には電気泳動やリアルタイム PCR 装置を要するが、DETECTR 法を用いることで、より簡便な蛍光検出による測定系を確立することができた。また、蛍光の検出にかかる時間が 1 分以内と短いため、検査効率をあげることができる有用な検査法であると考えられる。今後、本法に従ってガイド RNA をオーダーメイドすることにより多様な耐性遺伝子を検出できることが期待される。

### W3-8/P1-003

#### 完全長配列を用いた Enterotoxigenic *Escherichia coli* の比較ゲノム解析と新規病原プラスミドの発見

○森田 大地<sup>1</sup>, 武田 明佳<sup>1</sup>, 山本 美和子<sup>2</sup>, 神田 美幸<sup>1</sup>, 山本 佑樹<sup>1</sup>, 熊谷 孝則<sup>1</sup>, 田原 栄俊<sup>1</sup>, 丸山 史人<sup>3</sup>, 黒田 照夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>広島大・院・医系科学, <sup>2</sup>広島市衛生研究所, <sup>3</sup>広島大・IDEC国際連携機構)

#### Genomic comparison of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and discovery of novel pathogenic plasmids

○Daichi Morita<sup>1</sup>, Asuka Takeda<sup>1</sup>, Miwako Yamamoto<sup>2</sup>, Miyuki Kanda<sup>1</sup>, Yuki Yamamoto<sup>1</sup>, Takahiro Kumagai<sup>1</sup>, Hidetoshi Tahara<sup>1</sup>, Fumito Maruyama<sup>3</sup>, Teruo Kuroda<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Bio. Heal. Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Hiroshima City Inst. of Public Heal., <sup>3</sup>The IDEC Institute, Hiroshima Univ.)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) は世界の小児下痢症の主要な原因菌で、先進国では旅行者下痢症の原因菌でもある。ETECは耐熱性 (ST) または易熱性 (LT) エンテロトキシンと腸管粘膜上皮細胞に付着するための因子 (CS) に特徴づけられる大腸菌の一群であり、これらをプラスミドによって獲得している。ETECは大規模な比較ゲノム解析によって 21 の流行系統の存在が報告されているが、その病原プラスミドの配列は一部の系統でしか決定されていない。本研究では、illumina NextSeq および ONT MinION によって広島市衛生研究所が 2001~2016 年に分離した 17 事例 38 株の ETEC についてプラスミドを含む完全長配列を決定し、比較ゲノム解析を実施した。

ETEC での薬剤耐性は稀であったが、*tet (B)* や *GyrA S83L* 変異が確認された。また、1 株で複数の耐性因子 (*tet (B)*, *blaTEM-1B*, *aph (3')-Ia*, *aph (3')-Ib*, *aph (6)-Id*) を含む巨大なプラスミドが確認された。

一部の ETEC では毒素や CS が配列中に含まれておらず、不安定な病原プラスミドを保有していた可能性がある。毒素や CS が配列中に含まれた株の大部分は世界的な流行株である L2 や L7 系統に属しており、その病原プラスミドは過去に報告された配列とほぼ一致していた。また一部の系統 (L4, L11, L18) の間では共通する病原プラスミドが確認され、病原プラスミドの水平伝播が示唆された。一方で、主要な流行系統から外れた一部の株 (L19 および非典型) では新規の病原プラスミドが確認され、その構造は毒素遺伝子 *LT4*, *STb* を含む共通配列と接合伝達因子を含む可変領域を有しており、ETEC の病原プラスミドの一部は可塑性の高い配列を持つことが示唆された。

### W4

#### 選抜ワークショップ 2: 生態/遺伝・ゲノミクス・バイオテクノロジー

コンビーナー: 小椋 義俊 (久留米大学)  
高井 伸二 (北里大学)

#### Selected from general presentations 2: Ecology / Genetics / Genomics / Biotechnology

Conveners: Yoshitoshi Ogura (Kurume University)  
Shinji Takai (Kitasato University)

### W4-1/P1-088

#### ウェルシュ菌の温度依存的な遺伝子発現制御による環境適応機構の解析

○福田 良亮<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>2,3</sup>, 野村 暢彦<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>筑波大院・生物資源, <sup>2</sup>筑波大・医・TMRC, <sup>3</sup>筑波大・MiCS, <sup>4</sup>筑波大・生命環境系)

#### Environmental adaptation through temperature-responsive gene regulation in Clostridium perfringens

○Ryosuke Fukuda<sup>1</sup>, Nozomu Obana<sup>2,3</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>Grad. Agro Bio. Sci. Tech., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>MiCS, Univ. Tsukuba, <sup>4</sup>Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

病原性腸内細菌であるウェルシュ菌は宿主腸管や自然環境中に広く分布している。温度は宿主内外を認識する環境シグナルの一つであり、本菌のバイオフィーム形成や毒素産生を制御することから、温度による遺伝子発現調節は本菌の宿主内外環境への適応を可能にすると考えられる。本研究では、ウェルシュ菌の温度依存的な発現変動を示す遺伝子の探索とその発現制御機構を解明することを目的とした。RNA-seq の結果、宿主外温度 (37 度) に比べ宿主内温度 (25 度) においてミオイノシトール (MI) 代謝、クエン酸代謝、シアル酸代謝、バイオフィーム形成などに関与する合計 38 遺伝子の発現が上昇していた。中でも、宿主細胞膜に含まれる糖である MI の代謝に必須である *iol* オペロンでは、オペロンを構成する全 13 遺伝子が 10 倍程度の顕著な発現上昇を示した。*iol* オペロンの温度応答機構を解明するため、レポーター株を構築し *iol* プロモーター活性を測定したところ、37 度と 25 度で顕著な違いは見られなかった。一方で、RT-qPCR によって *iol* mRNA の半減期を解析した結果、25 度では 37 度と比べ半減期が 3 倍以上長いことが明らかとなった。以上より、25 度では *iol* mRNA が安定化することで発現量が上昇することが示唆された。*iol* オペロンの転写後レベルにおける制御は、温度変化にตอบสนองした迅速な発現量の調節を可能にすると考えられる。また、25 度で発現上昇した遺伝子群は、*iol* オペロンのみならず宿主成分利用への関与が予想される遺伝子を多く含んでいた。以上より、ウェルシュ菌は宿主の死亡時や排出時などの温度の低下を伴う急激な環境変化に対して、宿主成分を利用する代謝に切り替えることで適応していると考えられる。

**W4-2/P1-095****発現誘導や分解タグが遺伝子発現揺らぎに与える影響**

○北井 朝子<sup>1</sup>, 若本 祐<sup>1,2,3,4</sup>, 梅谷 実樹<sup>2,3,4</sup> (1東大・教養, 2東大・院総合文化研究・相関基礎, 3東大・複雑系センター, 4東京大・生物普遍性)

**Effect of expression induction and protein degradation tags on gene expression noise**

○Asako Kitai<sup>1</sup>, Yuichi Wakamoto<sup>2,3,4</sup>, Miki Umetani<sup>2,3,4</sup> (1Col. Arts and Sci., Univ. Tokyo, 2Dept. Basic Sci., Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. Tokyo, 3Res. Ctr. Complex Syst. Biol., Univ. Tokyo, 4UBI., Univ. Tokyo)

細胞内タンパク質の発現量の揺らぎは環境応答に影響すると考えられている。発現量の揺らぎはその揺らぎ幅（分散）だけでなく、時間方向への相関の強さ（自己相関）によっても特徴付けられる。例えば薬剤耐性タンパク質を恒常発現させた際、発現量の平均と分散が同じでも、自己相関の減衰が遅いほど、集団全体としては薬剤耐性度が高くなることを示唆されている。今回の研究では、薬剤耐性タンパク質の自己相関の減衰速度と薬剤耐性の関係を大腸菌をモデルとして明らかにすることを目的とした。またその過程で、発現量の集団平均、分散、自己相関の減衰速度が発現誘導の強さや分解タグの種類でどのように変化するか検討した。今回使用した大腸菌株は、染色体の2つの遺伝子座にそれぞれ異なる遺伝子発現モジュールを組み込んでいる。1つは恒常発現プロモーターの下流から蛍光タンパク質 mCherry を発現するモジュール、もう1つは、IPTG 誘導性プロモーターの下流からスプレプトマイシン耐性タンパク質と蛍光タンパク質 Venus の融合タンパク質を発現するモジュールである。また、この融合タンパク質のC末端には、分解タグを付加している。培地内での IPTG 濃度と分解タグの種類を変化させ、マイクロ流体デバイスで長期一細胞トラッキングを行った。その結果、タンパク質の分解率が高いほど自己相関の半減速度は早くなることがわかった。またプロモーターに関わらず、発現量の変動係数が大きい系列の自己相関の減衰速度は遅くなることがわかった。この結果は発現量の揺らぎ幅と自己相関が独立ではないことを示唆する。この揺らぎの性質と薬剤耐性の関係について今後検討を進める。

**W4-3/P1-078****抗生物質に曝された大腸菌の核様体構造**

○梅谷 実樹<sup>1</sup>, 若本 祐<sup>1,2,3</sup> (1東大・院総合文化・相関基礎, 2東大・複雑系センター, 3東大・生物普遍性)

**Nucleoid structure of antibiotic-stressed *Escherichia coli***

○Miki Umetani<sup>1</sup>, Yuichi Wakamoto<sup>1,2,3</sup> (1Dept. Basic Sci., Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. Tokyo, 2Res. Ctr. Complex Syst. Biol., Univ. Tokyo, 3UBI, Univ. Tokyo)

Bacterial cells can adapt to stress without genetic changes. Nucleoid structure is a strong candidate to link genome-wide gene expression and stress conditions, which can change depending on the physiology and regulate gene expression globally. Here we aim to describe nucleoid changes behind the phenotypic adaptation of *Escherichia coli*. We exposed isogenic *E. coli* cells expressing fluorescently tagged nucleoid-associated protein (NAP) HupA to sub-lethal Cm stress in our custom microfluidic device. Although most cells stopped dividing, a small fraction of cells continued dividing with decreased division rates. Spatial distributions of HupA-mCherry were compacted in growth-arrested cells, whereas those were uniform in growth-recovered cells. We also performed microarray analysis on 3 adaptive resistant populations derived from different single cells exposed to the same Cm environment. They showed distinct transcriptomic states without genetic changes. One of them altered RcsA-RcsB regulated genes dramatically. Although RcsB has other partners under the regulation of NAP H-NS like RcsA, their downstream genes did not show remarkable expression changes. These results evoked interest in the complex involvement of nucleoid structure in adaptive resistance. In this presentation, we will introduce the NAP profiles and discuss how nucleoid structure involves in phenotypic adaptation.

**W4-4/P1-084****Natural transformation mediates transfer of SCCmec in *Staphylococcus aureus* biofilms**

○マリー マイス<sup>1</sup>, Thuy Le Thi Nguyen<sup>2</sup>, 大庭 良介<sup>1</sup>, 東出 正人<sup>3</sup>, Tarek Msadek<sup>4</sup>, 森川 一也<sup>1</sup> (1筑波大・医, 2Biotechnology Centre of Ho Chi Minh City, 3Kotobiken Medical Laboratories, Inc., 4Institut Pasteur, Universite Paris Cite, CNRS UMR6047, Biology of Gram-Positive Pathogens, Dept. Microbiology)

○Mais Maree<sup>1</sup>, Thuy Le Thi Nguyen<sup>2</sup>, Ryosuke L. Ohniwa<sup>1</sup>, Masato Higashide<sup>3</sup>, Tarek Msadek<sup>4</sup>, Kazuya Morikawa<sup>1</sup> (1Fac. Med., Univ Tsukuba., 2Biotechnology Centre of Ho Chi Minh City, 3Kotobiken Medical Laboratories, Inc., 4Institut Pasteur, Universite Paris Cite, CNRS UMR6047, Biology of Gram-Positive Pathogens, Dept. Microbiology)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major human pathogen that has evolved through the horizontal acquisition of multiple antibiotic resistant traits. Methicillin resistance is conferred by the *mecA* gene, carried by the mobile staphylococcal cassette chromosome (SCC) element, that disseminates horizontally among staphylococci by an unknown mechanism. Here, we present evidence for natural transformation in *Staphylococcus aureus* and demonstrate its relevance in SCCmec transmission. Through analysis of two-component systems, we found that growth in biofilm conditions increased the transformation efficiency. Using these growth conditions, we have shown that natural transformation mediates the transfer of various SCCmec elements (types I to IV) from MRSA or methicillin-resistant coagulase negative staphylococci to methicillin-sensitive *S. aureus*. The transfer of SCCmec was dependent upon the site-specific insertion/excision system mediated by the cassette chromosome recombinases, and the stability of SCCmec varied depending on the SCC types and recipients. Our results suggest that natural transformation may be a key process in the emergence of MRSA.

**Reference:** Maree, M. et al. Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Nat Commun* 13, 2477 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29877-2>

**W4-5/P1-097****バクテリア染色体の試験管内操作法**

○藤田 裕寛, 尾作 采音, 向井 崇人, 末次 正幸 (立教大・理・生命理学)

**Manipulation of mega-sized bacterial chromosomes in vitro**

○Hironobu Fujita, Ayane Osaku, Takahito Mukai, Masayuki Su'etsugu (Dept. Life Science, Coll. of Sci., Rikkyo Univ.)

There is a need for a cell-free platform of genome synthetic biology to design and assemble artificial bacterial genomes. However, chromosomal DNA is fragile when extracted from cells. To convert extracted chromosomes into a compacted and easy-to-handle form in vitro, we established an enzymatic supercoiling and repair reaction, named SCR. In SCR, circular DNA molecules with nicks and gaps are repaired by DNA polymerase and ligase, and then negatively supercoiled by DNA gyrase. Up to 4.6 megabase (Mb) chromosomes extracted from cells were supercoiled by SCR and detected as a band using agarose gel electrophoresis. Furthermore, up to 1 Mb chromosomes were implanted into *E. coli* cells via electroporation. We also succeeded in vitro replication of bacterial chromosomes. Previously, we established the replication-cycle reaction (RCR) method using a reconstituted *E. coli* chromosome replication system. We optimized the enzyme concentrations and buffer composition, as well as the incubation conditions, and achieved the replication of a whole 2 Mb chromosome. Thus, we are trying to replicate the whole chromosome of a genome-reduced *E. coli* strain. In future, we desire that these methods would be a significant basis for the in vitro assembly of artificial genome. Reference Fujita and Osaku *et al. ACS Synth. Biol.* 2022, 11, 9, 30883099

## W4-6/P1-096

### Engineered Phage Capsids for Cancer Cell Targeted Drug Delivery Application

○ヴィーラナラヤナン スリワニ<sup>1</sup>, Kanate Thitianapakorn<sup>1</sup>, 菅野 貴史<sup>1</sup>, 渡邊 真弥<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>2</sup>, 氣 恒太郎<sup>2</sup>, Longzhu Cui<sup>1</sup> (1自治医科大学・医学部・細菌学部門, 2国立感染症研究所創薬 ワクチン開発研究センター)

○Srivani Veeranarayanan<sup>1</sup>, Kanate Thitianapakorn<sup>1</sup>, Takashi Sugano<sup>1</sup>, Shinya Watanabe<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>2</sup>, Kotaro Kiga<sup>2</sup>, Longzhu Cui<sup>1</sup> (1Div. Bacteriology, Dept. Infection & Immunol., Sch. Med., Jichi Med. Univ., 2Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases)

Cancer therapy using chemotherapeutic delivery systems are desired due to their ease of non-invasive use. Yet, most of the drug delivery systems (DDS) that are in use are complex in preparation plus not cost-effective. A cost-effective, and simple DDS are needed, and to this end, we developed cancer cell-targeted bacteriophage (phage) capsid-based DDS by employing genetic, chemical plus physical engineering methods. As the first step towards this goal, we used phage display technique to display certain mammalian cancer cell targeting ligands on the capsid proteins of the phages. These chimeric phages were then tagged with fluorescent moieties and then tested for cancer cell targeting efficacy employing confocal microscopy. The results implied the successful targeted cancer cell tropism of the genetically modified phages. Next, we employed a simple physical method to remove the phage DNA from their capsids. The DNA free capsids were then loaded with anti-cancer drug, Doxorubicin which self-assembles with phage capsids by pi-pi interaction. This self-assembly rendered the drug stability, reduced the drug leakage before reaching the target. The efficacy of the targeted phage-capsids to deliver the drugs and the cancer specific cytotoxic effect thereof were then evaluated successfully *in vitro* indicating the success in developing cost-effective DDS.

## W4-7/P1-079

### 結核クラスターの感染伝播予測に対するゲノムデータベース数理モデルの活用

○谷本 佳彦<sup>1</sup>, 有川 健太郎<sup>1</sup>, 藤山 理世<sup>2</sup>, 小野 綾子<sup>2</sup>, 大西 南<sup>2</sup>, 田丸 亜貴<sup>3</sup>, 山本 香織<sup>3</sup>, 吉田 志緒美<sup>4</sup>, 萩田 堅一<sup>5</sup>, 岩本 朋忠<sup>1</sup> (1神戸市健科研, 2神戸市保健所, 3大安研, 4近畿中央呼吸器センター, 5兵庫県健科研)

### Application of Mathematical Models Based on Genomic Data to Predict Tuberculosis Cluster Infection

○Yoshihiko Tanimoto<sup>1</sup>, Kentaro Arikawa<sup>1</sup>, Riyo Fujiyama<sup>2</sup>, Ayako Ono<sup>2</sup>, Minami Onishi<sup>2</sup>, Aki Tamaru<sup>3</sup>, Kaori Yamamoto<sup>3</sup>, Shiomi Yoshida<sup>4</sup>, Kenichi Ogita<sup>5</sup>, Tomotada Iwamoto<sup>1</sup> (1Kobe Inst. Heal., 2Pub. Heal. Mgmt. Ctr., Kobe City, 3Osaka Inst. Pub. Heal., 4NHO Kinki-chuo Chest Med. Ctr., 5Hyogo Pref. Inst. Pub. Heal. Sci.)

Tuberculosis (TB) infection clusters are difficult to identify due to the long incubation period and the presence of latent TB infection (LTBI). In this study, we evaluated the usefulness of the mathematical model using a large cluster KCT164 with matched VNTR types in Osaka Pref., Osaka City, Hyogo Pref., and Kobe City, and the KCT327 cluster in Kobe City, where epidemiological information is abundant, as model cases.

Timed phylogeny of 46 strains in the KCT164 clusters was generated by BEAST2 using whole genome sequencing and strain isolation date data. The predicted diagram diverged in the late 1970s according to the presence or absence of rifampicin resistance, providing an estimate the timing of resistance acquisition.

The KCT327 cluster, consisting of 7 strain-positive cases, 4 cases that developed the disease but no strain was obtained, and 6 cases with LTBI, was analyzed using Logically Inferred Tuberculosis Transmission (LITT), an algorithm that combines clinical and epidemiological data with genomic data to rank transmission. The analysis predicted one patient to be the hub of the spread of the infection, consistent with epidemiological information.

In summary, BEAST2 is suitable for the analysis of large clusters and is useful for estimating the timing of mutations; LITT is suitable for relatively small clusters for which epidemiological information is available.

## W4-8/P1-046

### 腸管粘液層模倣系における腸内細菌の定着とバイオフィーム形成の解析

○野村 佳祐<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>2,3</sup>, 尾花 望<sup>4,5</sup>, Andrew Utada<sup>2,3</sup> (1筑波大院・生物資源, 2筑波大・生命環境, 3微生物サステナビリティ研究センター, 4筑波大・医学医療系, 5トランスボーダー医学研究センター)

### Analysis of gut bacterial colonization and biofilm formation in an gut mucus layer mimetic system

○Keisuke Nomura<sup>1</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>2,3</sup>, Nozomu Obana<sup>4,5</sup>, Andrew Utada<sup>2,3</sup> (1Dept. Agro-biol. Resour. Sci., Tsukuba Univ. Grad. Sch., 2Dept. Life Environ., Tsukuba Univ., 3Microbiol. Res. Ctr. Sustainability, 4Dept. Med., Tsukuba Univ., 5Transborder. Med. Res. Ctr.)

ヒトの腸管では、腸管上皮の細胞を覆うように粘液層が形成され、腸内細菌は粘液層で細菌集団「バイオフィーム」を形成する事で腸管への定着を促進させる。近年、腸内細菌による宿主代謝プロセスや免疫応答への影響等が明らかとなり、ヒトの健康維持の観点から腸内細菌バイオフィームの理解と制御が重要である。これまでに、プラスチック上で静置培養したバイオフィームの研究が行われているが、実環境での細菌の挙動を推察する上では課題が残る。実際の腸内細菌バイオフィームは流動的な粘液層に形成され、かつ継続的な栄養供給や、液体の摩擦ストレスが存在する環境で形成される。よって粘液層を模倣した環境で液体培地を灌流しながら細菌を培養・解析可能な実験系が必要だが、ほとんど研究例が無い。そこで本研究では  $\mu\text{m}$  単位で構造をデザイン可能な流路「マイクロ流体デバイス」を応用した。まず腸管と同様に嫌気環境で細菌を培養・観察するために、培地中の酸素をアルゴンに置換しながら培地灌流が可能なデバイスを開発した。内部の嫌気環境を確認するために、嫌気呼吸として脱窒を行う *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 野生株と、脱窒を欠損し嫌気環境でほとんど増殖しない PAO1 $\Delta\text{narG}$  株をそれぞれ灌流培養して顕微鏡観察したところ、 $\Delta\text{narG}$  は野生株と比較して著しく増殖能が低下し、流路内部が嫌気的である事が示唆された。また、微小な窪みを持った流路中に人工粘液を貯留させ粘液層を形成させるデバイスを開発し、腸内細菌バイオフィームの観察を行った。本研究は、様々な腸内細菌の粘液層定着を定量的に解析する事を可能にし、実環境での腸内細菌の挙動を理解するための基盤技術として期待される。

## W5

## 家畜・家畜におけるサルモネラ研究

コンピーナー：楠本 正博（農業・食品産業技術総合研究機構）  
江口 正浩（農業・食品産業技術総合研究機構）

The recent research of *Salmonella* in farm animals

Conveners: Masahiro Kusumoto (National Agriculture and Food Research Organization)  
Masahiro Eguchi (National Agriculture and Food Research Organization)

サルモネラは、菌体表面（O抗原）と1種類または2種類のべん毛タンパク質（H抗原）の組み合わせにより2,600超の血清型に分類される。一部の血清型はヒトにおける食中毒の原因となるほか、家畜や家畜に消化器症状や敗血症などを引き起こし畜産農家に大きな被害をもたらす。本ワークショップでは、主に獣医領域でサルモネラの研究を推進されている先生方に、家畜や家畜におけるサルモネラ感染症についてゲノム、病原性、生体防御など様々な観点から講演していただく。

## W5-1

我が国の家畜に分布する *Salmonella* Typhimurium 及びその非定型株の遺伝学的背景の解明と流行系統の特徴

○新井 暢夫（農研機構・動衛研）

Genomic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolated from farm animals in Japan

○Nobuo Arai (Natl. Inst. Anim. Health, NARO)

家畜のサルモネラ症は酪農や肉牛生産、養豚における最も被害の大きい損耗要因の一つである。このうち、牛や豚からは4,[5],12:i:1,2という抗原構造を有する *Salmonella* Typhimurium (ST) が高頻度に分離される。1980年代まではSTによる牛のサルモネラ症の多くが子牛の下痢症であったが、1990年代には成牛のサルモネラ症が全国的に多発した。これまでに本研究グループでは、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 等による解析から、1990年代に流行した成牛のサルモネラ症に関与したPFGE型 (PFGE I型) を特定し、さらに2000年代には最優勢PFGE型が多剤耐性化の進行したPFGE VII型に置き換わったことを明らかにした。一方で、これらPFGE型の系統関係は不明であった。すなわち、これまでに観察されたPFGE型の変遷が小進化に基づくのか、播種に基づくのか明らかにされていない。また、農林水産省の統計によれば、近年、家畜サルモネラ症の届出数は減少傾向にある一方で、2相H抗原を発現しない4,[5],12:i:-という抗原構造の単相変異型 (非定型) ST の分離頻度が上昇している。世界的には特に欧州諸国で、非定型STの特定の系統による豚のサルモネラ症、当該系統に汚染された豚肉や加工品を介したヒトの集団食中毒事例が増加している。しかし、我が国の家畜から分離される非定型STについて、過去に国内で分離されたSTや欧州で流行中の非定型STとの遺伝学的関連は明らかにされていない。本ワークショップでは、これまでに我々が取り組んだ、全ゲノム系統解析による家畜由来STと非定型STの遺伝学的背景の解明、各年代における流行系統の特定、近年の流行系統内の遺伝的多様性と特異因子の機能について発表する。

## W5-2

## 家禽サルモネラ症：その発症機序の解明に向けて

○岡村 雅史（帯広畜産大・獣医学研究部門・獣医微生物）

## Avian salmonellosis: elucidation of a new aspect of the pathogenesis

○Masashi Okamura (Lab. Vet. Microbiol., Div. Vet. Sci., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.)

Fowl typhoid is a fatal acute septicemic disease specific to avian species caused by *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (SG) and causes significant economic loss worldwide. Currently, attenuated strains of SG are used as vaccines in endemic countries, but their efficacy is unstable, so the development of effective new vaccines and alternative preventive measures is desired. However, the virulence factors of SG as potential targets and their role in the pathogenesis of fowl typhoid are still poorly understood. Studies on the pathogenesis of salmonellosis have been conducted using serovar Typhimurium, which causes typhoidal disease in mice, as a model. The pathogenesis consists of two major steps: adhesion and invasion into the intestinal epithelium and hematogenous systemic spread, which are mediated by the type III secretion systems encoded by SPI-1 and SPI-2, respectively. However, SG does not show reduced virulence in SPI-1-deficient strains, suggesting that other virulence factors independent of SPI-1 contribute to the pathogenesis of fowl typhoid. Therefore, we performed an in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to explore the new virulence factors of SG. Some results of the analysis of 50 genes obtained by this method will be presented in this workshop.

## W5-3

## サルモネラ T3SS-2 によるマクロファージ細胞死誘導機構

○羽田 健（北里大・薬・微生物）

The mechanism of macrophage cell death-inducing by TS33-2 of *Salmonella* Typhimurium

○Takeshi Haneda (Lab. Microbiol, Sch. Pharm. Kitasato Univ.)

Type III secretion system (T3SS)-2 is an important virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium). T3SS-2 functions in promoting intracellular bacterial proliferation and inducing cell death. Cell death in mouse macrophage-like RAW264.7 (RAW) cells is triggered by five T3SS-2 effector proteins, including SifA, SpvB, SseF, SseJ, and SteA. A *S.* Typhimurium mutant lacking these effectors does not induce cell death and cecal inflammation in a mouse model. However, the mechanism through which T3SS-2 effectors induce macrophage cell death and intestinal inflammation in mice remain unclear. In this presentation, I would like to talk about the latest findings on the mechanism of macrophage cell death-inducing by TS33-2 of *S.* Typhimurium.

## W5-4

### サルモネラ属菌の経口感染に対する防御抗原の同定とその感染防御機構の解明

○中山 ももこ (農研機構・動衛研・動物感染症研究領域)

#### Identification of an antigen against *Salmonella* inducing CD8(+) T cell antigen-specific response

○Momoko Nakayama (National Institute of Animal Health, NARO)

*Salmonella* 属菌による家畜および家きんの疾病やヒトの食中毒は先進国・発展途上国を問わず発生しており、その被害の大きさから、感染防御に向けた研究のさらなる発展が求められている。現在、*Salmonella* 属菌に対するワクチン開発としては、大きく分けて生ワクチンと不活化ワクチンの2つのアプローチが進められている。当研究室では、高い安全性と優れた感染防御効果を併せ持つ *Salmonella* 新規不活化ワクチンの開発を目標に掲げ研究を進めてきた。免疫抗原として弱毒株などの生菌を利用すると、死菌を利用した場合に比べ、*Salmonella* 属菌の経口感染に対してより優れた防御効果を得られることが過去に報告されている。また、細胞内寄生菌である *Salmonella* 属菌は宿主細胞への侵入時や宿主細胞内で菌体成分を分泌することが知られている。これらのことから、生菌と死菌の菌体成分における違い、特に3型分泌装置を介して分泌される菌体成分に着目し、経口感染に対して優れた感染防御効果を持った不活化ワクチンの開発に取り組んだ。タンパク質解析とマウスを用いた感染防御試験の結果、生菌が宿主細胞に侵入する際に分泌する菌体成分である SseJ を防御抗原として同定した。次に、SseJ を免疫したマウスから精製された、抗体、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を非免疫マウスに移植し感染実験を行い、SseJ の感染防御機構について解析した。その結果、SseJ による感染防御に CD8 陽性 T 細胞が関与することを明らかにした。さらに、対象動物をマウスからニワトリ、ブタに拡大し感染防御試験を行ったところ、SseJ が家畜・家きんにも応用できることが示唆された。

## W6

### 私たちが活用し、私たちが守る、未来に繋げる研究・開発資源としての微生物

コンピーナー：田中 香お里 (岐阜大学)

川本 祥子 (国立遺伝学研究所)

#### Microorganisms; are our research and development resources that we use and protect for the future

Conveners: Kaori Tanaka (Gifu University)

Shoko Kawamoto (National Institute of Genetics)

微生物は、病原性・非病原性を問わず研究・開発の資源として大きな可能性を秘めており、新たな研究成果・イノベーションに繋がる資源となるが、必要な微生物株を自ら分離し利用する事は容易ではなく、研究・開発を進める上での大きなハードルとなる。必要な微生物株がカタログを見て選べ、いつでも入手できる、こういったリソースの整備は研究・開発のインフラとして重要である。また、長年の研究成果として論文等に発表されている微生物株を退職研究者から引き継ぎ利用可能な資源として整備する事も大切である。

本WSでは、一般には収集・整備が難しい病原細菌・病原真核微生物、非病原性の幅広いコレクションの一般微生物、研究や産業を支えるツールとして様々利用されている原核生物リソースに加え、利用者がより効率よく欲しいリソースにアクセスするための情報整備について紹介し、有効活用とこれまでの研究成果を未来に繋げるための資源の保全について考える。

## W6-1

### NBRP 病原細菌の役割

○田中 香お里<sup>1</sup>、飯田 哲也<sup>2</sup>、富田 治芳<sup>3,4</sup>、谷本 弘一<sup>3,4</sup>、林 将大<sup>1</sup> (1岐阜大・微生物遺伝資源、2阪大・微研・病原微生物資源室、3群馬大・院医・細菌、4群馬大・院医・薬剤耐性菌実験施設)

### NBRP Pathogenic Bacteria

○Kaori Tanaka<sup>1</sup>、Tetsuya Iida<sup>2</sup>、Haruyoshi Tomita<sup>3,4</sup>、Koichi Tanimoto<sup>3,4</sup>、Masahiro Hayashi<sup>1</sup> (1Ctr. Conserv. Microb. Genetic Resource, Gifu Univ., 2Pathogenic Microbes Repository Unit, Res. Inst. Microbial Dis., Osaka Univ., 3Bacteriology, Gunma Univ., 4Laboratory of Bacterial Drug Resistance, Gunma Univ.)

微生物は人類より早くから地球上に存在しており、ヒトの疾病・健康と深く関わっている。パストール、コッホ以来、感染症の病原体としての病原細菌を対象とした膨大な研究が為され、細菌の生態、病原因子やそれらに関する機構などが明らかにされ、医療の進歩に繋がっている。抗菌薬の登場によって一時は克服できるかに見えた細菌感染症も多剤耐性菌の蔓延が脅威になっている。細菌はヒトより変わり身の早い生き物であり、細菌感染症の闘いには終わりはない。また、科学技術の進歩によって病原細菌の生態や病原機構についてのより深い研究が進められるようになってきている。また、日和見病原体となる常在細菌のヒトの健康との関わりはより複雑であり、研究対象としての病原細菌の可能性は未だ大きいと考えられる。

医療機関では日々、患者の検体から多数の病原細菌が分離されているが、大多数は診断・治療後には廃棄されている一方、研究者や企業が医療や生命科学に関わる研究・開発、或いは教育に病原細菌を必要とする時、自ら必要な病原細菌を収集するのは容易ではない。NBRP 病原細菌では、これらを収集・整備し利用者が必要とするときに必要な菌株を提供することを目的としている。また、環境によって変異しうる多様性のある生物であるため、同じクローンを再び分離することは困難であり、重要な株については研究・開発資源として広く有効活用していくために系統を維持していくことも重要な業務である。特に、長年研究され、多くの情報が公開されている菌株が、研究者の引退等により途絶えることは、大きな損失であり、これらの菌株を引き継ぎ将来に伝えていくことは重要な責務と考えている。

**W6-2****病原真核微生物の収集、保存、提供**

○矢口 貴志, 伴 さやか (千葉大・真菌センター)

**Collection, preservation and distribution of pathogenic eukaryotic microorganisms**

○Takashi Yaguchi, Sayaka Ban (Med. Mycol. Res. Ctr., Chiba Univ.)

新型コロナウイルスの流行、高齢化、ならびに医療の高度化に伴う免疫不全患者の増加等により、感染症の重要性は高まっている。感染症教育や基礎研究の他、新しい診断薬や薬剤、ワクチンの開発研究にも、質の高い病原微生物株が必須である。代表機関として千葉大学真菌医学研究センターが病原真菌株を、分担機関として長崎大学熱帯医学研究所が病原原虫株を、それぞれ収集、保存、提供している。本事業では、今後起こり得るいかなる感染症にも対応可能なリファレンスとしての病原真核微生物株のコレクションを目的とし、以下の項目を実施する。真菌(含む放線菌)・原虫のいずれにおいても、(1) 基準株(あるいは標準株)、(2) クラス2, 3の高度病原菌、(3) これまで感染例の報告のある全ての真菌・原虫種、さらには、(4) 感染症の動向調査や薬剤開発のために必要となる新鮮な臨床分離株等を収集、保存、提供することを主たる目的としている。また、個々の株において、質的向上を図るために、(5) 重要な株の遺伝子配列を決定、さらに、(6) 最新の菌学的性状、臨床情報等をデータベースとして整備し、研究等に使用する病原体株の選択に役立つ情報として公開している。病原真菌・原虫リソースは、感染症研究には必要不可欠であり、国内医療機関から分離された臨床株は我が国独自のリソースであり、感染症の動向調査、新規薬剤の研究開発などには必須である。医真菌分野で重要な薬剤耐性真菌、欧米株とは異なる遺伝型・表現型を示す我が国で流行している病原原虫、我が国の研究者が作製した組換え病原原虫など取り揃えている。

**W6-3****JCMにおける一般微生物のリソース整備**

○大熊 盛也 (理研BRC・JCM)

**General Microbial Resources Served from JCM**

○Moriya Ohkuma (JCM, RIKEN BioResource Research Center)

Japan Collection of Microorganisms (JCM) has been collecting, preserving, and distributing microbial strains representing diverse species of aerobic and anaerobic bacteria including animal commensals, extremophiles, archaea, and fungi. Our mission is the contribution to scientific communities in a variety of fields with serving high-quality microbial resources useful for general microbial studies and others such as those related to environmental and health sciences. A typical feature of the JCM collection is abundance of prokaryotic type strains, which are very important for research in general because they are well characterized, valuable resources. JCM has annually accessioned depositions and distributed stains in large numbers, respectively. More than 70% of them came from and 30% went to abroad, respectively. On receiving a deposited strain, JCM extensively checks its viability, purity, and authenticity, to pursue quality standards of the JCM collections and to ensure the accuracy and reproducibility of research using them. Unfortunately, over 10% of the depositions found to be unacceptable and JCM is trying to correct as much as of them. JCM users annually published several hundreds of original scientific papers, which clearly indicates the significant contributions of JCM to scientific advances.

**W6-4****細菌研究のバイオリソースとしての大腸菌と枯草菌**

○仁木 宏典, 秋山 光市郎 (遺伝研・微生物機能)

**Bioresources for basic and applied science of Escherichia coli and Bacillus subtilis**

○Hironori Niki, Koichiro Akiyama (Microb. Physiol. Lab., Natl. Inst. Genet.)

大腸菌、枯草菌はこれまで幅広い分野において細菌のモデル生物として研究されてきた。分子遺伝学の黎明期から研究されてきたという歴史的なこともあり、膨大な研究成果と共に数多くの変異株がこれまでに創出されている。さらにゲノム時代を迎えてゲノム情報に基づいた網羅的な変異株のリソースが新たに開発された。大腸菌の遺伝子破壊ライブラリーである KEIO コレクションは、今では国際標準のリソースとして基礎研究から応用分野まで広く利用されている。他方、枯草菌でも遺伝子破壊ライブラリーが米国で開発され、その利用が普及し始めている。これらに加えて、染色体広域欠失株コレクションや、クロン化遺伝子のライブラリーなど多様なリソースが国内外の研究者により開発されてきた。大腸菌のベクタープラスミドのリソースも多種多様なものが存在する。これらのリソースをまとめて保存し、国内外を問わず提供しようというのが文部科学省で進めているナショナルバイオリソース事業 (NBRP) である。この事業では、両菌株のリソースを収集保存し、原則として基礎研究者へ実費程度の負担で分譲を行う。細菌遺伝学では個々の細菌種のゲノム情報が充実し、多様な細菌種での研究が可能になった。しかし、大腸菌、枯草菌はこれに対して遺伝子のリファレンス的な役割を新たに持ち、その結果大腸菌、枯草菌リソースへの需要はまだ多い。さらに、これらリソースを利用した応用的な研究も盛んである。NBRP 原核生物では、これまでの収集してきたリソースのゲノム配列を決め、その品質の向上に取り組み、さらにより多くの研究者に利用されるよう新たな展開を始めている。

**W6-5****NBRP ナショナルバイオリソースプロジェクト「情報センター」リソース情報の利活用を目指して**

○川本 祥子 (遺伝研・情報・系統情報)

**The National BioResource Project "Information Center" for the effective resource utilization**

○Shoko Kawamoto (Dept. Informatics, Natl. Inst. Genet.)

NBRP ナショナルバイオリソースプロジェクトは2002年にスタートした文部科学省のプロジェクトで、動物、植物、微生物、細胞および遺伝子など、研究に必要な実験材料を収集保全し、研究者のリクエストに応じて国内外に提供するプロジェクトである。微生物関連では、藻類、ゾウリムシ、細胞性粘菌、きのこ、酵母、一般微生物、大腸菌、枯草菌、病原真核微生物、病原細菌の10プロジェクトが運営されている。研究収集された貴重な種や菌株の他、モデル生物では網羅的遺伝子変異体コレクション、実験用のベクターやプラスミド、培地など研究全般に渡って豊富な材料が提供されている。このような専門機関で体系的に管理保管されている品質の保証された材料を研究に使用することは、実験の再現性の担保のためにも非常に重要な要素となっている。リソースの活用には遺伝子型、表現型などの情報が必須であるが、近年ゲノム解読されたリソースも増加しており、その他のオミックス情報と合わせさらなる充実が予定されている。NBRP 情報センターは、各生物のデータベースの構築公開を支援する他、プロジェクト全体の成果をとりまとめる論文データベースやリソース検索などのサービスを提供し、NBRP 全体の情報基盤の整備を担当している。現在、ライフサイエンス統合データベースセンター、理研バイオリソースセンター、製品評価技術基盤機構、農研機構らと連携し、データの共通利用に必要なオントロジーとデータスキーマを策定し、セマンティック・ウェブ技術を用いた横断的なリソース情報検索の開発を行っている。本発表では、NBRP 微生物情報の概要と、横断的リソース情報の利活用に向けた取り組みについて報告する。

### 選抜ワークショップ3：抗菌性物質・薬剤耐性／生体防衛

コンピーナー：横田 伸一（札幌医科大学）  
大原 直也（岡山大学）

### Selected from general presentations 3: Antimicrobial agents and resistance / Host defense

Conveners: Shinichi Yokota (Sapporo Medical University)  
Naoya Ohara (Okayama University)

### W7-1/P2-153

#### 緑膿菌感染を伴うイヌ慢性外耳炎に対するファージ療法の実施

○中村 暢宏<sup>1,2,3</sup>, 藤木 純平<sup>1</sup>, 中村 圭佑<sup>1</sup>, 酒井 俊和<sup>4</sup>, 岩崎 智仁<sup>5</sup>, 岩野 英知<sup>1</sup> (1)酪農大・獣医・獣医生化学, (2)国立感染症・治療薬ワクチン開発研究センター, (3)早大・ファージセラピー研, (4)酪農大・獣医・伴侶動物外科, (5)酪農大・食と健康・応用生化学)

#### Bacteriophage Therapy against Canine Clonic External Otitis with *Pseudomonas aeruginosa* Infection

○Tomohiro Nakamura<sup>1,2,3</sup>, Jumpei Fujiki<sup>1</sup>, Keisuke Nakamura<sup>1</sup>, Toshikazu Sakai<sup>4</sup>, Tomohito Iwasaki<sup>5</sup>, Hidetomo Iwano<sup>1</sup> (1)Lab. Vet. Biochem., Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., (2)Ctr. Drug and Vaccine Dev., NIID, (3)Phage Therapy Inst., Waseda Univ., (4)Lab. Vet. Surgery, Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., (5)Lab. Appl. Biochem., Col. Food and Health, Rakuno Gakuen Univ.)

【背景】イヌの外耳炎は最も発生が多い疾患の1つであり、特に慢性外耳炎からよく分離される緑膿菌は、多剤耐性化やバイオフィーム形成によって抗菌薬治療を困難にさせている。近年、バクテリオファージを用いたファージ療法が、抗菌薬に代わる治療法として注目を集めている。そこで、従来の抗菌薬治療を行うも再発を繰り返していた緑膿菌感染を伴うイヌ慢性外耳炎に対して、日本初となるファージ療法臨床試験を実施した。【材料・方法】被検動物の外耳道スワブより分離した緑膿菌を宿主菌とし、溶菌活性を示すファージを分離・選抜した。治療として、1日2回計21日間、複数種のファージをカクテル化した液体を耳道内に投与した。また、治療経過ごとの病変部細菌数の推移は細菌叢解析によって評価した。さらに、治療期間中のスワブから分離された緑膿菌のゲノム解析を実施し、変異解析を行った。

【結果】治療による副作用は認められなかった。また治療過程において、ファージの溶菌作用を回避する“ファージ耐性菌”の出現が認められたものの、ファージ耐性菌を溶菌することのできるファージを新たにカクテル化して投与することで顕著に排菌数は減少し、再診時に菌は全く検出されなかった。また、治療過程において分離された緑膿菌は線毛や鞭毛の遺伝子に変異が生じており、これらが関与する緑膿菌の運動性が低下していたことが明らかとなった。

【考察】ファージ療法の実施で慢性外耳炎が完治するに至った。治療途中で検出されたファージ耐性菌は細胞接着、バイオフィーム形成に重要な線毛や鞭毛などの遺伝子に変異が認められたことから、ファージ耐性化が症状改善に寄与した可能性も示唆される。

### W7-2/P2-166

#### 大腸菌 ST131 における *mcr-1* 保有プラスミドの獲得による病原性減弱機構

○佐藤 豊孝<sup>1,2</sup>, 山本 聡<sup>2</sup>, 小笠原 徳子<sup>2</sup>, 臼井 優<sup>3</sup>, 長野 則之<sup>4</sup>, 土井 洋平<sup>5</sup>, 堀内 基広<sup>1</sup>, 高橋 聡<sup>2</sup>, 横田 伸一<sup>2</sup>, 田村 豊<sup>3</sup> (1)北大・獣医・獣医衛生/国際感染症/ワンヘルスリサーチセンター, (2)札幌大・医・微生物/感染制御部, (3)酪農大・獣医・食品衛生, (4)信州大・大学院・総合医理工学, (5)藤田大・微生物学・感染症科)

#### Virulent attenuation mechanism by acquisition of *mcr-1*-harboring plasmid into *Escherichia coli* ST131

○Toyotaka Sato<sup>1,2</sup>, Soh Yamamoto<sup>2</sup>, Noriko Ogasawara<sup>2</sup>, Masaru Usui<sup>3</sup>, Noriyuki Nagano<sup>4</sup>, Yohei Doi<sup>5</sup>, Motohiro Horiuchi<sup>1</sup>, Satoshi Takahashi<sup>2</sup>, Shin-ichi Yokota<sup>2</sup>, Yutaka Tamura<sup>3</sup> (1)Lab. Vet. Hygiene./Infect. Dis./One Health Res. Cent., Hokkaido Univ., (2)Dept. Microb./, Sch. Med., Sapporo Univ., (3)Lab. Food Microb., Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., (4)Dept. Med. Sci., Grad. Sch. Med., Shinshu Univ., (5)Depart. Microb. and Infect. Dis., Sch. Med., Fujita Health Univ.)

Colistin is a last-line drug against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. The spread of plasmid-mediated colistin resistance genes (*mcr*) among Enterobacteriales is a worldwide concern. In this study, the virulent of an international high-risk fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clone, ST131, by acquisition of colistin resistance determinants, chromosomal (*pmrAB*) mutations or *mcr* (*mcr-1*, *mcr-3*, and *mcr-5*)-harboring plasmids, and their therapeutic effects of colistin were evaluated in murine infection model. We found that acquisition of some *mcr*-harboring plasmids (IncI2\_ *mcr-1* and IncP1\_ *mcr-3*) attenuated the virulence (prolonged the survival and reduced the viable bacterial number in abdominal cavity and liver) in mice, whereas *pmrB* mutations exhibited similar virulence with the parent strain, and lower efficacy of the colistin treatment. RNA-Seq analysis revealed that IncI2\_ *mcr-1* plasmid significantly altered the gene expressions of ST131, and this alteration was largely accompanied by the presence of two hypothetical proteins-encoding genes located on the plasmid. Therefore, this study demonstrated that potential risk of the virulence and efficacy of colistin treatment was depend on the resistance determinant but associated with non-*mcr* contributonal factors located on the plasmids.

### W7-3/P2-167

#### 多剤耐性菌による難治性尿路感染症治療に向けた新規アプローチの初期検討

○星子 裕貴<sup>1</sup>, 山本 武司<sup>1</sup>, 奥野 未来<sup>1</sup>, 前田 憲成<sup>2</sup>, 小椋 義俊<sup>1</sup> (1)久留米大・医・感染医学, (2)九工大・院生命体・環境共生工学)

#### A novel approach to the treatment of urinary tract infections caused by multidrug-resistant bacteria

○Yuki Hoshiko<sup>1</sup>, Takeshi Yamamoto<sup>1</sup>, Miki Okuno<sup>1</sup>, Toshinari Maeda<sup>2</sup>, Yoshitoshi Ogura<sup>1</sup> (1)Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med., (2)Dept. Biol. Func. Eng., Grad. Sch. Life Sci. Sys. Eng., Kyutech)

様々な感染症で薬剤耐性菌が深刻な問題となっている。特に尿路感染症 (UTI) においては起因菌の約 8 割が複数の抗菌薬耐性を有するとされている。多剤耐性菌の治療法として、ファージセラピーが検討されているが、狭い宿主域、低拡散性、高率な耐性菌出現などの問題点も多く、適応は限定的である。そこで、我々は薬剤耐性菌による難治性 UTI の新規治療法として、「細菌を食べる細菌」である細菌捕食性細菌に注目した。細菌捕食性細菌の一種である *Bdellovibrio bacteriovorus* は、広範囲種のグラム陰性桿菌を捕食する。また、運動能力が高く拡散性に優れており、物理的に宿主細胞内に侵入することから耐性菌が出現しにくいと予想される。細菌宿主不在では速やかに死滅し、真核生物は宿主としないことから安全性も高い。本研究では、細菌捕食性細菌の臨床応用を目指して、UTI の代表的な起因菌である尿路感染性大腸菌 (UPEC) に対する捕食能の検討と高捕食能を有する新たな細菌捕食性細菌の探索を行った。まず初めに、UPEC 臨床分離株 15 株に対する捕食能の評価を行った。その結果、標準株 *B. bacteriovorus* 109J 株は UPEC 臨床分離株の系統を問わず、捕食可能であることがわかった。次に、高捕食能を有する細菌捕食性細菌の探索を行うために、河川などの水環境中より単離を試みた。その結果、109J 株とは明らかに異なるブランクを形成する細菌捕食性細菌を分離することができた。一部の分離株を 16S rRNA 遺伝子配列を決定して菌種同定を行ったところ、*B. bacteriovorus* であることがわかった。今後は、UPEC 臨床分離株に対する分離株の捕食能を比較することで、難治性 UTI に対する有用株を選定する予定である。



## W7-4/P2-168

### 緑膿菌バイオフィームにおける SOS 応答を介した抗生物質耐性メカニズム

○鶴木海緒<sup>1</sup>, 矢野真弓<sup>2</sup>, 伊澤徹<sup>2</sup>, 野村暢彦<sup>3,4</sup>, 豊福雅典<sup>3,4</sup> (1)筑波大・生命環境・生物資源, (2)筑波大院・生命地球科学, (3)筑波大・生命環境系, (4)筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター)

### SOS response leads to antibiotic persistence in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

○Mio Unoki<sup>1</sup>, Mayumi Yano<sup>2</sup>, Toru Isawa<sup>2</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>3,4</sup>, Masanori Toyofuku<sup>3,4</sup> (1)Coll. Agro-Biol. Resour. Sci., Sch. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, (2)Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, (3)Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, (4)MICS, Univ., Tsukuba)

多くの細菌は実環境中で、細胞と細胞外マトリクスからなるバイオフィーム (BF) を形成する。これまで、BF 内部では多様な表現型の細胞や突然変異株が存在することが報告されている。これらは、近年問題視される抗生物質耐性細菌の出現との関連性が予想される。抗生物質耐性は、DNA 修復を司る SOS 応答との関連が報告されている一方で、BF 中における SOS 応答の誘導が示唆されている。しかし、BF 内における実際の SOS 応答の空間的解析や、細胞の不均一性との関連について、一細胞レベルでの検証はほとんど行われていない。そこで、本研究では BF 内部における SOS 応答の分布及びそれに起因する表現型の変化を解析することを目的とした。SOS 応答は RecA タンパク質により制御されているため、BF 研究のモデル細菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 株に SOS 応答のマーカーとして *recA* プロモーターレポーターを導入した株を用い、BF 内部の *recA* 高発現細胞を検出した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、*recA* 高発現細胞は BF 全体の細胞で一様に誘導されるのではなく、一部の細胞でのみ誘導されることが観察された。BF 由来の細胞に抗生物質を曝露したところ、パーシスターと推定される細胞が検出された。そこで、フローサイトメーターを用いて BF から *recA* 高発現細胞を分取し、抗生物質感受性を検証したところ、*recA* 高発現細胞特異的な抗生物質耐性が確認された。本研究は、バイオフィーム内部の SOS 応答を解析することにより、抗生物質耐性の出現経路について新たな知見が得られることが期待される。

## W7-5/P2-143

### 自然免疫シグナル伝達因子 STING が制御するリソソーム分解経路の解析

○飯伏純平, 野澤孝志, 中川一路 (京大院・医・微生物)

### STING (Stimulator of interferon gene) regulates lysosomal degradation pathway

○Junpei Iibushi, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

宿主の自然免疫シグナル伝達因子 STING (stimulator of interferon gene) は、細胞内に侵入した細菌やウイルスに対する自然免疫・炎症応答のシグナル伝達を担う。病原微生物の感染により細胞質に出現する環状ヌクレオチドと結合した STING は、小胞体からゴルジ体へ細胞内局在が変化して、活性化することで IFN を誘導する。活性化 STING は、後期・リサイクリングエンドソームを経てリソソームで分解される。また STING は v-ATPase 依存的なオートファジーを誘導することで細菌やウイルスを分解することが報告されている。IFN 誘導の詳細なメカニズムについての解析は進んでいるが、STING がゴルジ体からリソソームに至る細胞内輸送経路の制御分子、およびオートファジー誘導メカニズムについての知見は少ない。そこで活性化 STING の取束および病原微生物の分解にリソソームが関与することから、STING がリソソームへの輸送経路を制御すると予測し、STING が制御する分解経路のメカニズムを明らかにすることを目的とした。STING KO 細胞に A 群レンサ球菌 (Group A *streptococcus*; GAS) を感染させ、細胞内侵入率・生存率を検討したところ野生型細胞と変化はなかった。しかし、オートファジーのマーカーである LC3 だけでなく、GAS 感染初期から見られる損傷膜マーカーである galectin 3 の GAS へのリクルートが STING KO 細胞で低下していた。オートファジー機能不全細胞に STING をノックダウンするとコントロールと比較して GAS の細胞内生存率が増加した。また、EGF 刺激による EGFR の分解が野生型よりも STING KO 細胞で促進していた。以上より STING はオートファジー経路とは異なるリソソーム分解経路に関与していることが示唆された。

## W7-6/P2-141

### Co-evolution of bacteria and paired immune receptors in humans

○平安恒幸<sup>1</sup>, 長谷川玄<sup>1</sup>, Yifan Li<sup>1</sup>, 荒瀬尚<sup>2,3</sup>, 山口雅也<sup>4</sup>, 川端重忠<sup>5</sup>, 華山力成<sup>1</sup> (1)金沢大・先進, (2)阪大・微研・免疫, (3)阪大・免フロ・免疫, (4)阪大・院歯・バイオインフォ, (5)阪大・院歯・口腔細菌)

○Kouyuki Hirayasu<sup>1</sup>, Gen Hasegawa<sup>1</sup>, Yifan Li<sup>1</sup>, Hisashi Arase<sup>2,3</sup>, Masaya Yamaguchi<sup>4</sup>, Shigetada Kawabata<sup>5</sup>, Rikinari Hanayama<sup>1</sup> (1)Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., (2)Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., (3)Lab. Immunochem., IFReC, Osaka Univ., (4)Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., (5)Dept. Oral Mol. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) is an innate immune receptor family unique to primates and absent in rodents. The LILR family is composed of five activating receptors, five inhibitory receptors, and one soluble form. We and others reported that human *LILRA6* and *LILRB3*, which are paired activating and inhibitory receptors, respectively, show high levels of allelic diversity, suggesting that selective pressure such as infectious diseases has acted on the *LILRB3* and *LILRA6* genes. However, *LILRB3* and *LILRA6* ligands that could explain the biological significance of their allelic diversity have not been identified yet. To identify the *LILRB3* and *LILRA6* ligands that could serve as a selective pressure, we investigated the interaction between *LILRB3/LILRA6* and various bacteria by flow cytometry with receptor Fc-fusion proteins. Here we found that *LILRB3\*JP5* and *LILRA6\*JP1* alleles strongly recognized certain bacteria, whereas *LILRB3\*JP1* and *LILRA6\*JP4* alleles did not, suggesting that *LILRB3* and *LILRA6* recognize the bacteria in an allele-specific manner. In addition, we identified the cell wall protein as an allele-specific ligand, which was also polymorphic among the bacterial strains. Taken together, our findings suggest that mutual selective pressure has diversified not only the host *LILRB3* and *LILRA6* but also the bacterial ligand.

## W7-7/P2-147

### 空間的マルチオミックスで探索する結核肉芽腫における泡沫化マクロファージのバイオマーカー

○瀬戸真太郎, 土方美奈子, 慶長直人 (結核研究所・生体防御部)

### Spatial mutiomics profiling characterize foamy macrophages within tuberculous granulomas

○Shintaro Seto, Minako Hijikata, Naoto Keicho (Dept. Pathophysiol. Host Defense, RIT)

泡沫化マクロファージは結核の病原性において重要な機能を果たす。特に、結核肉芽腫において、泡沫化マクロファージは菌増殖の場であり、壊死して蓄積することによって乾酪壊死が形成される。本研究では、結核菌感染によって乾酪壊死を伴う壊死性肉芽腫を形成する C3HeB/FeJ マウスを用いて、泡沫化マクロファージで特異的に発現するタンパク質・遺伝子を空間的マルチオミックスで明らかにした。FFPE 化した壊死性肉芽腫をレーザーマイクロディセクションによって乾酪壊死、泡沫化マクロファージ、細胞層の 3 画分に画分して、それぞれの画分のプロテオミクス解析、およびトランスクリプトミクス解析を行った。泡沫化マクロファージ画分において、両解析で共通して発現量が多い遺伝子は 4 遺伝子存在した。免疫染色によって、これらのマーカータンパク質が泡沫化マクロファージに特異的に局在することを明らかにした。また、結核肉芽腫に移動した M2 マクロファージが泡沫化マクロファージに分化することも明らかにした。オミックス解析の結果から、泡沫化マクロファージ画分では、M2 マクロファージに関する遺伝子群、mTORC1 信号に関する遺伝子群の発現が増加することが明らかになった。以上の結果は、泡沫化マクロファージを標的とした新規診断薬、宿主治療薬開発の分子基盤形成に寄与する。

## W7-8/P2-142

### Innate immunity to microbial pathogens

○宮下 惇嗣<sup>1</sup>, 斎藤 優<sup>2</sup>, 藤本 ゆかり<sup>2</sup>, 新家 一男<sup>3</sup>, 関水 和久<sup>4</sup> (1帝京大・医真菌研究セ, 2慶應義塾大・理工・生体分子化学, 3産総研・細胞分子工学・最先端バイオ技術探求グループ, 4帝京大・薬・カイコ創薬学)  
○Atsushi Miyashita<sup>1</sup>, Yu Saito<sup>2</sup>, Yukari Fujimoto<sup>2</sup>, Kazuo Shinya<sup>3</sup>, Kazuhisa Sekimizu<sup>4</sup> (1Teikyo Univ. Inst. Med. Mycol., 2Keio Univ., 3National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 4Teikyo Univ.)

自然免疫システムは感染防御の最前線で重要な役割を果たす。最近私たちは、自然免疫システムしか持たない昆虫が、病原体接種によって後天的に個体レベルの感染抵抗性を獲得することを報告している。本発表では、食品の発酵に用いられる細菌が産生する化合物の中に、カイコに経口投与することによってカイコの緑膿菌感染死を予防する活性物質が存在することを、当該化合物の精製と構造解析の結果と共に報告する。また、当該化合物の化学合成品に同様の活性が見られ、そのときカイコの脂肪体（免疫担当組織）における自然免疫関連遺伝子の発現上昇が起きていることを、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析によって明らかにした。RNA-seq法において同定された自然免疫関連遺伝子の中に幾つかの抗菌ペプチドが含まれていた。それらの合成品の中に、感染との同時投与では治療効果が見られないが、感染の数時間前に前投与すると感染予防効果を示すものが見出された。当該抗菌ペプチドには哺乳動物における相同分子が存在し、その合成品もカイコに対して同様の感染予防効果を示した。カイコと哺乳動物で機能が保存されていた抗菌ペプチドの立体構造には共通の構造モチーフが見出された。センチクバエやサソリに存在する抗菌ペプチドも、構造と機能（カイコに対する感染予防効果）が共通していた。また、感染予防効果を示した抗菌ペプチドを血中に投与されたカイコの血球細胞では自然免疫関連遺伝子群の発現上昇が見られた。以上の結果は、自然免疫系を刺激することによって個体レベルでの感染抵抗性がもたらされ、抗菌ペプチドがサイトカインとして重要な役割を果たしていることを示唆している。

## W8

### 選抜ワークショップ4：病原性

コンピーナー：東 秀明（北海道大学）  
藤永 由佳子（金沢大学）

### Selected from general presentations 4: Pathogenicity

Conveners: Hideaki Higashi (Hokkaido University)  
Yukako Fujinaga (Kanazawa University)

## W8-1/P2-110

### レジオネラによる型破りなユビキチン修飾を介した宿主 v-SNARE の操作

○北尾 公英<sup>1</sup>, 飯田 里奈<sup>1</sup>, 久堀 智子<sup>1,2</sup>, 永井 宏樹<sup>1,2</sup> (1岐阜大・医・病原体制御, 2岐阜大・G-CHAIN)

### *Legionella* co-opts a host v-SNARE using noncanonical ubiquitination

○Tomoe Kitao<sup>1</sup>, Rina Iida<sup>1</sup>, Tomoko Kubori<sup>1,2</sup>, Hiroki Nagai<sup>1,2</sup> (1Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., 2G-CHAIN, Gifu Univ.)

*Legionella pneumophila* utilizes an arsenal of effector proteins delivered by the bacterial type IV secretion system to establish its replicative niche, known as *Legionella*-containing vacuole (LCV) during infection. A host v-SNARE Sec22b from the endoplasmic reticulum is recruited to the bacterial phagosome and forms noncanonical SNARE pairings with t-SNAREs from the host plasma membrane for LCV biogenesis. We previously identified that Sec22b is polyubiquitinated at the early stage of *L. pneumophila* infection, then a *Legionella* deubiquitinase LotB deconjugates the polyubiquitin to promote the dissociation of noncanonical SNARE pairing between v-SNARE and t-SNARE at the later stage of infection. However, the ubiquitination mechanism of Sec22b remained unknown. In this study, we identified a *Legionella* ubiquitin ligase that ubiquitinates Sec22b. This ligase conjugates the first ubiquitin to the serine residue of Sec22b by a unique mechanism distinct from the host ubiquitin ligase and the polyubiquitin chain appears to be formed on it. Furthermore, the Sec22b mutant, in which the ubiquitination site is substituted, is not ubiquitinated at the early stage of infection and is significantly less recruited to LCV than wild-type Sec22b. These results highlight a bacterial strategy manipulating the dynamics of host SNARE using noncanonical post-translational modifications.

**W8-2/P2-108****ペア型レジオネラエフェクターによるミトコンドリア ADP/ATP 交換輸送体の可逆的制御機構**

○久堀 智子<sup>1</sup>, Junup Lee<sup>2</sup>, Hyunmin Kim<sup>2</sup>, 山崎 浩平<sup>1</sup>, 西川 将成<sup>1</sup>, 北尾 公英<sup>1</sup>, Byung-Ha Oh<sup>2</sup>, 永井 宏樹<sup>1</sup> (1)岐阜大・医・病原体制御, (2)Dept. Biol. Sci., KAIST)

**Reversible modification of mitochondrial ADP/ATP translocases by paired Legionella effector proteins**

○Tomoko Kubori<sup>1</sup>, Junup Lee<sup>2</sup>, Hyunmin Kim<sup>2</sup>, Kohei Yamazaki<sup>1</sup>, Masanari Nishikawa<sup>1</sup>, Tomoe Kitao<sup>1</sup>, Byung-Ha Oh<sup>2</sup>, Hiroki Nagai<sup>1</sup> (1)Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., (2)Dept. Biol. Sci., KAIST)

Mitochondria are organelles of the central metabolism that produce ATP and play fundamental roles in eukaryotic cell function and thereby become targets for pathogenic bacteria to manipulate. We found that the intracellular bacterial pathogen, *Legionella pneumophila*, targets mitochondrial ADP/ATP translocases (ANTs), the function of which is linked to the mitochondrial ATP synthesis. This is achieved by a pair of effector proteins, Lpg0080 and Lpg0081, which have opposing enzymatic activities as an ADP-ribosyl transferase (ART) and an ADP-ribosyl hydrolase (ARH), respectively, coordinately regulating the chemical modification of ANTs upon infection. Our structural analyses indicate that Lpg0081 is an ARH with a non-canonical macrodomain, whose folding topology is distinct from that of the canonical macrodomain of known eukaryotic, archaeal, and bacterial proteins.

**W8-3/P2-124****Vi capsular polysaccharide of *Salmonella* Typhi promotes macrophage phagocytosis by binding DC-SIGN**

Lillian F. Zhang<sup>1</sup>, Andreas J. Bauml<sup>1</sup>, ○日吉 大貴<sup>1,2</sup> (1)Dept. Med. Microbiol. Immunol., UC Davis, (2)長崎大・熱研・細菌学)  
Lillian F. Zhang<sup>1</sup>, Andreas J. Bauml<sup>1</sup>, ○Hirota Hiyoshi<sup>1,2</sup> (1)Dept. Med. Microbiol. Immunol., UC Davis, (2)Dept. Bacteriol., NEKKEN, Nagasaki Univ.)

Capsular polysaccharides are common virulence factors of extracellular, but not intracellular bacterial pathogens, due to their antiphagocytic properties. It is therefore paradoxical that *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar (S.) Typhi, an intracellular pathogen, synthesizes a virulence associated (Vi) capsule, which exhibits antiphagocytic properties. Here we show that the Vi capsular polysaccharide has different functions when *S. Typhi* interacts with distinct subsets of host phagocytes. The Vi capsular polysaccharide allowed *S. Typhi* to selectively evade phagocytosis by human neutrophils, while promoting human macrophage phagocytosis. A screen of C-type lectin receptors identified human DC-SIGN as the receptor involved in macrophage binding and phagocytosis of capsulated *S. Typhi*. Consistent with the anti-inflammatory activity of DC-SIGN, purified Vi capsular polysaccharide reduced inflammatory responses in macrophages. These data suggest that binding the human C-type lectin receptor DC-SIGN by the Vi capsular polysaccharide contributes to the pathogenesis of typhoid fever.

**W8-4/P2-136*****Streptococcus* 属細菌と *H. pylori* の共感染による胃がん幹細胞の発生誘導機構**

○津川 仁<sup>1</sup>, 平井 美和<sup>2</sup>, 上田 孝<sup>2</sup>, 松崎 潤太郎<sup>3</sup>, 鈴木 秀和<sup>2</sup> (1)東海大・医・生体防御, (2)東海大・医・消化器内科, (3)慶應大・薬・薬物治療学)

**Co-infection with *Streptococcus* sp. and *H. pylori* enhances the risk of gastric carcinogenesis**

○Hitoshi Tsugawa<sup>1</sup>, Miwa Hirai<sup>2</sup>, Takashi Ueda<sup>2</sup>, Juntaro Matsuzaki<sup>3</sup>, Hidekazu Suzuki<sup>2</sup> (1)Div. Host Defense Mechanism., Sch. Med., Tokai Univ., (2)Div. Gastroenterol. and Hepatol., Sch. Med., Tokai Univ., (3)Div. Pharmacotherapeutics, Keio Univ. Fac. Pharmacy)

【目的】胃がんモデルマウスへ *H. pylori* を単独感染させても胃がんは発症せず、胃発がんには *H. pylori* に加えて特定の胃内細菌が要求される。そこで、胃がん患者より採取された胃液検体を用いて胃発がんに関わる胃内細菌を探索しその役割を解析した。

【方法】*Helicobacter pylori* G27 及び *cagPAI* 欠損株を使用した。マウス胃粘膜より構築した胃オルガノイドから胃上皮細胞層 Mucosoid を構築した。胃がん患者の胃液から DNA を抽出し 16SrDNA ライブラリーを構築した。

【結果】16SrDNA ライブラリー解析から、胃がん患者の胃内では非胃がん患者に比べ *Streptococcus* sp. の存在量が相対的に有意に亢進していることが明らかとなった。*Streptococcus* sp. の酪酸産生に関わる *butCoAT* 遺伝子発現は *starch* 存在下で大腸菌のそれに比べ有意に高く酪酸産生能の亢進が認められた。Mucosoid 及び AGS 細胞へ酪酸を添加すると CD44v9 陽性がん幹細胞の前駆細胞となる CAPZA1 の過剰発現が HDCA 阻害依存的に誘導された。そこで、酪酸刺激下の Mucosoid へ *H. pylori* を感染させると、CD44v9 陽性細胞が発生した。次に、AGS 細胞へ *Streptococcus* sp. の培養上清を添加すると CAPZA1 の過剰発現が誘導され、*H. pylori* の共感染により CD44v9 発現が亢進した。これらの結果から、*Streptococcus* sp. 存在下での *H. pylori* 感染が CD44v9 陽性細胞を発生させ胃発がんリスクを亢進させると考えられた。

**W8-5/P2-101****腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子の脂質膜認識機構**

○飯森 南斗<sup>1</sup>, 沖 大也<sup>2</sup>, 今井 友也<sup>3</sup>, 松田 重輝<sup>2</sup>, 吉田 卓也<sup>4</sup>, 大久保 忠 恭<sup>4,5</sup>, 飯田 哲也<sup>2,5</sup>, 中村 昇太<sup>2,5</sup>, 河原 一樹<sup>4,5</sup> (1)阪大・薬, (2)阪大・微研, (3)京大・生存研, (4)阪大院・薬, (5)阪大・CiDER)

**The membrane recognition mechanisms of colonization factors from Enterotoxigenic *Escherichia coli***

○Minato Iimori<sup>1</sup>, Hiroya Oki<sup>2</sup>, Tomoya Imai<sup>3</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>2</sup>, Takuya Yoshida<sup>4</sup>, Tadayasu Ohkubo<sup>4,5</sup>, Tetsuya Iida<sup>2,5</sup>, Shota Nakamura<sup>2,5</sup>, Kazuki Kawahara<sup>4,5</sup> (1)Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., (2)RIMD, Osaka Univ., (3)RISH, Kyoto Univ., (4)Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., (5)CiDER, Osaka Univ.)

腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) の病原性発現には、定着因子を介した宿主腸管粘膜への定着が必須である。現在までに同定された 25 種類の定着因子のうち、定着因子抗原 III (Colonization factor antigen III: CFA/III) と Longus の 2 種類は IV 型に分類される線毛システムにより形成される。先行研究から、CFA/III を保有する ETEC の定着には、*cof* オペロンと呼ばれる CFA/III 産生に関わる遺伝子群にコードされた分泌タンパク質 *CofJ* が必要であり、菌外において線毛と相互作用し定着に関与することが報告されている。同様の分泌タンパク質をコードする遺伝子は、Longus 産生に関わるオペロン内にも見出されており、またケニアの下痢症患者から最近分離された ETEC から発見された CFA/III バリエーションのオペロン内にも確認された。興味深いことに、配列比較解析の結果、高度に保存されている線毛構成タンパク質とは対照的に、これらの定着因子のアミノ酸配列相同性は低いことも明らかになった。

本研究では、CFA/III, CFA/III バリエーション, Longus の各 IV 型線毛システム由来分泌タンパク質の X 線単結晶構造解析を行い、それらの腸管定着における役割を考察した。その結果、いずれの分泌タンパク質も膜孔形成毒素ファミリーと類似した基本構造を採っていたが、立体構造から推定された脂質膜認識部位を構成するループ領域の長さ、構造、構成するアミノ酸に明確な違いが認められ、ETEC の宿主認識機構の多様化が示唆された。本発表では、脂質膜を模倣する人工膜小胞を用いた透過型電子顕微鏡観察および超遠心分析による結合アッセイの結果と併せて、各分泌タンパク質の詳細な脂質膜認識機構を議論する。

## W8-6/P2-109

### Endogenous production and neurotoxicity of novel botulinum neurotoxin (BoNT/X) in a clinical isolate

○松村 拓大, 阿松 翔, 小林 伸英, 藤永 由佳子 (金沢大・医・細菌)  
○Takuhiro Matsumura, Sho Amatsu, Nobuhide Kobayashi, Yukako Fujinaga (Dept. Bacteriol., Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

Botulinum Neurotoxins (BoNTs), which are produced by *Clostridium botulinum* and related species, are the most potent toxins known and the causative agents of the potentially lethal neuroparalytic disease botulism in humans and animals. BoNTs are traditionally classified into seven serotypes (A - G) based on their antigenicity. *C. botulinum* strain 111 was isolated from an infant botulism case in Japan in 1996, and serotype testing indicated that the strain 111 produces type B BoNT (BoNT/B). Zhang *S et al.* have reported that strain 111 encodes two BoNTs (Nat Commun, 2017). BoNT/B is encoded on a large plasmid, and a novel putative BoNT (BoNT/X) is encoded on the chromosome. BoNT/X shows no cross-reactivity with antibodies raised against these serotypes, suggesting that BoNT/X is a unique serotype. However, it is unclear whether BoNT/X is actually produced by strain 111 and contributes to the onset of botulism. In this study, we analyzed the production and toxic activity of native BoNT/X from strain 111. For analysis of BoNT/X, plasmid cured strain 111 which show no expression of BoNT/B was generated by serial passage. BoNT/X was detected in culture supernatant of plasmid cured strain 111 by western blot. These results indicate that strain 111 does produce BoNT/X. Now, we are investigating the toxic activity of BoNT/X in substrate cleavage assay and mouse bioassay.

## W8-7/P2-123

### Identification of a novel gene locus related to the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*

○西田 隆司<sup>1</sup>, 平松 征洋<sup>1</sup>, Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>, 堀口 安彦<sup>1,2</sup> (阪大・微研・分子細菌学, <sup>2</sup>阪大・感染症総合教育研究拠点)  
○Takashi Nishida<sup>1</sup>, Yukihiro Hiramatsu<sup>1</sup>, Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., <sup>2</sup>CiDER, Osaka Univ.)

*Burkholderia pseudomallei* (Bps) is a facultative intracellular bacterium and the causative agent of melioidosis, a severe disease with a high mortality rate (~40%) in acute phase. A Type III Secretion System (Bsa T3SS) has been considered a major virulence factor of Bps, contributing to its intracellular growth ability and virulence in mice. *Burkholderia thailandensis* (Bt), a closely related bacterium with Bps, also depends on the orthologue of Bsa T3SS to replicate in cells in vitro but rarely causes diseases in humans and mice. Therefore, we hypothesize that Bps-specific virulence genes in addition to Bsa T3SS are involved in the pathogenicity of Bps. Indeed, Bps mutant of Bsa T3SS ( $\Delta bsaZ$ ) was found to less replicate in Raw264.7 cells than wild-type Bps but better survive in the cells than Bt $\Delta bsaZ$ . In order to search the Bps-specific virulence genes, we performed a screening of a transposon library prepared from Bps $\Delta bsaZ$  and identified a Bps-specific gene locus (Bps-specific virulence gene locus; Bsv locus) that supported intracellular growth of Bps $\Delta bsaZ$ . Bsv locus is not present in Bt genome and Bps $\Delta bsaZ$  with deletion of a gene in Bsv locus showed reduced ability to proliferate in Raw264.7 cells, similar to Bt $\Delta bsaZ$ . These results suggest that Bsv locus contributes to the Bps-specific pathogenicity. We are currently analyzing the function of the genes in Bsv locus.

## W8-8/P2-107

### *S. mitis* 由来新規 5 ドメイン型コレステロール依存性細胞溶解毒素 Discoidinolysin の分子特性

○田端 厚之<sup>1,2</sup>, 松本 愛理<sup>2,3</sup>, 藤本 あい<sup>2</sup>, 友安 俊文<sup>1,2</sup>, 高尾 亜由子<sup>4</sup>, 大國 寿士<sup>5</sup>, 長宗 秀明<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, <sup>2</sup>徳島大・院先端技術科学教育・物質生命システム工学, <sup>3</sup>鹿児島大・院医歯学総合・口腔微生物学, <sup>4</sup>鶴見大・歯・口腔微生物学, <sup>5</sup>株式会社保健科学東日本・総合ラボ)

### Molecular characteristics of novel 5-domain type cholesterol-dependent cytolysin, discoidinolysin

○Atsushi Tabata<sup>1,2</sup>, Airi Matsumoto<sup>2,3</sup>, Ai Fujimoto<sup>2</sup>, Toshifumi Tomoyasu<sup>1,2</sup>, Ayuko Takao<sup>4</sup>, Hisashi Ohkuni<sup>5</sup>, Hideaki Nagamune<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., <sup>2</sup>Dept. Biol. Sci. & Tech., Grad. Sch. Adv. Tech. & Sci., Tokushima Univ., <sup>3</sup>Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. & Dent. Sci., Kagoshima Univ., <sup>4</sup>Dept. Oral Bacteriol., Tsurumi Univ., <sup>5</sup>Health Sci. Res. Inst. East Japan Co. Ltd.)

【目的】 ヒト口腔常在性の日和見レンサ球菌である *Streptococcus mitis* は、血液寒天上で  $\alpha$  溶血性を示す。一方、近年、 $\beta$  溶血性を示す *S. mitis* 株も確認されており、その  $\beta$  溶血因子として、グラム陽性病原性細菌の膜孔形成毒素であるコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) が見出されている。興味深いことに、*S. mitis* が産生する CDC には構造的・作用的な多様性が確認されている。本研究では、これまで ExD-CDC として報告してきた 5 ドメイン構造の新規 CDC について、分子 N 末追加ドメイン内の discoidin 領域に基づき discoidinolysin (DLY) と命名し、その分子特性について検討を行った。

【方法】 DLY を産生する *S. mitis* 臨床株 Nm-76 を対象とし、DLY 欠失株を構築して、ヒト赤血球やヒト株化細胞を対象とした DLY 依存性の細胞障害性を検討した。また、大腸菌発現系を用いて DLY 及びその変異体を調製し、溶血活性や細胞障害性、ヒト由来細胞との相互作用やヒト赤血球凝集活性の詳細を検討した。

【結果及び考察】 Nm-76 の DLY 欠失株は非溶血性を示し、野生株と比較して有意な細胞障害性の低下も確認された。さらに、DLY 組換え体は、discoidin 領域を含む N 末追加ドメインに依存的なヒト由来細胞間の相互作用のみならず、ヒト赤血球凝集活性も示した。*S. mitis* Nm-76 株は川崎病患児由来の分離株であり、DLY に確認された上記の諸特性は川崎病に特徴的な病態との関連からも興味深い。DLY 依存的な *S. mitis* の病原性の詳細について明らかにすべく、更なる検討を進めている。

## W9

## バイオリソースを用いた感染モデルの構築

コンピーナー：清水 隆 (山口大学)  
垣内 力 (岡山大学)

## Development of Infection model using bioresources

Conveners: Takashi Shimizu (Yamaguchi University)  
Chikara Kaito (Okayama University)

細菌学において細菌の生体内での動態や、病原性の研究には実験動物を用いた研究が不可欠である。これまで感染症のモデル生物といえばマウスやラットが主体であった。しかしながら、こうした動物実験を用いた研究では、動物福祉の観点から、動物の生命の尊重、苦痛の最小化、使用頭数の最小化などが必須であり、多くの実験を試行錯誤することは困難である。近年、このような倫理的問題を低減するために様々な感染モデルが提唱され、実績が蓄積されつつある。また、文部科学省が行っているナショナルバイオリソースプロジェクトはライフサイエンス研究の基盤となる様々な生物の収集をおこなっており、研究者が簡単にそれらの生物を利用できる。

このような背景から本ワークショップではカイコ、メダカ、ゼブラフィッシュ、ゾウリムシ、線虫、シロイヌナズナなど様々な感染モデルを使用し、感染症の研究を最前線で行っている研究者を紹介したい。

共催：NBRP ゾウリムシ  
Co-host: NBRP Paramecium

## W9-1

## 病原細菌の自然宿主モデルとしてのゾウリムシ

○渡邊 健太 (山口大・共同獣医・獣医公衆衛生)

## Paramecium as a host model for pathogenic bacteria

○Kenta Watanabe (Dept. Vet Med., Yamaguchi Univ.)

*Paramecium* spp. are free-living, single-celled, freshwater ciliates and found widely in environmental water. They are considered harmless to humans and animals and are often used as educational materials. On the other hand, their capability as host organisms in environment that maintain other species within their cells has been studied in previous research. We have also focused on this characteristic of *Paramecium* and have investigated the possibility that *Paramecium* might function as a natural host of pathogenic bacteria in the environment and be involved in their acquisition of virulence and spread in the environment. More than several hundred strains of *Paramecium* with different species and characters are available from National Bioresource Project, which is a great advantage in using *Paramecium* as a research tool. By utilizing this resource, we have shown that pathogenic bacteria, such as *Legionella* and *Francisella* which are isolated from environment water, can establish a stable relationship with *Paramecium*. Furthermore, it has been also found that these relationships are not maintained depending on *Paramecium* strains, suggesting that there is diversity in the relationships between pathogenic bacteria and *Paramecium* hosts. The *Paramecium* host model is useful as a novel tool for analyzing the survival strategies and mechanisms of pathogenic bacteria in environment.

## W9-2

Understanding virulence of *Bacillus cereus* group of bacteria using silkworms

○Atmika Paudel<sup>1,2</sup>, Hideaki Higashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Div. Infection and Immunity, International Inst. Zoonosis Control, Hokkaido Univ., <sup>2</sup>GenEndeavor LLC.)

Infectious diseases are one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. The ability of pathogens to infect a diverse range of hosts and adapt to various niches equips them for successfully infecting a host. On top of that, the emergence and spread of multi-drug-resistant bacteria pose a serious health threat, leaving the healthcare system overwhelmed with fewer treatment options. As treatment strategies shift toward pathogen-specific approaches, understanding bacterial pathogenesis has become more crucial for mitigating infections. Compared to *in vitro*-based approaches, use of small animal hosts is appropriate to get a picture of bacterial behavior during an actual environment where direct host-pathogen interaction can be assessed. We established a silkworm model of *Bacillus anthracis* infection, where we showed that clinically used antibiotics cured the infected silkworms, and *B. anthracis* strains disrupted in the toxin genes had a reduced virulence to silkworms. This suggested that the *B. anthracis* infection in mammals and silkworms uses a similar course. We utilized silkworms to further understand the pathogenicity of a highly virulent *Bacillus cereus* strain 30040, belonging to sequence type (ST) 1420, the ST that was predominant among bacteremia cases in Japan. We established a silkworm model of *B. cereus* 30040 infection and showed that clinically used antibiotics prolonged the survival of the infected larvae. To identify genes responsible for its pathogenicity, we generated a mutant library by random mutagenesis and screened for less-virulent strains using silkworms. By whole-genome sequencing, we found one of the mutants had a mutation in the *rsbW* gene, that could be attributed to the less-virulent phenotype. Further analysis revealed that the strain had reduced motility, protease production, and biofilm-forming ability compared to that of the wildtype. RsbW is well-conserved among firmicutes and encodes for a serine-protein kinase that acts as antagonist of the alternative sigma factor, SigB; however, its involvement in pathogenicity of *B. cereus* is unknown. Further elucidation of its role in pathogenicity will provide a novel insight in broadening our understanding of *B. cereus* infection and host-pathogen interaction.

## W9-3

## シロイヌナズナを細菌感染モデルとして用いる試み

○垣内 力, 石川 一也 (岡山大・院医歯薬・分子生物学)

Use of *Arabidopsis thaliana* as a bacterial infection model

○Chikara Kaito, Kazuya Ishikawa (Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

植物は育成が容易で、感染実験の倫理的問題がないことから、細菌と宿主の相互作用を観察するのに適した実験材料である。特に、モデル植物であるシロイヌナズナは、分譲機関から遺伝子破壊システムを入手することが容易で、感染防御に働く宿主遺伝子を解析する上で有用である。また、自然環境に存在する多くの細菌種は、生活環の中で動物と植物の両方と接触する。例えば、家畜肥料に含まれる細菌は植物に付着し、植物とともにヒトや家畜に経口接種され、食中毒を発症させることがある。したがって、細菌と植物との相互作用の解析は、環境中での細菌の存在状態とヒトへの侵入様式を理解する上でも重要である。本研究は、モデル細菌である大腸菌と枯草菌を用いて、植物感染時の細菌の増殖と植物の病徴を調べることを目的とした。大腸菌 BW25113 株と枯草菌 168 *trpC2* 株をシロイヌナズナ本葉にシリッジフィルターで接種した。その結果、接種後 5 日目まで大腸菌の生菌数は維持され、葉には弱い退緑がみられた。一方、枯草菌を接種した葉は接種後 3 日目には完全に枯死し、枯死した葉には枯草菌の生菌が見出されなかった。次に、病原関連分子パターンとして認識される鞭毛の欠損株を接種したところ、大腸菌の鞭毛欠損株は親株に比べて生菌数が増加したが、枯草菌の鞭毛欠損株は親株と同様に、葉の枯死を引き起こし、枯死した葉には生菌が存在しなかった。以上の結果は、大腸菌と枯草菌はそれぞれシロイヌナズナにおいて異なる増殖性と病徴を示すことを示唆している。今後は、大腸菌と枯草菌の植物での増殖性を決定する分子の同定を試みるとともに、他の細菌種の植物への影響を解析する予定である。

## W9-4

線虫 *C. elegans* を用いたプロバイオティクス評価と感染モデル系  
○中台(鹿毛) 枝里子 (大阪公大・院生活科学・食栄養)

### Probiotic evaluation and infection model system using *C. elegans*

○Eriko Kage-Nakadai (Dept. Nutr., Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metropol. Univ.)

Research on probiotics using human microbiota and fermentative bacteria has expanded. On the other hand, from the viewpoint of animal welfare, there is a rapid global trend toward reducing or eliminating mammalian experiments. In particular, infection experiments often cause unavoidable and prolonged suffering to laboratory animals. In response to growing needs for alternative mammalian models, the use of *Caenorhabditis elegans* has attracted much attention. Although *C. elegans* is minute, with a body length of only about 1 mm and a somatic cell number of about 1000, it possesses basic organs and tissues such as a nervous system, muscles, and digestive tract, as well as a body surface barrier equivalent to skin. Using *C. elegans* as an alternative model host, we have investigated the effects of probiotics, including *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* var. *natto*, on host resistance to pathogens such as *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. In addition, we have analyzed *Cutibacterium acnes* strains with the “healthy skin-related” ribotypes, which are frequently detected in acne-free skin, and found that the healthy skin-related strain enhanced the resistance of *C. elegans* to *S. aureus*. In this presentation, I would like to discuss the current status and challenges of using *C. elegans* as a model system for infection.

## W9-5

非哺乳類動物ゼブラフィッシュを用いた細菌感染における宿主の糖鎖リモデリングの生理機能解析

○塩崎 一弘, 石井 美都 (鹿児島大・水・食品生命科学)

### Physiological analysis of host glycan remodeling in bacterial infection using zebrafish model

○Kazuhiro Shiozaki, Mika Ishi (Div. Food Life Sci., Fac. Fish., Kagoshima Univ.)

Edwardsiella 属は、哺乳類から爬虫類、魚類まで幅広く感染するグラム陰性菌であり、エドワジエラ症の原因細菌である。最近、Edwardsiella 属の感染における宿主細胞シアロ複合糖質の糖鎖リモデリングの重要性が注目されている。Edwardsiella 属は、宿主細胞のN型糖鎖からシアル酸を遊離させ、露出したN-アセチルグルコサミンやマンノースを認識し、細胞内に感染する。さらに、遊離したシアル酸を菌体内に取り込み、代謝することで自らの病原性を高めるシステムを有している。

このように宿主側の糖鎖リモデリングと細菌感染の関係を解析するにあたり、実験動物の遺伝子改変、および感染試験は欠かすことができない。しかし、マウスなどの哺乳類を用いた動物試験には倫理的規制が大きく、また飼育スペースや実験コストの問題などが、しばしば研究を進める際の支障となる。また技術が発展したとはいえ、個々の研究室でゲノム編集マウスを作出するのは非常に煩雑である。そこで我々は、非哺乳類の脊椎動物であるゼブラフィッシュを実験動物とし、糖鎖関連遺伝子の改変や感染実験を行っている。魚類は動物愛護法の適応外であることから、様々な実験デザインが可能である（もちろん可能な限り苦痛を与えないようにすべきだが）。また、小型魚類であることから飼育コストやスペースをかなり低く抑えることができ、ゲノム編集による標的遺伝子の変異体作成も容易である。本ワークショップでは、リソソーム局在シアル酸加水分解酵素 Neu1 を欠損させたゼブラフィッシュを用いた感染モデルの構築について報告する。

## W10

### 真菌による発酵と感染 —各分野で醸成された独自研究技術や キャリアパス—

コンピーナー：上野 圭吾 (国立感染症研究所)  
宮澤 拳 (国立感染症研究所)

### Fungal biology in the fermentation and infection; Let's look at unique research approach and their career paths

Conveners: Keigo Ueno (National Institute of Infectious Diseases)  
Ken Miyazawa (National Institute of Infectious Diseases)

真菌は、古くからそのバイオマスそのもの（きのこ）が食されており、その代謝を利用した食品（清酒、醤油、味噌）や有用物質（医薬品原体、有機酸、酵素）の生産にも利用されている一方で、ヒトや動物、植物に感染する種もあります。そのため真菌は、農芸化学や生物工学、植物病理学、医真菌学等幅広い領域で研究対象とされています。真菌という共通の研究対象があっても、分野横断的に情報交換し、実験技術を習得する機会は限られているのが現状です。本講演では、各分野で活躍されている研究者に、各分野で醸成された独自の技術とその研究成果を紹介していただき、近くて遠かった真菌研究者間の議論を活性化させる企画したいと思います。また、若手研究者の減少が懸念されている昨今の状況を踏まえ、研究者としてのキャリアパスについても紹介していただき、若手研究者や学生諸賢の呼び込みに結びつけ、我が国の真菌学研究的未来を総合的に考えます。

共催：日本微生物学連盟  
Co-host: FMSJ

## W10-1

多核多細胞である黄麹菌における mRNA の時空間発現動態

○樋口 裕次郎 (九大・院農・生命機能)

### Spatiotemporal expression dynamics of mRNA in multinuclear and multicellular *Aspergillus oryzae*

○Yujiro Higuchi (Dept. Biosci. Biotechnol., Fac. Agr., Kyushu Univ.)

The yellow *Koji* mold *Aspergillus oryzae* is an essential filamentous fungus for fermentation and brewing in Japan and secretes to safely produce amylases and other useful enzymes in large quantities. In *A. oryzae*, the molecular mechanisms of the enzyme gene expression and protein secretion pathways have so far been analyzed by biochemistry and molecular cell biology. However, in the context of multinuclear and multicellular organisms, the spatiotemporal expressional regulation of secretory enzyme-encoding mRNAs is largely unknown. We employed the MS2 system to visualize the mRNA of glucoamylase, a major *A. oryzae* secretory enzyme, and revealed site- and nuclear-localization-specific expression patterns in living hyphal cells. In addition, although glucoamylase mRNAs localized on the endoplasmic reticulum membrane and were expected to be static when translated into protein, some glucoamylase mRNAs actually exhibited long-range motility of >10 μm. In my talk, the molecular mechanisms underlying the expression and localization of glucoamylase mRNAs will be discussed.

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、有用酵素を安全かつ多量に分泌しますが、分泌酵素をコードする mRNA の時空間発現制御機構は未解明です。我々は MS2 システムを用いて、黄麹菌の主要な分泌酵素であるグルコアミラーゼの mRNA を生細胞可視化し、菌糸細胞の部位や核の局在特異的な発現様式を明らかにしましたので、関連する分子機構と併せてお話しします。

**W10-2****A secreted virulence effector protein of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis***

○深田 史美<sup>1,2</sup>, Nicole Rosset<sup>2</sup>, Timo Glatter<sup>2</sup>, Karin Muench<sup>2</sup>, Petra Happel<sup>2</sup>, Regine Kahmann<sup>2</sup> (<sup>1</sup>岡山大学・植物研, <sup>2</sup>Dept. Organ. Inter., Max Planck Inst. for Terr. Microbiol.)

○Fumi Fukada<sup>1,2</sup>, Nicole Rosset<sup>2</sup>, Timo Glatter<sup>2</sup>, Karin Muench<sup>2</sup>, Petra Happel<sup>2</sup>, Regine Kahmann<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Inst. Plant Sci. Rec., Okayama Univ., <sup>2</sup>Dept. Organ. Inter., Max Planck Inst. for Terr. Microbiol.)

The biotrophic fungus *Ustilago maydis* causes smut disease in maize. Hallmarks of the disease are large tumors that develop on all aerial parts of the host in which dark-pigmented teliospores are formed. To establish a biotrophic, compatible interaction between *U. maydis* and maize, the secretion of specialized fungal proteins termed effectors play important roles. During plant colonization, *U. maydis* produces 467 putative secreted effectors whose expressions occur in discrete waves. Here, we functionally characterized a novel core effector *lep1* which is highly expressed during tumor formation and contributes to virulence. In tumors, *lep1* mutants show attenuated hyphal aggregation, fail to undergo massive late proliferation, and produce only few spores. Upon constitutive expression of *lep1*, cell aggregation is induced and the surface of filamentous colonies display enhanced hydrophobicity, suggesting that Lep1 is a novel surface-active protein. We show that Lep1 is bound to the cell wall of biotrophic hyphae and associates with the repellent protein Rep1. Those results suggested that Lep1 acts as a novel kind of cell adhesin that functions together with other surface-active proteins to trigger the proliferation of hyphae and for induction of the morphological changes associated with spore formation.

**W10-3****抗白癬化合物及び標的候補の探索を指向した手法の開発**

○石井 雅樹<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>武蔵野大学・薬・分子細胞生物, <sup>2</sup>武蔵野大学・薬研)

**Tool developments for the discovery of anti-dermatophyte compounds and target candidates**

○Masaki Ishii<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Cell Biol., Sch. Pharm. Musashino Univ., <sup>2</sup>Inst. Pharm. Musashino Univ.)

白癬菌 *Trichophyton rubrum* は、白癬（水虫）の原因真菌の 70%以上を占める。一方で、本菌の病原性の解明や治療薬開発に応用できる遺伝学ツールや動物感染モデルは非常に限られている。利用可能なツールを拡大するため、高効率な遺伝子ターゲティング手法の確立と、新規動物モデルの確立をおこなったので、実際の実験結果を踏まえて紹介する。真菌の標的遺伝子の欠損や変異導入において、真菌が有する DNA 修復機構である相同組み換えが用いられる。一方で、別の修復機構である非相同末端修復は効率的な相同組み換えの妨げになる。実際、*T. rubrum* 野生株の相同組み換え効率は 1 パーセント程度であり、本菌の増殖の遅さと相まって、一つの株の確立に要する時間や労力はかなり大きい。そこで、非相同末端修復を担う Ku80 タンパク質の欠損株を作出し、相同組み換え効率を野生株と比較した。ku80 欠損株では 45 倍高い効率で標的のゲノム領域に薬剤耐性遺伝子が挿入され、高効率な組み換えが確立できた。感染モデルについては、ヒト好性の本菌を齧歯類に感染させることは困難で、新規治療法や阻害剤の治療効果の検証のための感染モデルの確立が求められている。カイコは、化合物の毒性及び体内動態がラットなどを用いたモデルと類似している。また、近年問題となっている動物愛護の観点からの実験動物使用に対する倫理的問題を比較的受けにくく、かつコスト面も優れている。これまで多くの病原体の感染モデルが確立されており、白癬菌についてもカイコを用いて化合物の治療活性を簡便に評価する系を確立したため、本発表では本感染モデルの特徴についても紹介する。

**W10-4****Analysis of latent cryptococcal infection and reactivation using a novel mouse model**

○佐藤 光, 川上 和義 (東北大学・院医・感染分子病態解析学)

○Ko Sato, Kazuyoshi Kawakami (Dept. Med. Microbiol., Mycol. Immunol., Grad. Sch. Med., Tohoku Univ.)

*Cryptococcus neoformans*, a yeast-type opportunistic fungal pathogen with thick polysaccharide capsules, infects the lungs via an air-borne route and frequently causes fatal meningoencephalitis in immunocompromised hosts. The protection of this fungus is critically regulated by Th1 immune responses. However, this fungus, an intracellularly growing microbe, evades host immunity, leading to a latent infection (latent *C. neoformans* infection: LCNI), and cryptococcal disease is developed by its reactivation when host immunity is suppressed. Cryptococcal-specific memory Th1 cells may be suppressed during reactivation, but elucidation of the pathophysiology of LCNI has been difficult due to the lack of mouse models. Previously, we established an LCNI mouse model by infecting wild-type mice with an acapsular strain, in which it took a long term to reach LCNI condition and they had many non-specific T cells. Therefore, we established a transgenic mouse highly expressing cryptococcal antigen-specific T cell receptor and a novel mouse model of LCNI by infecting this mouse with a virulent strain of *C. neoformans*. Further investigation is now underway to elucidate the reactivation mechanism using this mouse model, especially focusing on specific memory Th1 cells. In this session, our recent data will be introduced, and active discussion is much appreciated.

## 選抜ワークショップ5：生理・構造／その他

コンピーナー：知花 博治（千葉大学）  
三宅 仁美（大分大学）

Selected from general presentations 5:  
Physiology / Structural biology /Others

Conveners: Hiroji Chibana (Chiba University)  
Hitomi Mimuro (Oita University)

## W11-2/P2-059

## 腸炎ビブリオの腸内代謝物への走化性の解析

○寺島 浩行, 児玉 年央（長崎大・熱研・細菌学）

Analysis of chemotaxis to metabolites of intestinal bacteria in  
*Vibrio parahaemolyticus*

○Hiroyuki Terashima, Toshio Kodama (Dept. Bacteriol., Inst. Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ.)

腸炎ビブリオ感染症は、腸炎ビブリオによって引き起こされる炎症性の下痢を伴う感染症である。本菌の病原性には、耐熱性溶血毒 TDH と III 型分泌装置が重要な働きをする。III 型分泌装置は、宿主細胞に直接エフェクターを注入することから、宿主細胞にアクセスすることが機能を発揮するための重要なステップであると考えられる。細菌の移動は走化性によって制御されている。走化性は、より好ましい化学物質が存在する環境に移動する能力であるので、腸管上皮細胞の周囲には本菌を誘引する物質が存在することが予想される。そこで、腸炎ビブリオが、腸管内のどのような物質を感知して感染場所を決定し、そこまで到達するのか明らかにすることを目的とした。まず、細菌叢の代謝産物や腸管表層の物質に対して走化性を示すかどうか調べた。短鎖脂肪酸や乳酸・コハク酸、ムチンを構成する糖類、アミノ酸やその誘導体に対して、軟寒天培地中での広がりによって走化性を評価した。その結果、乳酸やセリンの存在時に広がりを示した。走化性受容体 VP0183 はピルビン酸との共結晶構造が既に報告されていることから、VP0183 が乳酸に対する受容体ではないかと考えた。受容体のメチル化アッセイを行った結果、乳酸によって VP0183 はメチル化されたことから、乳酸を認識していることが示唆された。次に、精製タンパク質を用いた等温滴定カロリメトリーによって解析した結果、VP0183 はピルビン酸とは相互作用したが、乳酸とは相互作用しなかった。現在、VP0183 と乳酸の相互作用についてさらなる解析を行うと共に、スクリーニングした走化性物質を認識する受容体の同定をおこなっている。

## W11-1/P2-060

*Klebsiella pneumoniae* の外膜小胞は菌体内 small RNA を宿主細胞内へ送達する

○椿 翔吾<sup>1</sup>, 松崎 潤太郎<sup>2</sup>, 吉岡 祐亮<sup>3</sup>, 荒木 琢磨<sup>4</sup>, 津川 仁<sup>1</sup> (1東海大・医・生体防御学, 2慶應大・薬・薬物治療学, 3東京医大・医総研・分子細胞, 4東海大・医・生命科学統合支援)

Small RNA delivery by extracellular vesicles in *Klebsiella pneumoniae*

○Shogo Tsubaki<sup>1</sup>, Juntaro Matsuzaki<sup>2</sup>, Yusuke Yoshioka<sup>3</sup>, Takuma Araki<sup>4</sup>, Hitoshi Tsugawa<sup>1</sup> (1Dept. Host Defense., Sch. Med., Tokai Univ., 2Dept. Pharmacotherapeutics., Sch. Pharm., Keio Univ., 3Dept. Mol. Cell. Med., Inst. Med., Tokyo Medical Univ., 4Dept. Med. Sci. Coll. Office., Sch. Med., Tokai Univ.)

【目的】細菌の small RNA (sRNA) は動物細胞内で機能する。しかし、細菌 sRNA がどのように宿主細胞内へ送達されるか明確ではない。本研究は、消化管内共生菌であるが高齢者に肺炎や肝膿瘍を誘発する *Klebsiella pneumoniae* の sRNA の宿主細胞内送達機序を解析した。

【方法】*K. pneumoniae* の産生する外膜小胞 Extracellular Vesicles (EV) を超遠心法にて回収した。sRNA が EV によって細胞内へ送達されるかを評価する目的で、特定の single guide RNA (sgRNA) が細胞内へ導入されたとき lacZ を発現する lacZ reporter AGS 細胞を構築した。同時に、lacZ 発現を誘導する sgRNA を *K. pneumoniae* に形質転換した (Kp-sgRNA 株)。

【結果】Kp-sgRNA 株では *K. pneumoniae* 野生株に比べ粘稠度の低下と、TEM 電顕解析により莢膜の消失が確認された。Kp-sgRNA 株から抽出した EV でも莢膜の低下が確認された。qPCR 解析により Kp-sgRNA 株の EV 内に形質転換した sgRNA が内包されていることが示された。Kp-sgRNA 株の EV を lacZ reporter AGS 細胞に添加すると lacZ 陽性細胞が確認された。トランスウエルインサートを介して Kp-sgRNA 株を lacZ reporter AGS 細胞へ感染させても lacZ 陽性細胞の発生が認められ、*K. pneumoniae* は莢膜に関係なく EV により菌体内 small RNA を宿主細胞内へ送達できると考えられた。

## W11-3/P2-075

## 腸菌由来の細胞外小胞が A 群レンサ球菌に与える生物学的影響

○河岸 優, 村瀬 一典, 中川 一路（京都大・医・微生物感染症）

## Biological Effects of Escherichia coli derived extracellular vesicles on Group A Streptococcus

○Yu Kawagishi, Kazunori Murase, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【背景・目的】細胞外小胞 (Extracellular vesicle : EV) は細菌が細胞外へ産生する 20-400 nm の球状の構造体である。EV は細菌由来分子であるタンパク、脂質、核酸分子等を内包しており、それら分子を宿主へと運び、感染戦略の一旦を担っていることも多数報告されている。しかしながら、異なる細菌種間における EV の役割については未だ不明な点が多い。これまでに我々は、A 群レンサ球菌 (group A Streptococcus ; GAS) 培養時に大腸菌由来の EV を添加すると、GAS の増殖が有意に抑えられるという結果を得た。本研究では、この増殖抑制機構を明らかにするとともに、異なる細菌間における EV の生物学的影響の解明を目的とする。

【方法】大腸菌 EV を添加した際の GAS の増殖に関わる遺伝子の発現量を qPCR により測定した。また、透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて GAS の形態的变化を観察した。さらに、より詳細な増殖抑制機構を明らかにするために、RNA-seq を用いて網羅的な遺伝子発現変動の解析を行った。

【結果・考察】qPCR の結果、EV 添加群では特に DNA 複製、細胞分裂に関わる遺伝子発現量が低下していた。さらに、SEM、TEM を用いた形態的観察の結果、EV の添加群では非対称的な形態変化、細胞隔壁の多重形成が起こっていることが示された。このことから、EV は DNA 複製と細胞分裂の少なくとも二つの経路に干渉していることが示唆された。さらに RNAseq の結果、EV 添加群では病原性、代謝に関わる遺伝子などグローバルな遺伝子発現抑制が見られたことから、異種間の細菌では EV によって幅広い生物学的な影響を及ぼしていることが明らかとなった。



**W11-4/P2-061**

比較トランスクリプトーム解析を用いた植物病原細菌青枯病菌  
OE1-1 株の感染機構の解析

○都筑 正行<sup>1</sup>, 竹村 知夏<sup>1</sup>, 瀬沼 和香奈<sup>1</sup>, 寺澤 夕貴<sup>1</sup>, 舘田 宇宙<sup>1</sup>, 阿部 悠里<sup>1</sup>, 木場 章範<sup>1</sup>, 大西 浩平<sup>1</sup>, 甲斐 建次<sup>2</sup>, 埴地 康史<sup>1</sup> (1高知大・農林海洋, 2阪公大・院農)

**Comparative transcriptomics for the infection mechanism of *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1**

○Masayuki Tsuzuki<sup>1</sup>, Chika Takemura<sup>1</sup>, Wakana Senuma<sup>1</sup>, Yuki Terazawa<sup>1</sup>, Sora Tateda<sup>1</sup>, Yuri Abe<sup>1</sup>, Akinori Kiba<sup>1</sup>, Kouhei Ohnishi<sup>1</sup>, Kenji Kai<sup>2</sup>, Yasufumi Hikichi<sup>1</sup> (1Fac. Agric. Marine Sci., Kochi Univ., 2Grad. Sch. Agric., Osaka Met. Univ.)

Soil-borne Gram-negative bacteria *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) are a family of plant pathogenic bacteria causing a severe wilt disease on a wide-range of host crop plants. *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1 utilizes 3OH-MAME as a quorum sensing (QS) signal and forms a mushroom-type biofilm during infection. Although it is found that QS is essential for the pathogenicity of the strain OE1-1, roles during infection remain unknown. To understand how gene expression profile is changed during QS, we performed a comparative transcriptomic analysis using eight QS-signaling pathway mutants. By the combination of clustering and Gene Ontology enrichment analysis, we obtained the gene clusters strongly affected by QS-dependent gene regulation in both positive and negative manners. Some QS-signaling mutants showed different expression patterns suggesting the QS-dependent gene regulation is accomplished in a complicated manner via regulation of PhcA function. It is also indicated that the presence of iron switches the global gene expression patterns. Taken together, our study suggests that the strain OE1-1 switches the gene expression patterns during infection with the specific gene regulatory modules dependently on the environmental signals.

**W11-5/P2-071**

**Role of the cytoplasmic ATPase complex in export switching of the flagellar protein export apparatus**

○南野 徹<sup>1</sup>, 木下 実紀<sup>1</sup>, 難波 啓一<sup>1,2</sup> (1阪大・生命機能, 2理研・SPRING-8)  
○Tohru Minamino<sup>1</sup>, Miki Kinoshita<sup>1</sup>, Keiichi Namba<sup>1,2</sup> (1Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ., 2SPRING-8, RIKEN)

Bacteria employ the flagellar type III secretion system (fT3SS) to construct flagella on the cell surface. Flagellar assembly begins with the basal body, followed by the hook and finally the filament. The C-terminal cytoplasmic domains of FlhA (FlhA<sub>C</sub>) and FlhB (FlhB<sub>C</sub>) forms a docking platform for export substrates and, together with the cytoplasmic ATPase complex of the fT3SS, provide order to flagellar assembly. The fT3SS infrequently secretes the FliK ruler protein to measure the hook length during hook assembly, and the C-terminal domain of FliK (FliK<sub>C</sub>) binds to FlhB<sub>C</sub> to switch substrate specificity of the fT3SS from hook-type to filament-type when the hook length reaches about 55 nm in *Salmonella*. As a result, the FlhA<sub>C</sub> ring structure is highly cooperatively remodeled via the FliK<sub>C</sub>-FlhB<sub>C</sub> interaction, thereby terminating hook assembly and initiating filament assembly. However, the export switching mechanism of the fT3SS remains unclear. Here we provide experimental evidence suggesting that the FlhA<sub>C</sub> ring requires the energy derived from ATP hydrolysis by the cytoplasmic ATPase complex to induce its structural remodeling in a FliK-dependent manner.

**W11-6/P2-074**

抗酸菌ヒストン様タンパク質は天然変性領域を介して核酸との相分離を誘導する

○西山 晃史, 目黒 佳未, 真鍋 陸, 加藤 成祥, 尾関 百合子, 立石 善隆, 松本 壮吉 (新潟大院・医歯学総合・細菌)

**Phase separation of DNA via intrinsically disordered region of mycobacterial histone-like protein**

○Akihito Nishiyama, Yoshimi Meguro, Riku Manabe, Shigetada Kato, Yuriko Ozeki, Yoshitaka Tateishi, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

*Mycobacterium tuberculosis* has the property prone to become a dormant persister, which is known to be tolerant to anti-tuberculosis therapy and highly related to latent infections. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) is a histone-like protein highly expressed in the stationary and dormant phases. MDP1 has a unique histone tail-like intrinsically disordered region (IDR) which is absent in most of other bacterial histone-like proteins. We have reported that MDP1 induces the dormancy phenotypes of mycobacteria including chromosome compaction and growth suppression, in which the function of IDR is essential. In addition, we also elucidated the molecular dynamic mechanism of IDR-mediated DNA crosslinking process. Recently, it has been reported the significant roles of phase separation of the biomacromolecules in the various cellular functions and diseases. IDR is known as an inducer of phase separation. In this study, we investigated the phase separation between MDP1 and DNA as a possible mechanism involved in chromosome compaction. MDP1 induced phase separation of DNA in a dose- and time-dependent manner. IDR played a crucial role in this phase separation. Our data suggest that a series of IDR-mediated DNA crosslinking and phase separation are involved in MDP1-induced chromosome compaction which contributes to dormant cell formation.

**W11-7/P2-184**

**Comparison of analgesic effect between botulinum toxin A1 and A2 on cancer pain**

○明吉 愛実<sup>1</sup>, 幸田 知子<sup>2</sup>, 鳥居 恭司<sup>1</sup> (1東京農大院・農・動物, 2大阪公立大)  
○Manami Akeyoshi<sup>1</sup>, Tomoko Kohda<sup>2</sup>, Yasushi Torii<sup>1</sup> (1Grad. Sch. Tokyo Univ. of Agriculture, 2Osaka Metropolitan Univ.)

**Objective:** In recent years, the number of cancer patients has been increasing with the aging population in Japan, so pain management is very important. However, currently used analgesics have problems such as insufficient pain control for osteosarcoma pain. Botulinum toxin is known to relieve pain by inhibiting the release of neurotransmitters. In this study, we injected botulinum toxin to mice with bone cancer and evaluated its analgesic effect to verify whether it could be used for pain treatment.

**Method:** NCTC 2472 tumour cells were injected C3H/HeN mice into femur. The mice were administered botulinum toxin A1 or A2 20 days after the tumour cells injection. To compared, the tumour treated mice were administrated with Acetaminophen which is currently used as a non-opioid analgesic. The von frey test to measure tactile response, the hot plate test to acute pain, and the rotarod test to motor function, were performed.

**Result:** At high concentrations of toxins, the effect was not clear because the motor function was decreased due to the muscle relaxation. However, the toxins at the most effective concentrations increased the values in the von frey test than untreated mice and with Acetaminophen. This result suggests botulinum toxin are effective to suppress the pain in bone cancer. Furthermore, analgesic effect by A2 toxin was observed at lower concentration than A1 toxin.

## 高度封じ込め施設における業務と研究

コンピーナー：児玉 年央（長崎大学）  
遠矢 真理（順天堂大学）

### Operation and Research at the BSL4 facility

Conveners: Toshio Kodama (Nagasaki University)  
Mari Tohya (Juntendo University)

国立感染症研究所には“感染症の診断・治療薬の選定”を目的とした BSL4 施設があり、感染症法に基づき稼働している。しかし、制限された稼働であり、他の主要先進国での BSL4 施設の稼働状況とは異なっている。近年、交通網の発達から、人や物の行き交う速度・地域が飛躍的に拡大し、それに伴い感染症が急速に拡大する事例が見られるようになった。こうした背景から高病原性微生物が原因となる疾患の診断・治療・予防法の開発の必要性は日々高まっている。また、限定的な稼働体制の日本では高病原性微生物の感染症研究に遅れをとることも危惧されている。そこで本シンポジウムでは、国内外の高度封じ込め施設における業務や研究について、実際に従事している、もしくは過去に従事していた研究者に講演して頂き、BSL4 施設の経験を細菌学会員に提供を頂き、学会員の BSL4 施設での研究について理解を深めたい。

共催：公益社団法人日本獣医学会微生物学分科会  
Co-host: The Japanese Society of Veterinary Science  
Microbiology Section

## W12-1

### 米国 BSL-4 施設における高病原性ウイルスに関する研究紹介

○古山 若呼（長崎大・高度感染症研究センター・ウイルス感染動態）

#### Research on highly pathogenic viruses

○Wakako Furuyama (Dept. Virus Infection Dynamics, CCPID, Nagasaki Univ.)

米国モンタナ州にある国立衛生研究所 (NIH)、ロッキーマウンテン研究所にはバイオセーフティレベル (BSL)-2, -3, -4 実験室、管理事務所、会議室を一体化した NIH 初の BSL-4 施設が設置され、2008 年から稼働している。この施設において、高病原性病原体を対象とした *in vitro*, *in vivo* での解析が可能である。本シンポジウムでは、当該施設において遂行したエボラウイルスの病原性発現機構に関する研究を紹介する。エボラウイルスは、フィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類に高い致死率を伴う重篤なエボラウイルス病（エボラ出血熱）を引き起こす病原体として知られているが、現時点での有効な予防、治療法は限定的である。加えて、エボラウイルスは病原性の高さにより、BSL-4 での取り扱いが義務付けられているため、現時点での日本での研究は極めて制限されている。私は、上記 BSL-4 施設にて、エボラウイルスがコードする分泌型糖タンパク質 sGP の機能解析を試みた。本講演では研究成果と共に、sGP の病原性における役割について紹介する。また、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 流行時に最優先事項として取り組んだワクチン開発の詳細について、動物モデルを用いた検証を含めて紹介し、今後の展望について考察する。

## W12-2

### 豪国連邦科学産業研究機構の BSL4 実験室とヘニパウイルスの研究

○渡辺 俊平（岡山理科大・獣・微生物）

#### BSL4 laboratory in CSIRO, Australia and study for henipavirus

○Shumpei Watanabe (Okayama Univ. of Science)

口蹄疫をはじめとする家畜感染症の診断・研究拠点として、1985 年に活動を開始した Australia Animal Health Laboratory (AAHL) は、大型家畜動物を扱うことが可能な BSL4 施設を備えている。家畜を対象とした施設ながら BSL4 施設までの設備を整えているため、当初はその十分すぎる設備を維持することに疑問さえ持たれていたものの、1994 年にオーストラリアで発生したヘンドラウイルスの診断、予防、治療法などに関する研究を通して施設の機能や役割の価値を認められることになった。ヒトの健康を対象とする BSL4 施設は AAHL 以外にも豪国内に存在しているものの、全て州立の機関となっている。そのため AAHL の BSL4 施設が対象とする研究領域は、Animal Health に留まらず、Human Health までカバーしている。

ヘンドラウイルスの発生後には、1998-1999 年にマレーシア・シンガポールで新たにニパウイルスが発生した。そのため AAHL では、ヘンドラウイルスに加えて、近縁種のニパウイルスに関しても多くの研究活動を行ってきた。ヘンドラウイルスとニパウイルスは、現在ではパラミクソウイルス科ヘニパウイルス属に分類されている。近年では、2014 年からの西アフリカにおけるエボラウイルスの大規模流行に応じて、エボラウイルスに関する研究も開始し、COVID-19 流行以降は新型コロナウイルスのワクチン開発の研究も進んでいる。本発表では、AAHL の BSL4 実験室について紹介するとともに、発表者が AAHL で実施したヘニパウイルスの研究について紹介したい。

## W12-3

### 国立感染症研究所の BSL4 施設

○下島 昌幸（感染研・ウイルス第一部）

#### BSL4 facility in National Institute of Infectious Diseases

○Masayuki Shimojima (Dep. Virol. I, NIID)

1981 年、エボラウイルス等の重篤な疾患を引き起こす病原体を取り扱うための施設として国立感染症研究所に設置された BSL4 施設は、地域住民の反対等により BSL4 施設として稼働せず、代わりに BSL3 施設として各種業務に用いられてきた。2014 年に西アフリカで発生したエボラ出血熱の大流行を機に BSL4 施設としての稼働が喫緊の課題となり、種々の会談や協議を経て、2015 年に感染症法に基づく BSL4 施設として指定されるに至った。

BSL4 施設としての指定後、国立感染症研究所の BSL4 施設は BSL4 病原体はないものの BSL4 施設として稼働し、これまでに続いて各種業務に用いられてきた。行われる業務内容は外部メンバーを含む専用の委員会であらかじめ審議され、近隣自治会や市役所職員も含めた連絡協議会で適宜報告される等、BSL4 施設で行なわれる業務の透明化が図られている。

東京 2020 オリンピック・パラリンピック等における感染症対策の強化の一環として、BSL4 病原体（感染症法での特定一種病原体等）の分与を受けて検査法を強化することになった。2019 年 7 月、病原体の輸入に関する感染症法に基づく指定を受け、海外より BSL4 病原体が輸入された。中和抗体価測定法などの検査法の整備が進められた。現在は患者の治療のための業務が取り組まれている。

BSL4 施設における BSL4 病原体を用いた業務はこれまでと同様、あらかじめ審議を受け、また実施内容は連絡協議会を通し近隣住民、自治体へ伝えられる。また要望に基づいた地域・自治体への説明会も継続して行なわれる。行われる業務内容が開かれたものとなるよう、また不安が取り除かれるよう、国立感染症研究所の BSL4 施設の運営への努力が行なわれている。

**W12-4****長崎大学 BSL-4 施設の現状と期待される役割**

○安田 二郎 (長崎大・高度感染症研究センター)

**Nagasaki University BSL-4 facility**

○Jiro Yasuda (CCPID, Nagasaki Univ.)

わが国の感染症法で一類感染症に分類される7つの感染症のうち天然痘とペスト以外の5つ(エボラウイルス病, マールブルグ病, ラッサ熱, クリミア・コンゴ出血熱, 南米出血熱)は極めて致死性が高いウイルス性出血熱である。この5つの感染症の原因ウイルスはすべてBSL-4に分類されており, ワクチン・治療薬等の開発や病態解析等に必須である感染実験を行うには高度に安全度が確保されたBSL-4施設が必要である。しかしながら, わが国には, これまで平時からBSL-4病原体を用いた基礎・応用研究を実施するためのBSL-4施設は整備されておらず, 研究開発を進める上で大きな障壁となっていた。長崎大学は, このような状況を打開すべく, BSL-4設置活動を2010年から進めてきた。国内8大学(北海道大学, 東北大学, 東京大学, 東京医科歯科大学, 慶應義塾大学, 大阪大学, 神戸大学, 九州大学)とBSL-4施設設置計画を進める9大学コンソーシアムを形成し, 地元自治体, 関連団体の協力も得て, 政府, 文部科学省への働きかけを粘り強く続け, 2021年7月末に悲願のBSL-4施設が竣工した。今後, 厚生労働大臣によるBSL-4施設の指定を受け, 特定一種病原体等を搬入した後, 一定の準備期間を経て全国の研究者が平時から基礎・応用研究に利用することができるわが国初のBSL-4施設として, いよいよ本格稼働することになる。本格稼働までにはまだ相応の年月を要すると思われるが, 現状と期待される役割について本シンポジウムの場をお借りして細菌学会の皆様にご説明したい。

**W13****ゲノム変化により駆動される病原性スイッチ**

コンピナー: 小倉 康平 (金沢大学)

竹本 訓彦 (国立国際医療研究センター)

**Pathogenicity switches driven by genomic mutation and recombination**

Conveners: Kohei Ogura (Kanazawa University)

Norihiro Takemoto (National Center of Global Health and Medicine)

近年のシーケンス技術の発展は腸内・口腔・皮膚に常在する細菌の構成(細菌叢)についての研究を加速させ, 細菌叢と疾患との関連等について, 本学会のワークショップ・シンポジウムでも新たな知見が報告されてきている。それと同時に, 平時では感染症に至らない, すなわち非病原性や病原性の低い状態である細菌が, どのようなメカニズムで病原性を現し, 感染症を引き起こすのかについても, 本技術発展により革新的な知見が近年生み出されている。そこで我々(竹本・小倉)は, 細菌のゲノム変化とそれに伴う病原性獲得に焦点を当てたワークショップを開催し, 次世代シーケンス技術・オミクス解析等, 近年の技術を利用して遂行された基礎的研究についての発表の場を設けることを企画した。本ワークショップにより, 高病原化に至るゲノム変化メカニズムに関する研究の重要性の認識が高まり, このような分野の研究がより活発になることを期待する。

**W13-1****Mechanism of hyper-virulent mutation of *Streptococcus pyogenes***○竹本 訓彦<sup>1</sup>, 岩元 典子<sup>2</sup>, 稲田 誠<sup>2</sup>, 野本 英俊<sup>2</sup>, 守屋 任<sup>3</sup>, 目崎 和久<sup>3</sup>, 黒川 正美<sup>3</sup> (<sup>1</sup>国立国際医療研究センター研究所・感染症制御, <sup>2</sup>国立国際医療研究センター・国際感染症センター, <sup>3</sup>国立国際医療研究センター病院・中央検査部)○Norihiro Takemoto<sup>1</sup>, Noriko Iwamoto<sup>2</sup>, Makoto Inada<sup>2</sup>, Hidetoshi Nomoto<sup>2</sup>, Ataru Moriya<sup>3</sup>, Kazuhisa Mezaki<sup>3</sup>, Masami Kurokawa<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Dis., <sup>2</sup>DCC, NCGM, <sup>3</sup>Clinical Laboratory, NCGM)

劇症型レンサ球菌感染症(STSS)はレンサ球菌により引き起こされる致死率も30%程度と極めて重篤な感染症である。初期症状としては発熱, 腫脹, 四肢の疼痛などが多いが腹痛などを主訴とする症例もあり, 初期症状からの判断は困難である。2010年まで日本での発症数は年間100件程度であったが, 2019年には800件に達しており, 対応が求められる非常に危険な感染症である。原因菌としては, A群レンサ球菌とC/G群レンサ球菌による症例が大部分を占めるが, C/G群レンサ球菌は高齢者における症例からの単離例が有意に多いのに対し, A群レンサ球菌は比較的若く基礎疾患のない40-50代からの単離例もあることが特徴である。

STSS症例由来のA群レンサ球菌の分子疫学解析からは, 多くの病原性因子の発現を制御する*covR/S*に欠失または点変異を有する株が多いことが知られている。*covR/S*の機能欠損は菌の貪食回避能力の向上, 各種毒素の過剰産生による免疫系攪乱や多臓器不全などを誘発する。STSS症例では, 感染後に*covR/S*に変異が導入され, 高病原化株が発生することが予想されているが, その変異の発生機序については明らかではなかった。我々は, 公共データベースに登録されたデータを解析するとともに, 野生株集団中から*covR/S*変異体を特異的に選抜するシステムを開発し, 変異の発生機序の解明を試みた。解析の結果, 臨床株において見られる高病原化変異の大部分がDNA複製時のエラーに起因することを示唆する結果を得た。

現在, これらの解析に加え, 患者の体内に存在する菌集団を対象としたヘテロジェナイティに関する研究も進めており, 本発表ではその話題についても紹介したい。

## W13-2

### 人工呼吸器関連性肺炎を模し実験進化させた *Acinetobacter baumannii* の病原性解析

○鴨志田 剛 (京都薬大・微生物)

#### Pathogenicity analysis of *Acinetobacter baumannii* experimentally evolved to mimic VAP pathology

○Go Kamoshida (Dept. Microbiol. and Infect. Cont. Sci. Kyoto Pharm. Univ.)

*Acinetobacter baumannii* は健常人の皮膚にも常在する環境菌である。薬剤耐性菌の蔓延が問題となるが、抗菌薬のみならず多様な環境に対して高い適応能を示すため、医療機器や院内施設に定着し医療関連感染症の原因菌となる。*A. baumannii* は通常は無害であるが、免疫力が低下した易感染性宿主に感染症を引き起こす。なかでも人工呼吸器が挿管された患者において人工呼吸器関連性肺炎 (ventilator-associated pneumonia; VAP) を引き起こし致死率も高い。我々は、人工呼吸器に使用される気管挿管チューブに接着しやすい菌株が、患者体内に定着することで VAP を発症するのではないかと着想した。そこで、気管挿管チューブの存在下で *A. baumannii* を培養し、実験的に気管挿管チューブに対し高度接着能を獲得進化させた株を樹立した。本適応進化株を免疫が正常なマウスに投与すると一過性の肺感染を引き起こすが死亡することなく回復した。一方で、人工呼吸器が挿管された易感染性の患者を模しシクロフォスファミドで処理した免疫不全マウスに投与すると、肺炎を発症した後に全身性播種を伴う敗血症を引き起こし、全てのマウスが死亡した。さらに、本適応進化株をゲノミクス/プロテオミクス解析することにより、病原性増加に寄与する因子の同定を試みた。その結果、本菌はゲノム変化によりアミノ酸代謝/利用能が亢進することが示唆された。本研究により、気管挿管チューブに接着しやすい *A. baumannii* 株を実験的進化法を用い樹立することで、ゲノム変化に伴い高病原性化することが明らかとなった。今後、本研究成果を VAP 発症メカニズムの詳しい理解および予防/治療に繋げたい。

## W13-3

### 相変異によるピロリ菌の病原性調節と宿主適応機構

○三室 仁美 (大分大・グローバル感染症研究センター)

#### Pathogenic regulation and host adaptation mechanism of *Helicobacter pylori* by phase variation

○Hitomi Mimuro (RCGLID, Oita Univ.)

ヘリコバクターピロリは胃内に長期感染することで胃がんを誘導する。ピロリ菌の顕著な特徴のひとつは、高頻度の遺伝的多様性と変動性である。この特性は、ピロリ菌が宿主主体に適応して持続感染を成立させるのに重要であると考えられている。すでに持続感染の結果として胃疾患を発症した患者からの臨床分離株の解析研究のみでは、感染成立過程の全容を理解することができないことから、実験動物モデルを用いた研究が必要となる。我々はスナネズミおよびマウスを用いたピロリ菌動物実験モデルを用いて、ピロリ菌が宿主に適応する際に菌体に導入されるゲノム変異の網羅的解析を行なった。その結果、塩基の単純反復配列にスリップストランドミスベアリングが起こり、相変異による遺伝子発現の変動が見られる因子を複数見出した。その中の一つの small RNA HPnc4160 は、チミジン繰り返し配列 (T-リピート) の変化により発現が変動し、標的となる発がん因子 CagA や外膜タンパク質群の発現を変動させていた。本発表では、相変異によりピロリ菌集団が不均一性を獲得し、胃内環境に適応して持続感染を可能としているとする可能性も併せて紹介する。

## W13-4

### 細菌共存学の発展 —病原性に寄与する薬剤排出ポンプの阻害剤開発に向けて—

○山崎 聖司<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>阪大・高等共創・細菌共存学, <sup>2</sup>阪大・産研・生体分子制御, <sup>3</sup>阪大・院薬・細胞生物)

#### Development of Bacterial Coexistence Study —Toward the pump inhibitors which suppress pathogenicity—

○Seiji Yamasaki<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bact. Coexist., Inst. Adv. Co-Creat. Stud., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Biomol. Sci. Regul., SANKEN, Osaka Univ., <sup>3</sup>Dept. Cell Biol., Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

近年、細菌に関する世間の注目度は、日増しに高まっている。解析技術の進歩により、特に腸内細菌・腸内フローラ等、細菌叢分野の研究が飛躍的に進み、ヒトの免疫力向上・抗がん作用・抗うつ作用・アレルギー抑制等に関わることが示されつつある。一方、病原細菌に関しても、近年の急速な薬剤耐性化により非常に注目されている。2015年の世界保健総会 (WHA) では、薬剤耐性に関するグローバル・アクション・プランが採択され、薬剤耐性菌対策に向けて世の中は大きく動き出そうとしている。

一見すると、上記2つの研究分野は大きく異なると思われがちである。しかしながら、腸内フローラによる病原細菌感染防御機構の存在や、病原細菌への抗菌薬使用による腸内フローラの乱れの問題等、両者は密接に関わっている。ここで演者が気付いたのが、有用な菌・害を為す菌を含む、全ての細菌を同時に考慮しながら研究を進め、全細菌とうまく「共に助け合って生きていく (共生)」「お互い攻撃し合うことなく共に生存していく (共存)」ための新たな学問「細菌共存学」研究分野の必要性である。

本講演では、演者の研究グループで得られた、菌体内から菌体外に有害成分や抗菌薬を排出する細菌薬剤排出ポンプに関する最新の研究成果を交えて、当新規分野の内容について紹介したい。特に、抗菌薬不要の次世代の新規治療法につながる、病原性に寄与するサルモネラ薬剤排出ポンプ MacAB の阻害剤開発に関する研究、および薬剤排出ポンプ阻害剤の実用化に向けた阻害剤結合ピットの解析に関する研究について発表したい。

## W13-5

### 有孢子細菌における遺伝子再編成

○安部 公博<sup>1</sup>, 佐藤 勉<sup>2</sup> (<sup>1</sup>感染研・細菌1部, <sup>2</sup>法政大)

#### Sporulation-specific gene rearrangement in bacteria

○Kimihito Abe<sup>1</sup>, Tsutomu Sato<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriology I, NIID, <sup>2</sup>Hosei Univ.)

Upon infection, temperate phages undergo one of two different pathways, either of the lytic or lysogenic cycles. The lytic cycle involves viral reproduction and host cell killing. In the lysogenic cycle, unlike the lytic cycle, they insert their viral DNA into a specific site of the bacterial chromosome (called an attachment site, *att*) to reside in the host cell as a prophage. Attachment sites can be found not only in the intergenic regions and tRNA genes, but also within protein-coding genes in the bacterial genomes. Insertion of prophages within protein-coding regions seems to abolish the gene's function, causing harmful effects on the host cell viability. However, recent studies have demonstrated that some of prophages within genes allow reconstitution and timely expression of the functional genes by genetically-programmed excision from the host genome. This phenomenon is called "active lysogeny", which is attracting attention as a novel type of interaction between bacteria and phages. Here, we talk about sporulation-specific gene reconstitution (also called gene rearrangement) in spore-forming bacteria and discuss the molecular mechanism, mainly focusing on *spvM*-gene rearrangement by SPβ prophage in *Bacillus subtilis*, as examples of the active lysogeny in bacteria.

**W13-6****ヒト皮膚に常在する *Staphylococcus caprae* の病原性スイッチ**

○小倉 康平<sup>1</sup>, 古屋 紘花<sup>2</sup>, 高橋 夏樹<sup>1</sup>, 岡本 成史<sup>1,2</sup>, 大貝 和裕<sup>3</sup>, 須釜 淳子<sup>4</sup> (1金沢大・新学術, 2金沢大・医薬保・保・病態検査, 3金沢大・医薬保・AIセンター, 4藤田医科大・研究推進本部・社会実装看護創成研究センター)

**Pathogenicity switch of *Staphylococcus caprae* colonized on human skins**

○Kohei Ogura<sup>1</sup>, Hiroka Furuya<sup>2</sup>, Natsuki Takahashi<sup>1</sup>, Shigefumi Okamoto<sup>1,2</sup>, Kazuhiro Ogai<sup>3</sup>, Junko Sugama<sup>4</sup> (1Front. Sci. Init., Kanazawa Univ., 2Dept. Clinic. Lab. Sci., Inst. Med, Pharm, Health Sci., Kanazawa Univ., 3AI Cent., Inst. Med, Pharm, Health Sci., Kanazawa Univ., 4Res. Cent. Implement. Nurs. Sci. Init., Research Prom. Headquat., Fujita Health Univ.)

当研究グループは、寝たきり高齢者の Quality of Life の低下や疼痛・不快感の増強を引き起こす皮膚創傷である床ずれ = 褥瘡 について、その再発要因に皮膚常在細菌が関与するという仮説のもと、皮膚細菌叢に着目した研究をこれまで進めてきた。介護療養型医療施設の寝たきり高齢者と対象として、初回治癒後に癒痕部細菌を採取し、褥瘡が再発した群 (7名) と非再発であった群 (22名) との間の細菌叢構成を比較するために、16S rRNA V3-V4 領域を対象としたシーケンス解析に加えて、*Staphylococcus* 属のみを対象とした細菌種同定のためのシーケンス解析 (Single locus sequence typing) を実施した。その結果、後に褥瘡が再発する群においては、再発前の癒痕部に *Staphylococcus aureus* あるいは *Staphylococcus caprae* のいずれか 1 菌種が高い割合で存在することが明らかになった。*S. caprae* は、ヤギ乳から分離されることが以前から報告されている一方で、ヒト感染症原因菌としても近年報告されている。両由来株の病原性を解析するためにヒト血液溶解性実験を実施したところ、ヤギ乳由来と比較して、ヒト感染症由来 *S. caprae* 株は、有意に高い血液溶解性を示した。このことから、ヒト皮膚に常在する *S. caprae* は病原性を獲得している、すなわち病原性スイッチが ON となっていることが示唆された。本演題では、両由来株の比較ゲノム解析を実施し、病原性発揮に関与する遺伝子変化について報告する。

## P1-001/W3-4

### パーキンソン病患者便から単離した4種類の新規候補細菌

○関口 恭平<sup>1</sup>, 浜口 知成<sup>3</sup>, 伊藤 美佳子<sup>3</sup>, 西脇 寛<sup>3</sup>, 上山 純<sup>2</sup>, 大野 欽司<sup>3</sup>, 平山 正昭<sup>2</sup> (1名古屋大学・医・総合保健学, 2名古屋大学・医・オミックス医療科学, 3名古屋大学・医・神経遺伝情報)

### Four new microbes isolated from feces of Parkinson's disease patients

○Kyohei Sekiguchi<sup>1</sup>, Tomonari Hamaguchi<sup>3</sup>, Mikako Ito<sup>3</sup>, Hiroshi Nishiwaki<sup>3</sup>, Jun Ueyama<sup>2</sup>, Kinji Ohno<sup>3</sup>, Masaaki Hirayama<sup>2</sup> (1Dept. Comprehensive Health Sci., Sch. Med., Nagoya Univ., 2Dept. Omics Medical Sci., Sch. Med., Nagoya Univ., 3Dev. Neurogenetics., Sch. Med., Nagoya Univ.)

【背景・目的】近年、腸内細菌がパーキンソン病 (PD) の病態に関わっていることが明らかになっている。PD 運動症状発症の 20 年前に慢性便秘症を患うことが知られている。今回、PD 患者便から新規細菌の単離を試みた。【方法】4 種類の寒天培地を用いて単離培養を行った。単離細菌の 16S rRNA をサンガーシーケンス解析した。そして、既存菌との相同性を比較した。SEM で観察した。【結果】PD 患者凍結便より 4 種類 (13-1G, 13-11C, 13-8C, 13-18C) の新規細菌の単離培養に成功した。各種細菌の形態観察と 16S rRNA シークエンス解析を行った。NCBI と SILVA のデータベースを参照した。・13-1G グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Ruthenibacterium lactatiformans* と 95% の相同性が確認された。本菌は新属の可能性が高い。・13-11C グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Porphyromonas circumdentaria* と 90% の相同性が確認された。本菌は新属の可能性が高い。・13-8C グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Desulfovibrio intestinalis* と 98% の相同性が確認された。本菌は新種の可能性が高い。・13-18C グラム染色で、グラム陰性桿菌であった。SEM で桿菌を観察した。16S rRNA シークエンス解析の結果、*Ruminococcus torques* と 95% の相同性が確認された。本菌は新属の可能性が高い。【結論・今後の予定】PD 患者便から 4 種の新規候補細菌を単離培養した。今後、Whole genome 解析と TEM, 生化学性状分析を行う。

## P1-002/W3-1

### Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic marker based on whole-genome sequencing

○森田 昌知<sup>1</sup>, 児玉 年央<sup>2</sup>, 岡田 和久<sup>3</sup>, 泉谷 秀昌<sup>1</sup>, 荒川 英二<sup>1</sup>, 飯田 哲也<sup>3</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup> (1感染研・細菌第一部, 2長崎大・熱帯医学研究所, 3大阪大・微生物病研究所)

○Masatomo Morita<sup>1</sup>, Toshio Kodama<sup>2</sup>, Kazuhisa Okada<sup>3</sup>, Hidemasa Izumiya<sup>1</sup>, Eiji Arakawa<sup>1</sup>, Tetsuya Iida<sup>3</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriol. I, NIID., 2Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., 3RIMD, Osaka Univ.)

Although various serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* have been reported, O3:K6, O1:KUT, and O4:K68 are the major serotypes among pandemic clone that emerged in 1996 and onward. Here, to identify specific genomic islands in pandemic clones, we performed a comparative genomic analysis of *V. parahaemolyticus* strains before 1995 and after 1996 to investigate the differences in genomic characteristics. A total of 121 *V. parahaemolyticus* strains were used for whole-genome sequencing, which belong to O3:K6, O1:KUT, or O4:K68. We generated draft genome contigs of each strain from paired-end short reads and performed genome annotation. Then, we carried out a pan-genome analysis using the 121 *V. parahaemolyticus* strains and the reference genome of strain RIMD2210633. Core genes were extracted from the pan-genome profiles, and the regions more than 10 kb length between the two core genes in the reference genome (RIMD2210633) were defined as the genomic island. We identified 16 genomic islands, which included the previously reported *V. parahaemolyticus* islands (VPaIs), O-antigen biosynthetic gene clusters, K-antigen biosynthetic gene clusters, and type VI secretion system genes. Phylogenetic analysis constructed from single nucleotide variations on the core genes and the distribution of each genomic island revealed that VPaI-5 is specific to the pandemic clade.

## P1-003/W3-8

### 完全長配列を用いた *Enterotoxigenic Escherichia coli* の比較ゲノム解析と新規病原プラスミドの発見

○森田 大地<sup>1</sup>, 武田 明佳<sup>1</sup>, 山本 美和子<sup>2</sup>, 神田 美幸<sup>1</sup>, 山本 佑樹<sup>1</sup>, 熊谷 孝則<sup>1</sup>, 田原 栄俊<sup>1</sup>, 丸山 史人<sup>3</sup>, 黒田 照夫<sup>1</sup> (1広島大・院・医系科学, 2広島市衛生研究所, 3広島大・IDEC国際連携機構)

### Genomic comparison of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and discovery of novel pathogenic plasmids

○Daichi Morita<sup>1</sup>, Asuka Takeda<sup>1</sup>, Miwako Yamamoto<sup>2</sup>, Miyuki Kanda<sup>1</sup>, Yuki Yamamoto<sup>1</sup>, Takanori Kumagai<sup>1</sup>, Hidetoshi Tahara<sup>1</sup>, Fumito Maruyama<sup>3</sup>, Teruo Kuroda<sup>1</sup> (1Grad. Sch. Bio. Heal. Sci., Hiroshima Univ., 2Hiroshima City Inst. of Public Heal., 3The IDEC Institute, Hiroshima Univ.)

*Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) は世界の小児下痢症の主要な原因菌で、先進国では旅行者下痢症の原因菌でもある。ETEC は耐熱性 (ST) または易熱性 (LT) エンテロトキシンと腸管粘膜上皮細胞に付着するための因子 (CS) に特徴づけられる大腸菌の一群であり、これらをプラスミドによって獲得している。ETEC は大規模な比較ゲノム解析によって 21 の流行系統の存在が報告されているが、その病原プラスミドの配列は一部の系統でしか決定されていない。本研究では、illumina NextSeq および ONT MinION によって広島市衛生研究所が 2001-2016 年に分離した 17 事例 38 株の ETEC についてプラスミドを含む完全長配列を決定し、比較ゲノム解析を実施した。ETEC での薬剤耐性は稀であったが、*tet (B)* や *GyrA S83L* 変異が確認された。また、1 株で複数の耐性因子 (*tet (B)*, *blaTEM-1B*, *aph (3')-Ia*, *aph (3'')-Ib*, *aph (6)-Id*) を含む巨大なプラスミドが確認された。一部の ETEC では毒素や CS が配列中に含まれておらず、不安定な病原プラスミドを保有していた可能性がある。毒素や CS が配列中に含まれた株の大部分は世界的な流行株である L2 や L7 系統に属しており、その病原プラスミドは過去に報告された配列とほぼ一致していた。また一部の系統 (L4, L11, L18) の間では共通する病原プラスミドが確認され、病原プラスミドの水平伝播が示唆された。一方で、主要な流行系統から外れた一部の株 (L19 および非典型) では新規の病原プラスミドが確認され、その構造は毒素遺伝子 LT4, STb を含む共通配列と接合伝達因子を含む可変領域を有しており、ETEC の病原プラスミドの一部は可塑性の高い配列を持つことが示唆された。

## P1-004/W3-5

### 劇症型連鎖球菌感染症原因菌のデータベース構築

○秋山 徹<sup>1</sup>, 奥野 ルミ<sup>2</sup>, 山口 雅也<sup>3</sup>, 広瀬 雄二郎<sup>3</sup>, 大野 誠之<sup>3</sup>, 池辺 忠義<sup>4</sup> (1国立国際医療研究センター, 2東京都健康安全研究センター, 3大阪大学歯学部, 4国立感染症研究所)

### Database construction of streptococcal toxic shock syndrome-causing bacteria

○Tohru Akiyama<sup>1</sup>, Rumi Okuno<sup>2</sup>, Masaya Yamaguchi<sup>3</sup>, Yujiro Hirose<sup>3</sup>, Masayuki Oono<sup>3</sup>, Tadayoshi Ikebe<sup>4</sup> (1Nat. Cent. Global Health Med., 2Tokyo Metro. Inst. Pub. Heal., 3Osaka Univ. Grad. Sch. Dentis., 4Nat. Inst. Infect. Dis.)

The whole genome information of streptococci was put into a database by adding original virulence factor information. We constructed a database (named GAS-J) that includes information on over 10,000 types of virulence factors, which enables comparison of whole genome information of strains derived from streptococcal toxic shock syndrome (STSS) cases and strains derived from non-STSS cases as the control. Since the definition of STSS varies depending on the country and research, only Japanese isolates for which diagnostic criteria have been clarified will be used, and registration in the database will be done by a curator. The system was designed so that strains that do not meet the requirements are not registered. Registration of strains in the database is currently underway, and about 400 strains isolated since 2011 are scheduled to be registered, and the initial registration work has already been completed for 386 strains.

## P1-005

ゲノム情報、表現性状および化学分類学的性状に基づく  
*Faecalibacterium* 属の分類

○坂本 光央<sup>1</sup>, 櫻井 直美<sup>1</sup>, 丹野 広貴<sup>2</sup>, 飯野 隆夫<sup>1</sup>, 大熊 盛也<sup>1</sup>, 遠藤 明仁<sup>2,3</sup> (理研・バイオリソース・微生物材料, <sup>2</sup>東農大・生物・食香, <sup>3</sup>東農大・応生・食品安全)

Genome-based, phenotypic and chemotaxonomic classification of *Faecalibacterium* strains

○Mitsuo Sakamoto<sup>1</sup>, Naomi Sakurai<sup>1</sup>, Hiroki Tanno<sup>2</sup>, Takao Iino<sup>1</sup>, Moriya Ohkuma<sup>1</sup>, Akihito Endo<sup>2,3</sup> (RIKEN BRC-JCM, <sup>2</sup>Dept. Food, Aroma Cosmet. Chem., Facult. Bioindustry, Tokyo Univ. Agric., <sup>3</sup>Dept. Nutr. Sci. Food Saf., Facult. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

*Faecalibacterium prausnitzii* is one of the most important butyrate-producing bacteria in the human gut. Former studies suggested a presence of several phylogenetic groups. Here we examine the phenotypic, physiological, chemotaxonomic and phylogenomic characteristics of six *F. prausnitzii* strains (BCRC 81047<sup>T</sup>, JCM 31915, JCM 39207, JCM 39208, JCM 39209 and JCM 39210) with two reference strains of *F. butyricigenens* JCM 39212<sup>T</sup> and *F. longum* JCM 39211<sup>T</sup>. *Faecalibacterium* sp. JCM 17207 was also included. Three strains of BCRC 81047<sup>T</sup>, JCM 39207 and JCM 39209 shared more than 96.6% average nucleotide identity (ANI) and 69.6% digital DNA-DNA hybridization (dddH) values. On the other hand, remaining three strains of JCM 31915, JCM 39208 and JCM 39210 were clearly separated from the above three strains. JCM 39208 showed ANI and dddH values over the cut-off values of species discrimination with *F. longum* JCM 39211<sup>T</sup>, whereas JCM 31915, JCM 39210 and JCM 17207 did not share dddH and ANI values over the cut-off values with any of the tested strains. Furthermore, the cellular fatty acid patterns of these strains were slightly different from other *F. prausnitzii* strains. Based on the collected data, JCM 31915, JCM 39210 and JCM 17207 represent three novel species of the genus *Faecalibacterium*, for which the names *F. duncaniae*, *F. hattorii* and *F. gallinarum* are proposed, respectively.

## P1-006

ヒト糞便から分離された新菌種 *Sellimonas catena*

○久富 敦, 大熊 盛也, 坂本 光央 (理研・バイオリソース・微生物材料)

*Sellimonas catena* sp. nov., isolated from human feces

○Atsushi Hisatomi, Moriya Ohkuma, Mitsuo Sakamoto (RIKEN BRC-JCM)

【目的】我々はヒト腸内から未分離・未分類の細菌を単離し、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行うことを目的として研究を進めている。本研究では、新たに単離された菌株の分類学的位置を明確にすることを目的とした。

【材料および方法】健康成人のヒト糞便材料から種々の血液寒天培地を用いて嫌気条件下で培養を行い、新規な微生物株の単離を試みた。分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、その配列の比較から既知種あるいは新菌種であるかを判定した。新菌種の候補である菌株に対しては、さらに詳細な生理生化学的性状を調べた。

【結果および考察】分離された菌株 (12EGH17 および 18CBH55) は、偏性嫌気性、無芽胞のグラム陽性球菌であり、16S rRNA 遺伝子配列による解析から、*Sellimonas* 属内に独立したクラスターを形成した。12EGH17 株と 18CBH55 株の塩基配列の類似度は 99.4% であり、同種であることが示唆された。また、12EGH17 株、18CBH55 株の最も近縁な菌種はともに *Sellimonas intestinalis* JCM 30749<sup>T</sup> (塩基配列の類似度がそれぞれ 95.5%, 95.3%) であった。性状試験において分離株 2 株は *S. intestinalis* JCM 30749<sup>T</sup> には認められないスクロースやサリシンの資化性を示した。さらに、分離株 2 株は *S. intestinalis* JCM 30749<sup>T</sup> と比較して β-Glucosidase や α-Arabinosidase 活性を認める点などで異なった。以上の結果より、12EGH17 株、18CBH55 株の両株を新菌種 *Sellimonas catena* (12EGH17<sup>T</sup> = JCM 35622<sup>T</sup>, 18CBH55 = JCM 35623) として命名提案する予定である。本研究は AMED が実施する次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業の支援によって行われた。

## P1-007

後肢麻痺を呈した仔牛から分離された *Clostridium perfringens* E 型株のゲノム解析

○馬田 貴史<sup>1</sup>, 後藤 庸<sup>2</sup>, 熊谷 真彦<sup>3</sup>, 坂井 寛章<sup>3</sup>, 金森 裕<sup>4</sup>, 高松 大輔<sup>1,5</sup> (農研機構・動物衛生・動物感染症, <sup>2</sup>宮城県・仙台家保, <sup>3</sup>農研機構・分析研・ゲノム情報, <sup>4</sup>農研機構・作物研・ゲノム育種支援, <sup>5</sup>岐阜大院・連合獣医)

Genome analysis of a *Clostridium perfringens* type E strain from a calf with hind limb paralysis

○Takashi Mada<sup>1</sup>, Yo Goto<sup>2</sup>, Masahiko Kumagai<sup>3</sup>, Hiroaki Sakai<sup>3</sup>, Hiroyuki Kanamori<sup>4</sup>, Daisuke Takamatsu<sup>1,5</sup> (Anim. Infect. Res. Div., Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO, <sup>2</sup>Sendai LHSC, Miyagi Pref., <sup>3</sup>Bioinfo. Unit., Adv. Anal. Res. Ctr., NARO, <sup>4</sup>Genome Breed. Sprt. Ofce., Inst. Crop Sci., NARO, <sup>5</sup>Utd. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

【背景】*Clostridium perfringens* E 型株の分離報告は非常に少なく、牛の報告ではいずれも消化管症状が観察されている。今回、後肢麻痺を呈した仔牛から E 型株が分離されたため、分離株のゲノム解析を行い、分離株と病態形成の関連性を調査した。【症例・方法】患者は 12 日齢の雌の仔牛で、右側後肢麻痺を呈して起立不能となった。各種検査の後、患部からの分離株について次世代シーケンサー (MiSeq 及び MinION) によりゲノムデータを取得し、ゲノム配列を決定した。既報の *C. perfringens* 167 株のゲノムデータを加えて、本菌種の毒素関連遺伝子 (既報の 36 遺伝子) の検索とコア遺伝子を用いた系統解析を行った。また、E 型各株が保有する毒素遺伝子の推定アミノ酸配列を比較した。【結果】剖検では、腎部骨格筋の壊死及び坐骨神経表面の出血斑を認めた。鏡検では、腎部骨格筋の筋線維間にグラム陽性桿菌が観察され、骨格筋と坐骨神経に化膿性炎症を、坐骨神経に血管変性と高度な出血を認めた。消化管に著変はなかった。分離された E 型株は 16 の毒素関連遺伝子を保有しており、系統解析により、食中毒由来 E 型株や enterotoxin を保有する F 型菌群と同一クレードに分類された。本分離株を含む E 型 4 株が同一クレードに分類され、各 *iota*-toxin 及び enterotoxin の推定アミノ酸配列は互いに 99~100% 一致した。【考察】本分離株のゲノムには、神経症状に関与する既報の毒素遺伝子は認められず、本例における後肢麻痺は、坐骨神経での血管変性と出血による軸索異常が一因であると推測された。また、本分離株と同様の特性を持つ E 型株が人に感染すると、食中毒を引き起こす可能性があることが示唆された。

## P1-008

制限酵素切断片解析による菌株の推定

○多和田 早紀, 平井 到 (琉球大・保健・微生物)

Estimation of bacterial strains by restriction enzyme fragment analysis

○Saki Tawata, Itaru Hirai (Lab. Microbiol., Sch. Health. Sci., Univ. The Ryukyus)

【背景】病原細菌の系統解析は、公衆衛生上の対策を講じる際の重要な手法となる。パルスフィールドゲル電気泳動法は、病原細菌の遺伝子の関連性の評価にこれまで最も広く利用されてきた型別法の一つで、一般的に再現性に優れている。しかし、実験操作が煩雑で解析に時間がかかるといったデメリットがある。本研究では制限酵素断片両端部の遺伝子解析を行う事で、大腸菌の菌株を推定することができるか検討した。

【方法】実験大腸菌株 DH5α と薬剤耐性臨床分離大腸菌株から抽出した DNA を制限酵素 XbaI, HaeIII, AluI で消化し、自家製バーコードアダプター (HM アダプター, XbaI アダプター) と連結した。次に電気泳動により 1000~1500bp の長さの DNA 断片を選択・精製し、PCR 法により増幅した。増幅した DNA 配列をナノポアシーケンサーで解析し、BLAST 解析によって、本解析で得られた遺伝子配列情報を保持する菌株の検索を行った。

【結果・考察】本系統解析法により得られた DH5α の配列をリファレンス配列 (DH5α の全ゲノム配列から XbaI 認識部位の前後 2000 塩基対を抽出した配列) にマッピングした。その結果、得られた配列がリファレンス配列をカバーする率は 77~83% であった。次に、BLAST 解析を用いて本解析法により得られた配列と相同な配列を検索した。その結果、DH5α から得た遺伝子配列は実験大腸菌株 *Escherichia coli* strain DH5α (Gene Bank アクセッションナンバー: CP076470.1)、臨床分離大腸菌株から得た遺伝子配列は、臨床や環境分離大腸菌に相同であるという検索結果となった。このことから、解析によって菌株の推定に必要な遺伝情報が得られたことが示唆された。

## P1-009

### 食中毒等事例から分離された *astA* 保有大腸菌の *astA* 遺伝子解析

○山崎 悠華, 貫洞 里美, 土井 りえ, 島田 慎一, 成澤 一美 (埼玉衛生研究所・食微)

### Genetic analysis of *E. coli* carrying *astA* isolated mainly from food poisoning cases

○Yuka Yamazaki, Satomi Kando, Rie Doi, Shinichi Shimada, Kazumi Narisawa (Div. Food Microbiol., Saitama Prefect. Instit. Pub. Heal.)

国内では *astA* 保有大腸菌による食中毒事例が散発しており、埼玉県においても令和2年6月に *astA* 保有大腸菌 (O7:H4) による患者数約3,000人の大規模食中毒が発生した。*astA* 遺伝子は38のアミノ酸で構成される腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1) をコードしている。種々の下痢原性大腸菌だけでなく、健康なヒトや家畜、食品由来の一部の大腸菌も *astA* 遺伝子を保有しており、EAST1の病原性については未解明な部分が多い。今回我々は、国内の食中毒等事例由来 *astA* 保有大腸菌7株および市販食用肉由来 *astA* 保有大腸菌4株について、*astA* 遺伝子配列の比較を行った。また、様々な状況下における *astA* 遺伝子発現解析を試みたので報告する。食中毒等事例由来の7株は、染色体とプラスミド上に *astA* 遺伝子を保有していた。一方、市販食用肉由来の1株は染色体とプラスミド、3株は染色体のみ *astA* 遺伝子を保有していた。基準配列 (GenBank Accession No. AB042002) と比較して、食中毒等事例由来の7株は全て変異が確認されたが、市販食用肉由来株のうち2株は全く変異が認められなかった。また、食中毒等事例由来株は共通して20番目のコドンに変異が認められ、システインからアルギニンへアミノ酸変異を生じていたが、この変異は市販食用肉由来株では認められなかった。EAST1や類似構造を持つ耐熱毒素 ST は、システイン同士のジスルフィド結合が機能的な立体構造をとる上で重要と考えられており、毒素活性の発現に必要と過去に報告されている。本研究で確認された *astA* 遺伝子配列の変異が、*astA* 保有大腸菌の病原性に対してどのように影響しているのか、更なる検証が必要と考えられる。

## P1-010

### ORF-based phylogenetic analysis of *Enterobacter hormaechei* using Oxford Nanopore sequencing

○林 謙吾<sup>1</sup>, 土井 洋平<sup>1,2,3</sup>, 鈴木 匡弘<sup>1</sup> (1藤田医科大学・医・微生物, 2藤田医科大学・医・感染症, 3ピッツバーグ大・医・感染症)

○Kengo Hayashi<sup>1</sup>, Yohei Doi<sup>1,2,3</sup>, Masahiro Suzuki<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., 2Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Fujita Health Univ., 3Div. Infect. Dis., Sch. Med., Pittsburgh Univ.)

Phylogenetic analysis based on core genome single nucleotide polymorphisms (cgSNPs) using whole-genome sequencing (WGS) is increasingly used in epidemiological investigations of bacteria. However, cgSNP-based analysis based on Illumina sequencing is still time-consuming. Oxford Nanopore Technologies (ONT) sequencing is significantly faster but its high error rate hampers its application in cgSNP-based phylogenetic analysis. Therefore, we developed a cgSNP-independent phylogenetic analysis method using ONT read assemblies by focusing on open reading frame (ORF) content patterns. WGS data of *Enterobacter hormaechei* were converted to binary sequences based on the presence or absence of ORFs using BLASTn. We show that phylogenetic tree calculated from binary sequences (ORF tree) derived from ONT sequencing provides resolution that is compared with that based on cgSNPs obtained from Illumina sequencing. Conversion of assembled WGS data to binary sequences based on ORFs circumvents read error concerns with ONT sequencing. Additionally, clusters of closely related strains in the cgSNP trees formed comparable clusters in the ORF trees built with binary sequences. Since ONT sequencing generates data in real-time and does not require major investment, this ORF-based phylogenetic analysis method has the potential to enable phylogenetic and epidemiological analysis at the point of care.

## P1-011

### 薬剤耐性菌モニタリングの追跡マーカーとして用いることが可能な薬剤耐性遺伝子の上流遺伝子構造の多様性

○屋宜 宣慶, 多和田 早紀, 平井 到 (琉球大・保健・微生物)

### Characterization of the upstream genetic structure of antimicrobial resistance gene

○Nobuyoshi Yagi, Saki Tawata, Itaru Hirai (Dept. Microbiol., Sch. Health. Sci., Univ. Ryukyus)

薬剤耐性 (AMR) 菌が環境や市中からも検出されるなど、AMR 菌問題は深刻さを増している。現状では、環境や市中から分離される AMR 菌がどの程度、臨床分離株 AMR 菌株と遺伝学的関連性があるのか不明であるため、AMR 菌モニタリングの整備が必要となっている。我々は、これまでに基質特異性拡張型βラクタマーゼ遺伝子 (*bla<sub>CTX-M</sub>*) の上流遺伝子構造 (Upstream Genetic Structure : UGS) に着目し、解析を行ったところ、*bla<sub>CTX-M</sub>* の上流 0.5~3.0 kbp の遺伝子構造によって *bla<sub>CTX-M</sub>* をタイピングできることを示した。この UGS 解析を他の AMR 遺伝子に適用することで、AMR 菌モニタリングへの応用が期待された。そこで、本研究では、塩基配列 DB (RefSeq) に登録されている細菌プラスミドを用い、UGS 解析を行った。RefSeq に登録されている細菌プラスミド 54,963 件中 14,490 件から 787 種類 72,104 件の AMR 遺伝子が記載されていた。取載数上位 30 種類の AMR 遺伝子を選択し、それぞれの AMR 遺伝子の上流 5 Kbp の遺伝子構造を詳細に解析した。概して AMR 遺伝子から上流約 2 Kbp 未満では、特定の位置に AMR 遺伝子やインサーションシーケンスが検出された。一方で、AMR 遺伝子の上流 3 Kbp 以上になると、他の AMR 遺伝子やインサーションシーケンスが散発的に検出され、UGS にバリエーションが生じていることが示された。以上のことから、*bla<sub>CTX-M</sub>* 以外の AMR 遺伝子に関しても、タイピングが可能であることが示唆された。また、複数の AMR 遺伝子について UGS によるタイピングを行い、それらの構造を同時に持つプラスミドをデータベースと照合することで、プラスミド全体の構造が推定できることが強く期待された。

## P1-012

### インド・コルカタ地域でのコレラ菌の不顕性感染に関する研究

○岡本 敬の介<sup>1,2</sup>, 高橋 栄造<sup>1,3</sup>, 三好 伸一<sup>1</sup>, 元岡 大祐<sup>2</sup>, 中村 昇太<sup>2</sup>, 飯田 哲也<sup>2</sup> (1岡山山大・インド感染症共同研究センター, 2大阪大・微研, 3横浜薬大・健康)

### Study on inapparent infection of *Vibrio cholerae* O1 in Kolkata, India

○Keinosuke Okamoto<sup>1,2</sup>, Eizo Takahashi<sup>1,3</sup>, Shin-ichi Miyoshi<sup>1</sup>, Daisuke Motooka<sup>2</sup>, Shota Nakamura<sup>2</sup>, Tetsuya Iida<sup>2</sup> (1Colla. Res. Cent. Infect. Dis. Ind., Okayama Univ., 2Res. Inst. Micro. Dis., Osaka Univ., 3Heal. Pharm., Yokohama Pharm. Univ.)

Based on the previous metagenomic sequencing analysis of diarrheal stools of residents of Kolkata region of India, we speculated that there may be asymptomatic individuals infected with *Vibrio cholerae* O1. Therefore, in order to clarify the existence of these infected persons, we analyzed stool samples of 47 cholera patients in the Kolkata area and of 234 healthy neighbors of the patients by metagenomic sequencing analysis. For each stool examined, the ratio of individual bacterial gene to all bacterial genes in the stool was calculated. As a result, the following matters were clarified. 1); In the feces of cholera patients, on average, 37% of the bacterial gene in the stool were from *V. cholerae*, and 42% were from *Escherichia coli*. 2); Obligatory anaerobes accounted for 85% of the feces of healthy subjects, and *E. coli* accounted for 4%. 3); In all stools of healthy subjects, the gene from *V. cholerae* was detected, with a ratio of 0.8% in the highest healthy subject. 4); Most of the bacteria in the stools of the highest healthy subject shown in 3) were obligate anaerobes. The ratio of *E. coli* of the subject was 2%. 5); *V. cholerae* O1 was isolated from the stool of the healthy individual. Based on these data, we thought that there were subclinical cases of *V. cholerae* O1 in Kolkata.



**P1-013****健常な学生集団から回収されたメチシリン耐性ブドウ球菌の解析**

○金子日向子<sup>1</sup>, 西田 智<sup>1</sup>, 永川 茂<sup>1</sup>, 上田 たかね<sup>1</sup>, 佐藤 義則<sup>1</sup>, 斧 康雄<sup>1,2</sup>, 吉野 友祐<sup>1</sup> (<sup>1</sup>帝京大・医・微生物, <sup>2</sup>帝京平成大・健康メディカル)

**PCR-based ORF typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus* isolates from medical school students**

○Hinako Kaneko<sup>1</sup>, Satoshi Nishida<sup>1</sup>, Shigeru Nagakawa<sup>1</sup>, Takane Ueda<sup>1</sup>, Yoshinori Sato<sup>1</sup>, Yasuo Ono<sup>1,2</sup>, Yusuke Yoshino<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., <sup>2</sup>Faculty Health Med. Sci., Teikyo Heisei Univ.)

【目的】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、病院感染の主要な病原菌であるが、近年は市中感染例の増加もあり、公衆衛生上の問題となっている。本邦では、これまで、院内外で臨床分離された黄色ブドウ球菌に占める MRSA の検出率は報告されているが、健常な集団から回収された分離株に関する最近の情報は重要である。そこで、健常な医学部学生を対象に、メチシリン耐性株保有の有無やその性状及び遺伝子の特徴を解析した。

【方法】医学部 2 年生 115 名の鼻腔からスワブを用いてブドウ球菌を採取した。黄色ブドウ球菌の検出はコアグラウゼ検査と PS ラテックス検査を行った。メチシリン耐性株の選択には MRSA-Cl 培地を用いた。薬剤感受性試験はディスク法を行った。mecA 遺伝子および SCCmec エレメントは PCR-based ORF typing (POT) 法を用いて検出した。毒素産生性はラテックス凝集法により検出した。

【結果】合計 29 株のブドウ球菌が回収され、28 株がコアグラウゼ陽性 PS ラテックス陽性 (97%) であった。両陰性株 1 株は *S. epidermidis* であった。メチシリン耐性株は 6 株 (21%) 得られ、5 株の MRSA と 1 株の MRSE であった。耐性株のうち 5 株がオキサリリン耐性、5 株は mecA 遺伝子を保有し、2 株は TSST-1 を産生していた。SCCmec エレメントは全て IV 型だった。

【結論】本研究により、学生集団から回収された菌株は、その遺伝子カセットに保有する SCCmec エレメントの均一性が高いことが明らかとなった。また、TSST-1 産生株も存在するため、今後、臨床実習前の手指衛生の徹底など感染対策が重要であると考えられる。

**P1-014****肉牛牧場におけるサルモネラ血清型 Mbandaka から Lubbock への変遷におけるバクテリオファージの役割**

○太田 奈保美<sup>1,3</sup>, Gizem Levent<sup>2,3</sup>, Abbey Korn<sup>3</sup>, Henk den Bakker<sup>4</sup>, Jason Gill<sup>3</sup>, Guy Loneragan<sup>2</sup>, Marie Bugarel<sup>2</sup>, Morgan Scott<sup>3</sup>, Javier Vinasco<sup>3</sup>, Keri Norman<sup>5</sup> (<sup>1</sup>岡理大・獣医・疫学, <sup>2</sup>Sch. Vet. Med., Texas Tech Univ., <sup>3</sup>Dept. Vet. Path., Texas A&M Univ., <sup>4</sup>Dept. Food. Sci., Univ. Georgia, <sup>5</sup>Dept. Vet. Int. Biosci., Texas A&M Univ.)

**The role of phages in the population shift of *Salmonella* Mbandaka to Lubbock observed in cattle**

○Naomi Ohta<sup>1,3</sup>, Gizem Levent<sup>2,3</sup>, Abbey Korn<sup>3</sup>, Henk den Bakker<sup>4</sup>, Jason Gill<sup>3</sup>, Guy Loneragan<sup>2</sup>, Marie Bugarel<sup>2</sup>, Morgan Scott<sup>3</sup>, Javier Vinasco<sup>3</sup>, Keri Norman<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Fac. Vet. Med., Okayama Univ. Sci., <sup>2</sup>Sch. Vet. Med., Texas Tech Univ., <sup>3</sup>Dept. Vet. Path., Texas A&M Univ., <sup>4</sup>Dept. Food. Sci., Univ. Georgia, <sup>5</sup>Dept. Vet. Int. Biosci., Texas A&M Univ.)

*Salmonella* populations have evolved in response to environmental selection pressures. A new *Salmonella enterica* serovar, *Salmonella* Lubbock was first identified in 2015 in Texas, USA and reported as repeatedly emerging through recombination events. We revealed a serovar shift between Mbandaka and Lubbock during a 7-year period at the same Texas research feedlot. In this study, we explored the role of phages in the emergence of *Salmonella* Lubbock. We tested a panel of *Salmonella* phages on a set of *Salmonella* Lubbock (from 2016), Mbandaka (from 2009) isolates. Using core-genome maximum likelihood phylogeny, we also compared publicly available Lubbock and Mbandaka genomes and investigated the origin and distribution of these Lubbock strains. Our findings suggest that a T4-like phage targeting the ompC/LPS receptor of *Salmonella* could be one of the causes of the observed evolutionary shift between *Salmonella* Mbandaka and Lubbock. Flagellar proteins, metabolism, and environmental information process-related genes were found to have major genomic differences between the two serovars. *Salmonella* Lubbock strains have been reported from various states but were mostly isolated from cattle-related samples in Texas and neighboring states. Additional research is needed to determine the role of environmental or host-related factors involved in the repeated emergence of *Salmonella* Lubbock.

**P1-015****都内で報告された *Shigella sonnei* の分子疫学的解析**

○村上 昂, 河村 真保, 小野 明日香, 小西 典子, 山梨 敬子, 和田 紀乃, 横山 敬子, 貞升 健志 (東京都健康安全研究センター・微生物部)

**Molecular epidemiology of *Shigella sonnei* isolated from Tokyo, Japan**

○Ko Murakami, Maho Kawamura, Asuka Ono, Noriko Konishi, Keiko Yamanashi, Kotono Wada, Keiko Yokoyama, Kenji Sadamasu (Dept. Microbiol., Tokyo Metro. Inst. Pub. Health)

【背景】細菌性赤痢は赤痢菌を病原体とする腸管感染症であり、感染症法で 3 類感染症に定められている。国内の感染報告の多くはアジア地域をはじめとする海外からの帰国者及び感染者からの二次感染である。本研究では細菌性赤痢の原因菌種として最も多い *Shigella sonnei* を対象に全ゲノム解析を行い、都内で発生した集団感染事例の関連性、各菌株と推定感染地域の関連性および薬剤耐性遺伝子の保有状況を調査した。

【方法】2018 年から 2020 年に都内で分離された *S. sonnei* 63 株を解析対象とした。分離菌株は MiSeq を用いて塩基配列を獲得した。得られた塩基配列から、*S. sonnei* Ss046 株をリファレンス株とした core SNPs を抽出し、系統樹を作成した。また ResFinder を用いて β-ラクタマーゼ遺伝子およびキノロン系耐性に関わる SNP の保有状況を確認した。

【結果および考察】系統解析の結果、本菌は少なくとも 4 つのクラスターに分類された。2018 年に都内で発生した 2 つの集団感染事例 A, B は同一のクラスターに属していた。これら 2 つの集団由来株は *gyrA* に共通の S83L 変異を持つ一方で、異なる β-ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。したがって、これらの集団由来株は系統発生後に β-ラクタマーゼ遺伝子を獲得したと考えられた。また、集団感染事例 C 由来株は東南アジア関連株と同一のクラスターに分類された。本クラスターではキノロン耐性に関与する SNP をもつ株は確認されなかった。今回、地域特異的なクラスターが確認されたことから、今後も継続してデータを収集することで、国内感染原因菌に対する由来推定の一助となる可能性が示された。

**P1-016****Genomic characterization of Japanese meningococcal strains isolated from 2003 to 2020 in Japan**

○高橋 英之<sup>1</sup>, 森田 昌知<sup>1</sup>, 神谷 元<sup>2</sup>, 福住 宗久<sup>3</sup>, 砂川 富正<sup>3</sup>, 三輪 春奈<sup>2</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, 志半田 健<sup>1</sup>, 大西 真<sup>1</sup> (<sup>1</sup>感染研・細菌 1, <sup>2</sup>感染研・感染症疫学センター, <sup>3</sup>感染研・実地疫学研究センター)

○Hideyuki Takahashi<sup>1</sup>, Masatomo Morita<sup>1</sup>, Hajime Kamiya<sup>2</sup>, Munehisa Fukusumi<sup>3</sup>, Tomimasa Sunagawa<sup>3</sup>, Haruna Miwa<sup>2</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup>, Ken Shimuta<sup>1</sup>, Makoto Ohnishi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol. 1, Nat. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Infect. Dis. Surveil. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis., <sup>3</sup>Cent. Field Epi. Int. Tes. Prof. Dev., Nat. Inst. Infect. Dis.)

Since Invasive meningococcal disease (IMD) is a rare infectious disease in Japan, the causative agents and epidemiology have not been characterized well. In this study, we epidemiologically characterized 291 meningococcal strains isolated in Japan from 2003 to 2020 by whole genome sequencing (WGS). Serogroup Y meningococci (MenY) were the most abundant, followed by B (MenB) and then C and W among meningococci from IMD patients, while non-groupable as well as MenY and MenB were the most abundant. Sequence type (ST) defined by multilocus sequence typing (MLST) showed that ST-1655 isolates, while ST-11026 (cc32) unique to Japan as well as ST-23 were dominant among Japanese non-IMD isolates. Phylogenetic analyses of ST by MLST revealed that Japanese isolates were classified with 12 ccs, including recently reported cc2057. Phylogenetic analyses by WGS showed that isolates of ST-11026 and of ST-1655 were genetically close, whereas ST-23 isolates appeared to be diverse. Moreover, comparisons with other cc11 isolates isolated worldwide indicated that some Japanese cc11 isolates were genetically close to those isolated in Europe and China. An *in silico* analysis suggested that 14.3 and 44.2% of Japanese MenB were cross-reactive with 4CMenB and rLP2086 MenB vaccines, respectively. The results in the present study revealed that some epidemiological features were unique to Japan.

## P1-017

### 2020-2021年に沖縄県で分離された淋菌の薬剤感受性と *penA* の多様性

○中尾 浩史<sup>1</sup>, 玉山 貴大<sup>1</sup>, 金城 秀尚<sup>1</sup>, 仲田 聡明<sup>1</sup>, 高良 富頌<sup>1</sup>, 中山 周一<sup>3</sup> (琉球大・医・保・分子遺伝, <sup>2</sup>那覇市医師会生活習慣病検診センター, <sup>3</sup>感染症研・細菌1)

### Drug susceptibility and *penA* diversity of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Okinawa in 2020-2021

○Hiroshi Nakao<sup>1</sup>, Takahiro Tamayama<sup>1</sup>, Hidenao Kinjo<sup>1</sup>, Toshiaki Nakada<sup>1</sup>, Tominobu Takara<sup>1</sup>, Shu-ichi Nakayama<sup>3</sup> (Lab. Mol. Genetics, Sch. Health Sci., Univ. Ryukyus, <sup>2</sup>Lifestyle Relat. Dis. Med. Ctr., Naha City Med. Assc., <sup>3</sup>Dept. Bact. 1., Natl. Inst. Infec. Dis.)

**Background:** With the emergence of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* (NG), gonorrhea has been listed as one of the priority sexually transmitted infections that need to be addressed worldwide. Okinawa is the only subtropical prefecture in Japan and is also a resort area, which attracts tourists from all over the world and may bring diverse strains of NG.

**Methods:** NG strains were tested their susceptibility to 7 drugs by standard agar dilution method according to the CLSI method. The *penA* sequence was determined using a ABI3500 DNA sequencer or extracted from the obtained whole genome sequence. Typing of *penA* was performed by NG-STAR, and the neighbor-joining method was used for phylogenetic analysis.

**Results:** In 2020, 45.8% of the strains were resistant to PCG, but this decreased to 16.1% in 2021. The percentage of resistant strains decreased for AZM and TC as well; CPF and CFIX were similar. All were susceptible to CTRX and SPCM. Among the 35 strains, Type X was the most abundant, followed by Type II and Type V. The remaining strains were Type I, XVIII, 101, and 106. *penA* Type phylogenetic analysis revealed two major clusters, but no year-to-year variation was observed.

The diversity of *penA* was small, probably because the state of emergency declared against new coronavirus infection had led to a sharp decline in the number of travelers, especially those from overseas.

## P1-018

### Enterococcal linear plasmids adapt to *E. faecium* and spread within multidrug-resistant clades

○橋本 佑輔<sup>1</sup>, 鈴木 仁人<sup>2</sup>, 野村 隆浩<sup>1</sup>, 久留島 潤<sup>1</sup>, 平川 秀忠<sup>1</sup>, 谷本 弘一<sup>3</sup>, 富田 治芳<sup>1,3</sup> (群馬大・院医・細菌学, <sup>2</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, <sup>3</sup>群馬大・院医・薬剤耐性菌実験施設)

○Yusuke Hashimoto<sup>1</sup>, Masato Suzuki<sup>2</sup>, Takahiro Nomura<sup>1</sup>, Jun Kurushima<sup>1</sup>, Hidetada Hirakawa<sup>1</sup>, Koichi Tanimoto<sup>3</sup>, Haruyoshi Tomita<sup>1,3</sup> (Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Gunma Univ., <sup>2</sup>Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases, <sup>3</sup>Lab. Bacteriol. Drug Resist., Grad. Sch. Med., Gunma Univ.)

**【緒言】**腸球菌における薬剤耐性遺伝子の拡散に関し、プラスミドの水平伝達は重要な役割を果たしている。我々は2019年に日本国内のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) から線状構造の伝達性プラスミド pELF1 を発見・報告した。これらはVRE院内アウトブレイクの原因となるなど臨床的重要性の高いプラスミドと考えられるが、その網羅的な分子疫学解析や宿主腸球菌への影響に関する報告はない。**【方法・結果】**臨床分離腸球菌1769株を対象にPCR法によりpELF1型線状プラスミドの保有状況を確認したところ、16株を検出した。これらは全て *Enterococcus faecium* で多剤耐性臨床分離株の系統であった。Public database 検索から得た14個のpELF1型線状プラスミドの配列と共にコアゲノム解析を実施したところ、pELF1型線状プラスミドの構造は極めて保存されており、薬剤耐性遺伝子を含んだ mobile genetic element により多様性が生み出されていた。pELF1型線状プラスミドの fitness cost について解析したところ、*E. faecium* において fitness cost が小さく、抗菌薬非存在下においても極めて安定的に保持された。Transcriptome 解析からも、pELF1型線状プラスミドの保有は *E. faecium* 宿主への転写レベルでの影響が少なく、fitness cost の低減に繋がっている可能性が示唆された。**【考察】**腸球菌のpELF1型線状プラスミドは全世界に普遍的に存在しており、特に近年検出されたものの一部にはバンコマイシン耐性遺伝子群を含む薬剤耐性遺伝子が獲得されていた。この線状プラスミドはVREにおいて最も多量の菌種である *E. faecium* 株で最も安定的に保持され、更に高頻度接合伝達性を示すことからVREの拡散・増加に寄与するものと考えられた。

## P1-019

### 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコロプレイティブスタディによる評価

○新井 沙倉<sup>1</sup>, 高橋 直人<sup>2</sup>, 床井 由紀<sup>3</sup>, 小林 章人<sup>4</sup>, 松永 典久<sup>5</sup>, 山中 拓哉<sup>6</sup>, 今野 貴之<sup>7</sup>, 土井 りえ<sup>8</sup>, 齊木 大<sup>9</sup>, 山谷 聡子<sup>10</sup>, 小嶋 由香<sup>11</sup>, 柳本 恵太<sup>12</sup>, 廣瀬 昌平<sup>1</sup>, 工藤 由起子<sup>1</sup> (国立衛研・衛微, <sup>2</sup>静岡県環境保研, <sup>3</sup>宇都宮市衛試, <sup>4</sup>三重保環研, <sup>5</sup>福岡市保環研, <sup>6</sup>岩手県環境保研セ, <sup>7</sup>秋田健環セ, <sup>8</sup>埼玉衛研, <sup>9</sup>東京都健安研, <sup>10</sup>宮城保環セ, <sup>11</sup>川崎健安, <sup>12</sup>山梨衛環研)

### An interlaboratory study on efficient detection of *Escherichia albertii* in food

○Sakura Arai<sup>1</sup>, Naoto Takahashi<sup>2</sup>, Yuki Tokoi<sup>3</sup>, Akihito Kobayashi<sup>4</sup>, Norihisa Matsunaga<sup>5</sup>, Takuya Yamanaka<sup>6</sup>, Takayuki Konno<sup>7</sup>, Rie Doi<sup>8</sup>, Dai Saiki<sup>9</sup>, Satoko Yamaya<sup>10</sup>, Yuka Kojima<sup>11</sup>, Keita Yanagimoto<sup>12</sup>, Shouhei Hirose<sup>1</sup>, Yukiko Kudo<sup>1</sup> (Div. Microbiol., Natl. Inst. Health Sci., <sup>2</sup>Shizuoka City Inst. Env. Sci. Public Health, <sup>3</sup>Utsunomiya City Inst. Public Health & Env., <sup>4</sup>Mie Pref. Hlth & Environ. Res. Inst., <sup>5</sup>Fukuoka City Inst. Health and Env., <sup>6</sup>Wate Pref. Res. Inst. Env. Sci. and Public Health, <sup>7</sup>Akita Pref. Res. Ctr. Public Health and Env., <sup>8</sup>Saitama Inst. Public Health, <sup>9</sup>Tokyo Metropol. Inst. Public Health, <sup>10</sup>Miyagi Pref. Inst. Public Health and Env., <sup>11</sup>Kawasaki City Inst. for Public Health, <sup>12</sup>Yamanashi Inst. Public Health Environ.)

**【目的】***Escherichia albertii* の食品での検査法を確立するため、リアルタイムPCR法および分離培養法を用いた試験法について11試験研究機関によるコロプレイティブスタディを実施した。**【方法】**1機関につき、鶏肉とモヤシそれぞれの *E. albertii* 低菌数 (17.7 CFU) 接種、高菌数 (88.5 CFU) 接種、非接種各3検体および鶏肉の陽性1検体の計19検体を試験した。検体へ9倍量のセフェキシム・亜テルル酸添加mECを加え、42°Cにて培養した。培養液からDNAを抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイムPCR法を実施した。また、分離培養法では、培養液をDHL増地 (DHL)、マッコンキー増地 (MAC)、ラムノースおよびキシロース添加DHL (RX-DHL) および同添加MAC (RX-MAC) に画線し、生育した *E. albertii* 様コロニーをRX-DHLに継代後、リアルタイムPCR法で *E. albertii* か確認した。全機関の集計データを有意差検定した。**【結果と考察】**リアルタイムPCR法では、全機関の全接種検体が *E. albertii* 陽性と判定された。分離培養法では、全増地での検出感度は鶏肉の低菌数接種検体で94%以上、高菌数接種検体で100%であった。一方、モヤシでは、低菌数接種検体で52-73%、高菌数接種検体で85-97%と鶏肉よりも低い傾向にあった。リアルタイムPCR法と分離培養法での有意差検定の結果、モヤシではリアルタイムPCR法がDHLおよびMACよりも有意に高かった。また、RX添加増地の方が非添加増地よりも釣菌コロニー陽性率がおおむね有意に高かった。本研究から、リアルタイムPCR法により増菌培養液のスクリーニングを行い、陽性検体についてRX添加増地で分離培養することが、食品での *E. albertii* 検査法として優れた方法であると考えられた。

## P1-020

### 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* の溶血因子の解析

○小川 諒<sup>1</sup>, 白砂 結子<sup>1</sup>, 阿座上 弘行<sup>2</sup> (山口大・農・生物機能, <sup>2</sup>山口大・中高温微セ)

### Analysis of hemolytic factor in periodontal disease-associated bacterium, *Eikenella corrodens*

○Ryo Ogawa<sup>1</sup>, Yuko Shiramasa<sup>1</sup>, Hiroyuki Azakami<sup>2</sup> (Dept. Biol. Chem., Fac. Agr., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Res. Center Thermotolerant Microb. Ressources, Yamaguchi Univ.)

歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* 1073株ではコロニーの周りが透明になるβ型溶血が観察される。1073株から溶血因子を精製したところ、約65 kDaのタンパク質が得られ、アミノ酸配列の相同性から溶血因子がX-prolyl aminopeptidaseであることが示唆された。さらに、溶血因子をコードする *hlyA* 遺伝子を欠損させた株では溶血が見られなかったことから、X-prolyl aminopeptidaseが本菌の溶血因子として機能することが示唆された。しかし、これまでにペプチダーゼが溶血作用を示すという報告はなく、その溶血メカニズムは不明である。そこで、*E. corrodens* の溶血メカニズムを解明する一環として、*HlyA* の溶血因子としての性質を調べた。まず、温度や培養時間が本菌の溶血に及ぼす影響を調べた。その結果、37°Cで最も高い活性を示した。また、野生株と *ΔluxS* 株 (クオラムセンシングのシグナルであるオートインデューサーを合成できない株) を比較したところ、培養後18時間から24時間で活性の上昇が見られたが *ΔluxS* 株では培養時間による溶血活性の変化はなかった。次に、鉄濃度やシステイン濃度が溶血に及ぼす影響を調べた。鉄欠乏時に溶血活性の上昇が見られたことから、本菌は鉄の欠乏時に溶血活性を誘導することにより、鉄の獲得に努める可能性が示唆された。さらに、培養液やアッセイ系にシステインを添加したところ、溶血活性の上昇が見られた。

## P1-021

## 入院患者由来腸球菌の抗菌薬感受性および薬剤耐性遺伝子の解析

○藤井 愛弓<sup>1,2</sup>, 松尾 美樹<sup>1</sup>, 増田 加奈子<sup>1</sup>, 久恒 順三<sup>3</sup>, 田寺 加代子<sup>4</sup>, 櫻山 誠也<sup>4</sup>, 横崎 典哉<sup>4</sup>, 相川 友直<sup>2</sup>, 大毛 宏喜<sup>5</sup>, 小松澤 均<sup>1</sup> (1)広島大・医系科学研究科・細菌, (2)広島大・医系科学研究科・口腔外科, (3)国立感染症・薬剤耐性研究センター, (4)広島大病院・検査部, (5)広島大病院・感染症科)

## Analysis of antimicrobial susceptibility and drug resistance genes of Enterococci

○Ayumi Fujii<sup>1,2</sup>, Miki Matsuo<sup>1</sup>, Kanako Masuda<sup>1</sup>, Junzo Hisatsune<sup>3</sup>, Kayoko Tadera<sup>4</sup>, Seiya Kashiya<sup>4</sup>, Michiya Yokozaki<sup>4</sup>, Tomonao Aikawa<sup>2</sup>, Hiroki Ohge<sup>5</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (3)Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Institute of Infectious Diseases, (4)Div. Lab. Med., Hiroshima Univ. Hosp., (5)Dept. Infect. Dis., Hiroshima Univ. Hosp.)

【目的】腸球菌はヒト常在菌であるが、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は術後感染症などの日和見感染症を起こし、重篤化することがある。近年、VRE は日本において増加傾向を示し、院内感染対策においてさらに注意が必要である。そこで、潜在的な VRE の存在を検討するため、当院で一定期間分離された腸球菌の菌種、薬剤感受性、バンコマイシン耐性遺伝子の有無について明らかにする。

【方法】2021 年 4~6 月の広島大学病院における入院患者を対象に、臨床検査部門にて分離した腸球菌 170 株について、TOF-MS 法による菌種同定、薬剤感受性試験、NGS 解析等を行った。NGS データに基づき、バンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA-vanC* など) を含む耐性遺伝子の探索を行った。

【結果、考察】同定した腸球菌 170 株のうち *E. faecalis*/81 株と最も多く、*E. faecium*/53 株、*E. avium*/12 株、*E. raffinosus*/11 株、*E. casseliflavus*/10 株、*E. gallinarum*/2 株、*E. malodoratus*/1 株であった。*vanA* 遺伝子の検出は他施設において VRE 陽性と判明している患者からの *E. faecium* 1 株のみであった。また、*E. casseliflavus* 9 株と *E. gallinarum* 2 株は *vanC* 遺伝子を保有していた。胆汁、便、中間尿からの分離が特に多く認められたが、菌種と分離部位について明らかな相関は認めなかった。NGS 解析の結果、テトラサイクリン耐性遺伝子 *tet (M)* を持つ菌株が最も多く、リンコマイシン耐性遺伝子 *lsa (A)* が続き、多くの菌株において何らかの薬剤耐性遺伝子を保有していることが確認された。また薬剤感受性試験の結果、腸球菌の菌種・菌株により各抗生薬の感受性は異なっていた。今回の分離株ではダプトマイシンとリネゾリドに耐性を持つ菌株は認めなかった。

## P1-022

## 鼻腔・口腔内からの薬剤耐性菌の分離および性状解析

○川柳 智暉<sup>1,2</sup>, 松尾 美樹<sup>1</sup>, Mi Nguyen Tra Le<sup>1</sup>, 竹下 徹<sup>3</sup>, 久恒 順三<sup>5</sup>, 下 知<sup>4</sup>, 野村 良太<sup>4</sup>, 柴 秀樹<sup>2</sup>, 菅井 基行<sup>5</sup>, 小松澤 均<sup>1</sup> (1)広島大・医系科学研究科・細菌, (2)広島大・医系科学研究科・歯髄生物, (3)九州大・歯学研究院・口腔予防医学, (4)広島大・医系科学研究科・小児歯科, (5)国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

## Isolation and characterization of drug-resistant bacteria from nasal and oral cavities

○Tomoki Kawayanagi<sup>1,2</sup>, Miki Matsuo<sup>1</sup>, Mi Nguyen Tra Le<sup>1</sup>, Toru Takeshita<sup>3</sup>, Junzo Hisatsune<sup>5</sup>, Satoru Kusaka<sup>4</sup>, Ryota Nomura<sup>4</sup>, Hideki Shiba<sup>2</sup>, Motoyuki Sugai<sup>5</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Biological Endodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (3)Sec. Preventive & Public Health Dentist., Div. Oral Health., Growth and Develop., Fac. Dent. Sci., Kyushu Univ., (4)Dept. Pediatric Dentist., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (5)Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Institute of Infectious Diseases)

【目的】薬剤耐性菌の問題は世界的な公衆衛生上の脅威であり、動向調査と対策が重要である。本研究では鼻腔・口腔から薬剤耐性菌を分離し、性状解析および患者情報との関連性を解析することで、鼻腔・口腔での薬剤耐性菌の現状を把握する。【方法】広島大学病院歯科外来を受診した 50 歳以上の対象者から、口腔粘膜・舌および鼻腔粘膜より検体を採取した。採取した試料を種々の選択培地で培養後、*Staphylococcus aureus* (以下 Sa) および第三世代セファロスポリン/カルバペネム耐性グラム陰性菌を分離した。Sa では PCR 法を用いた *mecA* 遺伝子検出により、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の同定、グラム陰性菌では TOF-MS による菌種の同定と PCR 法により ESBL 遺伝子の同定を行った。さらに、被験者の年齢や性別、既往歴、口腔健康状態等の情報について統計解析を行い、薬剤耐性菌の定着に関与または阻害する因子を検討した。【結果と考察】480 名の患者から検体を採取し、Sa は鼻腔から 115 名、口腔からは 87 名分離され、全体として 157 名 (32.7%) から分離された。その内 48 名 (10.0%) で MRSA を認めた。グラム陰性耐性菌では 93 名 (19.4%) から耐性菌が分離された。鼻腔からの分離は 8 名、口腔からの分離は 90 名で、ほとんどが口腔からの分離であった。また ESBL 産生菌保有者は 8 名認めた。薬剤耐性菌保有と患者情報との統計解析では、残存歯数の減少と口腔での薬剤耐性菌保有に有意差を認め、歯周病やう蝕等の進行が薬剤耐性菌の定着に関与している可能性が示唆された。

## P1-023

国内の家畜における *Escherichia fergusonii* の浸潤状況調査および分離株の性状解析

○桃木 杏奈<sup>1</sup>, 玉村 雪乃<sup>1</sup>, 新井 暢夫<sup>1</sup>, 岩田 剛敏<sup>1</sup>, 渡部 綾子<sup>1</sup>, 楠本 正博<sup>1,2</sup> (1)農研機構・動衛研, (2)大阪公立大・獣医)

Prevalence and characterization of *Escherichia fergusonii* isolated from farm animals in Japan

○Anna Momoki<sup>1</sup>, Yukino Tamamura<sup>1</sup>, Nobuo Arai<sup>1</sup>, Taketoshi Iwata<sup>1</sup>, Ayako Watanabe<sup>1</sup>, Masahiro Kusumoto<sup>1,2</sup> (1)Nat. Inst. Anim. Health, NARO., (2)Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ.)

【背景・目的】*Escherichia fergusonii* は 1985 年に新菌種として提唱された細菌であり、他の *Escherichia* 属の中では大腸菌に最も近縁である。*E. fergusonii* において大腸菌と類似したプラスミドを保有する株が報告されていることから、本菌が大腸菌と同様に病原因子や薬剤耐性を獲得し、動物やヒトに健康被害を及ぼす可能性が懸念される。本研究では、国内の家畜における *E. fergusonii* の浸潤状況およびその性状を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】2019 年~2021 年に国内で収集された家畜の糞便 1,705 検体 (牛由来 780 検体, 豚由来 631 検体, 鶏由来 294 検体) を増菌培養後、*E. fergusonii* 特異的な PCR で陽性となった増菌培養液を選択培地に接種して一晚培養した。糖分解能や酵素活性を指標に選抜したコロニーについて、生化学性状試験により菌種を同定した。*E. fergusonii* 分離株について、PCR により病原性大腸菌が保有する毒素および付着因子の遺伝子を検索し、ディスク拡散法により薬剤感受性試験を実施した。

【結果・考察】牛 126 検体 (16.2%)、豚 197 検体 (31.2%)、鶏 126 検体 (42.9%) から合計 468 株の *E. fergusonii* を分離した。鶏由来 28 株 (20.3%) が LT 陽性、豚由来 4 株 (2.0%) および鶏由来 2 株 (1.4%) が EAST1 陽性であり、病原因子を保有する *E. fergusonii* が家畜に潜在していることが明らかになった。また、牛、豚、鶏由来株の薬剤耐性傾向は、各家畜由来大腸菌 (農水省 JVARM データ) と類似しており、家畜における抗菌剤使用状況を反映していると考えられた。以上より、家畜の *E. fergusonii* 保有率は大腸菌ほど高くないが、病原性および薬剤耐性の観点から本菌の浸潤には今後も注意が必要がある。

## P1-024/W3-6

## MALDI 法を用いた質量分析による O 抗原の迅速同定

○浦上 彰吾, 比能 洋 (北大・生命科学)

## O antigen identification by MALDI-MS

○Shogo Urakami, Hiroshi Hinou (Grad. Sch. Life. Sci., Hokkaido Univ.)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI 法) による質量分析は生体高分子を測定する手法として開発された。ここ十年、MALDI 法による微生物の菌種同定法が開発され、迅速さと簡便さから世界中の臨床現場において普及している。この手法はワンチューブ内の簡単な操作を行うことで、菌種同定に必要なマススペクトルを迅速に検出することが出来る。しかし、現在活用されている菌種同定法はリポソームタンパク質を標的とした測定法であり、血清型の同定は困難である。血清型は同一種内を区別するとき利用され、集団感染時に感染源を特定するための疫学調査に活用される。血清型の中でも特にグラム陰性菌の O 抗原は多様な構造を有し、血清型同定における重要な標的となっている。従来の O 抗原の同定では、抗原抗体反応や生化学実験、PCR 法などが用いられており、これらの手法はそれぞれの型に対応した試薬を事前に準備しスクリーニングすることで同定に繋がる。しかし、O 抗原は多様性を有するが故に、その絞り込み操作は極めて煩雑となる。疫学調査の遅れに伴い感染拡大へと繋がる可能性が高く、迅速性と正確性を有する O 抗原同定法の開発が求められる。本研究では、カラムや HILIC などの煩雑な分離操作を行うことなく、大腸菌の菌株から 1 時間以内に O 抗原を同定する手法を開発した。複数の菌株が混合した寒天培地から、それぞれのコロニーが有する O 抗原の同定が可能となった。また、本手法は従来法と組み合わせることにより、1 コロニーから種の同定と O 抗原の同定、その両方が実施可能であることを実証した。

## P1-025/W3-7

### CRISPR-Cas12a を用いた多剤耐性アシネトバクターのカルバペネマーゼ遺伝子検査

○古賀美沙希<sup>1</sup>, 西田 智<sup>1</sup>, 永川 茂<sup>1</sup>, 上田 たかね<sup>1</sup>, 佐藤 義則<sup>1</sup>, 斧 康雄<sup>1,2</sup>, 吉野 友祐<sup>1</sup> (<sup>1</sup>帝京大・医・微生物, <sup>2</sup>帝京平成大・健康メディカル)

### CRISPR-Cas12a system for carbapenemase gene detection of multidrug-resistant *Acinetobacter*

○Misaki Koga<sup>1</sup>, Satoshi Nishida<sup>1</sup>, Shigeru Nagakawa<sup>1</sup>, Takane Ueda<sup>1</sup>, Yoshinori Sato<sup>1</sup>, Yasuo Ono<sup>1,2</sup>, Yusuke Yoshino<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., <sup>2</sup>Fac. Health. Med. Sci. Teikyo Heisei Univ.)

【目的】カルバペネマーゼ産生アシネトバクター (CRAB) は、しばしば多剤耐性を獲得して MDRA となり、コリスチンやチゲサイクリンなど利用可能な治療薬の選択肢に限られる。そのため予後が悪く、特に ICU における日和見感染を多く引き起こすため重大な問題となっている。本研究では、カルバペネマーゼ遺伝子のうち *bla*<sub>OXA-23</sub> に焦点を当て、DETECTR 法により迅速で簡便な検出法を確立することを目的とした。

【方法】*bla*<sub>OXA-23</sub> は PCR 法により増幅した。検出には CRISPR-Cas12a を利用した DETECTR 法を用いた。臨床分離株として *bla*<sub>OXA-23</sub> 産生 CRAB を 2 株、*bla*<sub>OXA-23</sub> 非産生 CRAB を 9 株用いた。

【結果】*bla*<sub>OXA-23</sub> をターゲットとした PCR 増幅で得られたアンプリコンに、ガイド RNA, Cas12a, 蛍光 ssDNA プローブを加え 37°C で反応を行ったところ、コラテラル ssDNase 活性により反応時間依存的に蛍光が検出できた。また、アンプリコンの用量依存的な蛍光増強も見られた。この蛍光は PCR 法によって増幅されたアンプリコンを用いることで 1 分以内に検出できた。陰性コントロールでは検出されなかった。

【考察】PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出には電気泳動やリアルタイム PCR 装置を要するが、DETECTR 法を用いることで、より簡便な蛍光検出による測定系を確立することができた。また、蛍光の検出にかかる時間が 1 分以内と短いため、検査効率をあげることができると考えられる。今後、本法に従ってガイド RNA をオーダーメイドすることにより多様な耐性遺伝子を検出できることが期待される。

## P1-026/W3-2

### 下水中病原微生物 DNA・RNA の高感度・高スループット検出法 (COPMAN 法) の開発

○片山 夕花<sup>1</sup>, 早瀬 晋<sup>1</sup>, 安藤 良徳<sup>1</sup>, 黒板 智博<sup>1,2</sup>, 岡田 和也<sup>1</sup>, 岩本 遼<sup>1,2</sup>, 柳本 徹<sup>1</sup>, 奥田 智彦<sup>1</sup>, 北島 正章<sup>3</sup>, 真砂 有作<sup>1</sup> (<sup>1</sup>塩野義製薬株式会社, <sup>2</sup>株式会社 AdvanSentinel, <sup>3</sup>北大院・工)

### COPMAN: A method for automated and sensitive detection of DNA/RNA of various pathogens in wastewater

○Yuka Katayama<sup>1</sup>, Shin Hayase<sup>1</sup>, Yoshinori Ando<sup>1</sup>, Tomohiro Kuroita<sup>1,2</sup>, Kazuya Okada<sup>1</sup>, Ryo Iwamoto<sup>1,2</sup>, Toru Yanagimoto<sup>1</sup>, Tomohiko Okuda<sup>1</sup>, Masaaki Kitajima<sup>3</sup>, Yusaku Masago<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shionogi & Co., Ltd., <sup>2</sup>AdvanSentinel Inc., <sup>3</sup>Fac. Eng., Hokkaido Univ.)

下水疫学調査 (WBE) は、下水中に存在する病原体を検出することで市中の感染動向を効率的に把握する手法である。しかし、既存手法には病原体の検出感度およびスループット性の向上、様々な病原体に対する汎用性の改善等の課題があった。本研究では、WBE の社会実装に向けこれらの課題を解決可能な COPMAN 法 (COagulation and Proteolysis method using MAgnetic beads for detection of Nucleic acids in wastewater) を開発した。まず、自動化可能な高感度核酸検出系を新規に構築した。3 つの工程 (凝集剤を用いた下水中微生物濃縮、磁性ビーズによる核酸抽出、および阻害物質耐性酵素を用いた (RT-前増幅) qPCR) を組み合わせることで、汎用ロボットで操作可能かつ高感度に下水中微生物核酸を検出可能であった。構築した COPMAN 法を既存手法 (PEG 沈殿-qPCR 法, 限外ろ過-qPCR 法, EPISSENS-S 法) と比較するために、下水中に段階希釈した SARS-CoV-2 を添加および検出した結果、COPMAN が 4 手法の中で最も低い濃度まで検出することができた。続いて、特性の異なる 10 種類の微生物の都市下水からの検出効率を既存の RNA/DNA 抽出法 (AllPrep PowerViral DNA/RNA Kit 使用) と比較した結果、COPMAN は既存法よりウイルス RNA (PMMoV) を 39-97 倍、グラム陽性細菌 DNA (Lachnospiraceae 16S rRNA 遺伝子) を 7.7-13 倍、および真菌 DNA (*Candida albicans*) を 34-894 倍の濃度で検出し、実際の下水疫学調査でも COPMAN が非常に有効な下水中核酸検出系であることを示した。COPMAN は高感度・自動化・幅広いターゲットの検出が可能な手法として、WBE の社会実装に大きく貢献することが期待される。

## P1-027

### ヘリコバクター・スイスとヘリコバクター・ピロリ感染の世界初の同時診断

○松井 英則<sup>1,2</sup>, 林原 絵美子<sup>1</sup>, 青木 沙恵<sup>1</sup>, 柴山 恵吾<sup>2</sup>, 鈴木 仁人<sup>3</sup> (<sup>1</sup>国立感染症研究所・細菌第二部, <sup>2</sup>名古屋大学・医学部・分子病原細菌学, <sup>3</sup>国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

### The world's first simultaneous diagnostic approach of *H. suis* and *H. pylori* infection

○Hidenori Matsui<sup>1,2</sup>, Emiko Rimbara<sup>1</sup>, Sae Aoki<sup>1</sup>, Keigo Shibayama<sup>2</sup>, Masato Suzuki<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases (NIID), <sup>2</sup>Dept. Bacteriology, Nagoya Univ. Grad. Sch. Medicine, <sup>3</sup>Antimicrobial Research Center, National Institute of Infectious Diseases (NIID))

*Helicobacter suis* hosted by hogs is the most-prevalent gastric non-*H. pylori Helicobacter* species (NHPH) found in humans with gastric diseases such as MALT lymphoma. The infection period and route of *H. suis* from hogs remain unclear. There is no reliable diagnostic method for *H. suis* infection in clinical practice. As the post-*H. pylori* eradication era began in Japan, a possible runup of the *H. suis* infection rate already may have induced many gastric diseases that cannot be ignored. We developed an ELISA for simultaneously diagnosing *H. suis* and *H. pylori* infection. In this study, *Helicobacter* infections were diagnosed by using routine methods, PCR, culture, genome analysis, microscopy, and ELISA for detecting NHPH and *H. pylori* infection. The ELISA showed 100% sensitivity for detecting *H. suis* infection. We proved that all *H. suis* isolates have more than 99% ANI values against the *H. suis* type strain. Except for *H. suis*, other NHPH and mixed infection were not identified in this study. The phylogenetic tree was constructed using the core gene alignments of *H. suis* strains from humans and hogs, which elucidated the infection route of *H. suis*. We also confirmed the time-dependent decline of anti-*H. suis* antibody titers after eradication. We are now conducting a large-scale epidemiological investigation concerning NHPH infections.

## P1-028

### Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay 法を用いた、メタロ βラクタマーゼ遺伝子の迅速同定法

○酒井 純<sup>1</sup>, 飯島 孝太<sup>2</sup>, 金森 大<sup>2</sup>, 中村 昭博<sup>2</sup>, 荻原 孝<sup>2</sup>, 星野 倫範<sup>2</sup>, 前崎 繁文<sup>1</sup>, 関みつ子<sup>2</sup> (<sup>1</sup>埼玉医科大学病院・感染症科・感染制御科, <sup>2</sup>明海大学・小児歯科学)

### A new rapid method: Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for detecting metallo β lactamase

○Jun Sakai<sup>1</sup>, Takahiro Iijima<sup>2</sup>, Dai Kanamori<sup>2</sup>, Akihiro Nakamura<sup>2</sup>, Takashi Ogihara<sup>2</sup>, Tomonori Hoshino<sup>2</sup>, Shigefumi Maesaki<sup>1</sup>, Mitsuko Seki<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. and Infect. Cont., Saitama Med. Univ. Hosp., <sup>2</sup>Dept. Dent. pharm., Meikai Univ.)

Nosocomial infections caused by β-lactamase-producing strains are of growing concern globally. Rapid evaluation of antimicrobial susceptibility is important in the treatment of nosocomial infections by Gram-negative bacteria, which increasingly carry carbapenemases and metallo-β-lactamases. We developed loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assays for four β-lactamase genes (*bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub>). The assays were evaluated using eight reference bacterial strains (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter bereziniae*) harboring six β-lactamase genes. A total of 55 Gram-negative bacterial strains, including 47 clinical *P. aeruginosa* isolates, fully characterized by next-generation sequencing (NGS), were used to evaluate the LAMP assays. The results were compared to those of conventional PCR. The LAMP assays were able to detect 10 to 100 copies of a gene, as the same as conventional PCR. The LAMP assay detected four β-lactamase genes with a sensitivity like that using purified DNA as the template in DNA-spiked urine, sputum, and blood specimens. By contrast, the sensitivity of PCR was 1- to 100-fold lower with DNA-spiked clinical specimens. Therefore, the LAMP assays were proved to be an appropriate tool for the detection of four β-lactamases.

## P1-029

## 感染症における呼吸オミックス解析

○緒方 星陵<sup>1</sup>, 井田 智章<sup>1</sup>, 守田 匡伸<sup>1</sup>, 松永 哲郎<sup>1</sup>, 村上 昌平<sup>2</sup>, 魏 范研<sup>3</sup>, 本橋 ぼつみ<sup>2</sup>, 赤池 孝章<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院・医・環境医学, <sup>2</sup>東北大・加齢医学・遺伝子発現制御, <sup>3</sup>東北大・加齢医学・モドミクス医学)

## Breath omics for infectious diseases

○Seiryu Ogata<sup>1</sup>, Tomoaki Ida<sup>1</sup>, Masanobu Morita<sup>1</sup>, Tetsuro Matsunaga<sup>1</sup>, Shohei Murakami<sup>2</sup>, Fan-Yan Wei<sup>3</sup>, Hozumi Motohashi<sup>2</sup>, Takaaki Akaike<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., <sup>2</sup>Dept. Gene Exp. Regul., IDAC, Tohoku Univ., <sup>3</sup>Dept. Modomics Biol. Med., IDAC, Tohoku Univ.)

【背景】新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、呼吸エアロゾルにより伝播することが知られており、呼吸エアロゾルを用いた迅速かつ高感度・高精度な検査法の確立は喫緊の課題である。呼吸は、無接触・無侵襲に採取が可能であり、呼吸凝集液を対象とした「呼吸オミックス」は新規疾患診断法として注目されている。そこで本研究では、SARS-CoV-2 感染患者と動物モデルの呼吸凝集液を用いて、ウイルス検出および感染に伴う宿主由来代謝物変動について明らかにすることを目的とした。【方法・結果】SARS-CoV-2 感染患者から回収した呼吸凝集液を用いて、SARS-CoV-2 の PCR およびプロテオーム解析を行った結果、両手法でウイルスが検出された。また、呼吸条件の違いが呼吸凝集液中のウイルス量に与える影響を検討した結果、深呼吸と比較して発声条件では、より多くのウイルスが検出された。さらに、患者から回収した呼吸凝集液の硫黄代謝物解析の結果、健康人と比較し、複数の硫黄代謝物の量が変動していた。一方、動物モデルの解析では、シリアンハムスターを入れたボックス内の空気をポンプにより吸引し、回収した空気を急速冷却することで、呼吸凝集液の回収法を新規に構築した。本手法を用いて、SARS-CoV-2 感染ハムスターの呼吸凝集液の解析を行った結果、ヒトと同様に、PCR とプロテオーム解析の両方でウイルスが検出されるとともに、複数の硫黄代謝物の量が変動していることが示された。【結論】本研究から、呼吸オミックスは、SARS-CoV-2 の感染診断に有用であることが示唆された。本手法は、今後、感染のみならず、インフルエンザや結核、病原細菌などの感染症における先進的な医療技術となることが期待される。

## P1-030

## 野生型結核菌抗原を用いた抗体検出による活動性結核の診断と発症予測法の検討

○山崎 智也<sup>1</sup>, 石川 智史<sup>1,2</sup>, 田村 敏生<sup>3</sup>, 塚本 裕美子<sup>3</sup>, Desak Nyoman<sup>1</sup>, 吉田 豊<sup>1</sup>, 尾関 百合子<sup>1</sup>, 西山 晃史<sup>1</sup>, 立石 善隆<sup>1</sup>, 松本 壮吉<sup>1</sup> (<sup>1</sup>新潟大院・医学総合・細菌, <sup>2</sup>福山市立動物園, <sup>3</sup>感染研・ハンセン病研究センター)

## Diagnosis of tuberculosis and prediction of onset by antibody detection using native antigen

○Tomoya Yamazaki<sup>1</sup>, Satoshi Ishikawa<sup>1,2</sup>, Toshiki Tamura<sup>3</sup>, Yumiko Tsukamoto<sup>3</sup>, Desak Nyoman<sup>1</sup>, Yutaka Yoshida<sup>1</sup>, Yuriko Ozeki<sup>1</sup>, Akihito Nishiyama<sup>1</sup>, Yoshitaka Tateishi<sup>1</sup>, Sohkiichi Matsumoto<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., <sup>2</sup>Fukuyama Zoo, <sup>3</sup>Leprosy Research Center, NIID)

現在世界人口の約 4 分の 1 とされる膨大な結核菌の無症候感染者を治療することは困難である。そのため、無症候感染者の中で発症の可能性が高い者に絞って治療を行うことが望ましい。しかし、従来の結核菌の感染診断は病勢と相関せず、無症候感染からの発症を診断できない。我々は以前の研究において、結核発症前の患者において結核菌抗原に対する抗体価が上昇していることを報告した。また、結核を発症したゾウの血清抗体価測定により、結核菌抗原 Antigen85B (Ag85B) の抗体価が結核の発症予測につながることを示した。本研究では、Ag85B をはじめとする結核菌抗原に対する抗体検出による診断の確立を目指し、その有用性を評価するとともに無症候感染からの発症予測能を検証する。我々は Ag85B を組換え大腸菌および野生型結核菌より精製し、その抗原に対するヒトおよびマウスの血清抗体価を測定した。結核菌精製抗原に対する抗体価は大腸菌精製抗原に対する抗体価よりも高い値を示した。したがって、血清診断には結核菌精製抗原の使用が適すと示唆された。今後は大腸菌精製抗原と野生型結核菌精製抗原の違いを明らかにするとともに、簡便に野生型結核菌から抗原を精製する方法を確立し、診断への応用を検証する。そして、Ag85B に蛍光蛋白質を付加した組換え抗原を発現する結核菌を用いた発現解析を行った。宿主体内における菌数の増加と比例して Ag85B の発現量は増加し、発症前の抗体価の上昇につながることを示唆された。今後は無症候感染から発症に伴って発現の増加する Ag85B と病原性との関係、潜在期から増殖期への移行時における発現解析などが課題となる。(非会員共同研究者 井内絵里奈, 萩野公香)

## P1-031

## 腸管侵入性大腸菌と赤痢菌を鑑別するリアルタイム PCR 法の開発とその評価

○磯部 順子<sup>1</sup>, 木全 恵子<sup>1</sup>, 金谷 潤一<sup>1</sup>, 伊豫田 淳<sup>2</sup>, 大石 和徳<sup>1</sup> (<sup>1</sup>富山衛研・細菌, <sup>2</sup>感染研・細菌)

Development of a real-time PCR assay discriminating EIEC from *Shigella* spp., and its evaluation

○Junko Isobe<sup>1</sup>, Keiko Kimata<sup>1</sup>, Jun-ichi Kanatani<sup>1</sup>, Sunao Iyoda<sup>2</sup>, Kazunori Oishi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health, <sup>2</sup>Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis)

【目的】細菌性赤痢は三類感染症で赤痢菌の迅速な同定が求められる。その中で腸管侵入性大腸菌 (EIEC) との鑑別が重要になる。そこで、赤痢菌と EIEC を鑑別するリアルタイム (RT-) PCR 法の開発を試みた。

【方法】供試菌株は EIEC37 株、赤痢菌 19 株を用いた。Sabat ら (AEM, 2000) が報告した大腸菌特異的な 16S rRNA 配列と ipaH を同時に検出する RT-PCR を設計した。PCR の結果が[++]を EIEC, [-+]を赤痢菌とした。Multilocus Sequence Typing (MLST) を実施し、7 遺伝子の連結した配列を用いて系統樹を作成した。系統発生群解析は Clermont らの方法に準じた。

【結果】PCR の結果は、EIEC では、[++] 26 株, [-+]2 株, [+]-8 株, [-]-1 株、赤痢菌では[-+]19 株 (100%) であった。MLST による系統樹では、EIEC の ipaH 陰性[+] 8 株のうち 6 株が同一のクラスターに集積した。系統発生群解析では、赤痢菌では A 型が 84% を占め、EIEC 株は、A 型 (46%) が最も多く、B1, D, E, F 型と続き、多様であった。

【考察】EIEC と判定できなかった 11 株のうち 6 株は独自の同一クラスターを形成し、遺伝的背景との関連が示唆された。今回の RT-PCR 法を用いた EIEC の判定は系統関係に依存しており、利用する上で注意が必要である。

【謝辞】供試株一部提供: 吉野修司 (宮崎県), 緒方喜久代 (大分県), 岩出義人 (三重県) 八柳潤 (秋田県) (会員外協力者: 綿引正則, 原田哲也, 小坂真紀, 前西絵美)

## P1-032/W3-3

## Longitudinal alterations of the gut microbiota and mycobiota on COVID-19 severity

○元岡 大祐<sup>1</sup>, 前田 悠<sup>2,3</sup>, 沖 大也<sup>1</sup>, 田中 健太郎<sup>1</sup>, 猪頭 英里<sup>3</sup>, 平田 晴彦<sup>3</sup>, 木田 博<sup>4</sup>, 熊ノ郷 淳<sup>3</sup>, 中村 昇太<sup>1</sup>, 竹田 潔<sup>2</sup> (<sup>1</sup>阪大・微研・感染症メタゲノム, <sup>2</sup>阪大・医・免疫制御, <sup>3</sup>阪大・医・呼吸器内科, <sup>4</sup>大阪刀根山医療センター)

○Daisuke Motooka<sup>1</sup>, Yuichi Maeda<sup>2,3</sup>, Hiroya Oki<sup>1</sup>, Kentaro Tanaka<sup>1</sup>, Eri Igashira<sup>3</sup>, Haruhiko Hirata<sup>3</sup>, Hiroshi Kida<sup>4</sup>, Atsushi Kumanogoh<sup>3</sup>, Shota Nakamura<sup>1</sup>, Kiyoshi Takeda<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Metagenomics, RIMD, Osaka Univ., <sup>2</sup>Lab. Immune Regulation, Grad. Sch. Medicine, Osaka Univ., <sup>3</sup>Dept. Resp. Med., Grad. Sch. Medicine, Osaka Univ., <sup>4</sup>National Hospital Organization Osaka Toneyama Medical Center)

我々の常在細菌叢は、遺伝的背景、食事などの生活環境や免疫機能などと密接に関わっていることがわかっており、宿主免疫系や様々な疾患との関連に対する研究が急速に進んできている。我々は、常在細菌叢の獲得・消失過程と健康状態との関連に注目しており、腸内のみならず、鼻腔、口腔、皮膚や各種消化管部位についての細菌叢解析を行ってきた。一方、腸内には細菌のみならず、多様な真菌も存在している。その絶対数は腸内全微生物の約 0.1% と非常に少ないが、アレルギー性疾患や自己免疫疾患と関与していることが報告されている。それ故、種々の疾患と常在微生物の関係を明らかにする上では、腸内細菌のみならず、腸内真菌叢の役割も重要であると考えられる。今回、我々は COVID-19 重症度と腸内細菌および真菌叢の関係性について解析を行った。本研究では、COVID-19 の重症・軽症患者および健康者を対象に、腸内細菌叢、真菌叢とその相関について解析した。その結果、重症群および軽症群の真菌群は健康群に比べ多様性が低く、一部では単一の真菌種である *Candida albicans* に専有された特徴的なパターンが検出された。細菌の多様性は重症群では低いことが確認されたが、軽症群と健康群との間には検出されなかった。重症群の細菌叢では、*Enterococcus* と *Lactobacillus* が増加し、*Faecalibacterium* や *Bacteroides* が減少していることが特徴的であった。細菌と真菌の相関解析では、*Candida albicans* が *Enterococcus* と正の相関を示した。また回復後の変化を観察するために回復 6 ヶ月後のフォローアップ解析も行った。その結果、重症患者は回復後 6 ヶ月を経過してもなお、細菌叢が元に戻っていないことがわかった。

## P1-033

### 病原細菌同定のための表現系検査法の継承と提供の重要性

○田中 美智男, 服部 裕美, 飯田 哲也 (大阪大・微研・感染症国際研究センター・病原微生物資源室)

### Importance of succession and provision of phenotypic test methods for identification of pathogen

○Michio Tanaka, Yumi Hattori, Tetsuya Iida (Pathogenic Microbes Repository Unit, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

病原細菌の生物学的・生化学的性状といった表現系性状は試験菌の基本的性質を示す情報として重要であるが、基準株との相違を標準化法に則って比較し、正しく管理された装置と環境で検査して性状を決定する必要がある。近年、臨床微生物検査室における病原細菌の同定検査法は表現系検査法から質量分析法や遺伝子検査法に変わりつつある。試薬類の保持管理の厳格化や効率化を重視した業務の定型化も進んでいることから培養検査や検査試薬の自家調製など手間と時間を要する表現系検査法が実施困難な状況にある。

当資源室では寄託された病原細菌株の表現系性状を試験管法など標準化法に則り検査するとともに、必要に応じて毒素検査、型別検査あるいは顕微鏡観察や特異遺伝子の塩基配列解析などを行っている。特に遅発性 *Mycobacterium* spp. や *Leptospira* spp. など継代培養や判定に時間を要する菌株では性状検査に手間がかかるが寄託株の成績が症例報告や新菌種提案論文の基本性状として利用されている。

既存の性状検査技術を継承し、論文化に堪えうる質の高い検査成績を提供し、病原細菌を安全に長期間保存する施設が広く細菌学研究機関および臨床微生物検査室に認知され利用されることは病原細菌学の発展に寄与すると思われる。病原細菌を見いだす検査室と基礎研究機関を結び病原細菌学の基盤を支える表現系性状リファレンスセンターを目指す当資源室の取り組みを報告する。

## P1-034

### Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Salmonella* spp. from canals of Thailand

○Jirachaya Toying<sup>1</sup>, Fuangfa Utrarachki<sup>2</sup>, Neunghatai Supha<sup>2</sup>, Yuwanda Thongpanich<sup>2</sup>, 中島千絵<sup>1,3</sup>, 鈴木定彦<sup>1,3</sup> (1)北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・バイオリソース部門, (2)Dept. Microbiol., Fac. Publ. Health. Mahidol Univ., (3)北海道大学・国際連携研究教育局)

○Jirachaya Toying<sup>1</sup>, Fuangfa Utrarachki<sup>2</sup>, Neunghatai Supha<sup>2</sup>, Yuwanda Thongpanich<sup>2</sup>, Chie Nakajima<sup>1,3</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1,3</sup> (1)Div. Biores., Hokkaido Univ. Int. Inst. Zoonosis Contr., (2)Dept. Microbiol., Fac. Publ. Health. Mahidol Univ., (3)Glob. Inst. Col. Res. Edu., Hokkaido Univ.)

**Introduction:** The presence of plasmid-mediated antimicrobial resistance (AMR) genes in *Salmonella* spp. inhabiting canals is a crucial public health threat, especially in Bangkok, where canals serve as consumption resources for agriculture and daily use. **Objectives:** To examine the prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) determinants in *Salmonella* isolated from canal water in Bangkok, Thailand. **Materials & Methods:** 336 water samples were collected between 2016 and 2020 from 6 canals in Bangkok, Thailand. *Salmonella* spp. was isolated by bacterial culture, and PMQR genes were identified by the specific polymerase chain reactions. **Results:** 91% of water samples were positive for *Salmonella* spp. Serogroup B and serogroup C were the majority serogroups. A significant proportion (40%) of *Salmonella* isolates carried PMQR genes, predominantly *qnrS* (38%) followed by *qnrB* (2%). The prevalence of PMQR-positive *Salmonella* isolates in this study was higher than in every previous study conducted in Thailand. Moreover, *qnrC*, *qnrD*, *oqxAB*, and *aac(6)-Ib-cr* were also detected. To our knowledge, this is the first report of *qnrC* and *qnrD* in *Salmonella* spp. isolated from environmental water in Thailand. **Conclusion:** This study highlights the importance of including environmental samples in the surveillance program, which is essential for AMR problem solving in the One Health approach.

## P1-035

### 環境因子の変動に伴う土壌細菌の空気中への浮遊: 生菌回収用自作エアサンプラーによる野外調査の試み

○森 沙彩, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

### Suspension of soil bacteria in the air due to changes in environmental factors: A field work

○Saaya Mori, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

私達は3Dプリンターを用いて浮遊細菌を効率よく生け捕り可能な空気収集装置を開発し、浮遊細菌数が温度・湿度・風速と連動し変動することを発見した (Mori et al, Res Microbiol, 2021)。一方、空気中には多数の細菌が存在し、ヒトの健康への影響が考えられる。それらは床や土壌由来だが、浮遊を惹起する環境要因は明らかではない。そこで北大農場の牧草地を挟んだ2地点で空気を2021.5.31~6.28にかけて採取 (1回2時間, n=20) し、浮遊菌数を算出し、環境因子 (各採材時3点, 計n=60) は札幌管区気象台の計測値を利用) との関連性をピアソンの相関係数の検定により検証した。風向は、2地点を結ぶ両方角を最大値とした。その結果、浮遊菌数 (平均7.42CFU/m<sup>3</sup>)、現地気圧 (r=-0.263, p=0.043)、海面気圧 (r=-0.26, p=0.045) が有意に相関した。さらにRにて環境因子を2成分に圧縮した結果、第一主成分は、現地気圧0.416、海面気圧0.418、露点温度-0.406、第二成分は、湿度-0.551、風向-0.42、日照時間0.404が合成変数の主体であった。二つの合成変数より散布図を作成すると、採取日毎に群に分かれた。この結果から、浮遊菌数が気圧・日照時間の増加に伴い増加し、湿度・風向・露点温度の上昇により減少することが明らかとなった。そこで本当に土壌細菌が環境因子により空気中に浮遊しているのか確かめるため、農場内外の土壌を追加で採取し、浮遊菌と土壌から放牧家畜由来の細菌 (*M. sciuri*) の検出を試みMLST解析を行った。その結果、農場の空気と土壌からST75と近縁の *M. sciuri* が検出された。このように土壌由来の細菌は、環境因子が連動し変化することにより、空気中に巻き上げられ浮遊し移動することが確認された。

## P1-036

### 原生生物 *Paramecium* による薬剤耐性菌捕食作用の評価

○田中 佑佳<sup>1</sup>, 鶴井 実桜<sup>1</sup>, 小林 由紀<sup>1</sup>, 渡邊 健太<sup>2</sup>, 度会 雅久<sup>2</sup> (1)山口大院・医・保健, (2)山口大・共同獣医・獣医公衆衛生)

### Evaluation of predation by protists *Paramecium* on antimicrobial resistant bacteria

○Yuka Tanaka<sup>1</sup>, Mio Tsurui<sup>1</sup>, Yuki Kobayashi<sup>1</sup>, Kenta Watanabe<sup>2</sup>, Masahisa Watarai<sup>2</sup> (1)Grad. Sch. Med. Sci., Yamaguchi Univ., (2)Grad. Sch. Vet. Sci., Yamaguchi Univ.)

**【背景・目的】** 薬剤耐性菌は今や院内に限らず環境中にも拡散し、大きな問題となっている。家庭や農地、病院からの排水は下水処理場で処理されるが細菌が残存しており、その細菌が薬剤耐性遺伝子を保持していることが危惧される。殺菌処理として塩素系消毒薬や紫外線、オゾン等を使用することが可能だが、自然環境では他の生物への影響が懸念され現実的ではない。そこで本研究では、細菌の捕食者である原生生物 *Paramecium* と薬剤耐性菌 ESBL 産生菌を用い、*Paramecium* による薬剤耐性菌捕食作用の評価を行うことを目的とした。

**【方法】** 原生生物として2種の *Paramecium* を、薬剤耐性菌として3種の ESBL 産生菌を用いた。 *Paramecium* 培養液に ESBL 産生菌を培養した LB 培地を加え、25°C で培養した。一定時間培養後、培養サンプルを LB 寒天培地上に播き、37°C で一晩培養後、捕食率を算出した。 *Paramecium* の薬剤耐性菌消化部位を評価するため GFP 発現 ESBL 産生菌と LysoTracker を用いて観察を行った。 *Paramecium* 培養液に CP 耐性 *E. coli* と ESBL 産生菌を 25°C で共培養し、接合頻度を求めた。

**【結果・考察】** *Paramecium caudatum*, *Paramecium multimicronucleatum* の24時間後の ESBL 産生菌捕食率は、3種全ての ESBL 産生菌で高率を示し90%以上であった。 LysoTracker による食胞の酸性化率は、3種全ての ESBL 産生菌で *P. caudatum* が70%以上、*P. multimicronucleatum* では90%以上であり、捕食効果を認めた。

**P1-037**

食用コオロギの腸内細菌によるサルモネラ菌定着抑制の解析

○辻 秀真, 後藤 和義, 松下 治 (岡山大・院・医歯薬・病原細菌学)

**Inhibition of Salmonella colonization by intestinal bacteria in edible crickets**

○Shuma Tsuji, Kazuyoshi Gotoh, Osamu Matsushita (Dept. Microbial., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

**Objective:** For the development of a sustainable society, food production with low environmental burden is desirable. Recently, edible insects have been reevaluated as a food source with low environmental impact and excellent nutrition. However, food safety guidelines for edible insects have not been defined. In this study, we analyzed the persistence of foodborne pathogens in edible crickets.

**Methods:** An edible cricket *Gryllus bimaculatus* and *Salmonella* Enteritidis ATCC 31194 were used for colonization model. Agar block containing bacteria was ingested ad libitum for 24 hours. The digestive tract was homogenized and were spread to MLCB agar. Antibiotics was used to destroy the intestinal bacteria.

**Results:** Although conventional crickets cured *Salmonella* within 2 days after bacterial inoculation, in the antimicrobial-treated group, *Salmonella* were detected at  $10^5$  cfu/g after 7 days. This suggests that intestinal commensal bacteria may inhibit *Salmonella* colonization.

**Discussion:** We suggested that intestinal dysbiosis of crickets associated with the risk of food poisoning. Because some antimicrobials pesticides are commercially available, it is possible that cricket feed is contaminated with antimicrobials. Inappropriate feeding is a concern in the rearing of edible crickets.

**P1-038****Diversity of innate fluorescent signatures in biofilm**○高部 響介<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>1,2</sup>, 八幡 穰<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>筑波大・生命環境系, <sup>2</sup>筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)○Kiyosuke Takabe<sup>1</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>1,2</sup>, Yutaka Yawata<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Microbiology Research Center for Sustainability, Univ. of Tsukuba)

Many bacteria live in the population to survive the stressful circumstance. Recent works revealed that individual cells in biofilm diversify their own phenotype even in the clonal population, resulting in a division of labor which is beneficial for the maintenance of population and bet-hedging strategy, and drug resistance. However, spatiotemporal development of such division of labor remains elusive, mainly due to the technical difficulty for tracking multiple cell types. We expected that analyzing the innate fluorescence (IF) emitted from a cell which have been known to reflect various cellular properties can overcome the limitation and identify the individual cell types in the process of division of labor. Here, we investigated changes in diversity of IF of *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm maturation and whether IF of the cell exerting specific function differ from that of the others by time lapse imaging combined with microfluidic devices. As the results, IF diversity increase with the biomass increment, indicating IF traits could be linked to cell types and quorum sensing might be involved in the division of labor. Furthermore, the cell performing a key role in development of biofilm (Extracellular polymeric substances producer) emitted the distinct IF from the others. Our results propose the new methodology, Function Imaging, without any prior gene manipulation.

**P1-039**

全長 16S rRNA 遺伝子配列解析を用いた重度歯周病患者の歯肉縁下プラークと舌苔の共有菌の解析

○馬 佳楽, 影山 伸哉, 竹下 徹, 朝川 美加季, 山下 喜久 (九大・院歯・口腔予防)

**Bacteria sharing between subgingival plaque and tongue coating from severe periodontitis patients**

○Jiale Ma, Shinya Kageyama, Toru Takeshita, Mikari Asakawa, Yoshihisa Yamashita (Sect. Prev. Public Health Dent., Grad. Sch. Dent., Kyushu Univ.)

Subgingival plaque (SUBP) and tongue coating (TC) are both anaerobic environment in the oral cavity and these two microbiotas possibly link with each other. The present study aimed to analyze the sharing of bacteria between SUBP and TC from severe periodontitis patients. SUBP and TC samples were collected from 39 severe periodontitis patients with  $\geq 20\%$  of probing sites with probing depth  $\geq 4$  mm. We determined the bacterial composition of each sample by using PacBio long-read sequencing of the full-length 16S rRNA gene and the amplicon sequence variant (ASV) approach. Principal component analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distance indicated that the bacterial compositions were significantly different between SUBP and TC ( $P < 0.001$ ). On the other hand, a median of 49 ASVs (range of 1 to 172 ASVs) were shared in SUBP and TC samples of the same patient, and they accounted for 58.8% and 16.7% median relative abundance in SUBP and TC microbiota, respectively. Interestingly, well-known periodontopathic bacteria, such as *Porphyromonas endodontalis*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra* and *Tannerella forsythia* were frequently shared. These results demonstrate the highly shared periodontopathic bacteria between SUBP and TC samples of severe periodontitis patients and suggest the importance of tongue coating cleaning during periodontal treatment and maintenance.

**P1-040****腸内細菌は便秘症を誘発する**○浜口 知成<sup>1,2,3</sup>, 宜保 憲明<sup>2</sup>, 西脇 寛<sup>1</sup>, 伊藤 美佳子<sup>1</sup>, 平山 正昭<sup>3</sup>, 大野 欽司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋大・医・神経遺伝情報学, <sup>2</sup>名古屋大・医・消化器内科学, <sup>3</sup>名古屋大・医・オミックス医療科学)**Gut microbes cause constipation**○Tomonari Hamaguchi<sup>1,2,3</sup>, Gibo Noriaki<sup>2</sup>, Hiroshi Nishiwaki<sup>1</sup>, Mikako Ito<sup>1</sup>, Masaaki Hirayama<sup>3</sup>, Kinji Ohno<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Div. Neurogenetics, Sch. Med., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Dept. Gastroenterology and Hepatology, Sch. Med., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Dept. Pathophys. Lab. Sciences, Sch. Med., Nagoya Univ.)

Constipation is generally described as having fewer than three bowel movements a week. Stools are hard and dry. Patients sometimes feel pain to pass, which has considerable impact on quality of life. In this study, we search for the causality between microbiota and constipation. We collect feces both from 223 Parkinson's patients and 52 chronic idiopathic constipation patients, and these stools were subjected to 16s rRNA analysis. We found several bacteria are abundant, common in these patients. We produced gnotobiotic model mouse according to these data. And this novel gnotobiotic model mouse showed the symptom of constipation, such as dry texture and reduced number of pellets. Stools from these mice were analyzed by WGA staining, and we found reduced signal of lectin inside. We speculate that specific microbes could degrade mucin inside feces, which in turn let feces dry, and this causes chronic constipation. Here, we found specific microbe causes chronic constipation. These data could propose novel pathogen in our gut.

## P1-041

### 初回人工授精前の子宮内膜組織を用いた乳牛の低受胎に関わる子宮内細菌叢の解析

八木沢 拓也<sup>1</sup>, ○内山 淳平<sup>2</sup>, 内山 伊代<sup>2</sup>, 安藤 駿<sup>1</sup>, 市居 修<sup>3</sup>, 村上 裕信<sup>4</sup>, 松下 治<sup>2</sup>, 片桐 成二<sup>3</sup> (<sup>1</sup>北海道農産, <sup>2</sup>岡山大学, <sup>3</sup>北海道大学, <sup>4</sup>麻布大学)

### Characterization of endometrial microbiota associated with low fertility in dairy cows

Takuya Yagisawa<sup>1</sup>, ○Junpei Uchiyama<sup>2</sup>, Iyo Uchiyama<sup>2</sup>, Shun Ando<sup>1</sup>, Osamu Ichii<sup>3</sup>, Hironobu Murakami<sup>4</sup>, Osamu Matsushita<sup>2</sup>, Seiji Katagiri<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Hokkaido Agri. Mut. Aid Asso., <sup>2</sup>Okayama Univ., <sup>3</sup>Hokkaido Univ., <sup>4</sup>Azabu Univ.)

受胎率の低下に伴う繁殖成績の悪化は、酪農経営において大きな経済的損失となる。近年、原因不明の低受胎の一因として子宮内細菌叢が注目されている。本研究では、国内4カ所の農場において、初回人工授精前の乳牛69頭を使用して低受胎に関連する子宮内細菌叢を解析した。はじめに、子宮内膜組織から16S rRNA 遺伝子アンブリコンシーケンスによる菌叢データを取得し、産次数および受胎までの人工授精回数と、飼養環境（農場、給餌方法、飼養形態）と細菌叢多様性の関連性を解析した。農場、給餌方法、飼養形態によって、unweighted UniFrac 指標に有意差が認められ、産次数と人工授精回数には認められなかった。そのため、農場、給餌方法、飼養形態の因子は低受胎関連の細菌叢解析の交絡因子となる可能性が考えられた。次に、1つの農場の31頭の菌叢データを使用し、産次数と人工授精回数に関する解析を行った。細菌叢多様性を解析した結果、weighted UniFrac において人工授精回数との相関が見られた。一方、産次数と相関は見られなかった。さらに、人工授精回数に関連した Differential abundance 解析と共起ネットワーク比較を行った結果、Arcobacter 属の細菌が検出され、Arcobacter 属細菌が低受胎率に関するネットワークモジュールのハブとなる可能性が考えられた。最後に、この Arcobacter ハブモデルが他の3つの農場の低受胎の牛で適応するかを検討を行った。その結果、他の農場での適応割合は低いことが明らかとなった。以上から、ウシの子宮内細菌叢には環境因子が大きく影響し、子宮内細菌叢のネットワークモジュールが低受胎に関与する可能性がある。

## P1-042

### オゾンナノバブル水が口腔細菌叢へおよぼす影響

○藤藤 真規, 桑原 紀子, 瀧澤 智美, 泉福 英信 (日本大・松戸歯・感染免疫)

### Effect of ozone nanobubble water on oral microflora

○Masanori Saito, Noriko Shinozaki-Kuwahara, Tomomi Hashizume-Takizawa, Hidenobu Senpuku (Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent. Matsudo, Nihon Univ.)

Ozone nanobubble water (ONW) is a pink liquid with a strong bactericidal effect and has the unique property of becoming colorless and transparent when deactivated. Aspiration pneumonia has been announced as the sixth leading cause of death in the Ministry of Health, Labour and Welfare demographic statistics in 2020, and the importance of oral care has been pointed out. Therefore, we decided to develop a system to improve the oral environment by irrigating the mouthguard with ONW. Perfusion experiments were conducted once a week for three consecutive weeks. Saliva samples were collected before and after the experiment, and a comparative analysis of the bacterial flora was performed using a next-generation sequencer. Lachnospiraceae, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae, and Rhizobiales were reduced after the ONW irrigation experiment. On the other hand, Fusobacteria, and its lower taxonomic orders, Fusobacteriaceae and Fusobacteriales, increased significantly after the experiment. Bacteria that were abundant before ONW irrigation included opportunistic infection-causing bacteria and multidrug-resistant strains, which were significantly reduced by ONW. This method is expected to become a simple chairside oral care system for patients at high risk of aspiration pneumonia, such as those with oral frailty or immunodeficiency.

## P1-043

### 自己免疫性胃炎患者の胃内細菌叢解析

○大崎 敬子<sup>1</sup>, 北条 史<sup>2</sup>, 米澤 英雄<sup>3</sup>, 岡 健太郎<sup>4</sup>, 高橋 志達<sup>4</sup>, 花輪 智子<sup>1</sup>, 三戸部 治郎<sup>1</sup>, 神谷 茂<sup>1</sup> (<sup>1</sup>杏林大・医・感染症学, <sup>2</sup>杏林大・医・実験動物施設, <sup>3</sup>東京歯科大・歯・微生物, <sup>4</sup>ミヤリサン製薬・中央研究所)

### Analysis of Gastric microbiota in autoimmune gastritis patients

○Takako Osaki<sup>1</sup>, Fuhito Hojo<sup>2</sup>, Hideo Yonezawa<sup>3</sup>, Kentaro Oka<sup>4</sup>, Motomichi Takahashi<sup>4</sup>, Tomoko Hanawa<sup>1</sup>, Jiro Mitobe<sup>1</sup>, Shigeru Kamiya<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med., <sup>2</sup>Institute of Laboratory Animals, Grad. Sch. Med, Kyorin Univ., <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Tokyo Dental Col., <sup>4</sup>Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd.)

慢性胃炎は自己免疫性胃炎 (AIG) と Helicobacter pylori 感染による感染胃炎 (GI) の2つに分類されている。AIG は、抗胃壁細胞抗体の出現により胃壁細胞が消失し、胃酸 (塩酸と内因子) の分泌が低下し、胃体部を中心とした萎縮性変化が認められる。一方、GI においては、幽門前庭部を中心とした萎縮性変化が認められる。AIG に対する治療法は確立しておらず、萎縮の改善や胃酸分泌が戻ることはなく、胃癌発症率が高い疾患である。従って、AIG の病態の詳しい解析により、予後予測、治療法に有益な情報を得ることは極めて重要な課題である。本研究では、AIG の胃内細菌叢に着目し、GI の細菌叢との比較を実施した。

【方法】除菌治療を受けた自己免疫性胃炎患者と対照は除菌治療後の H. pylori 陰性既感染者とした。胃内視鏡施行時に、胃体部 (A) および前庭部 (B) から、細菌叢解析のため組織を採取した。生検組織から抽出した総 DNA は、細菌 16S rRNA V3-V4 領域を増幅し、アンブリコンシーケンス法にて解析した。QIIME2 解析および Lefse 解析を実施した。

【結果と考察】4 群間で α 多様性解析の結果、AIG-A と B はそれぞれ GI-A と B に対してシャノン (q=0.058)、シン普森インデックスでおよび (q=0.019) で有意な差 (permanova 解析) が認められた。また、Bray Curtis dastans を用いた β 多様性解析の結果、AIG-A と GI-A (q=0.0016) および AIG-B と GI-B (q=0.0011) 間で有意な差となった。今後萎縮の程度を考慮した解析を加えたい。

## P1-044

### 健康女性の唾液中の性周期依存的な Streptococcus ならびに Prevotella 属細菌の変動

○山崎 綾夏<sup>1</sup>, 小倉 康平<sup>1</sup>, 南 香奈<sup>2</sup>, 大貝 和裕<sup>3</sup>, 岡本 成史<sup>1,4</sup>, 向井 加奈恵<sup>5</sup> (<sup>1</sup>金沢大・新学術創成, <sup>2</sup>金沢大・医薬保・保・健康発達看護, <sup>3</sup>金沢大・医薬保・AIセンター, <sup>4</sup>金沢大・医薬保・保・病態検査, <sup>5</sup>金沢大・医薬保・保・臨床実践看護)

### Menstrual cycle-dependent changes of Prevotella and Streptococcus in saliva of healthy women

○Ayaka Yamazaki<sup>1</sup>, Kohei Ogura<sup>1</sup>, Kana Minami<sup>2</sup>, Kazuhiro Ogai<sup>3</sup>, Shigefumi Okamoto<sup>1,4</sup>, Kanae Mukai<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Front. Sci. Init., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Dept. Health Develop. Nurs. Inst. Med, Pharm, Health Sci., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>AI Cent., Inst. Med, Pharm, Health Sci., Kanazawa Univ., <sup>4</sup>Dept. Clinic. Lab. Sci., Inst. Med, Pharm, Health Sci., Kanazawa Univ., <sup>5</sup>Dept. Clinic. Nurs., Inst. Med, Pharm, Health Sci., Kanazawa Univ.)

【目的】性周期は、卵巣と子宮の周期的な変化による生理的サイクルである。本研究では、性周期に伴い口腔内の健康状態が変化する一連の機構を明らかにすることを目的として、成人女性の唾液中の細菌叢を解析した。

【方法】性周期が安定した成人女性 11 名を対象に、月経初日から翌月経開始まで、起床後に基礎体温測定と唾液採取を行った。月経開始日と基礎体温をもとに、月経期・卵胞期・黄体初期・黄体後期の4期に分け、各期の唾液サンプル中細菌 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域のシーケンスデータを QIIME2 プログラムにより解析した。唾液サンプル中 16S rRNA 遺伝子のコピー数は、定量的 PCR により算出した。

【結果】4 期間の存在比率を比較した結果、存在比率 1 位の Streptococcus 細菌属は卵胞期と比較して黄体初期ならびに黄体後期で、2 位の Prevotella 細菌属は卵胞期と比較して黄体初期において、それぞれ有意に増加していた。次に、qPCR により算出したサンプル中菌体コピー数と存在比率とを掛け合わせた結果、Streptococcus 細菌属は 4 期間において有意な変動は見られない一方で、Prevotella 細菌属は卵胞期において有意な菌数減少が見られた。

【考察】性周期に伴う女性ホルモン (エストロゲン・プロゲステロン等のステロイド) の分泌状態の変化は、唾液中にも反映される。本研究から、女性ホルモンの分泌状態の変化が Prevotella 細菌属の量変動に関与する可能性が示された。



## P1-045

## NASH メダカモデルにおけるマイクロプラスチック摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響の評価

○岡部 華子<sup>1</sup>, 山本 麻衣<sup>2</sup>, 坂本 丞<sup>3,4</sup>, 亀井 保博<sup>3</sup>, 神谷 重樹<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>大阪大・生活科学・食栄養学, <sup>2</sup>大阪府大・総リハ・栄養, <sup>3</sup>基生研・超階層, <sup>4</sup>バイオフォニクス・EXCELLS)

## Evaluation of the effects of microplastic ingestion on gut microbiota in a NASH medaka model

○Hanako Okabe<sup>1</sup>, Mai Yamamoto<sup>2</sup>, Joe Sakamoto<sup>3,4</sup>, Yasuhiro Kamei<sup>3</sup>, Shigeki Kamitani<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Nutr., Grad. Sch. Hum Life & Ecol., Omu, <sup>2</sup>Div. Clin. Nutr., Sch. Comp. Rehabil., OPU, <sup>3</sup>Trans-Scale Biol Cent, NIBB, <sup>4</sup>Biophotonics, EXCELLS)

【目的】生活習慣病の一つである非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の発症には腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) や LPS の肝臓への流入等が大きく影響を与えるとされている。一方、マイクロプラスチック (MP) はすでに広く環境中に広まっており生物濃縮などを通じてヒトが摂取した際の健康影響が懸念されている。魚類やげっ歯類の動物実験では大部分が消化管を通じて排泄されるものの一部が腸管内に貯留しさらに一部が免疫細胞等を通じて体内に取り込まれることが知られており、また海洋メダカを MP に曝露させると肝臓がんを発症するという報告があった。そこでヒトと同様に雑食性であるメダカを用いて MP を高脂肪食 (HFD) と同時に摂取させ、NASH 病態及び腸内細菌叢の構造に影響が見られるかを検討した。【方法】実験には 3 ヶ月齢の Kyoto-Cab メダカを使用した。HFD のみを与える HFD 群と HFD に MP 粒子を混合して与える HFD+MP 群の 2 群に分けて 12 週間飼育した。病態は体重・肝臓重量の変化、肝臓の組織染色、qPCR 法による遺伝子発現の評価、腸内細菌叢解析 (16S アンプリコン解析) の 4 つで行った。【結果と考察】体重・遺伝子発現の結果は MP 摂取によって病態が増悪している傾向が見られたが明確な差は見受けられなかった。腸内細菌叢解析の結果、HFD 群と HFD+MP 摂取群の間で構成する菌種や偏りに変化があり、MP 摂取による影響が見られた。α 多様性は通常のエサを与えた個体と比較すると HFD 摂取により多様性の減少が見られ dysbiosis が起こっている可能性があるが、飼育週数・MP 摂取による差は見られなかった。今後、MP の粒径による影響差や環境中で MP 表面に付着する物質による影響の検討が必要と考えられる。

## P1-046/W4-8

## 腸管粘液層模倣系における腸内細菌の定着とバイオフィーム形成の解析

○野村 佳祐<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>2,3</sup>, 尾花 望<sup>4,5</sup>, Andrew Utada<sup>2,3</sup> (筑波大院・生物資源, <sup>2</sup>筑波大・生命環境, <sup>3</sup>微生物サステナビリティ研究センター, <sup>4</sup>筑波大・医学医療系, <sup>5</sup>トランスボーダー医学研究センター)

## Analysis of gut bacterial colonization and biofilm formation in an gut mucus layer mimetic system

○Keisuke Nomura<sup>1</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>2,3</sup>, Nozomu Obana<sup>4,5</sup>, Andrew Utada<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Agro-biol. Resour. Sci., Tsukuba Univ. Grad. Sch., <sup>2</sup>Dept. Life Environ., Tsukuba Univ., <sup>3</sup>Microbiol. Res. Ctr. Sustainability, <sup>4</sup>Dept. Med., Tsukuba Univ., <sup>5</sup>Transborder. Med. Res. Ctr.)

ヒトの腸管では、腸管上皮の細胞を覆うように粘液層が形成され、腸内細菌は粘液層で細菌集団「バイオフィーム」を形成する事で腸管への定着を促進させる。近年、腸内細菌による宿主代謝プロセスや免疫応答への影響等が明らかとなり、ヒトの健康維持の観点から腸内細菌バイオフィームの理解と制御が重要である。これまでに、プラスチック上で静置培養したバイオフィームの研究が行われているが、実環境での細菌の挙動を推察する上では課題が残る。実際の腸内細菌バイオフィームは流動的な粘液層に形成され、かつ継続的な栄養供給や、液体の摩擦ストレスが存在する環境で形成される。よって粘液層を模倣した環境で液体培地を灌流しながら細菌を培養・解析可能な実験系が必要だが、ほとんど研究例が無い。そこで本研究では μm 単位で構造をデザイン可能な流路「マイクロ流体デバイス」を応用した。まず腸管と同様に嫌気環境で細菌を培養・観察するために、培地中の酸素をアルゴンに置換しながら培地灌流が可能なデバイスを開発した。内部の嫌気環境を確認するために、嫌気呼吸として脱窒を行う *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 野生株と、脱窒を欠損し嫌気環境でほとんど増殖しない PAO1ΔnarG 株をそれぞれ灌流培養して顕微鏡観察したところ、ΔnarG は野生株と比較して著しく増殖能が低下し、流路内部が嫌气的である事が示唆された。また、微小な窪みを持った流路中に人工粘液を貯留させ粘液層を形成させるデバイスを開発し、腸内細菌バイオフィームの観察を行った。本研究は、様々な腸内細菌の粘液層定着を定量的に解析する事を可能にし、実環境での腸内細菌の挙動を理解するための基盤技術として期待される。

## P1-047

## 歯周病原菌の新規増殖因子の同定

○才木 桂太郎, 田代 有美子, 山中 幸, 高橋 幸裕 (日歯大・生命歯・微生物)

Identification of novel growth factors for *Porphyromonas gingivalis*

○Keitarou Saiki, Yumiko Urano-Tashiro, Yuki Yamanaka, Yukihiko Takahashi (Dept. Microbiol., Nippon Dent. Univ. Sch. Life Dent. Tokyo)

*Porphyromonas gingivalis* is a causative agent of chronic periodontitis. Standard strains of *P. gingivalis*, such as W83 and ATCC 33277, proliferate in minimal medium when protein is added as the energy source and hemin and menadione are added as growth factors. Nevertheless, minimal medium containing bovine serum albumin sometimes fails to support the growth. Previously, we determined that calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) was a growth factor for W83NM, a W83 strain. In this study, we found that vitamin B<sub>12</sub> enhanced the proliferation of W83NM in a minimal medium with cultures from the fourth passage but not from the first to the third passage. Therefore, using fourth-passage cultures, we assessed the proliferation of two W83 and seven ATCC 33277 strains in minimal media containing various protein sources and the effects of CaCl<sub>2</sub> and vitamin B<sub>12</sub>. Surprisingly, the nine *P. gingivalis* strains all differed with respect to their proliferation in minimal media, and protein products used as energy sources showed product-to-product and lot-to-lot heterogeneity. Even though strains or protein products were different, we found CaCl<sub>2</sub>-dependent growth in nine strains and vitamin B<sub>12</sub>-dependent growth in seven strains. These results indicate the difficulty in studying growth properties of *P. gingivalis*, but suggest that calcium ions and vitamin B<sub>12</sub> are novel growth factors for *P. gingivalis*.

## P1-048

歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* のクオラムセンシングが自己凝集に及ぼす影響

○清弘 峻吾<sup>1</sup>, 坂口 直子<sup>2</sup>, 阿座上 弘行<sup>3</sup> (<sup>1</sup>山口大・農・生物機能, <sup>2</sup>山口大院・創成科学, <sup>3</sup>山口大・中高温微生)

## Effect of quorum sensing on autoagglutination in periodontal disease-associated bacterium

○Syungo Kiyohiro<sup>1</sup>, Naoko Sakaguchi<sup>2</sup>, Hiroyuki Azakami<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Chem., Fac. Agr., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>Res. Center Thermotolerant Microb. Resources, Yamaguchi Univ.)

【目的】一般に、病原細菌においては、クオラムセンシングによって毒素生産や抗生物質耐性、バイオフィーム形成など様々な病原性が制御されている。本研究では、歯周病関連細菌 *E. corrodens* のクオラムセンシングが本菌の凝集性に及ぼす影響を調べた。【方法・結果】初めに、*E. corrodens* 1073 株 (野生株) とオートインデューサーの合成に必須な *luxS* 遺伝子を欠損させた株 (*ΔluxS* 株) の自己凝集能を比較した。その結果、野生株では高い凝集性を示したが、*ΔluxS* 株では凝集性が低下していた。さらに、野生株の高い凝集性は塩の添加により阻害された。次に、両株の凝集の差は何によって引き起こされているのかを調べることにした。野生株の自己凝集には菌体表面の GalNAc 依存性のレクチンが関与することが知られている。そこで、GalNAc 添加時の凝集性を比較した結果、両株とも凝集性の低下がみられたため、両株の凝集にはどちらも GalNAc 依存性のレクチンが関与していることが示唆された。次に、両株の凝集性の差がレクチン活性の差によるものかどうかを調べるために、GalNAc 添加時の赤血球凝集活性を測定したが、両株間に赤血球凝集活性の差は見られなかった。しかし、野生株の自己凝集能は塩によって抑制されるため、両株の赤血球凝集活性に差が見られなかった可能性も示唆された。さらに、細胞表面疎水性による影響を調べたところ、野生株は、大腸菌や緑膿菌に比べて非常に高い表面疎水性を示したが、*ΔluxS* 株では表面疎水性の低下が観察された。このことから、両株における凝集能の差は表面疎水性の違いによる可能性が示唆された。

## P1-049

主成分解析と一般化線形モデルによる札幌地下歩行空間に浮かぶ集落形成菌数に影響を及ぼす環境因子の可視化

○山口 博之<sup>1</sup>, 大崎 敬子<sup>2</sup>, 大久保 寅彦<sup>1</sup> (1北大院・保科・病態解析, <sup>2</sup>杏林大・医・感染症学)

### Environmental factors affecting the number of colony-forming bacteria floating in public space

○Hiroyuki Yamaguchi<sup>1</sup>, Takako Osaki<sup>2</sup>, Torahiko Okubo<sup>1</sup> (1Fac. Health Science, Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ.)

【目的】私達は札幌地下歩行空間(地下歩)に浮遊する集落形成菌数やその菌叢さらに環境因子との関連性から、地下歩における浮遊菌数が温度や通行人数など複合的な要因の連鎖にて変動する可能性を見いだした(PLoS ONE, 2019)。しかしその変動を規定する環境因子の特定には至っていない。本研究では主成分解析(PCA)と一般化線形モデル(Glm2)を用いてこれらデータを再解析し、地下歩浮遊菌数の動態に影響を与える環境因子を可視化した。【方法】データは計60セットで、セット毎に浮遊生菌数(SCD上の集落)、温度(T)、湿度(M)、気圧(A)、通行人数(TP)、微粒子数(1.0-5.0 $\mu$ m)を含む。環境因子と微粒子数は、30分間隔でオンサイトで取得。浮遊生菌数は2時間毎にフィルターにトラップされた集落数。PCA, Glm2へのフッティング、その妥当性(尤度と赤池情報指数AIC)、有意差検定(anova)は、全てR(version1.0.136)にて実施した。【結果】環境因子60セットを2成分に圧縮した。PC1の合成変数の主体は、T(-0.62)/M(-0.647)/TP(0.399)であり、PC2は、AP(-0.825)/P(0.501)/H(0.209)が主体であった。PC1とPC2の累積寄与率はそれぞれ54.4%と29.5%。これら合成変数にて散布図を作成すると、4つのグループ(G1-G4)に分かれた。微粒子数はG4からG1に向け増加し(T $\downarrow$ , H $\downarrow$ , TP $\uparrow$ )、浮遊生菌数はG2で突出した(A $\downarrow$ , TP $\uparrow$ , H $\uparrow$ )。Glm2へのフッティングより、微粒子数は2つの環境因子(T, H)で説明できたが、浮遊生菌数は複数の環境因子(H+A+TP)が必要であった。anovaにて有効性を確認した。【結論】地下歩において微粒子数は温度と湿度に依存し変動したが、浮遊生菌数は複数の環境条件(湿度、気圧、通行人数)が揃わないと上昇しない。

## P1-050

医療関連感染の制御に向けた検証：人肌に温めた手すりデバイス上での大腸菌の生存性

○今野 綾乃, 大久保 寅彦, 山口 博之(北大・院・保健科学)

### Effect of handrails warmed to human skin on the survival of Escherichia coli

○Ayano Konno, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sc., Hokkaido Univ.)

【背景・目的】高頻度接触面に付着した細菌は、医療関連感染の原因となりうる。そのため臨床では消毒剤等に代わる新たな制御策が求められている。以前我々は、乾燥物質表面を人肌に温めることで付着する大腸菌の生存率が顕著に低下することを発見した(PLoS ONE, 2019)。今回は、院内環境への実装を見据え温度制御可能な手すり型デバイスを作成し、その表面の大腸菌の生存制御に加温が与える効果を検証すると共に、以前取得した病院内乾燥面の環境データと菌数との関連性を再解析した。【方法】手すりデバイス：ステンレス製の手すり(33x3x3cm)にハンドルヒーターを取り付け作成した。手すり上での大腸菌の生存性の検証：大腸菌 DH5 $\alpha$ を用いて10<sup>10</sup>cfu/mLの菌液を調製後、これを両面テープに10 $\mu$ Lずつ接種し、完全に乾燥させた。乾燥直後と15 $^{\circ}$ C/55%RHに設定した恒温恒湿機内に18-72時間静置した際の生存菌数を比較した。手すりは約37 $^{\circ}$ Cに温めたものと温めないものを使用した。またその妥当性を検証するため、LIVE/DEAD染色を行い蛍光顕微鏡で評価を行った。主成分解析：札幌市内3病院の高頻度接触面の汚染度(CFU)と環境因子(温度、湿度、人数)との関係性をRを用いて主成分解析により検証した。有意差検定：Bonferroni/Dunn法による多重比較検定【結果・考察】手すりデバイスでは、生菌数はヒーターからの距離が近く放置時間が長い程有意に低下した。LIVE/DEAD染色でも同様の傾向が確認された。主成分解析の結果、湿度と温度低下が顕著な乾燥面において生菌数の有意な増加が認められた。以上より、手すりの加温はその表面の大腸菌の生存制御に効果的であることが示唆された。(非会員共同研究者：矢野理香)

## P1-051

生存必須遺伝子プロファイルからみた Mycobacterium intracellulare 臨床菌株の低酸素適応

○立石 善隆, 尾関 百合子, 西山 晃史, 松本 壮吉(新潟大・医・細菌)

### Hypoxic adaptation in nontuberculous mycobacteria implicated from the essential gene profiles

○Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Akihito Nishiyama, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

【目的】Mycobacterium intracellulareはM. aviumと並んで、昨今急増している肺MAC症の主要な病原体である。我々は、トランスポゾンシーケンシング(TnSeq)による機能ゲノム解析により、M. intracellulare type strain ATCC13950の生存必須遺伝子を解明したが、肺MAC症由来臨床菌株の生存必須遺伝子については不明であった。今回、M. intracellulare 臨床菌株のTnSeqを行い、type strainの生存必須遺伝子と比較することで、臨床菌株の低酸素適応について検討した。【方法】肺MAC症患者由来M. intracellulare 臨床菌株8菌株とM. intracellulare ATCC13950の合計9菌株を対象とした。各菌株に対して、ゲノム全体を網羅したトランスポゾン変異ライブラリーを複製し、NextSeqによりTnSeqを行った。【結果】臨床菌株において、糖新生系、type VII secretion system、鉄硫黄クラスターの遺伝子の遺伝子必須性が高まっており、遺伝子発現抑制剤においても増殖抑制効果がみられた。Type strainと同様、臨床菌株においても低酸素条件下において、菌膜型バイオフィーム(ベリクル)を形成した。そして、低酸素条件下において、臨床菌株の多くがtype strainに比べて早い時期に対数増殖に入ることが分かった。【考察】M. intracellulare 臨床菌株は、type strainに比べて、低酸素下での生存に関わる遺伝子の必須性が高まっており、低酸素に対する適応性と関連することが示唆された。

## P1-052

結核菌 Sulfide Quinone Oxidoreductase の生化学的解析

○松尾 祐一<sup>1,2</sup>, 稲岡 健ダニエル<sup>2,3,4</sup>, 北 潔<sup>2,4,5</sup> (1熊本大院・生命科学研究部・生体情報解析学分野, <sup>2</sup>長崎大院・熱帯医学 グローバルヘルス研究科, <sup>3</sup>長崎大・熱帯医学研究所・感染分子ダイナミクス分野, <sup>4</sup>東京大・医学系研究科・生物医化学教室, <sup>5</sup>長崎大・熱帯医学研究所・感染生化学分野)

### Biochemical studies of Mycobacterium tuberculosis sulfide quinone oxidoreductase

○Yuichi Matsuo<sup>1,2</sup>, Daniel Ken Inaoka<sup>2,3,4</sup>, Kiyoshi Kita<sup>2,4,5</sup> (1Dept. Health Sciences., Sch. Med., Kumamoto Univ., <sup>2</sup>Sch. Tropical Medicine and Global Health., Nagasaki Univ., <sup>3</sup>Dept. Molecular Infection Dynamics., Institute of Tropical Medicine., Nagasaki Univ., <sup>4</sup>Dept. Biomedical Chemistry., Grad. Sch. Medicine., The Univ. of Tokyo, <sup>5</sup>Dept. Host-Defense Biochemistry., Institute of Tropical Medicine., Nagasaki Univ.)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the etiological agent of tuberculosis, is an extremely successful pathogen that adapts to survive within the host. In recent years, the importance of hydrogen sulfide for expressing pathogenicity in Mtb infection has been reported. However, the metabolism of sulfide in Mtb is unknown. In this study, as an initial attempt to understand the sulfide metabolism of Mtb, steady-state kinetics of the putative sulfide quinone oxidoreductase (MtbSQOR) were conducted. Purified recombinant MtbSQOR (rMtbSQOR) could not reduce quinones in presence of sulfide unless sulfite was provided. rMtbSQOR can utilize a variety of sulfur acceptors, such as cyanide, sulfite, coenzyme A and glutathione, which showed the highest activity with cyanide. However, rMtbSQOR cannot use L-cysteine as a sulfur acceptor. Moreover, sulfane-sulfur generation could be detected using a specific probe (SSP4, Dojindo) only in presence of both sulfide and quinone. UV-vis spectrum of rMtbSQOR revealed a peak at 450 nm which was the formation of classical FAD spectra. In conclusion, rMtbSQOR showed biochemical features. Moreover, we are analyzing the charge-transfer complex between FAD and sulfane-sulfur. The physiological function of SQOR in Mtb is discussed in the session.

**P1-053****細菌から動物まで種横断的に保存された超硫黄分子合成経路の発見**

○井田 智章<sup>1</sup>, Minkyung Jung<sup>1</sup>, 松永 哲郎<sup>1</sup>, 守田 匡伸<sup>1</sup>, 緒方 星陵<sup>1</sup>, 高田 剛<sup>1</sup>, 海野 雄加<sup>1</sup>, 本橋 ぼづみ<sup>2</sup>, 赤池 孝章<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大・院医・環境医学, <sup>2</sup>東北大・加齢医学・遺伝子発現制御)

**Discovery of supersulfide biosynthesis highly conserved among all organisms**

○Tomoaki Ida<sup>1</sup>, Minkyung Jung<sup>1</sup>, Tetsuro Matsunaga<sup>1</sup>, Masanobu Morita<sup>1</sup>, Seiryu Ogata<sup>1</sup>, Tsuyoshi Takata<sup>1</sup>, Yuka Unno<sup>1</sup>, Hozumi Motohashi<sup>2</sup>, Takaaki Akaike<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., <sup>2</sup>Dept. Gene Exp. Regulation, IDAC, Tohoku Univ.)

【目的】我々は、強力な求核性を有するシステインパースルフィド (CysSSH) などの超硫黄分子が、細菌から動物に至るまで種横断的に生成されることを見出し、主要な CysSSH 生成系として cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) を同定した。しかしながら、超硫黄分子合成経路の全貌は明らかではない。本研究では、種横断的な超硫黄分子合成経路について解析した。

【方法・結果】CARS に種横断的に高度に保存されたアミノ酸配列 (KIHKモチーフ) とその周辺アミノ酸配列を同定した。組換え大腸菌 CARS を用いた超硫黄代謝解析により、KIHKモチーフ周辺のアミノ酸配列が CysSSH 合成活性を制御していることがわかった。さらに、CARS はシステインを基質にした酵素反応において光学異性体特異性はなく、また、システイン以外のチオール含有化合物を基質としてそのパースルフィド体を合成することが示された。一方、大腸菌や古細菌の CARS 以外の 19 種のアミノアシル-tRNA 合成酵素 (ARS) を調製し、その CysSSH 合成活性を検討した結果、CARS 以外にも leucyl-tRNA synthetase (LARS) を筆頭に、ほぼ全ての ARS が CysSSH 合成能を有することが示された。さらに、組換えマウス LARS2 (ミトコンドリア局在型 LARS) やヒト LARS2 欠損細胞を用いた結果、動物由来 LARS2 による CysSSH 合成能を見出した。

【考察】生物進化において、全ての ARS は同一起源から分子進化してきたと考えられている。ほぼ全ての ARS が、種横断的に保存された CysSSH 合成活性を有することは、生物進化初期に CysSSH 合成能を獲得し、エネルギー代謝や寿命等の生命維持や生物進化に重要な役割を果たしていることが示唆される。

**P1-054****口腔 *Veillonella* の新エネルギー源であるフルクトースの利用**

○眞島 いづみ<sup>1</sup>, 中澤 太<sup>2</sup>, 清浦 有祐<sup>1</sup> (<sup>1</sup>奥羽大・歯・口腔病態解析制御, <sup>2</sup>Dept. Oral Biol., Fac. Dent., Univ. Indonesia)

**The usage of fructose as a novel energy source in oral *Veillonella***

○Izumi Mashima<sup>1</sup>, Futoshi Nakazawa<sup>2</sup>, Yusuke Kiyoura<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Oral Med. Sci., Sch. Dent., Ohu Univ., <sup>2</sup>Dept. Oral Biol., Fac. Dent., Univ. Indonesia)

**Purpose:** Up until now, it has been known that *Veillonella* spp. use short chain organic acids, like lactate as their only energy sources. However, recent our pan-genome study revealed that oral *Veillonella* genetically conserved the fructose metabolic pathway. Therefore, this study investigated how oral *Veillonella* uses the fructose.

**Methods:** The growth curve and metabolome analysis by CE-TOFMS were conducted using the type strain of *V. atypica* cultured in TYH medium with fructose or/and lactate substrates.

**Results:** *V. atypica* most increased with lactate, and they also could grow with only fructose. At the same time, when the double substrates were remarkably extended the stationary phase compared to only lactate. In metabolome analysis, each intermediate metabolite related to fructose metabolism along with EMP pathway were identified quantitatively. Furthermore, the relatively highest concentration of all metabolites including malate and lactate were detected in *V. atypica* cells when they cultured with double substrates at stationary phase.

**Discussions:** It was suggested that *V. atypica* used the fructose as their energy source after using up the lactate. Furthermore, gluconeogenesis pathway from staving malate and lactate was possible to relate to the *V. atypica* life-span extension. This usage of fructose might affect to the metabolic network in oral microbiome.

**P1-055****NADPH オキシダーゼおよび一酸化窒素合成酵素による超硫黄分子活性化と宿主防御機構**

○ジョン ミンギョン<sup>1</sup>, 高田 剛<sup>1</sup>, 井田 智章<sup>1</sup>, 松永 哲郎<sup>1</sup>, 守田 匡伸<sup>1</sup>, 土屋 幸弘<sup>2</sup>, 渡邊 泰男<sup>3</sup>, 本橋 ぼづみ<sup>3</sup>, 住本 英樹<sup>4</sup>, 赤池 孝章<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院・医・環境医学, <sup>2</sup>昭和薬大・薬理学, <sup>3</sup>東北大・加齢医学・遺伝子発現制御, <sup>4</sup>九州大院・医・生化学)

**Supersulfide activation and host defence by NADPH oxidase and NO synthase**

○Minkyung Jung<sup>1</sup>, Tsuyoshi Takata<sup>1</sup>, Tomoaki Ida<sup>1</sup>, Tetsuro Matsunaga<sup>1</sup>, Masanobu Morita<sup>1</sup>, Yukihiko Tsuchiya<sup>2</sup>, Yasuo Watanabe<sup>2</sup>, Hozumi Motohashi<sup>3</sup>, Hideki Sumimoto<sup>4</sup>, Takaaki Akaike<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., <sup>2</sup>Dept. Pharm., Showa Pharm. Univ., <sup>3</sup>Dept. Gene Exp. Reg., IDAC, Tohoku Univ., <sup>4</sup>Dept. Biochem., Kyushu Univ., Grad. Sch. Med. Sci.)

生体の感染防御因子である活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素 (NO) は、NADPH オキシダーゼ (NOX) や一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって、NADPH から供給される電子を用いて生成される。我々は最近、複数の硫黄原子が直鎖状に連結した超硫黄分子が、電子供与体および受容体として機能することを報告した。すなわち、NOX や NOS の反応においても NADPH から供給される電子を酸素のかわりに超硫黄分子が受け取る可能性を示唆している。本研究では NOX および NOS による超硫黄代謝メカニズムと感染防御機能を解明する。

各種 NOX や NOS の過剰発現細胞に酸化型グルタチオントリスルフィド (GSSSG) を処置し、硫黄代謝物を解析した結果、酵素発現に依存してグルタチオンパースルフィド (GSSH) やグルタチオントリスルフィド (GSSSH) が有意に増加した。次に *in vitro* において、組換え nNOS および eNOS を GSSSG 存在下で NADPH と反応させたところ、NADPH の消費と共に GSSSG は完全に代謝され、GSSH や GSSSH が産生された。また、興味深いことに NO 産生条件下においては硫黄の伸長反応が観察され、連結した硫黄が閉環した八硫黄 S8 が形成されることが判明した。さらに、マウス骨髄由来マクロファージのネズミチフス菌 (サルモネラ) 感染モデルにおいて、GSSSG がマクロファージの抗菌活性を増強することが明らかとなった。

以上、各種 NOX および NOS は、超硫黄分子を還元酸化的に伸長・活性化することにより感染防御機能を発揮していることが示唆された。

**P1-056****らせん繊維状コレラ菌の運動観察**

○許 駿<sup>1</sup>, 阿部 敬吾<sup>2</sup>, 山城 哲<sup>1</sup> (<sup>1</sup>琉球大・医・細菌, <sup>2</sup>東北大・工・応用物理)

**Measurement of helical-filamentous shaped motility of clinically isolated *Vibrio cholerae* O1**

○Jun Xu<sup>1</sup>, Keigo Abe<sup>2</sup>, Tetsu Yamashiro<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, <sup>2</sup>Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【研究目的】コレラ菌 (毒素産生性 *Vibrio cholerae* O1 または O139) は、飢餓状態や、ストレスなどの条件下でコマ状から細長い繊維状菌体に変形することが知られている。最近我々の観察で、繊維状コレラ菌が独特な運動を示す事を見出した。本研究は、生物・物理学的アプローチにより、繊維状コレラ菌の持つ独特な運動様式と感染に対する意味の解明を目的とする。【方法】被検菌株として、*V. cholerae* 臨床分離株 O1 El Tor N16961 と環境分離株 AJ13 を用いた。本研究室では、コレラ菌の運動性を保持しながら、コマ状から繊維状へ誘導する方法を確立した。厚さ 90  $\mu\text{m}$  の両面テープとカバーガラスで作製したチャンパーにコレラ菌浮遊液を注入し、異なる粘度、塩度、胆汁などの条件下で菌体運動の観察を行った。運動を観察し、CMOS カメラで遊泳菌体を記録した。細長い菌体が回転しながら遊泳する動きと変形を計測するため斜光暗視野照明法を用いた。以上の様々な運動を ImageJ, VBA-Macro, LabVIEW などを用いて解析した。【結果・考察】繊維状コレラ菌の菌体はコマ状の 10 倍ほどに伸長した。さらに繊維状コレラ菌の示す運動は、コマ状コレラ菌が持つ高速遊泳 (100  $\mu\text{m/s}$  以上) と比べ 10  $\mu\text{m/s}$  と比較的低い運動速度でありながら強いトルクを産み出すこと、周囲の液体粘度の影響を受けにくいことが特徴として挙げられた。さらに、腸管内を模倣した環境中における運動観察により、繊維状コレラ菌が持つ運動性は感染の成立にさらに有利である可能性が示唆された。

## P1-057

### 細菌の運動性の変化が薬剤効果に及ぼす影響

○采女 美生<sup>1</sup>, 石川 一也<sup>2</sup>, 古田 和幸<sup>2</sup>, 垣内 力<sup>2</sup> (1岡山大学・薬・分子生物学, 2岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・分子生物学)

### Study on the effect of motility mutation against antibiotic resistance

○Mio Uneme<sup>1</sup>, Kazuya Ishikawa<sup>2</sup>, Kazuyuki Furuta<sup>2</sup>, Chikara Kaito<sup>2</sup> (1Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., 2Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

抗生物質は細菌のスィミングやスウォーミングに影響を与えることや、鞭毛運動に関わる遺伝子の発現を低下させることが分かっている。細菌の運動能は動物への感染に関与するため、細菌の運動と薬剤効果の関係性を理解することは、臨床上、適切な抗生物質を選択する為に重要と考えられる。しかし、細菌の運動性の変化が薬剤効果に及ぼす影響は明らかになっていなかった。多くの細菌種は、鞭毛フィラメント、ジョイント、回転モーターで構成される鞭毛を用いて運動する。膜間腔に存在する陽イオンを駆動力として回転モーターが回転することで、ジョイントと鞭毛フィラメントが回転し、運動性が生み出される。本研究では、グラム陽性モデル細菌である枯草菌を対象とし、鞭毛フィラメントを欠損させた株 (*hag* 欠損株)、鞭毛フィラメントが回転しない株 (*motB* 欠損株) について、様々な種類の薬剤に対する耐性を調べた。解析の結果、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコールと細胞壁合成阻害剤であるセフトラジウムに対して *hag* 欠損株及び *motB* 欠損株が野生株よりも耐性を示すことが明らかとなった。現在は、他の薬剤に対しても *hag* 欠損株と *motB* 欠損株が耐性を示すか調査を進めている。今後は、*hag* 欠損株と *motB* 欠損株に対して遺伝子発現変化解析を行い、耐性化した薬剤の特徴と合わせて、細菌の運動性と薬剤効果の関係性を解明したいと考えている。

## P1-058

### HubP は海洋性ビブリオ菌のべん毛本数制御因子 FlhG の ATPase 活性を高める

Yuxi Hao<sup>1</sup>, 竹川 宜宏<sup>2</sup>, 本間 道夫<sup>1</sup>, 小嶋 誠司<sup>1</sup> (1名古屋大学・院理・生命理学, 2大阪大学・院理・高分子科学)

### HubP enhances the ATPase activity of the flagellar number regulator FlhG in *Vibrio alginolyticus*

Yuxi Hao<sup>1</sup>, Norihiro Takekawa<sup>2</sup>, Michio Homma<sup>1</sup>, Seiji Kojima<sup>1</sup> (1Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., 2Dept. Macromol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Marine bacterium *Vibrio alginolyticus* has a single flagellum at the cell pole. Two proteins FlhF and FlhG regulate the polar flagellar number to be one: FlhF is a positive regulator and intrinsically localizes at cell pole, whereas FlhG, a MinD-type ATPase, acts negatively on flagellar biogenesis. Regulation by FlhG requires the polar landmark protein HubP, which has a single transmembrane segment with a very large cytoplasmic region. Previously we showed that *V. alginolyticus* FlhG cannot localize at pole without HubP, and hubP deletion results in multiple flagellar formation at cell pole. To examine how HubP affects FlhG function, we made some HubP truncation mutants and purified HubP C-terminal fragments. We found that a HubP fragment of C-terminal 51 residues (C51) did not affect FlhG ATPase activity. On the other hand, a longer fragment with C-terminal 178 residues (C178) significantly enhanced FlhG ATPase activity. Further studies revealed that the C51 part in the C178 fragment is dispensable for this effect. The ATPase-active FlhG D171A mutant is easy to aggregate, but HubP fragments that enhance FlhG ATPase suppressed this precipitation. Our results suggest that stimulation of FlhG ATPase at cell pole, induced by its interaction with C-terminal HubP, is important for regulatory role of FlhG to inhibit FlhF function at *V. alginolyticus* cell pole.

## P1-059

### The T9SS cargo protein PorA binds to a sensor kinase PorY to regulate the T9SS gene expression

○伊藤 李香<sup>1</sup>, 雪竹 英治<sup>1</sup>, 庄子 幹郎<sup>1</sup>, 藤原 卓<sup>2</sup>, 中山 浩次<sup>1</sup>, 内藤 真理子<sup>1</sup> (1長崎大学・院医歯薬・口腔病原微生物学, 2長崎大学・院医歯薬・小児歯科学)

○Momoko Ito<sup>1</sup>, Hideharu Yukitake<sup>1</sup>, Mikio Shoji<sup>1</sup>, Taku Fujiwara<sup>2</sup>, Koji Nakayama<sup>1</sup>, Mariko Naito<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Bio. Sci., Nagasaki Univ., 2Dept. Pediatric. Dent., Grad. Sch. Bio. Sci., Nagasaki Univ.)

**Purpose:** *Porphyromonas gingivalis* is an etiological pathogen of chronic periodontitis. *P. gingivalis* is a Gram-negative, obligate anaerobic bacterium. As it can't use saccharides for energy, it secretes strong proteinases called gingipains. Gingipains are secreted to the cell surface via the type IX secretion system (T9SS). T9SS component proteins are consisted with more than 15 proteins. Gene expression of some T9SS component proteins is regulated by a two-component regulatory system, PorY-PorX, and a ECF sigma factor, SigP. We have shown that PorA can activate the PorYX-SigP signaling cascade. However, it remains unknown how PorA activates downstream signals. **Methods:** We examined whether C-terminal amino acids-deleted PorA is functional by complementation analysis and whether PorA binds to PorY. **Results:** Complementation analysis revealed that C-terminal four amino acids-deleted PorA was not expressed. So, we constructed PorA-GSGS, in which four amino acids at the C-terminus were changed to GSGS, and found that PorA-GSGS could rescue the PorA-deficient phenotype. Dot blot analysis revealed that amount of PorA-GSGS on the cell surface was significantly reduced. Furthermore, immunoprecipitation or pull-down assays revealed that PorA bound to PorY. **Discussion:** We found that periplasmic PorA presumably activates the signaling cascade by binding to PorY.

## P1-060

### クローン病関連大腸菌の cyclic-di-AMP シグナルの亢進

○田中 里佳<sup>1</sup>, 津川 仁<sup>2</sup>, 今井 仁<sup>3</sup>, 鎌田 信彦<sup>4</sup>, 穂積 勝人<sup>1</sup> (1東海大学・生体防御学領域・免疫, 2東海大学・生体防御学領域・Transkingdom Signaling, 3東海大学・健康管理学領域, 4ミシガン大学・消化器内科学)

### Enhanced cyclic-di-AMP signaling in adherent-invasive E. coli (AIEC) isolated from Crohn's disease

○Rika Tanaka<sup>1</sup>, Hitoshi Tsugawa<sup>2</sup>, Jin Imai<sup>3</sup>, Nobuhiko Kamada<sup>4</sup>, Katsuto Hozumi<sup>1</sup> (1Dept. Immunol., Div. Infect. Host Def., Tokai Univ. Sch. Med., 2Dept. Transkingdom Signal., Div. Infect. Host Def., Tokai Univ. Sch. Med., 3Dept. Clin. Health Sci., Tokai Univ. Sch. Med., 4Dept. Internal Med., Div. Gastroenterol., Univ. of Michigan)

【目的】腸管内の慢性炎症を主訴とするクローン病は発症要因が未だ不明である。近年、クローン病患者より粘膜上皮細胞内への付着・侵入性を示す Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) が分離され、本菌感染が慢性炎症の発症要因となる可能性が指摘されている。しかし、AIEC の感染経路のみならず本菌の付着・侵入性の発現機構も明確にされていない。本研究では、AIEC の付着・侵入性の発現に対する cyclic-di-AMP の関与について検証した。【方法】大腸菌 K12 株とクローン病患者由来 AIEC LF82 株を用いた。cDNA アレイ解析にて大腸菌の網羅的遺伝子発現解析を行った。大腸菌の遊走能は Swarming assay で評価した。Caco-2 細胞を用いた in vitro 感染モデルにより付着・侵入性を評価した。【結果】AIEC LF82 は、大腸菌 K12 と比較しフラジェリン遺伝子 (*flhC*) の発現が亢進していた。AIEC LF82 株は、*flhC* 欠損により遊走性及び Caco2 細胞への付着性が有意に低下した。細菌の遺伝子発現及び菌体間シグナルを制御する cyclic-di-AMP 存在下で大腸菌 K12 を培養すると、*flhC* 発現が有意に亢進することが cDNA アレイ解析及び qPCR 解析により明らかになった。また、cyclic-di-AMP は大腸菌 K12 の遊走性を亢進させると同時に Caco-2 細胞への付着能を亢進させた。これらの結果から、cyclic-di-AMP シグナルは非病原性大腸菌に AIEC が示す細菌学的特徴を与えると考えられた。

## P1-061

大腸菌再構成系による *Clostridium* 属細菌走化性受容体ホモログの機能解析

○西山 宗一郎, 小池 祥平, 小林 夏希, 宮川 結衣 (新潟薬科大・応用生命科学・食品安全学)

Functional analysis of chemoreceptors of *Clostridium* spp. by an *E. coli* reconstitution system

○So-ichiro Nishiyama, Shohei Koike, Natsuki Kobayashi, Yui Miyakawa (Fac. App. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. App. Life Sci.)

*Clostridium* 属細菌は、芽胞を形成するグラム陽性偏性嫌気性菌であり、少なくともその一部はヒトに対して病原性を示す。食中毒の原因となるボツリヌス菌 *C. botulinum* や、その代替菌であるスポロゲネス菌 *C. sporogenes* は、運動性を有し走化性を示す。また、走化性受容体ホモログ (MCP-like proteins, MLPs) を 30 種前後備えている。当研究室では、*C. sporogenes* が複数種のアミノ酸に対して走化性応答を示すことを近年見出している。本研究では当該菌のアミノ酸走化性受容体の同定を目的とし、解析を行った。まず、コレラ菌 *Vibrio cholerae* の既知のアミノ酸走化性受容体と、*C. sporogenes* 走化性受容体ホモログ (CsMLPs) で多重配列比較を行い、高い相同性を有し、アミノ酸認識モチーフを保持している CsMLPs を 4 種見出し候補とした。次に候補 CsMLPs 遺伝子のクローニングを行い、大腸菌走化性受容体 Tar とのキメラ受容体を作製し、大腸菌内で発現させ機能解析を行った。結果、うち 3 種のキメラ受容体が L-アルギニンへの走化性応答を媒介した。また、一部のキメラ受容体においては、他の複数のアミノ酸に対しても応答を媒介した。以上のように本研究では CsMLPs・Tar キメラ受容体を多数作製し、少なくともその一部はアミノ酸走化性応答を媒介したことから、当該菌の新規アミノ酸走化性受容体を複数同定できたと考えられる。今後類縁のボツリヌス菌 *C. botulinum* についても同様のアプローチにより解析を行う予定である。

## P1-062

## 青枯病菌 OE1-1 株におけるクオラムセンシングの Fe(II) に依存した制御

○館田 宇宙<sup>1</sup>, 寺澤 夕貴<sup>1</sup>, 木場 章範<sup>1</sup>, 大西 浩平<sup>1</sup>, 甲斐 建次<sup>2</sup>, 曳地 康史<sup>1</sup>, 都筑 正行<sup>1</sup> (<sup>1</sup>高知大・農林海洋, <sup>2</sup>阪公大院・農)

Fe(II)-dependent regulation of quorum sensing of *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1

○Sora Tateda<sup>1</sup>, Yuki Terazawa<sup>1</sup>, Akinori Kiba<sup>1</sup>, Kouhei Ohnishi<sup>1</sup>, Kenji Kai<sup>2</sup>, Yasufumi Hikichi<sup>1</sup>, Masayuki Tsuzuki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. Agric. and Mar. Sci., Kochi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Osaka Met. Univ.)

土壌生息性のグラム陰性細菌である *Ralstonia pseudosolanacearum* (青枯病菌) は、ナス科植物を含む幅広い植物種に感染し萎凋症状を引き起こす植物病原細菌である。青枯病菌 OE1-1 株の細菌密度依存的な遺伝子発現制御系クオラムセンシング (QS) は、病原性に不可欠である。OE1-1 株において、自ら産生・分泌した QS シグナル Methyl 3-hydroxymyristate の受容により活性化される LysR 型転写因子 PhcA により、QS 依存遺伝子の発現は制御される。これまでに、二価鉄 [Fe(II)] 非存在下で培養した OE1-1 株において、QS 依存遺伝子の発現制御能は損なわれることを明らかにした。本研究では、OE1-1 株のゲノム情報より、金属結合ドメインの存在が推定された 2 つの転写制御因子、Fur1 および Fur2 について、OE1-1 株の QS の Fe(II) に依存した制御への影響を解析した。OE1-1 株、phcA 欠損株、fur1 欠損株および fur2 欠損株の Fe(II) 存在下および非存在下でのトランスクリプトームを RNA-seq 法により解析した。Fe(II) 存在下において QS により誘導される QS 誘導遺伝子のうち、67.9% の遺伝子の発現が fur1 欠損により有意に低下した。それらの遺伝子のうち、病原性に関与する菌体外多糖、植物細胞壁分解酵素およびラルフラノンなどの産生に関わる遺伝子を含む、48.7% の遺伝子の発現は、Fe(II) 非存在下において fur2 欠損によって有意に上昇した。興味深いことに、fur1 の発現は Fe(II) に依存しない一方、fur2 は Fe(II) 非存在下で発現が誘導された。すなわち、Fur1 は Fe(II) 存在下での QS 誘導遺伝子の誘導に、Fur2 は Fe(II) 非存在下での QS 誘導遺伝子の抑制に Fe(II) 依存的に関与すると考えられた。

## P1-063

## コレラ菌タウリン走化性受容体遺伝子の温度依存的転写制御

○佐藤 沙知香<sup>1</sup>, 山内 那津<sup>2</sup>, 小野木 汐里<sup>2</sup>, 田島 寛隆<sup>1,3</sup>, 川岸 郁朗<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>法政大・生命科学・生命機能, <sup>2</sup>法政大・院理工・生命機能, <sup>3</sup>法政大・ナノテクセンター)

Temperature regulation of the taurine chemoreceptor gene expression in *Vibrio cholerae*

○Sachika Sato<sup>1</sup>, Natsu Yamauchi<sup>2</sup>, Shiori Onogi<sup>2</sup>, Hirota Tajima<sup>1,3</sup>, Ikuro Kawagishi<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., <sup>3</sup>Res. Cen. Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

*Vibrio cholerae* はコレラの病原となるグラム陰性細菌である (以下コレラ菌とよぶ)。コレラ菌は単極べん毛の回転により運動し、走化性を示す。コレラ菌の感染過程に走化性が関与することが示されている。多数ある走化性受容体 [MCP (methyl-accepting chemotaxis protein)-like proteins, MLPs] のうち、Mlp37 は、多くのアミノ酸および胆汁の構成成分であるタウリンを認識する。Mlp37 をコードする遺伝子 (mlp37) の転写は、菌を 37°C で培養すると 30°C で培養したときに比べて劇的に増加する。これらの事実、Mlp37 が感染過程で働くことを示唆するものである。本研究では、まず、mlp37 の転写に対する病原性遺伝子転写制御因子 ToxR, TcpP の遺伝子欠失の影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。その結果、30°C で培養した場合の mlp37 プロモーター活性が上昇した。mlp37 の上流に tox box と呼ばれる配列はみられないが、縦列・逆位反復配列が同定され、mRNA が二次構造をとることも予測された。しかし、これらの配列に変異を導入しても、転写活性が低下するものはあつたが、toxR 欠失株のように温度非依存的転写の表現型を示すものは得られなかった。そこで、mlp37 プロモーター領域の下流にテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子 tetA コーディング領域を入れたプラスミドを構築した。このプラスミドを移入した野生株は、37°C で Tc 耐性、30°C で Tc 感受性の表現型を示した。一方、toxR 欠失株に移入すると温度比依存的に Tc 耐性を示した。前者の菌株から、30°C で Tc 耐性となる変異体を単離し、解析中である。

## P1-064

海洋ビブリオ *Vibrio alginolyticus* のべん毛モーター回転制御因子 CheY の細胞分化への関与

山根 花鈴<sup>1</sup>, 田島 寛隆<sup>2,3</sup>, 伊藤 真由<sup>2</sup>, 西川 正俊<sup>1,2</sup>, 川岸 郁朗<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>法政大・院理工・生命機能, <sup>2</sup>法政大・生命科学・生命機能, <sup>3</sup>法政大・ナノテクセンター)

The flagellar motor regulator CheY is involved in cell differentiation of *Vibrio alginolyticus*

Karin Yamane<sup>1</sup>, Hirota Tajima<sup>2,3</sup>, Mayu Ito<sup>2</sup>, Masatoshi Nishikawa<sup>1,2</sup>, Ikuro Kawagishi<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. and Engin., Hosei Univ., <sup>2</sup>Fac. Biosci. and Appl. Chem., Hosei Univ., <sup>3</sup>Res. Cent. for Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

海洋性ビブリオ *Vibrio alginolyticus* は、外環境に応じて形態を変化させ、分化する。低粘性液体中の swimmer cell は一本の極べん毛 (Pof) を使い高速で泳ぐ。固体表面に付着すると、菌が伸長して多核の細胞になるとともに、多数の側べん毛 (Laf) が形成され、swarmer cell に分化する。Swarmer cells は、Laf を用いて表面を這うように集団で移動する (surface swarming)。Pof と Laf の回転は同じ応答調節因子 CheY によって制御されているが、それぞれ反時計回り/時計回り (Pof) と、速い/遅い (Laf) と様式が異なる。我々は、cheY 遺伝子欠失株は、液体中のみならず、固体培地表面上でも運動能は野生株より高いが、surface swarming、すなわちコロニーの拡大が見られないことを見出した。このとき、菌体長はばらついており、全体として野生株より有意に短くなっており、Laf フラジャリン量も野生株より低かった。また、cheY 欠失により、システイン走化性に関わり細胞分化のマーカーともなるタンパク質 CtpA 存在量は、swimmer 細胞と同程度であった。以上の結果から、*V. alginolyticus* の CheY は、べん毛回転制御のみならず、細胞分化にも関与していることが示唆された。

## P1-065

### **Vibrio** べん毛モーター構成因子 FliF と FliG との融合タンパク質を用いた膜そう入 MS リング形成の解析

○本間 道夫<sup>1</sup>, 錦野 達郎<sup>2</sup>, 高橋 幹士<sup>3</sup>, 福嶋 優理亜<sup>1</sup>, ハオ 雨希<sup>1</sup>, 梶野 洗樹<sup>1</sup>, 内橋 貴之<sup>3</sup>, 小嶋 誠司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋大・理・生命理学, <sup>2</sup>大阪大・蛋白質研, <sup>3</sup>名古屋大・理・物質理学)

### **Assembly of MS ring in membrane by a fusion of *Vibrio* flagellar motor components, FliF and FliG**

○Michio Homma<sup>1</sup>, Tatsuro Nishikino<sup>2</sup>, Kanji Takahashi<sup>3</sup>, Yuria Fukushima<sup>1</sup>, Yuxi Hao<sup>1</sup>, Hiroki Kajino<sup>1</sup>, Takayuki Uchihashi<sup>3</sup>, Seiji Kojima<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Div. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Ins. Protein Res., Osaka Univ., <sup>3</sup>Div. Mat. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* は、細胞極に運動器官としてべん毛を1本持ち、これをイオン駆動力により回転させて液体中を遊泳する。べん毛の根元には、動力機関となるべん毛モーター構造が存在し、イオンエネルギー変換ユニットである固定子と、固定子との相互作用によりトルクを発生する回転子から構成されている。べん毛基部に存在し、回転子の一部を形成するMSリングは、べん毛形成で最初に作られる部分で、FliFという2回膜貫通タンパク質が、34個集合し形成される。このMSリングの直下にFliG、FliM、FliNがCリングを作る。FliGが固定子と相互作用し、回転力発生に寄与するもっとも重要なタンパク質の1つである。これまでに本研究室において、FliGとFliHがFliFのMSリング形成を大腸菌中で促進するということが発見した。本研究では、ネズミチフス菌 (*S. enterica*) がFliFとFliGを融合しても機能するという知見をもとに、*V. alginolyticus* のFliF-FliG融合遺伝子をpColdベクターにクローニングし、大腸菌内で過剰発現させ、融合タンパク質の精製を行い、機能と構造をしらべることを目的とした。FliFとFliGの分子量は、各々ca.64kDaとca.39kDaである。融合タンパク質は、SDS-PAGEにより130kDaのマーカー付近に分離され、FliFとFliGの抗体に反応する。超音波破碎によって得られた膜画分を界面活性剤で可溶化してゲル濾過をすると、Void付近の非常に大きな分子量の位置に融合蛋白質は分離された。融合タンパク質により形成されたリング構造を詳細に解析し、融合タンパク質がどのように効率よく膜に挿入され、MSリング形成するのかについてを議論したい。

## P1-066

### 肺炎球菌の自己融解酵素 LytA による溶菌過程の高速 AFM 観察

○太田 悠夢<sup>1</sup>, 山下 隼人<sup>1</sup>, 東 孝太郎<sup>2</sup>, 山口 雅也<sup>2</sup>, 川端 重忠<sup>2</sup>, 阿部 真之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大・院基礎工, <sup>2</sup>阪大・院歯)

### **High-speed AFM observation of the lysis process of bacterial cell by pneumococcal autolysin LytA**

○Yumu Ota<sup>1</sup>, Hayato Yamashita<sup>1</sup>, Kotaro Higashi<sup>2</sup>, Masaya Yamaguchi<sup>2</sup>, Shigetada Kawabata<sup>2</sup>, Masayuki Abe<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Den., Osaka Univ.)

The gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is the main pathogen causing pneumonia [1]. Autolysin LytA is considered a virulence factor that facilitates the spread of toxins and genetic exchange by lysing the bacterial cell wall [2]. However, the relationship between the cell wall architecture and the lysis mechanism by LytA remains unclear. High-speed atomic force microscopy (HS-AFM) is a unique technique for capturing the dynamic biomolecular processes with nanometer resolution under physiological conditions. HS-AFM has been applied not only for the imaging of purified proteins but also for that of living gram-negative bacterial cell surfaces [3]. In this study, we applied it to observe gram-positive bacteria *Streptococcus mitis*, *S. pneumoniae*-close relative. We successfully visualized the band-like structure of cell wall peptidoglycans along the short axis of the cells. Furthermore, HS-AFM movies showed the binding of LytA to the cell wall surface and the lysis of the bacterial cell. We will discuss the lysis process by autolysin LytA. [1] M. Yamaguchi et al., *Commun. Biol.*, 2, 96 (2019). [2] P. Mellroth et al., *J. Biol. Chem.*, 287, 14, 11018-11029 (2012). [3] H. Yamashita et al., *J. Mol. Biol.*, 422, 2, 300-309 (2012).

## P1-067

### **Potential role of intact cell division on bacteriolysis by enterococcal plasmid-encoded Bac41**

○久留島 潤, 富田 治芳 (群馬大・医・細菌学)

○Jun Kurushima, Haruyoshi Tomita (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ.)

Enterococcal plasmid-encoded bacteriolysin Bac41 is a narrow spectrum antimicrobial system to against *Enterococcus faecalis* cells without Bac41-encoding plasmid. The Bac41 effector consists of the secreted proteins BacL<sub>1</sub> and BacA, which attack the actively dividing cell wall of the target *E. faecalis* cell. In this study, we isolated spontaneous resistant mutants to Bac41. The spontaneous mutants were revealed to carry a truncation deletion of the C-terminal amino acid region 288 to 298 of the translated the UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, GalU. This truncated mutation or in-frame deletion of the *galU* resulted in a failure to utilize galactose and produce the enterococcal polysaccharide antigen (EPA), which is a major cell surface-associated polysaccharide. EPA defect resulted from *galU* or EPA biosynthesis gene caused an abnormal cell morphology. Interestingly, these mutants had reduced susceptibility to beta-lactams besides Bac41, despite their increased susceptibility to other bacteriostatic antimicrobial agents and chemical detergents probably due to reduced cell wall surface integrity. In addition, we identified that the other spontaneous resistant clones carry mutated cell division associated gene. These observations suggest that a potential role of intact cell division activity underlies exogenous bacteriolysis such as Bac41 or beta-lactams in *E. faecalis*.

## P1-068

### ウェルシュ菌フィブロネクチン結合タンパク質 FbpD の peptidoglycan 分解酵素としての機能

○森本 晃平<sup>1</sup>, 片山 誠一<sup>2</sup>, 榎本 泰雄<sup>2</sup>, 松永 望<sup>2</sup> (<sup>1</sup>岡山理科大学・理・臨床生命科学, <sup>2</sup>岡山理科大学・理・臨床生命科学)

### **FbpD, a fibronectin-binding protein of *Clostridium perfringens*, is one of a peptidoglycan hydrolase**

○Kohei Morimoto<sup>1</sup>, Seiichi Katayama<sup>2</sup>, Yasuo Hitsumoto<sup>2</sup>, Nozomu Matsunaga<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., <sup>2</sup>Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

【目的】我々はウェルシュ菌の菌体表層に存在する Fibronectin 結合タンパク質 FbpD を同定した。FbpD はモチーフ検索により、Cell wall-binding repeats と peptidoglycan hydrolase (PGH) を持つと予想された。本研究では、実際に FbpD が PGH としての機能や役割を担うか調べた。【方法】FbpD の PGH 活性を調べるため、1) 組換え体 FbpD (rFbpD) および各種菌体成分を加熱死菌含有ゲルにアブライした Zymography, 2) rFbpD をウェルシュ菌由来 peptidoglycan (PG) 含有ゲルにアブライした Zymography, 3) rFbpD によるウェルシュ菌を基質とした濁度低下法、を検討した。また rFbpD の細胞壁結合能を 4) ウェルシュ菌と PG を担体とした pull-down assay にて調べた。5) グラム染色を行い、野生株および  $\Delta fbpD$  株の形態を観察した。【結果と考察】1) rFbpD, 野生株および  $\Delta fbpD$ /pfbpD 株の菌体成分に溶菌バンドが検出され、2) rFbpD に PG 分解バンドが検出された。3) rFbpD による濁度低下は見られなかった。以上から、FbpD は弱い PGH 活性を有すると考えられた。4) 菌体および PG、ともに沈査にバンドが検出されたため、rFbpD は細胞壁に結合すると考えられた。5) 野生株に比べて  $\Delta fbpD$  株は、有意な菌体の伸長が認められたため、FbpD は菌体の形状に影響を及ぼすと考えられた。以上から、FbpD はウェルシュ菌の新たな PGH である可能性が示唆された。

**P1-069****Function of the cell wall-binding domain of *Clostridium perfringens* autolysin**

○青野りよ<sup>1</sup>, 松永望<sup>2</sup>, 玉井栄治<sup>3</sup>, 成谷宏文<sup>4</sup>, 櫃本泰雄<sup>2</sup>, 片山誠一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岡山理科大学・理・物質理学, <sup>2</sup>岡山理科大学・理・臨床生命, <sup>3</sup>松山大・薬・感染症, <sup>4</sup>十文字学園女子・人間生活・食品開発)

○Riyo Aono<sup>1</sup>, Nozomu Matsunaga<sup>2</sup>, Eiji Tamai<sup>3</sup>, Hirofumi Nariya<sup>4</sup>, Yasuo Hitsumoto<sup>2</sup>, Seiichi Katayama<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Material Sci., Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. of Sci., <sup>2</sup>Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. of Sci., <sup>3</sup>Dept. Infect. Dis., Coll. of Pharm. Sci., Matsuyama Univ., <sup>4</sup>Fac. Human Life, Jumonji Univ.)

The autolysin of *Clostridium perfringens* 13 (Acp, CPE1231) is a 120 kDa N-acetylglucosaminidase. It is composed of 10 N-terminal cell wall-binding repeats (cell wall-binding domains, CBD) at the N-terminal and a catalytic domain (CD) at the C-terminal. The apparent molecular weight of Acp had been first reported to be 95 kDa. However, the presence of 120 kDa Acp as well as 95 kDa Acp was found by our Western blot analysis using anti-AcpCD polyclonal antibody. The sequence of the N-terminal 10 amino acids of the purified 95 kDa Acp was determined. It revealed that the N-terminal amino acid of 95 kDa Acp was the 297th serine of whole Acp polypeptide. To elucidate each function of 120 kDa Acp and 95 kDa Acp, we constructed four plasmids, pacp, pRIA1, pRIA4, and pRIA3, expressing wild-type Acp, 120 kDa Acp (R296A, S297A), 95 kDa Acp, and AcpCD. The 13 *acp::erm* mutant was transformed with each plasmid. The culture sedimentation of the 13 *acp::erm/pRIA3* was observation, but not that of the other strains. The shape of the cells of 13 *acp::erm/pRIA3* was longer than those of the 13 *acp::erm/pacp*. Using immunofluorescence staining with anti-AcpCD antibodies, 120 kDa Acp and 95 kDa Acp were located on the cell surface but not AcpCD. AcpCD was detected in the intracellular. These results suggested that the CBD is essential for the extracellular export.

**P1-070****バクテリアの形態形成に必須な RodZ による転写後調節 (4)**

○三戸部 治郎<sup>1</sup>, 須藤 直樹<sup>1</sup>, 米澤 英雄<sup>2</sup>, 大崎 敬子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>杏林大・医・感染症学, <sup>2</sup>東京歯大・微生物)

**Post-transcriptional regulation by RodZ protein essential for rod shape of bacilli. (4)**

○Jiro Mitobe<sup>1</sup>, Naoki Sudo<sup>1</sup>, Hideo Yonezawa<sup>2</sup>, Takako Osaki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ., <sup>2</sup>Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Col.)

【目的】RodZ はアクチン様細胞質蛋白 MreB とともに桿菌の桿状形態を形成する内膜蛋白である。我々は赤痢菌の 3 型分泌装置のレギュレーター InvE (VirB) を転写後レベルで調節する因子としてこれを同定し、塩基性アミノ酸のクラスターに RNA 結合活性を持つことを報告した。病原性以外の表現型を調べたところ、赤痢菌の *rodZ* 欠損株は過酸化水素の分解が亢進し、RpoS (KatF) の発現が抑えられる対数増殖期にその発現が起こることが分かった。また RpoS 以外に mRNA の二次構造で調節される RpoH と RpoE の発現が増加することが示された。

【方法・結果】Hfq の制御下にあることが報告されている遺伝子群の発現を FLAG-tag で調べ、いくつかの遺伝子がシグマ因子と同様に赤痢菌の *rodZ* 欠損株で増加することを明らかにした。また、臨床由来の赤痢菌株と比較して多くの遺伝子が欠損している大腸菌 K12 株の *rodZ* 欠損では生育が非常に悪化することが分かった。

【考察】赤痢菌において、いくつかの遺伝子では確かに *rodZ* 欠損株で発現が変化することが示された。RpoS は翻訳融合のレポータープラスミドでプロモータを構成的な *lacUV5* や *trc* に置換しても RodZ の影響は同じであったことから、この系を利用して構成的な発現下で RodZ の影響を確認する予定である。

**P1-071****The essential roles of Type IX secretion system in periodontal pathogen *Prevotella intermedia***

○内藤真理子<sup>1</sup>, 庄子幹郎<sup>1</sup>, 佐藤啓子<sup>2</sup> (<sup>1</sup>長崎大・院・医歯薬・口腔病原微生物学, <sup>2</sup>長崎大・院・医歯薬・フロンティア口腔科学)

○Mariko Naito<sup>1</sup>, Mikio Shoji<sup>1</sup>, Keiko Sato<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Biomedical Sci., Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Dept. Frontier Oral Sci., Grad. Sch. Biomedical Sci., Nagasaki Univ.)

**Purpose:** *Prevotella intermedia*, a gram-negative oral anaerobic bacterium, is considered one of the periodontal pathogens. In recent years, the involvement of this bacterium in respiratory tract infections as well as in other oral infections has been revealed. The virulence factors of this bacteria have not yet well studied. Recently we established a targeted mutagenesis technique in *P. intermedia* OMA14. Here we investigate the role of type IX secretion system (T9SS) using newly generated mutants and complemented strain. **Methods:** *P. intermedia* possesses potent virulence factors, such as cysteine proteinase interpain A encoded by the *inpA* gene. It is one of predicted T9SS cargo protein. We successfully obtained mutants deficient in *inpA* and the T9SS component genes *porK* and *porT*. The *porK*+ complemented strain also could be generated. The generated strains were investigated to elucidate the roles of T9SS. **Results and Discussion:** None of the mutants exhibited protease activity of interpain A. The *porK* and *porT* mutants, but not the *inpA* mutant, showed defects in colony pigmentation, hemagglutination, and biofilm formation. The *porK*+ complemented strain recovers all above activities. Those indicate that T9SS functions in *P. intermedia* and that interpain A is one of the T9SS cargo proteins. Our gene engineering techniques are expected to facilitate further studies in *P. intermedia*.

**P1-072****新規スクリーニング法, EBIS 法によるグラム陰性菌に対する抗菌薬探索**

○塩田 拓也, 中島 由香里 (宮大・テニユアトラック推進)

**A new screening method for discovering anti-gram-negative agents by EBIS**

○Takuya Shiota, Yukari Nakajima (Org. TT. Univ. of Miyazaki)

グラム陰性菌の外膜は、高度な透過障壁として、抗菌薬などによる治療の障害となる。外膜の主成分の一つに β バレル型の膜貫通領域を持つ外膜タンパク質が存在する。これらが機能するためには、正しい立体構造を伴った膜組込 (アセンブリー) が必要である。ほとんどすべての外膜タンパク質のアセンブリーは、外膜に存在する Beta-Barrel Assembly Machinery (BAM) 複合体と呼ばれる分子装置によって行われる。外膜タンパク質のアセンブリー阻害は、グラム陰性菌の弱体化に直結するため、BAM 複合体は魅力的な抗菌薬の標的として多角的な視点から研究がなされている。近年では、BAM 複合体に対する有効な阻害剤が発見されている。しかしながら、それら全てが、BAM 複合体の最も重要な触媒部位に結合するものであり、その多様性は低い。本研究では、より広い視点からランダムに BAM 複合体に対する阻害剤を探索するためのスクリーニング系として、*E. coli* microsoma membrane (EMM) assembly assay Based Inhibitor Screening (EBIS) を開発した。この手法は、大腸菌の粗膜画分である EMM を用いた *in vitro* 再構築実験系に外部から候補物質を添加し、アセンブリー効率の変化から有効物質を探索する手法である。現在、このスクリーニングを用いて、BAM 複合体を効率的に阻害できるペプチド配列などを決定している。

## P1-073

### Study of protein secretion mechanisms in *Porphyromonas gingivalis*

○庄子幹郎<sup>1</sup>, 佐々木祐子<sup>1</sup>, 末吉峻幸<sup>1</sup>, 柴田敏史<sup>2</sup>, 松尾長大<sup>1</sup>, 雪竹英治<sup>1</sup>, Matthias Wolf<sup>3</sup>, 内藤真理子<sup>1</sup> (長崎大・院医歯薬・口腔病原微生物学分野, <sup>2</sup>鳥取大・医・感染制御学・細菌学分野, <sup>3</sup>沖縄科学技術大学院大・生体分子電子顕微鏡解析ユニット)

○Mikio Shoji<sup>1</sup>, Yuko Sasaki<sup>1</sup>, Takayuki Sueyoshi<sup>1</sup>, Satoshi Shibata<sup>2</sup>, Takehiro Matsuo<sup>1</sup>, Hideharu Yukitake<sup>1</sup>, Matthias Wolf<sup>3</sup>, Mariko Naito<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Bio. Sci., Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Div. Bacteriol, Dept. Microbiol. Immunol., Med., Tottori Univ., <sup>3</sup>Molecular Cryo-Electron Microscopy Unit, OIST)

**Purpose:** *Porphyromonas gingivalis* has virulence factors such as fimbriae and gingipain proteases on the cell surface. Fimbriae related proteins and gingipain proteases are secreted to the cell surface as lipoproteins and via the Type IX secretion system (T9SS), respectively. To study these secretion mechanisms, we constructed conditional gene expression systems in *P. gingivalis*. **Methods:** The anhydrotetracycline-inducible promoter with the *tetR* gene was inserted into an *mfa1mfa2::ermF* targeting plasmid. Gene of interest was placed after the inducible promoter. We used a nanoluciferase gene with the *fimA* signal sequence in N-terminus and His-tag in C-terminus (*fimAsigN-nluc-His*) and a *hbp35* gene to study the lipoprotein secretion system and the T9SS, respectively. **Results and Discussion:** Using the conditional gene expression system of *fimAsigN-nluc-His*, we found that charged amino acids after the lipidation site of FimA are essential for secretion. This finding was consistent with the case of intact FimA protein, suggesting that charged amino acids after lipidation site are presumably present to pass the outer membrane. Furthermore, we succeeded a conditional expression system of the *hbp35* gene. A-LPS bound form of Hbp35 was reduced in the presence of a proton motive force inhibitor (PMF). Therefore, it is plausible that the T9SS cargo proteins are secreted by PMF.

## P1-074

### 3D reconstruction by electron tomography to ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 particles

○呉紅, 藤岡良彦, 坂口翔一, 鈴木陽一, 中野隆史 (大阪医薬大・医・微生物学・感染制御学)

○Hong Wu, Yoshihiko Fujioka, Shoichi Sakaguchi, Youichi Suzuki, Takashi Nakano (Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ.)

SARS-CoV-2 is the cause of COVID-19. The three-dimensional morphology of viral particles existing and multiplying in infected cells has not been established by electron tomography. In this study, we establish the morphological structure of SARS-CoV-2 particles by three-dimensional reconstruction of images obtained by electron tomography and transmission electron microscopy of biological samples embedded in epoxy resin. The characteristic roots of spike structures were found to be arranged at the surface of a virion covered with an envelope. A high-electron-density structure that appears to be a nucleocapsid was observed inside the envelope of the virion on three-dimensional images reconstructed by electron tomography. The SARS-CoV-2 particles that budded in the vacuoles in the cytoplasm were morphologically identical to those found outside the cells, suggesting that mature and infectious SARS-CoV-2 particles were already produced in the vacuoles. Here, we show the three-dimensional morphological structure of SARS-CoV-2 particles reconstructed by electron tomography. Considering the infection control of COVID-19, inhibition of viral release from vacuoles would be a new target in the development of prophylactic agents against SARS-CoV-2.

## P1-075

### リボソームタンパク質の欠損による大腸菌の亜鉛耐性化機構

○白川璃子<sup>1</sup>, 小崎智己<sup>2</sup>, 石川一也<sup>1</sup>, 古田和幸<sup>1</sup>, 垣内力<sup>1</sup> (岡山大・院医歯薬・分子生物学, <sup>2</sup>岡山大・薬・分子生物学)

### Zinc tolerance caused by deletion of ribosomal protein genes in *Escherichia coli*

○Riko Shirakawa<sup>1</sup>, Tomoki Kosaki<sup>2</sup>, Kazuya Ishikawa<sup>1</sup>, Kazuyuki Furuta<sup>1</sup>, Chikara Kaito<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., <sup>2</sup>Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

亜鉛は細菌にとって必要不可欠であると同時に過剰量では毒性を示す。亜鉛は酵素活性やタンパク質構造維持に関わっており、毒性メカニズムとしては鉄・硫黄クラスターの破壊が知られている。そのため細菌は取り込みや排出を調節して細胞内亜鉛濃度を維持している。本研究では、亜鉛耐性化に関わる新たな因子の同定を目的とし、大腸菌遺伝子欠損株ライブラリを用いて亜鉛耐性株を探索した。その結果、リボソームタンパク質 RpmJ の欠損が大腸菌の亜鉛耐性を導くことを見出した。RpmJ の欠損株はタンパク質合成阻害剤に対して感受性を示し、翻訳の忠実度が変化していたことから、RpmJ の欠損によりリボソーム機能が変化していると考えられた。RNA-Sequence 解析により、RpmJ の欠損株では亜鉛の標的である鉄・硫黄クラスターを合成する遺伝子群が発現低下していることが明らかとなった。さらに、過剰亜鉛条件下において、RpmJ の欠損株の細胞内亜鉛濃度が低下していた。以上の結果から、RpmJ の欠損によるリボソームの機能変化は、鉄・硫黄クラスターの合成量低下や細胞内亜鉛濃度の低下によって亜鉛耐性を導くことが示唆された。さらに、RpmJ 以外のリボソームタンパク質が亜鉛耐性に関与するか解析したところ、RplA, RpmE, RpmI, RpsT の各欠損株、及び RpmB など複数種のリボソームタンパク質の過剰発現株が亜鉛耐性を示すことが明らかとなった。以上の結果は、リボソームタンパク質の発現変動が大腸菌の亜鉛耐性化を導くことを示唆している。今後は、亜鉛耐性化に関わるリボソームタンパク質の共通性と亜鉛耐性化の分子メカニズムを解析していきたい。

## P1-076

### *Mycobacterium avium* の酸性環境下での適応能の解析

○瀧井猛将<sup>1,2</sup>, 伊藤佐生智<sup>2</sup>, 大原直也<sup>3</sup>, 前田伸司<sup>4</sup>, 肥田重明<sup>2</sup> (結核予防会・結核研・抗酸菌, <sup>2</sup>名市大・院薬・衛生化学, <sup>3</sup>岡山大・院医歯薬・口腔微生物, <sup>4</sup>北海道科学大・薬)

### Analysis of the adaptation mechanism under acidic envelopment of *Mycobacterium avium*

○Takemasa Takii<sup>1,2</sup>, Saotomo Itoh<sup>2</sup>, Naoya Ohara<sup>3</sup>, Shinji Maeda<sup>4</sup>, Shigeaki Hida<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mycobac. Ref. Res., RIT, JATA, <sup>2</sup>Dep. Hygienic Chem., Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ., <sup>3</sup>Dep. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., <sup>4</sup>Sch. Pharm., Hokkaido Univ. Sci.)

【背景・目的】*Mycobacterium avium* は、他の抗酸菌種 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG) と比較して、酸性環境下において増殖可能であることを報告している。本研究では *M. avium* の酸性環境適応機構の解析を行った。【方法】菌体外 pH は pH メーターで、菌体内 pH は BCECF を用いて測定した。培養中のアンモニア量は GLDH 法で測定した。遺伝子およびタンパク質発現は、RT-PCR 法、ウエスタンブロッティング法で測定した。sigF による *arcA* 遺伝子転写活性はレポーター遺伝子アッセイ法で測定した。生菌数はコロニーアッセイ法で測定した。【結果】他の抗酸菌種と比べて *M. avium* では pH 4.9 での培養下で、菌体外 pH が 0.2-1.0 上昇し、培地中には 0.4-0.8mM のアンモニアが測定された。アンモニアの産生はアルギニン添加により上昇し、アミノグアニジン添加により菌体外 pH 上昇は阻害された。菌体外 pH の低下に伴いアルギニン代謝 (ADI) 経路の *arcA* と *ArcA* タンパク質の発現が誘導された。また、菌体内 pH も *M. avium* では菌体外の pH に比例して低下し、それに伴い pH センサーの sigF の発現も上昇した。sigF 発現誘導により *arcA* のレポーター活性が上昇した。宿主細胞内の菌数はアンモニアの産生能に比例していた。【考察】ファゴソーム内の pH は pH6.8 程度、菌を消化・分解するリソソーム内は pH4.0 程度であり、低 pH 環境下で誘導されるアンモニア産生は、*M. avium* の宿主細胞内で生存に有利に働いていることが示唆された。*arcA* の転写活性化に sigF の関与が示された。今後、*arcA* 遺伝子欠損株や *arcA* 遺伝子復帰株を用いて、検証を進める予定である。さらに、pH 依存性の抗菌剤クラリスロマイシンの薬剤感受性との関連性の検討も予定している。



**P1-077****氷包埋 cryo-TEM 観察で得られた *Mycobacteroides* 属 6 種間の基礎形態の比較**

○山田 博之<sup>1</sup>, 近松 絹代<sup>1</sup>, 青野 昭男<sup>1</sup>, 村田 和義<sup>2</sup>, 宮崎 直幸<sup>3</sup>, 香山 容子<sup>4</sup>, 御手洗 聡<sup>1,5</sup> (1)抗酸菌・結核研, (2)生体分子構造・生理研, (3)大塚製薬(株), (4)テラベース (株), (5)長崎大)

**Comparison of cell morphology between 6 species in genus *Mycobacteroides* examined with cryo-TEM**

○Hiroyuki Yamada<sup>1</sup>, Kinuyo Chikamatsu<sup>1</sup>, Akio Aono<sup>1</sup>, Kazuyoshi Murata<sup>2</sup>, Naoyuki Miyazaki<sup>3</sup>, Yoko Kayama<sup>4</sup>, Satoshi Mitarai<sup>1,5</sup> (1)Dept. Mycobac. Ref. Res., RIT, JATA., (2)Div. Struct. Biol., NIPS, (3)Otsuka Pharma, (4)Terabase Inc., (5)Nagasaki Univ.)

In 2018, novel genera have been emended in the family *Mycobacteriaceae*. Genus *Mycobacteroides* contains 6 species with 3 subspecies. These species share 24 conserved signature peptides and 27 conserved signature indels, and, therefore, are closely related in the phyletic affinity of each other. In the 94th annual meeting of JSB, we reported the results in 4 species with three subspecies. This study examined the fundamental cell morphologies of all six species with three subspecies containing 853 cells with whole-mount cryo-TEM. Cell diameter, length, perimeter, circularity, and aspect ratio were measured with ImageJ/Fiji software and compared between species. *M. abscessus* subsp. *abscessus* (Maa) and *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Mam) have no significant differences between each other in all comparisons. On the other hand, *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Mab) showed significantly larger values in diameter, length and perimeter in comparison with both Maa and Mam. *M. immunogenum* (Mi) showed a significantly larger diameter in comparison with other species, whereas perimeters of Mi and *M. salmoniphilum* (Msl) were significantly longer than the remaining species. Msl showed 30 significant differences in all comparisons.

**P1-078/W4-3****抗生物質に曝された大腸菌の核様体構造**

○梅谷 実樹<sup>1</sup>, 若本 祐一<sup>1,2,3</sup> (1)東大・院総合文化・関連基礎, (2)東大・複雑系センター, (3)東大・生物普遍性)

**Nucleoid structure of antibiotic-stressed *Escherichia coli***

○Miki Umetani<sup>1</sup>, Yuichi Wakamoto<sup>1,2,3</sup> (1)Dept. Basic Sci., Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. Tokyo, (2)Res. Ctr. Complex Syst. Biol., Univ. Tokyo, (3)UBI, Univ. Tokyo)

Bacterial cells can adapt to stress without genetic changes. Nucleoid structure is a strong candidate to link genome-wide gene expression and stress conditions, which can change depending on the physiology and regulate gene expression globally. Here we aim to describe nucleoid changes behind the phenotypic adaptation of *Escherichia coli*. We exposed isogenic *E. coli* cells expressing fluorescently tagged nucleoid-associated protein (NAP) HupA to sub-lethal Cm stress in our custom microfluidic device. Although most cells stopped dividing, a small fraction of cells continued dividing with decreased division rates. Spatial distributions of HupA-mCherry were compacted in growth-arrested cells, whereas those were uniform in growth-recovered cells. We also performed microarray analysis on 3 adaptive resistant populations derived from different single cells exposed to the same Cm environment. They showed distinct transcriptomic states without genetic changes. One of them altered RcsA-RcsB regulated genes dramatically. Although RcsB has other partners under the regulation of NAP H-NS like RcsA, their downstream genes did not show remarkable expression changes. These results evoked interest in the complex involvement of nucleoid structure in adaptive resistance. In this presentation, we will introduce the NAP profiles and discuss how nucleoid structure involves in phenotypic adaptation.

**P1-079/W4-7****結核クラスターの感染伝播予測に対するゲノムデータベース数理モデルの活用**

○谷本 佳彦<sup>1</sup>, 有川 健太郎<sup>1</sup>, 藤山 理世<sup>2</sup>, 小野 綾子<sup>2</sup>, 大西 南<sup>2</sup>, 田丸 亜貴<sup>3</sup>, 山本 香織<sup>3</sup>, 吉田 志緒美<sup>4</sup>, 萩田 堅一<sup>5</sup>, 岩本 朋忠<sup>1</sup> (1)神戸市健科研, (2)神戸市保健所, (3)大安研, (4)近畿中央呼吸器センター, (5)兵庫県健科研)

**Application of Mathematical Models Based on Genomic Data to Predict Tuberculosis Cluster Infection**

○Yoshihiko Tanimoto<sup>1</sup>, Kentaro Arikawa<sup>1</sup>, Riyo Fujiyama<sup>2</sup>, Ayako Ono<sup>2</sup>, Minami Onishi<sup>2</sup>, Aki Tamaru<sup>3</sup>, Kaori Yamamoto<sup>3</sup>, Shiomi Yoshida<sup>4</sup>, Kenichi Ogita<sup>5</sup>, Tomotada Iwamoto<sup>1</sup> (1)Kobe Inst. Heal., (2)Pub. Heal. Mgmt. Ctr., Kobe City, (3)Osaka Inst. Pub. Heal., (4)NHO Kinki-chuo Chest Med. Ctr., (5)Hyogo Pref. Inst. Pub. Heal. Sci.)

Tuberculosis (TB) infection clusters are difficult to identify due to the long incubation period and the presence of latent TB infection (LTBI). In this study, we evaluated the usefulness of the mathematical model using a large cluster KCT164 with matched VNTR types in Osaka Pref., Osaka City, Hyogo Pref., and Kobe City, and the KCT327 cluster in Kobe City, where epidemiological information is abundant, as model cases.

Timed phylogeny of 46 strains in the KCT164 clusters was generated by BEAST2 using whole genome sequencing and strain isolation date data. The predicted diagram diverged in the late 1970s according to the presence or absence of rifampicin resistance, providing an estimate the timing of resistance acquisition.

The KCT327 cluster, consisting of 7 strain-positive cases, 4 cases that developed the disease but no strain was obtained, and 6 cases with LTBI, was analyzed using Logically Inferred Tuberculosis Transmission (LITT), an algorithm that combines clinical and epidemiological data with genomic data to rank transmission. The analysis predicted one patient to be the hub of the spread of the infection, consistent with epidemiological information.

In summary, BEAST2 is suitable for the analysis of large clusters and is useful for estimating the timing of mutations; LITT is suitable for relatively small clusters for which epidemiological information is available.

**P1-080****機械学習を利用した薬剤耐性大腸菌ゲノムの特徴探索**

○鈴木 匡弘 (藤田医大・医・微生物学)

**Feature search for drug-resistant *E. coli* genome using machine learning**

○Masahiro Suzuki (Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ.)

【緒言】大腸菌を MLST による ST 型レベルで観察すると、薬剤耐性遺伝子をほとんど保有しない ST 型 (薬剤感受性クローン) と、多くの分離株が薬剤耐性遺伝子を保有する ST 型 (薬剤耐性クローン) とが存在するように見え、ゲノム中に何らかの差があると推測される。ゲノムデータの集積が進み、大腸菌では 30,000 株以上のデータが利用可能となっており、機械学習による解析が可能なレベルに達している。そこで、薬剤耐性クローンの特徴を探るため、DecisionTree による機械学習によってゲノムの探索を行った。

【方法】14,445 株の contig レベルゲノムデータのうち、同一 ST 型株が 20 株以上存在した 9,400 株を使用した。bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>OXA</sub>, aac のいずれかが検出された菌を薬剤耐性菌とした。ST 型毎に、薬剤耐性株が 80%以上を薬剤耐性クローン、20%以下の場合感受性クローン、それ以外を混合クローンとした。ゲノムデータは wgMLST locus を BLASTn 検索し、その有無によって二値化した。薬剤耐性及び感受性クローンの各 ST 型について、30 株までを上限に感受性クローンについては感受性菌を、耐性クローンについては耐性菌をランダムに選択し、DecisionTree による機械学習を行い、薬剤耐性クローンの特徴付ける locus を探索した。

【結果及び考察】45 個の locus によって感受性クローンと耐性クローンが ST 型レベルで大別された。しかし、同一 ST 型内における感受性株と耐性株を区別する locus は見つからなかった。この 45 個の locus に薬剤耐性獲得・許容に関連する遺伝子が含まれる可能性がある。機械学習による探索はゲノムデータの利用に有用なツールとなり得ることから、探索方法の改善、実験による検証を進める必要がある。

## P1-081

### 隠れた志賀毒素産生性大腸菌系統, Clonal complex 119 (CC119) の集団構造と CC119 菌株の糖代謝特性

○中村 佳司<sup>1</sup>, 勢戸 和子<sup>2</sup>, 李 謙一<sup>3</sup>, 後藤 恭宏<sup>1</sup>, 伊豫田 淳<sup>3</sup>, 林 哲也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・医・細菌学, <sup>2</sup>大安研, <sup>3</sup>感染症・細菌第一)

### Population structure of CC119, a hidden STEC lineage, and glycolytic phenotypes of CC119 strains

○Keiji Nakamura<sup>1</sup>, Kazuko Seto<sup>2</sup>, Ken-ichi Lee<sup>3</sup>, Yasuhiro Gotoh<sup>1</sup>, Sunao Iyoda<sup>3</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Fac. Med. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Osaka Inst. Pub. Health, <sup>3</sup>Dept. Bac. I., Inst. Infect. Dis.)

志賀毒素 (Stx) 産生性大腸菌 (STEC) の O157:H7 や主な non-O157 血清型の菌株は、亜テルル酸耐性を利用して選択的に分離することができる。O165:H25 STEC は、重症患者から分離されることも多く、STEC 主要血清型と同様の病原性を有すると考えられる。しかし、O165:H25 菌株は亜テルル酸感受性であるため、他の血清型に比べて分離が容易ではなく、罹患率などが過小評価されている可能性がある。また、体系的な全ゲノム配列解析も行われていない。本研究では O165:H25 とその近縁の O172:H25 を Clonal complex 119 (CC119) と定義し、新規にシーケンスを行った 90 株を含む 202 株のグローバルなゲノム解析と、11 株の完全長ゲノム配列 (7 株は今回決定) の詳細なゲノム比較を行った。また、50 株の Stx ファージの全配列を決定し、配列比較を行った。これらにより、Stx2a ファージ, Locus of enterocyte effacement (LEE), STEC 病原プラスミドが CC119 の主要系統の共通祖先によって獲得され、安定に維持されていること、また主要系統内では STEC 主要血清型と同様の病原遺伝子セットが保存されていることが明らかとなった。さらに 14 種の糖の代謝能を解析し、CC119 菌株では 4 種の糖 (rhamnose, sucrose, salicin, dulcitol) に対する分解活性が消失あるいは著しく遅延した活性を示すことを確認するとともに、その遺伝的背景を明らかにした。今回の菌株セットにおいて関連遺伝子を解析した結果、現在各国で主流となっている CC119 系統のほぼすべての菌株で、これら 4 つの表現系が観察されることが示唆された。多くの大腸菌が利用可能な rhamnose に対する CC119 菌株の代謝特性は、菌同定の一助になると考えられる。

## P1-082

### STEC O157:H7 clade 8 の世界的な集団構造と Stx2 と Stx2a ファージのバリエーション

○宮田 達弥<sup>1</sup>, 谷口 愛樹<sup>1</sup>, 中村 佳司<sup>1</sup>, 後藤 恭宏<sup>1</sup>, 平井 晋一郎<sup>2,4</sup>, 横山 栄二<sup>2</sup>, 大西 真<sup>3</sup>, 伊豫田 淳<sup>3</sup>, 小椋 義俊<sup>1,5</sup>, 林 哲也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九大院・医・細菌学, <sup>2</sup>千葉衛生研究所・細菌, <sup>3</sup>感染症・細菌第一, <sup>4</sup>感染症・感染症危機管理研究センター, <sup>5</sup>久留米大・医・感染医学)

### Global population structure of STEC O157:H7 clade 8 and the variation of Stx2 and Stx2a phages

○Tatsuya Miyata<sup>1</sup>, Itsuki Taniguchi<sup>1</sup>, Keiji Nakamura<sup>1</sup>, Yasuhiro Gotoh<sup>1</sup>, Shinichiro Hirai<sup>2,4</sup>, Eiji Yokoyama<sup>2</sup>, Makoto Ohnishi<sup>3</sup>, Sunao Iyoda<sup>3</sup>, Yoshitoshi Ogura<sup>1,5</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol. Fac. Med. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Div. Bacteriol., Chiba Prefect. Instit. Pub. Heal., <sup>3</sup>Dept. Bacteriol. I., NIID, <sup>4</sup>Dept. Infect. Dis. Risk Manag. Center, NIID, <sup>5</sup>Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med.)

【背景】志賀毒素産生大腸菌 (STEC) O157:H7 の中で、clade 8 は高病原性系統とされている。Stx2 産生は重症化のリスクファクターだが、以前に提唱された clade 8 の 2 つの subclade 間での Stx2 産生量の違いについて、結果が異なる報告がされている。また、clade 8 のグローバルな集団構造も解析されていない。【方法】今回シーケンスした国内株 (n=147) を含むグローバルな clade 8 の菌株セット (n=510) のゲノム系統解析を行うとともに、clade 8 系統を網羅する 35 株の完全長配列 (18 株は今回決定) の詳細な比較解析を行った。また、clade 8 内の亜系統間での Stx2 産生量や疾患重症度の違いも再評価した。【結果・考察】Clade 8 は既報の SNP genotypes (SGs) に対応した 4 つの亜系統 (SG8\_30, 31A, 31B, 32/33) に分類され、Clade 8 内では、まず SG8\_30 と non-SG8\_30 が分かれ、後者から SG8\_31A と SG8\_31B が分岐し、さらに SG8\_31B から SG8\_32/33 が出現したと考えられる。完全長ゲノムの比較では、染色体構造はよく保存され、ゲノム構造多型の原因となること多いプロファージも、その多くは株間よく保存されていた。しかし、Stx2a ファージの配列はバリエーションに富み、SG8\_31 では  $\gamma$  サブタイプからそのバリエーション ( $\gamma_{v1}$ ) に変化し、SG8\_32/33 では  $\gamma$  から  $\delta$  へのサブタイプスイッチが生じていた。また、 $\gamma$  ファージ保有株 (主に SG8\_30 株) は  $\delta$  ファージ保有株 (主に SG8\_32/33 株) に比べて高い Stx2 産生量を示し、重症感染症からの分離頻度も高いことが判明した。SG8\_31A と 31B は株数が少なく今後さらなる解析が必要だが、 $\gamma_{v1}$  ファージを保有する SG8\_31A 株には SG8\_30 株よりもさらに高い Stx2 産生性を示す株があり、注意が必要である。

## P1-083

### 肺 MAC 症の病型に関連する細菌側因子の GWAS による探索

○矢野 大和<sup>1</sup>, 有川 健太郎<sup>2</sup>, 西内 由紀子<sup>3</sup>, 三澤 可奈<sup>4</sup>, 西村 知泰<sup>4</sup>, 大田 篤<sup>3</sup>, 丸山 史人<sup>3</sup>, 三木 真理<sup>5</sup>, 阿戸 学<sup>1</sup>, 長谷川 直樹<sup>4</sup>, 木田 博<sup>5</sup>, 南宮 湖<sup>4</sup>, 北田 清悟<sup>5</sup>, 岩本 朋忠<sup>2</sup> (<sup>1</sup>感染症, <sup>2</sup>神戸市健康科学研, <sup>3</sup>広島大・国際協力, <sup>4</sup>慶應大病院, <sup>5</sup>大阪刀根山医療センター)

### GWAS approach identifies bacterial risk factors for cavitary MAC lung diseases

○Hirokazu Yano<sup>1</sup>, Kentaro Arikawa<sup>2</sup>, Yukiko Nishiuchi<sup>3</sup>, Kana Misawa<sup>4</sup>, Tomoyasu Nishimura<sup>4</sup>, Atsushi Ota<sup>3</sup>, Fumito Maruyama<sup>3</sup>, Mari Miki<sup>5</sup>, Manabu Ato<sup>1</sup>, Naoki Hasegawa<sup>4</sup>, Hiroshi Kida<sup>5</sup>, Ho Namkoong<sup>4</sup>, Seigo Kitada<sup>5</sup>, Tomotada Iwamoto<sup>2</sup> (<sup>1</sup>NIID, <sup>2</sup>Kobe Inst. Health, <sup>3</sup>Hiroshima Univ. IDEC, <sup>4</sup>Keio Univ. Hosp., <sup>5</sup>NHO Osaka Toneyama Med. Cent.)

肺 MAC 症は遅進行性かつ難治性の肺疾患で、稀に患者を死に至らしめる。現在、その進行のテンポや患者病型に影響を与える細菌側因子は不明である。私たちは肺 MAC 症の原因菌として日本で最も頻繁に分離される *Mycobacterium avium* の遺伝子と患者病型との間に関連が認められるかどうかを明らかにするため、宿主病型、治療歴の有無、分離菌株のゲノムが関連付けられた独立した 218 の *M. avium* 感染症例データセット (大阪刀根山医療センター: N=109 [空洞なし: 49, 空洞あり: 60], 慶應義塾大学病院: N=109 [空洞なし: 90, 空洞あり: 19]) を構築した。線形混合モデルを使用した unitig GWAS により、*M. avium* のシクロローム C の合成に関わる *ccdA* タンパク質コード領域内の unitig が空洞病型、すなわち重症化と関連していることが示唆された ( $P$  value:  $6 \times 10^{-10}$ , 2 群間頻度差: 31%)。ccdA の当該 unitig は慶應大分離株にはみつからなかった。そこで公共データベースに登録されている情報をデータセットに加え、大阪地域から分離された *M. avium* (N=115) と東京地域から分離された *M. avium* (N=115) の間で、異なる頻度で分布している unitig があるかどうか調べたところ、10 の遺伝子座に地域間で異なる頻度で分布している unitig があることが判明し、そのうちのひとつが *ccdA* 内の unitig とオーバーラップする配列であった。今後、データセットに加える症例数をさらに増やし、今回観察された *ccdA* と患者病型との関連の妥当性を検証する。

## P1-084/W4-4

### Natural transformation mediates transfer of SCCmec in *Staphylococcus aureus* biofilms

○マリー マイス<sup>1</sup>, Thuy Le Thi Nguyen<sup>2</sup>, 大庭 良介<sup>1</sup>, 東出 正人<sup>3</sup>, Tarek Msadek<sup>4</sup>, 森川 一也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大・医, <sup>2</sup>Biotechnology Centre of Ho Chi Minh City, <sup>3</sup>Kotobiken Medical Laboratories, Inc., <sup>4</sup>Institut Pasteur, Université Paris Cite, CNRS UMR6047, Biology of Gram-Positive Pathogens, Dept. Microbiology)

○Mais Maree<sup>1</sup>, Thuy Le Thi Nguyen<sup>2</sup>, Ryosuke L. Ohniwa<sup>1</sup>, Masato Higashide<sup>3</sup>, Tarek Msadek<sup>4</sup>, Kazuya Morikawa<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. Med., Univ Tsukuba., <sup>2</sup>Biotechnology Centre of Ho Chi Minh City, <sup>3</sup>Kotobiken Medical Laboratories, Inc., <sup>4</sup>Institut Pasteur, Université Paris Cite, CNRS UMR6047, Biology of Gram-Positive Pathogens, Dept. Microbiology)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major human pathogen that has evolved through the horizontal acquisition of multiple antibiotic resistant traits. Methicillin resistance is conferred by the *mecA* gene, carried by the mobile staphylococcal cassette chromosome (SCC) element, that disseminates horizontally among staphylococci by an unknown mechanism. Here, we present evidence for natural transformation in *Staphylococcus aureus* and demonstrate its relevance in SCCmec transmission. Through analysis of two-component systems, we found that growth in biofilm conditions increased the transformation efficiency. Using these growth conditions, we have shown that natural transformation mediates the transfer of various SCCmec elements (types I to IV) from MRSA or methicillin-resistant coagulase negative staphylococci to methicillin-sensitive *S. aureus*. The transfer of SCCmec was dependent upon the site-specific insertion/excision system mediated by the cassette chromosome recombinases, and the stability of SCCmec varied depending on the SCC types and recipients. Our results suggest that natural transformation may be a key process in the emergence of MRSA.

**Reference:** Maree, M. et al. Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. Nat Commun 13, 2477 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29877-2>

## P1-085

CA-MRSA/J と感染症 (V): ホットスポット *oriT* をもつ高頻度伝達系 pWtra/p32kb

○Tsay-Wen Wan<sup>1,2</sup>, Lee-Jene Teng<sup>2</sup>, 山本 達男<sup>1</sup> (1国際医学教育研究センター, 2国立台湾大・医)

CA-MRSA/J and infections (V): High-frequency mobilization system p32kb/pWtra with "hot-spot" *oriT*

○Tsay-Wen Wan<sup>1,2</sup>, Lee-Jene Teng<sup>2</sup>, Tatsuo Yamamoto<sup>1</sup> (1Dept. Epidemiol. Genomics Evol., Intl. Med. Rdu. Res. Center, 2National Taiwan Univ., Col. Med.)

We studied the unique features of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, with genotype ST8/SCCmecIV1 (CA-MRSA/J), and its infections. Our findings were that: (i) the *spj* gene on SCCmecIV1 encodes a large, highly variable cell-wall anchored protein; (ii) CA-MRSA/J has a high-frequency mobilization system (HFM); (iii) CA-MRSA/J infections include "strongly invasive", "invasive (TSS-like)", and "adherent" pathotypes; and (iv) the "invasive (TSS-like)" type exhibits the phenomenon of staphylococcal interbacterial aggregate and net structures (SIAN) with novel long spikes. In this study, we further analyzed HFM. A 32-kilobase plasmid (p32kb) and 35-kb conjugative plasmid (pWtra), respectively, carries the toxin gene cluster (*tgc*) for community infection-related toxins (*citA-C*) and a *tra* region that encodes a type IV secretion system. The two plasmids exist at a high-copy number in a cell and share similar *oriT*. The combination pWtra/p32kb enables simultaneous transfer of the two. Moreover, CA-MRSA/J occasionally carried a large recombinant (pWA/B), in which two recombinations occurred at two "hot-spots" (IS257 and *oriT*); pWA/B was *tgc*<sup>+</sup>, but *tra*<sup>-</sup> (due to lack of part of *tra*). Based on the finding that *oriT* plays a role as a "hot-spot", we suggest that pWtra and p32kb form a pair at *oriT* also in a conjugative mobilization event, leading to HFM.

## P1-086

## C型とD型ボツリヌス毒素をコードするバクテリオファージのゲノム比較解析

○阪口 義彦<sup>1</sup>, 武 晃<sup>1</sup>, 後藤 和義<sup>2</sup>, 山本 由弥子<sup>2</sup>, 幸田 知子<sup>3</sup>, 向本 雅都<sup>3</sup>, 小崎 俊司<sup>3</sup>, 林 俊治<sup>1</sup>, 林 哲也<sup>4</sup>, 小熊 惠二<sup>2</sup> (1北里大・医・微生物, 2岡山 大・医歯薬・病原細菌, 3大阪公大院・獣医, 4九大・医・細菌)

Genomic analysis of neurotoxin-converting phages of *Clostridium botulinum* types C and D

○Yoshihiko Sakaguchi<sup>1</sup>, Akira Take<sup>1</sup>, Kazuyoshi Gotoh<sup>2</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>2</sup>, Tomoko Kohda<sup>3</sup>, Masafumi Mukamoto<sup>3</sup>, Shunji Kozaki<sup>3</sup>, Shunji Hayashi<sup>1</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>4</sup>, Keiji Oguma<sup>2</sup> (1Dept. Microbiol., Kitasato Univ. Sch. Med., 2Dept. Bacteriol., Facul. Med., Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., 3Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 4Dept. Bacteriol., Facul. Med. Sci., Kyushu Univ.)

ボツリヌス毒素は、抗原性により A 型から G 型に分類される。この中で C 型と D 型毒素遺伝子は、バクテリオファージ (ファージ) のゲノム上にコードされている。我々は、C 型と D 型毒素遺伝子保有ファージのゲノムの全塩基配列を決定し、種々のゲノムの比較解析を行った。C 型菌ファージ (c-st) のゲノムサイズは 185,681 bp で、C 型神経毒素を含む 198 個のタンパク質コード領域 (ORF) が同定された。また、枯草菌の SPβ ファージゲノムの ORF と有意な相同性を示した。c-st ゲノム上には、新しいタイプの insertion sequence (IS) が多数存在し、ゲノムの約 10% を占めていた。c-st が感染した菌株 (溶原株) では、c-st DNA が宿主染色体とは独立して環状で存在することも明らかとなった (偽溶原化)。このことは、培養条件によってボツリヌス毒素産生性の消失の有無との関連性が推察された。また、偽溶原化には、*tubZ*, *tubR*, *tubS* および *tubY* の遺伝子産物がファージ DNA の分配を調節していることも明らかとなった。次に、その他の C 型および D 型ファージ (c-468, c-6813, d-1873, d-4947) の全塩基配列を決定し、c-st ゲノムと比較解析したところ、それぞれのファージにも C 型または D 型毒素遺伝子、溶原化関連遺伝子群、DNA 複製遺伝子群がよく保存されていた。詳細なことについては、本学会総会で発表する。

## P1-087

*Rodentibacter pneumotropicus* 表現型の多様性を生み出す可能性のある要因について

○池 郁生<sup>1</sup>, 佐々木 啓<sup>2</sup>, 内山 淳平<sup>3</sup>, 豊田 敦<sup>4</sup> (1理研BRC・実験動物, 2順天堂大, 3岡山 大, 4遺伝研)

Factors that may produce phenotypic diversity of *Rodentibacter pneumotropicus*

○Fumio Ike<sup>1</sup>, Hiraku Sasaki<sup>2</sup>, Jumpei Uchiyama<sup>3</sup>, Atsushi Toyoda<sup>4</sup> (1Exp. Anim. Div., BRC, RIKEN, 2Juntendo Univ., 3Okayama Univ., 4Nat. Inst. Genet.)

*Rodentibacter pneumotropicus* (旧 *Pasteurella pneumotropica* から再分類) は齧歯類の日見感染症菌である。この菌は免疫不全系統で肺に膿瘍を作る。本菌の生化学性状を含めた表現型は多様である。我々は *R. pneumotropicus* 基準株の完全ゲノム配列を決定し、ゲノムに複数・多種のバクテリオファージ由来配列が侵入していることを発見した。さらに分離株のゲノム解析を進めたところ、プロファージのパターンが分離株ごとに異なること、その一方で調べた全株に共通のファージ由来遺伝子が存在することがわかった。【材料及び方法】*R. pneumotropicus* JCM:14074<sup>T</sup> のほか理研や国内各所の分離株について、完全ゲノム配列決定およびリシークエンスを行った。既報配列には NCBI, コアゲノム情報は ProPan から得た。ファージ解析には PHASTER, ISfinder 等を用いた。【結果および考察】JCM:14074<sup>T</sup> は環状ファージおよびそれと 1 塩基が異なる配列 (J2), そのほかに 2 つのプロファージ配列をゲノム上に持つ (J1 および J3)。分離株のリシークエンスや既報のゲノム配列、合計 24 株 (3 株はリソースセンターの異なる同一基準株) のプロファージを解析したところ、株によりゲノム上のプロファージの数や型が異なっていた。同一基準株 3 株については同じパターンを示した。面白いことに、JCM:14074<sup>T</sup> のファージ J2 は一部の株のみに認められ (12/24)、ファージ J3 は全株に存在した (24/24)。コアゲノム 1,403CDS 中に J3 の integrase 遺伝子などが共通して存在した (相同性 97-100%)。これら共通遺伝子は、可動性 DNA 断片と本菌染色体の組換えに関与し、本菌の表現型多様性を生み出す一因なのかもしれない。

## P1-088/W4-1

## ウェルシュ菌の温度依存的な遺伝子発現制御による環境適応機構の解析

○福田 良亮<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>2,3</sup>, 野村 暢彦<sup>3,4</sup> (1筑波大院・生物資源, 2筑波大・医・TMRC, 3筑波大・MiCS, 4筑波大・生命環境系)

Environmental adaptation through temperature-responsive gene regulation in *Clostridium perfringens*

○Ryosuke Fukuda<sup>1</sup>, Nozomu Obana<sup>2,3</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>3,4</sup> (1Grad. Agro Bio. Sci. Tech., Univ. Tsukuba, 2TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, 3MiCS, Univ. Tsukuba, 4Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

病原性腸内細菌であるウェルシュ菌は宿主腸管や自然環境中に広く分布している。温度は宿主内外を認識する環境シグナルの一つであり、本菌のバイオフィーム形成や毒素産生を制御することから、温度による遺伝子発現調節は本菌の宿主内外環境への適応を可能にすると考えられる。本研究では、ウェルシュ菌の温度依存的な発現変動を示す遺伝子の探索とその発現制御機構を解明することを目的とした。RNA-seq の結果、宿主外温度 (37 度) に比べ宿主外温度 (25 度) においてミオイノシトール (MI) 代謝、クエン酸代謝、シアル酸代謝、バイオフィーム形成などに関与する合計 38 遺伝子の発現が上昇していた。中でも、宿主細胞膜に含まれる糖である MI の代謝に必須である *iol* オペロンでは、オペロンを構成する全 13 遺伝子が 10 倍程度の顕著な発現上昇を示した。*iol* オペロンの温度応答機構を解明するため、レポーター株を構築し *iol* プロモーター活性を測定したところ、37 度と 25 度で顕著な違いは見られなかった。一方で、RT-qPCR によって *iol* mRNA の半減期を解析した結果、25 度では 37 度と比べ半減期が 3 倍以上長いことが明らかとなった。以上より、25 度では *iol* mRNA が安定化することで発現量が上昇することが示唆された。*iol* オペロンの転写後レベルにおける制御は、温度変化に反応した迅速な発現量の調節を可能にすると考えられる。また、25 度で発現上昇した遺伝子群は、*iol* オペロンのみならず宿主成分利用への関与が予想される遺伝子を多く含んでいた。以上より、ウェルシュ菌は宿主の死亡時や排出時などの温度の低下を伴う急激な環境変化に対して、宿主成分を利用する代謝に切り替えることで適応していると考えられる。

## P1-089

### 腸管出血性大腸菌のプラスミド因子による生体殺菌物質に対する抵抗性の増強

○清水 健<sup>1</sup>, 鈴木 真<sup>1</sup>, 濱端 崇<sup>2</sup> (<sup>1</sup>千葉大・院医・病原細菌, <sup>2</sup>国立国際医療研究センター研究所・細菌感染)

### Enhanced resistance of EHEC to bactericidal substances by plasmid factor

○Takeshi Shimizu<sup>1</sup>, Shin Suzuki<sup>1</sup>, Takashi Hamabata<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Infectiol., Grad. Sch. Med., Chiba Univ., <sup>2</sup>Bacterial infection, Research Institute, NCGM)

Three types of nitric oxide (NO) scavenging enzymes exist in *Escherichia coli* (*E. coli*), including enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), which attenuate the bactericidal effect of NO. In our study, we compared the NO resistance of triple-deficient mutant EHEC lacking the three NO scavenging enzymes with that of triple-deficient mutant nonpathogenic *E. coli*, and found that the number of viable bacteria after NO treatment was predominantly reduced in the triple-deficient mutant nonpathogenic *E. coli*. This result suggested the existence of unknown defense resistance factors in EHEC other than the three NO scavenging enzymes. Therefore, we attempted to identify the EHEC-specific defense resistance factors. A library generated from the genomic DNA of EHEC was transformed into the triple-deficient mutant nonpathogenic *E. coli*. To enrich the clones that retained the defense resistance factors, we treated the transformants with NO. Among them, positive clones with increased resistance to NO were isolated and their insert DNA were analyzed. As a result, we identified the *rop* gene encoded on the EHEC O157-specific plasmid pOSAK1 as a factor that enhances NO resistance; *Rop* had already been reported as a plasmid replication regulator. In addition, *rop* was found to enhance resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reactive oxygen species.

## P1-090

### ArcB/ArcA regulatory system modulates anaerobic biofilm formation of *Vibrio cholerae* through HapR

○Jant Cres Caigoy, 島本 整, 島本 敏 (広島大学・大学院統合生命科学研究所・生物資源科学プログラム)

○Jant Cres Caigoy, Tadashi Shimamoto, Toshi Shimamoto (Program Food Agrilife Sci., Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

*Vibrio cholerae*, the causative agent of cholera, is a waterborne pathogen capable of causing human infections. The HapR, a transcriptional regulator involved in quorum sensing system, represses biofilm formation and virulence factors under high cell density. Moreover, the ArcB/ArcA two-component regulatory system, involved in the anaerobiosis response of the pathogen, enhances biofilm formation under anoxia. We have previously reported that frameshift or terminal deletion HapR variants possess a non-functional regulator and significantly influenced the anaerobic biofilm formation of *V. cholerae* (Caigoy et al., Appl. Environ. Microbiol., 88, e01044-22, 2022). Thus, the current study aimed to further determine the role of both ArcA and HapR regulators on the biofilm formation of *V. cholerae* under anaerobic condition. We found that the *arcA* mutant strains with a functional HapR exhibited lower biofilm formation compared to the wild-type strain, whereas *arcA* mutant strains with a non-functional HapR did not show significant reduction in biofilms under anoxia. These observations led us to hypothesize that ArcA regulates *V. cholerae* biofilm formation through the repression of HapR activity under the condition that HapR is functional.

## P1-091

### 新規抗結核薬の薬剤標的と検証

○北原 知樹<sup>1</sup>, 松本 壮吉<sup>1</sup>, 立石 善隆<sup>1</sup>, 西山 晃史<sup>1</sup>, 尾関 百合子<sup>1</sup>, 吉田 豊<sup>1</sup>, 森 茂太郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>新潟大・院医・細菌学, <sup>2</sup>感染研・細菌第二部)

### Drug Targeting and Validation of New Anti-Tuberculosis Drugs

○Tomoki Kitahara<sup>1</sup>, Sohkiichi Matsumoto<sup>1</sup>, Yoshitaka Tateishi<sup>1</sup>, Akihito Nishiyama<sup>1</sup>, Yuriko Ozeki<sup>1</sup>, Yutaka Yoshida<sup>1</sup>, Shigetaru Mori<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Niigata Univ., <sup>2</sup>Dept. Bacteriology 2., NIID)

結核菌によって引き起こされる結核は、いまだに世界的に深刻な公衆衛生上の問題であり、死亡者数が最も多い感染症の一つである。結核の治療には複数の薬剤を半年以上服用する必要があり、長期の服用が原因で薬剤耐性を持った結核が増加している。そこで本研究では結核菌において存在している生存必須遺伝子の中で、結核菌群でしか見つからず、従来の薬剤標的になっていない機能未知の遺伝子は選択毒性を持ち、薬剤耐性結核菌に対する将来の薬剤開発の標的になると着目した。そこで Essential unknown Mtb specific gene (EMG) を検証することとした。

まず CRISPRi を用いて結核菌と標的遺伝子が相同であり、危険性が少ない弱毒株である BCG でコンディショナルノックダウン株を作製した。この株を培養し、qPCR と CFU で mRNA 量の変化と菌数変化を解析したところ、EMG#1 において EMG の発現量、菌数が増加傾向に減少した。このことから EMG は BCG において生存必須であることが確認できた。結核菌の強毒株である H37Rv 株でも BCG と同じ結果が得られた。精製した EMG タンパクを用いてマウス抗体を作製し、ウエスタンブロッティングを行ったところ EMG は菌体ではなく培養上清に存在することが分かった。Alpha Fold2 での構造予測の結果、DNA 結合タンパク質である可能性が示唆された。現在 RNA seq を行っている。またウエスタンブロッティングの結果から今回の研究対象としている標的遺伝子は菌体外に分泌されているため、菌体内に薬剤を届ける必要がなく、非常に少量の薬剤で効果が出る標的である可能性が示唆された。しかし DNA 結合タンパク質でありながら外部に分泌されているということから今後詳細な解析が必要だと考えられる。

## P1-092

### 腸炎ビブリオの宿主細胞認識・応答機構の解析

Saranporn Tandhavanant<sup>1</sup>, 寺島 浩行<sup>2</sup>, Dhira Saraswati Anggramukti<sup>3</sup>, 日吉 大貴<sup>2</sup>, 飯田 哲也<sup>3</sup>, 松田 重輝<sup>3</sup>, 〇児玉 年央<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Trop. Med., Mahidol Univ., <sup>2</sup>長崎大・熱研, <sup>3</sup>阪大・微研)

### Analysis of host cell recognition and response mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus*

Saranporn Tandhavanant<sup>1</sup>, Hiroyuki Terashima<sup>2</sup>, Dhira Saraswati Anggramukti<sup>3</sup>, Hirotaka Hiyoshi<sup>2</sup>, Tetsuya Iida<sup>3</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>3</sup>, 〇Toshio Kodama<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Trop. Med., Mahidol Univ., <sup>2</sup>Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., <sup>3</sup>RIMD, Osaka Univ.)

腸炎ビブリオは経口感染し、急性胃腸炎を引き起こす食中毒菌である。Vp-PAI と呼ばれるゲノムアイランドにコードされる 3 型分泌装置 (T3SS2) は下痢原性に必須である。T3SS は、エフェクターを宿主細胞に直接注入する。T3SS が宿主細胞にエフェクターを効率よく注入するには、宿主細胞にコンタクトしたことを認識し、これを合図にエフェクター分泌を亢進させるという分泌制御機構が必要である。この分泌制御機構のキーとなるゲートキーパーは、宿主細胞とコンタクトする前ではエフェクター分泌を抑制し、コンタクトに応じて自身が分泌されることでエフェクターの分泌抑制を解除する。したがって、ゲートキーパー欠損株は宿主細胞とのコンタクトのいかんにかかわらずエフェクター分泌が亢進し、これは宿主細胞にコンタクトした状態を模倣していると考えられている。

本研究では、本菌が宿主細胞へのコンタクト依存性な遺伝子発現制御機構を持つのではないかと考え、ゲートキーパー欠損株のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、ゲートキーパー欠損により Vp-PAI 遺伝子群の発現上昇が認められた。この Vp-PAI 遺伝子群の発現上昇は T3SS2 の分泌活性が必要であったことから、T3SS2 から分泌される負の制御因子の存在が示唆された。この因子を同定する目的で T3SS2 分泌タンパク質のプロテオーム解析を行い、新たに VtrN を同定した。VtrN は宿主細胞とコンタクトを模倣した条件下で T3SS2 依存的に分泌され、vtrN 遺伝子欠損は Vp-PAI 遺伝子群の発現を誘導した。以上の結果により、腸炎ビブリオは T3SS2 分泌性の新規タンパク質、VtrN を介した宿主細胞とのコンタクト依存性な遺伝子発現制御機構を持つと考えられた。

**P1-093****腸管出血性大腸菌の病原性調節遺伝子 *ler* の発現制御に関する小分子 RNA の探索**

○須藤 直樹<sup>1,2</sup>, 栗田 啓嗣<sup>1</sup>, 三戸部 治郎<sup>2</sup>, 岡田 信彦<sup>1</sup> (1北里大・薬・微生物学, 2杏林大・医・感染症)

**The exploration of small RNAs regulating the expression of *ler* encoding the LEE regulator in EHEC**

○Naoki Sudo<sup>1,2</sup>, Takatsugu Kurita<sup>1</sup>, Jiro Mitobe<sup>2</sup>, Nobuhiko Okada<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Kitasato Univ., 2Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ.)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の多くは、病原性遺伝子として志賀毒素遺伝子と LEE と呼ばれる病原性遺伝子群を持つ。LEE には主に宿主細胞への接着に必要な III 型分泌装置の構成因子と、そこから分泌されるエフェクターの遺伝子がコードされる。この LEE の発現は転写因子 *Ler* を介して厳密に制御され、*ler* の発現は多くの転写因子により制御されるが、*ler* の転写後段階の制御に関する知見は少ない。細菌における転写後制御因子として小分子 RNA (sRNA) が知られている。sRNA は多くの場合、mRNA の 5'末端非翻訳領域 (5'UTR) に結合することで、mRNA の安定性や翻訳活性を変化させ、その遺伝子発現を調節する。我々はこの点に着目し、*ler* mRNA の 5' UTR に結合する sRNA の網羅的同定を MAPS (MS2 affinity purification coupled with RNA sequencing) を用いて行った。MAPS は MS2 タグと呼ばれる RNA 配列を持つ RNA を精製した際に共精製される RNA を RNA シーケンスにより解析する手法である。この手法を用いて *ler* の 5' UTR に結合する sRNA の同定を行ったところ、複数種の sRNA を同定した。これらの sRNA が *ler*、及び LEE の発現に与える影響を sRNA 遺伝子のマルチコピー株を用いて解析した結果、いくつかの sRNA が *ler*、及び LEE の発現を抑制した。これらの結果から、複数の sRNA が関与する *ler* の複雑な転写後制御ネットワークの存在が推察される。

**P1-094****黄色ブドウ球菌の Maus 感染時の臓器間における遺伝子発現の相違**

○浜本 洋<sup>1</sup>, 鈴木 稔<sup>2</sup>, 関水 和久<sup>3</sup> (1帝京大・医真菌, 2東大・新領域・メディカル情報生命, 3帝大・薬・カイコ創薬学)

**Differences in gene expression of *Staphylococcus aureus* between organs during infection of mice**

○Hiroshi Hamamoto<sup>1</sup>, Yutaka Suzuki<sup>2</sup>, Kazuhisa Sekimizu<sup>3</sup> (1Teikyo Univ. Institute of Medical Mycology, 2Dep. Computat. Biol. Med. Sci., Univ. of Tokyo, 3Teikyo Univ., Pharm.-Sci., Drug Dis. Silkworm)

我々は、哺乳動物細胞と異なり、堅い細胞壁を有していることから細胞の強度が高く、溶解液にも耐性を示すことを利用し、宿主の臓器に感染した状態における黄色ブドウ球菌の網羅的な遺伝子発現解析手法を確立した。感染の進行に従って、肝臓における黄色ブドウ球菌の定着や菌数の増加が認められ、免疫系の細胞が集積し組織の損傷が認められた。黄色ブドウ球菌は、これらの状況の変化に応じて、感染初期は酸素を必要とする好気的な条件でエネルギー生産していたものが、感染後期では酸素を必要としない嫌気的な条件でのエネルギー生産系に変化していた。その他、病原性毒素や金属トランスポーター等の発現量の変動を個々に解析し報告した (Hamamoto et al *Comm Biol* 2022)。本発表では、感染 24 時間および 48 時間後における、他の臓器について解析し比較した。その結果、感染 24 時間後での血液生化学的解析では肝臓および心臓の組織障害マーカーは上昇するが、腎臓の障害マーカーは上昇せず 48 時間後に上昇が確認された。このとき、肝臓および心臓における呼吸系は、24 時間後は嫌気的になっているにも関わらず、腎臓における黄色ブドウ球菌の呼吸系は好気的なままで、48 時間後に嫌気的になっていた。これらのことから、黄色ブドウ球菌の呼吸系に与える影響は、宿主の循環器系の影響よりも、局在している臓器の損傷の寄与が大きいと考えられる。本シンポジウムでは、その他の病原性遺伝子の解析結果を含め、臓器間における黄色ブドウ球菌の遺伝子発現の相違を議論したい。

**P1-095/W4-2****発現誘導や分解タグが遺伝子発現揺らぎに与える影響**

○北井 朝子<sup>1</sup>, 若本 祐<sup>2,3,4</sup>, 梅谷 実樹<sup>2,3,4</sup> (1東大・教養, 2東大・院総合文化研究・相関基礎, 3東大・複雑系センター, 4東京大・生物普遍性)

**Effect of expression induction and protein degradation tags on gene expression noise**

○Asako Kitai<sup>1</sup>, Yuichi Wakamoto<sup>2,3,4</sup>, Miki Umetani<sup>2,3,4</sup> (1Col. Arts and Sci., Univ. Tokyo, 2Dept. Basic Sci., Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. Tokyo, 3Res. Ctr. Complex Syst. Biol., Univ. Tokyo, 4UBI., Univ. Tokyo)

細胞内タンパク質の発現量の揺らぎは環境応答に影響すると考えられている。発現量の揺らぎはその揺らぎ幅 (分散) だけでなく、時間方向への相関の強さ (自己相関) によっても特徴付けられる。例えば薬剤耐性タンパク質を恒常発現させた際、発現量の平均と分散が同じでも、自己相関の減衰が遅いほど、集団全体としては薬剤耐性度が高くなることを示唆されている。今回の研究では、薬剤耐性タンパク質の自己相関の減衰速度と薬剤耐性の関係を大腸菌をモデルとして明らかにすることを目的とした。またその過程で、発現量の集団平均、分散、自己相関の減衰速度が発現誘導の強さや分解タグの種類でどのように変化するか検討した。今回使用した大腸菌株は、染色体の 2 つの遺伝子座にそれぞれ異なる遺伝子発現モジュールを組み込んでいる。1 つは恒常発現プロモーターの下流から蛍光タンパク質 mCherry を発現するモジュール、もう 1 つは、IPTG 誘導性プロモーターの下流からスプレプトマイシン耐性タンパクと蛍光タンパク質 Venus の融合タンパク質を発現するモジュールである。また、この融合タンパク質の C 末端には、分解タグを付加している。培地内での IPTG 濃度と分解タグの種類を変化させ、マイクロ流体デバイスで長期一細胞トラッキングを行った。その結果、タンパク質の分解率が高いほど自己相関の半減速度は早くなることがわかった。またプロモーターに関わらず、発現量の変動係数が大きい系列の自己相関の減衰速度は遅くなることがわかった。この結果は発現量の揺らぎ幅と自己相関が独立ではないことを示唆する。この揺らぎの性質と薬剤耐性の関係について今後検討を進める。

**P1-096/W4-6****Engineered Phage Capsids for Cancer Cell Targeted Drug Delivery Application**

○ヴィーラナラヤナン スリワニ<sup>1</sup>, Kanate Thitiananpakorn<sup>1</sup>, 菅野 貴史<sup>1</sup>, 渡邊 真弥<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>2</sup>, 氣賀 恒太郎<sup>2</sup>, Longzhu Cui<sup>1</sup> (1自治医科大学・医学部・細菌学部門, 2国立感染症研究所創薬ワクチン開発研究センター)

○Srivani Veeranarayanan<sup>1</sup>, Kanate Thitiananpakorn<sup>1</sup>, Takashi Sugano<sup>1</sup>, Shinya Watanabe<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>2</sup>, Kotaro Kiga<sup>2</sup>, Longzhu Cui<sup>1</sup> (1Div. Bacteriology, Dept. Infection & Immunol., Sch. Med., Jichi Med. Univ., 2Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases)

Cancer therapy using chemotherapeutic delivery systems are desired due to their ease of non-invasive use. Yet, most of the drug delivery systems (DDS) that are in use are complex in preparation plus not cost-effective. A cost-effective, and simple DDS are needed, and to this end, we developed cancer cell-targeted bacteriophage (phage) capsid-based DDS by employing genetic, chemical plus physical engineering methods. As the first step towards this goal, we used phage display technique to display certain mammalian cancer cell targeting ligands on the capsid proteins of the phages. These chimeric phages were then tagged with fluorescent moieties and then tested for cancer cell targeting efficacy employing confocal microscopy. The results implied the successful targeted cancer cell tropism of the genetically modified phages. Next, we employed a simple physical method to remove the phage DNA from their capsids. The DNA free capsids were then loaded with anti-cancer drug, Doxorubicin which self-assembles with phage capsids by pi-pi interaction. This self-assembly rendered the drug stability, reduced the drug leakage before reaching the target. The efficacy of the targeted phage-capsids to deliver the drugs and the cancer specific cytotoxic effect thereof were then evaluated successfully *in vitro* indicating the success in developing cost-effective DDS.

## P1-097/W4-5

### バクテリア染色体の試験管内操作法

○藤田 裕寛, 尾作 采音, 向井 崇人, 末次 正幸 (立教大・理・生命理学)

### Manipulation of mega-sized bacterial chromosomes in vitro

○Hironobu Fujita, Ayane Osaku, Takahito Mukai, Masayuki Su'etsugu (Dept. Life Science, Coll. of Sci., Rikkyo Univ.)

There is a need for a cell-free platform of genome synthetic biology to design and assemble artificial bacterial genomes. However, chromosomal DNA is fragile when extracted from cells. To convert extracted chromosomes into a compacted and easy-to-handle form in vitro, we established an enzymatic supercoiling and repair reaction, named SCR. In SCR, circular DNA molecules with nicks and gaps are repaired by DNA polymerase and ligase, and then negatively supercoiled by DNA gyrase. Up to 4.6 megabase (Mb) chromosomes extracted from cells were supercoiled by SCR and detected as a band using agarose gel electrophoresis. Furthermore, up to 1 Mb chromosomes were implanted into *E. coli* cells via electroporation. We also succeeded in vitro replication of bacterial chromosomes. Previously, we established the replication-cycle reaction (RCR) method using a reconstituted *E. coli* chromosome replication system. We optimized the enzyme concentrations and buffer composition, as well as the incubation conditions, and achieved the replication of a whole 2 Mb chromosome. Thus, we are trying to replicate the whole chromosome of a genome-reduced *E. coli* strain. In future, we desire that these methods would be a significant basis for the in vitro assembly of artificial genome. Reference Fujita and Osaku *et al. ACS Synth. Biol.* 2022, 11, 9, 30883099

## P1-098

### ボツリヌス菌の遺伝子改変法の開発

○阿松 翔<sup>1,2</sup>, 斎藤 和樹<sup>1</sup>, 成谷 宏文<sup>3</sup>, 藤永 由佳子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>金沢大・医・細菌,<sup>2</sup>金沢大・医・法医,<sup>3</sup>十文字大・人間生活・食品開発)

### Development and Optimization of Genetic Manipulation Systems in Group I Clostridium botulinum

○Sho Amatsu<sup>1,2</sup>, Kazuki Saito<sup>1</sup>, Hirofumi Nariya<sup>3</sup>, Yukako Fujinaga<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol, Grad. Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Dept. Forensic Med. Pathol., Grad. Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Lab. Food Microbiol., Grad. Sch. Human Life Sci Food Nutrition. Sci., Jumonji Univ.)

*Clostridium botulinum* causes the disease botulism. Genetic manipulation of these organisms is essential to elucidate the underlying mechanism of pathogenicities. Five strains of group I *C. botulinum* (strain 62A, 7I03-H, Okra, Osaka05, 111) were transformed with pMTL83153-mCherry-opt by electroporation (Zhou & Johnson. *Biotechnol Lett* 15, 121-26 1993) or conjugation (Purdy, et al. *Mol Microbiol* 46, 439-52 2002). We constructed a novel conjugal mazF-based suicide vector pXMTL that contains the xylose-inducible promoter from pXM (Nariya, in preparation) and pMTL8000 vectors. We optimized the conjugal transformation method for group I *C. botulinum*, and yielded at least 10-fold higher transformation efficiency in all strains tested compared with the original conjugation protocol. We showed that the bont gene of *C. botulinum* 62A and 7I03-H were knocked out by the allele-coupled exchange (ACE) system using pXMTL. We demonstrate that the optimized conjugal transformation method significantly increases the efficiencies of DNA transfer to these recipient strains. Furthermore, we developed a novel conjugal suicide vector pXMTL that contains a xylose-inducible mazF counter-selection marker and can be transferred into *Clostridium* spp. by conjugation. The ACE system using pXMTL provides a rapid method for precise and seamless genome editing in group I *C. botulinum*.

## P1-099

### Development of highly efficient CRISPR-Cas13-antimicrobials against MRSA

○Adeline Yeo Syin Lian<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>2</sup>, 氣賀 恒太郎<sup>2</sup>, 渡邊 真弥<sup>1</sup>, 宮永 一彦<sup>1</sup>, 相羽 由詞<sup>1</sup>, Xin-Ee Tan<sup>1</sup>, 崔 龍洙<sup>1</sup> (<sup>1</sup>自治医大・医・細菌学,<sup>2</sup>感染研・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Adeline Yeo Syin Lian<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>2</sup>, Kotaro Kiga<sup>2</sup>, Shinya Watanabe<sup>1</sup>, Kazuhiko Miyanaga<sup>1</sup>, Yoshifumi Aiba<sup>1</sup>, Xin-Ee Tan<sup>1</sup>, Longzhu Cui<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., <sup>2</sup>Drug and Vaccine Development, NIID)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections with limited effective antibiotics demand the development of new therapeutic modalities. We have developed an antimicrobial agent that specifically kills MRSA by loading phage with CRISPR-Cas13a. However, problems remain in efficient synthesis and bactericidal potency. The aim of this study is to develop an antimicrobial agent against MRSA with high efficiency by synthetic phage modification. We first established cell wall-deficient L-form cell line of *S. aureus* (SA). The viable cell count of the L-form cells was optimized by testing bacterial OD 0.1-1.5 to increase the effectiveness of the SA phage reboot. Next, the phage genome was shortened and CRISPR-Cas13 was inserted synthetically. The bactericidal activity of each phage was compared by spot test. The phage rebooting efficiency was optimal at OD 0.5. Rebooted phage with the genome shortened by 2 kb in length during phage genome reconstruction gave rise to a stronger bactericidal activity compared to the wild-type phage. Moreover, loading the shorter phage with CRISPR-Cas13 enhanced cell death. These results suggest that the engineered shortened phages loaded with the CRISPR-Cas13 system may be potent antimicrobial agents against MRSA infections.

## P1-100

### 大腸菌 O157 株がもつトキシン-アンチトキシン系 ECs3274-ECs3275 の解析

○佐々木 優香<sup>1</sup>, 吉岡 瑞貴<sup>1</sup>, 茂木 優奈<sup>2</sup>, 大塚 裕一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>埼玉大・理工・分子生物,<sup>2</sup>東大・新領域)

### Analysis of the toxin-antitoxin system, ECs3274-ECs3275, encoded in *Escherichia coli* O157

○Yuka Sasaki<sup>1</sup>, Mizuki Yoshioka<sup>1</sup>, Yuna Mogi<sup>2</sup>, Yuichi Otsuka<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biochem. Mol. Biol., Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Front. Sci., Univ. of Tokyo.)

細菌がもつトキシン-アンチトキシン系 (以下, TA) は, トキシンとアンチトキシンの 2 成分で構成され, プラスミド維持や薬剤耐性, ファージ防御に関わる。トキシンは DNA 複製や翻訳, 細胞分裂などを阻害して細菌自身の増殖を抑制する。一方, アンチトキシンはトキシンに結合してトキシンの毒性を抑制する。我々は, 大腸菌 O157 株ゲノム上に新規の TA と予測される ECs3274-ECs3275 を発見した。昨年の本大会では, ECs3274-ECs3275 が確かに TA 系であり, 抗ファージ作用を有することを報告した。また, ECs3274 アンチトキシンについて, ECs3275 トキシンと結合すること, Lon プロテアーゼにより不安定化すること, 自身の転写を抑制することも報告した。今回, DNA 結合ドメインである helix-turn-helix (HTH) をもつ ECs3275 の作用機序の解明に取り組んだ。HTH の変異により ECs3275 の毒性が消失することから, ECs3275 の作用には HTH が必要であることがわかった。HTH をもつタンパク質の多くは転写因子であるため, ECs3275 も転写因子として働く可能性が示唆される。そこで, ECs3275 により発現が変動する遺伝子群を RNA-Seq により網羅的に解析した。その結果, 発現が上昇する遺伝子が 19 個, 減少する遺伝子が 72 個同定された。発現上昇する遺伝子の欠失株において ECs3275 の毒性がまだ検出されたことから, これらの遺伝子は毒性に関与しないと考えられる。また, 発現が減少する遺伝子の中には, 必須遺伝子が 4 個, 欠失により増殖能が低下する遺伝子が 5 個存在した。現在, ECs3275 の毒性にこれらの遺伝子が関与するか検討中である。また, ECs3274 の転写抑制機構についても解析を進めているので, 本大会では併せて報告する。

**P1-101****Isolation of bacteriophages targeting AIEC strains with a broad host range from wastewater**

○Ola Alessa, Kanate Thitianapakorn, Thi My Duyen Ho, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Srivani Veerananarayanan, Xin-Ee Tan, 笹原 鉄平, 崔龍珠 (自治医科大学・医学部・細菌学部門)

○Ola Alessa, Kanate Thitianapakorn, Thi My Duyen Ho, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyayama, Srivani Veerananarayanan, Xin-Ee Tan, Tepei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC), a phylogenetically diverse *E. coli* pathovar, has been implicated in inflammatory bowel diseases (IBD) like Crohn's disease and ulcerative colitis. Targeting and eliminating AIECs in IBD patients is essential for controlling the symptomatic inflammation. Genetically engineered bacteriophages (phages) with Cas13 cargo, are a promising approach toward eradication of any undesired bacteria, such as AIECs in the gut.

Our goal is to isolate broad host range phages that can infect various kinds of *E. coli*, including AIECs. *E. coli* strains were isolated from the wastewater treatment plant at Jichi Medical University. The isolated *E. coli* strains were induced with mitomycin C to yield crude phage solutions. In total, 167 phage solutions were induced either from single colonies (114) or bacterial mixtures (53). The infection ratio of these phage solutions was then determined using a spot test assay. Only one phage solution could infect the AIEC reference strain LF82. This phage was further purified, and its host range was re-checked with 79 *E. coli* clinical isolates. The purified phage showed a proficient broad host range with an infection ratio of 75%. This phage was then sequenced to clarify its genomic information with the goal of developing genetically engineered Cas13 phage-capsids that could specifically kill the AIECs in the gut.

**P1-102*****Helicobacter cinaedi* の VI 型分泌装置を介した細胞付着及び炎症誘発について**

○富田 純子, 久綱 僚, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

**Cell adhesion and proinflammatory activity by Type 6 secretion system in *Helicobacter cinaedi***

○Junko Tomida, Ryo Kutsuna, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

【背景】*Helicobacter cinaedi* は微好気性環境で生育するグラム陰性ラセン菌であり、感染症状として発熱や下痢、蜂窩織炎、敗血症などが挙げられる。本菌種は複数の医療施設で院内感染を引き起こしており、再発率も高いことが問題となっている。*H. cinaedi* のゲノム解析を行い特異的遺伝子群を探索したところ、VI 型分泌装置 (T6SS) を保有していることが判明した。本菌種の T6SS の機能は不明であるが、何らかのエフェクター分子を宿主 cell に注入し病原性に関与していると予測された。そこで、*H. cinaedi* における T6SS の機能を解析するために、遺伝子欠損株を作成して比較解析を行った。

【方法】*H. cinaedi* PAGU611 株を用いて、T6SS の構成遺伝子である *icmF* の欠損株を作成した。腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞およびマクロファージ様細胞株 RAW264 に対して、細胞への吸着性・侵入性を定量 PCR および FISH 法で評価した。また T6SS が炎症反応の誘導にどのような影響を及ぼすかを検討するために、各種サイトカインの mRNA 発現量を定量 PCR にて測定した。

【結果および考察】腸管上皮細胞様に分化した Caco-2 細胞および RAW264 細胞に対して、野生株および *icmF* 欠損株を感染させ、細胞への吸着性・侵入性を測定したところ、ともに *icmF* 欠損株が高値を示した。FISH 法により視覚的に観察した結果からも、*icmF* 欠損株の感染量が多いことが確認された。一方で、炎症性サイトカインの測定をしたところ、いずれのサイトカインにおいても T6SS を有する野生株で発現量が多い結果が得られた。野生株では高い炎症反応が起きているため、T6SS は何らかのエフェクターを産生し、炎症誘発に関与している可能性が示唆された。

**P1-103****Characterization of novel autotransporter protein HcaA in *Helicobacter cinaedi***

○青木 沙恵<sup>1</sup>, 森 茂太郎<sup>1</sup>, 松井 英則<sup>1</sup>, 柴山 恵吾<sup>2</sup>, 見理 剛<sup>1</sup>, 林原 絵美子<sup>1</sup> (1)感染研・細菌第二, (2)名古屋大・医・分子病原細菌学)

○Sae Aoki<sup>1</sup>, Shigetaro Mori<sup>1</sup>, Hidenori Matsui<sup>1</sup>, Keigo Shibayama<sup>2</sup>, Tsuyoshi Kenri<sup>1</sup>, Emiko Rimbara<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol. II, NIID, (2)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

*Helicobacter cinaedi* infects the human gut and causes invasive infections by bacterial translocation. In this study, we focused on a novel autotransporter protein named *H. cinaedi* autotransporter protein A (HcaA) and examined its relationship with *H. cinaedi* pathogenicity.

The measurement of cytotoxicity of *H. cinaedi* infection in the human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) by lactate dehydrogenase (LDH) assay showed a significant reduction in cytotoxicity in HcaA knockout cells. Adhesion assay further revealed that the HcaA-knockout strain showed significantly reduced attachment of *H. cinaedi* to Caco-2 cells compared to the wild-type strain. To determine the role of HcaA in *H. cinaedi* infection *in vivo*, *H. cinaedi* wild-type and HcaA-knockout strains were orally transmitted to C57BL/6 mice. The subsequent effects were analyzed 7, 14, and 28-days post-infection. The numbers of colonized *H. cinaedi* cells was significantly lower in HcaA-knockout strain infections than in wild-type strain infections at 7 days post-infection. Recombinant HcaA protein showed strong adhesion characteristics to the human monocytic cell line (U937). The adherent activity was diminished by the replacement of the RGD motif in HcaA with RAD. These results suggest that HcaA, a novel autotransporter protein of *H. cinaedi*, plays a significant role in establishing infection as an adhesin.

**P1-104****ボルデテラ属細菌の感染初期の定着に必要な病原因子の同定**

○Ali Shymaa<sup>1</sup>, 西田 隆司<sup>1</sup>, 後藤 慎平<sup>2</sup>, 堀口 安彦<sup>1,3</sup> (1)阪大・微研・分子細菌学分野, (2)京大・iPS細胞研究所・臨床応用研究部門, (3)阪大・感染症総合教育研究拠点)

**Identification of virulence factors required for colonization of *Bordetella* during infection**

○Ali Shymaa<sup>1</sup>, Takashi Nishida<sup>1</sup>, Shimpei Gotoh<sup>2</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,3</sup> (1)Dept. Mol. Bact., RIMD., Osaka Univ, (2)Dep. Clin App research., CiRA., Kyoto Univ., (3)CiDER., Osaka Univ)

*Bordetella pertussis* (Bp) and *B. bronchiseptica* (Bb) are causative agents of whooping cough in humans and various infections in mammals, including immunocompromised humans, respectively. Since these two species share many virulence factors, Bb is utilized as a model pathogen *in vivo* instead of human-specific pathogen Bp, which lacks convenient models for human infection. Previous studies have revealed that Bp and Bb establish respiratory colonization by certain virulence factors including filamentous hemagglutinin (FHA), fimbriae, and Bp-specific pertussis toxin; however, the mechanism of adhesion or colonization remains elusive. In this study, we tried to re-explore the mechanism of *Bordetella* adhesion and its colonization for target tissues by combining the bacteria vs. target subject as follows: Bb vs. rats *in vivo* and rat tracheal cells *in vitro*; Bp vs. human lung epithelia and iPS-human multiciliated airway cells. *Bordetella* multi-gene mutants deficient in various virulence factors were also constructed and examined. Our results suggest that (1) toxins and virulence effectors of type III secretion system do not participate in bacterial colonization, while (2) fimbriae are necessary for colonizing rat tracheas. (3)FHA contributes to bacterial attachment to cells, (4) which is supported by other unknown bacterial factors.

## P1-105

ウェルシュ菌フィブロネクチン結合タンパク質およびオートリシンとのフィブロネクチン構造との相互作用

○松永 望<sup>1</sup>, 青野 りよ<sup>2</sup>, 岡部 加奈子<sup>3</sup>, 橋本 泰雄<sup>1</sup>, 片山 誠一<sup>1</sup> (1岡山理大・理・臨床生命, 2岡山理大院・理・材質理学, 3川崎福大・医療技術・臨床検査)

### The interaction of fibronectin conformation with *Clostridium perfringens* Fbps and autolysin

○Nozomu Matsunaga<sup>1</sup>, Riyo Aono<sup>2</sup>, Kanako Okabe-Watanabe<sup>3</sup>, Yasuo Hitsumoto<sup>1</sup>, Seiichi Katayama<sup>1</sup> (1Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., 2Dept. Material Sci. Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., 3Dept. Med. Technol., Fac. Health Sci. Technol., Kawasaki Univ. Med. Welf.)

Fibronectin (Fn) is an extracellular matrix protein that consists of 12 type I, 2 type II, and 15-17 type III modules and plays a role in wound healing. Fn in the solutions of low and high ionic strength take the compact and extended conformations, respectively. We reported that *Clostridium perfringens* cells bind to gelatin via Fn, recognize Fn type III<sub>9-10</sub> (III<sub>9-10</sub>), and express some Fbps (FbpC and FbpD) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) on surface of cells. GAPDH of *C. perfringens* may be expressed cell surface via autolysin (Acp). We investigated the interaction of *C. perfringens* cells (HN13: strain 13 *ΔgalK ΔgalT*), Fbps, GAPDH, and Acp with Fn in low (l-Fn) and high (h-Fn) ionic strength solutions. Dry-fixed HN13 absorbed l-Fn than h-Fn. Few h-Fn bound to dry-fixed HN13. Substantial amount of anti-III<sub>9-10</sub> antibody (HB39) and substantial number of HN13 bound to both the gelatin prebound with l-Fn (l-Fn gelatin) and h-Fn (h-Fn gelatin). Both of HB39 and HN13, however, bound to l-Fn gelatin compared with h-Fn gelatin. On the other hand, both l-Fn and h-Fn enough bound to immobilized FbpC, FbpD, and GAPDH. l-Fn bound to Acp compared with h-Fn. These results suggested that the III<sub>9-10</sub> modules which are recognized by *C. perfringens* Acp is expressed on l-Fn form, whereas that FbpC, FbpD and GAPDH of *C. perfringens* can recognize both l-Fn and h-Fn.

## P1-106

Cryo-EM structure of the Mfa minor type V pilus from the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*

○柴田 敏史<sup>1</sup>, 庄子 幹郎<sup>2</sup>, 松波 秀行<sup>3</sup>, Matthias Wolf<sup>3</sup>, 藤井 潤<sup>1</sup> (1鳥取大・医・感染制御学・細菌学分野, 2長崎大・院医歯薬・口腔病原微生物学分野, 3沖縄科学技術大学院大・生体分子電子顕微鏡解析ユニット)

○Satoshi Shibata<sup>1</sup>, Mikio Shoji<sup>2</sup>, Hideyuki Matsunami<sup>3</sup>, Matthias Wolf<sup>3</sup>, Jun Fujii<sup>1</sup> (1Div. Bacteriol, Dept. Microbiol. Immunol., Med., Tottori Univ., 2Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Bio. Sci., Nagasaki Univ., 3Molecular Cryo-Electron Microscopy Unit, OIST)

*P. gingivalis* is a primary pathogen causing periodontal disease. Its type V pili major Fim pilus and minor Mfa pilus are involved in the colonization, biofilm formation, and virulence of *P. gingivalis*. We recently reported that the Fim pilus assembled by a polymerization mechanism using protease-mediated strand exchange. However, the assembled structure and polymerization mechanism of Mfa pilus are unknown. Here we show the atomic structure of the polymerized Mfa pilus consisting of recombinant Mfa1 stalk pilin determined by cryo-electron microscopy at 2.8 Å resolution. The atomic model of Mfa pilus confirms that Mfa1 pilins are also polymerized by protease-mediated strand exchange. We found that the assembled Mfa1 retains a metal atom in the metal binding pocket and identified the structure of the region involved in the interaction of *P. gingivalis* with oral streptococci on the Mfa pilus. Our results demonstrate that protease-mediated strand exchange is the universal assembly mechanism of type V pili. The high-resolution 3D structure of the polymerized Mfa pilus provides potential drug targets to treat periodontal disease and *P. gingivalis*-related systemic diseases.

## P1-107

Fatty acid homeostasis tunes flagellar motility, contributing to *Salmonella* gut colonization

○三木 剛志<sup>1</sup>, 星野 佑介<sup>1</sup>, 坂本 太郎<sup>2</sup>, 須藤 直樹<sup>1</sup>, 伊藤 雅洋<sup>1</sup>, 羽田 健<sup>1</sup>, 岡田 信彦<sup>1</sup> (1北里大・薬・微生物, 2北里大・薬・衛生化学)

○Tsuyoshi Miki<sup>1</sup>, Yusuke Hoshino<sup>1</sup>, Taro Sakamoto<sup>2</sup>, Naoki Sudo<sup>1</sup>, Masahiro Ito<sup>1</sup>, Takeshi Haneda<sup>1</sup>, Nobuhiko Okada<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Kitasato Univ., 2Dept. Hygienic Chem., Sch. Pharm., Kitasato Univ.)

Intestinal long-chain fatty acid (LCFA) can serve as a nutrient source or building block for lipid membrane in bacteria, as well as an environmental cue that modulates the virulence of enteropathogenic bacteria. However, it remains unclear how LCFA metabolism impacts the gastrointestinal infection. Aim of this study is to decipher the role of LCFA metabolism in gastrointestinal infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, a major enteropathogenic bacterium. Here, we show lipid LCFA homeostasis of *S. Typhimurium* maintains proper flagellar motility by activating phase 2 flagella, which contributes to gut colonization of this bacterium. Understanding the regulatory mechanism of intestinal environmental cues, including LCFA, in gastrointestinal infection might lead to the development of novel anti-infectious or probiotic therapeutic interventions.

## P1-108

*Porphyromonas gingivalis* ジンジバインによる PLC を介した COX-2 発現と PGE2 産生の分子機序

○中山 真彰<sup>1,2</sup>, 山口 智之<sup>1</sup>, 内藤 真理子<sup>3</sup>, 中山 浩次<sup>3</sup>, 大原 直也<sup>1,2</sup> (1岡山大・院医歯薬・口腔微生物学, 2岡山大・歯先端研セ, 3長崎大・院医歯薬・口腔病原微生物学)

*Porphyromonas gingivalis* gingipains induce COX-2 expression and PGE2 production via phospholipase C

○Masaaki Nakayama<sup>1,2</sup>, Tomoyuki Yamaguchi<sup>1</sup>, Mariko Naito<sup>3</sup>, Koji Nakayama<sup>3</sup>, Naoya Ohara<sup>1,2</sup> (1Dept. Oral Microbiol., Okayama Univ. Fac. Med. Dent. Pharm. Sci., 2ARCOCS, Okayama Univ. Dent. Sch., 3Dept. Microbiol. Oral Infect., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci.)

*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) は代表的な歯周病原細菌である。歯周炎では COX-2 発現や PGE2 産生が認められる。これまでに、単球系細胞において *Pg* の病原因子ジンジバインが細胞外カルシウムを流入させ、COX-2 発現や PGE2 産生を起こすことを示した。本研究では、単球系細胞株 THP-1 における細胞内カルシウム濃度上昇に関連するホスホリパーゼ C (PLC) に着目して、ジンジバインによる COX-2 発現と PGE2 産生における PLC の関与を調べた。PLC 阻害剤 U73122, およびその陰性コントロール U73343 を用いて、ジンジバインによる COX-2 発現と PGE2 産生に対する PLC の関与を調べた。またジンジバインによる COX-2 発現の上流因子である ERK/AP-1 と IKK/NF-κB の 2 経路に及ぼす PLC の関与についても調べた。その結果、THP-1 細胞における *Pg* 感染による COX-2 発現と PGE2 産生は U73122 の濃度依存的に減少し、U73122 未処理、および U73343 処理では COX-2 発現と PGE2 産生にほとんど抑制効果を示さなかった。*Pg* 感染による ERK と IKK の活性化は、U73122 未処理と比べて U73122 処理によって抑制された。また ERK が制御する c-Fos と c-Jun の発現誘導とリン酸化活性も同様に U73122 処理によって抑制された。したがって、*Pg* 感染におけるジンジバインによる COX2 発現と PGE2 産生には PLC の関与が示され、PLC の活性化は細胞外のカルシウム流入にも関わっている可能性が示唆された。



## P1-109

GntR 型転写因子はアンチセンス鎖 RNA を介して *Rhodococcus equi* 毒力関連抗原 VapN 発現を制御する

○鈴木 康規<sup>1</sup>, 高木 美羽<sup>1</sup>, 久保田 寛顕<sup>2</sup>, 高井 伸二<sup>1</sup>, 佐々木 由香子<sup>1</sup>, 角田 勤<sup>1</sup> (1北里大・獣医・獣医衛生, 2都健安研・微生物部)

GntR-type transcription factor regulates *Rhodococcus equi* VapN expression via antisense RNA

○Yasunori Suzuki<sup>1</sup>, Miu Takagi<sup>1</sup>, Hiroaki Kubota<sup>2</sup>, Shinji Takai<sup>1</sup>, Yukako Sasaki<sup>1</sup>, Tsutomu Kakuda<sup>1</sup> (1Lab. Animal Hygiene, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ., 2Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health)

【背景】先行研究において、病原性プラスミド pVAPN を保有する *Rhodococcus equi* 株間で VapN 産生量が異なり、それが病原性に関与することを報告した。本研究では、これらの株間で VapN 産生量が異なる要因について検討した。【材料・方法】VapN 産生株と非産生株の RNA-Seq 解析を実施した。個々の mRNA 発現量は qRT-PCR を用いて定量し、転写開始点を 5' RACE により特定した。シャトルベクターに転写開始点上流配列 (P<sub>AS</sub>) と lacZ をクローニングし、プロモーター活性を測定した。超音波破碎した菌体タンパク質と P<sub>AS</sub> 配列を用いて DNA プルダウンを実施し、結合タンパク質の同定・計量を行った。P<sub>AS</sub> 結合候補タンパク質の内、RE0327\_29070 (GntR) に着目し、本遺伝子の欠損株及び補完株を作製後、VapN 産生量並びに P<sub>AS</sub> プロモーター活性を調べた。【結果・考察】VapN 発現の至適条件以外で培養すると、vapN の ORF 内にアンチセンス鎖 RNA (AS 鎖) が増加することが明らかとなった。産生株に AS 鎖を強制発現させると、VapN 産生量が著しく減少した。また、5' RACE により AS 鎖の転写開始点を vapN ORF の 6bp 下流に特定した。非産生株において P<sub>AS</sub> プロモーター活性を検出し、特に pH8.0 培養条件下で高値を示した。非産生株の pH8.0 培養時に P<sub>AS</sub> 配列への結合量が 4 倍以上増加したタンパク質の内、転写因子は GntR 及び RE0327\_45140 (IclR) のみであった。非産生株の GntR 欠損株において VapN 発現が検出され、補完株でその発現が減少した。さらに、P<sub>AS</sub> 配列のプロモーター活性は、欠損株において野生株と比較して有意に減少した。以上のことから、VapN 発現において、GntR による vapN アンチセンス RNA 発現を介した抑制機構が存在することが示唆された。

## P1-110

*Streptococcus pyogenes* のモジュロン情報は溶血活性を変化させる炭素源を明らかにする

○広瀬 雄二郎<sup>1</sup>, Victor Nizet<sup>2</sup>, Bernhard O Palsson<sup>3</sup>, 川端 重忠<sup>1</sup> (1阪大・院歯・口腔細菌, 2Dept. Ped., Univ. California San Diego Sch. Med., 3Dept. Bioeng., Univ. California San Diego)

Computed modulos in *Streptococcus pyogenes* reveals carbon sources that alter its hemolytic activity

○Yujiro Hirose<sup>1</sup>, Victor Nizet<sup>2</sup>, Bernhard O Palsson<sup>3</sup>, Shigetada Kawabata<sup>1</sup> (1Dept. Oral Mol. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 2Dept. Ped., Univ. California San Diego Sch. Med., 3Dept. Bioeng., Univ. California San Diego)

*Streptococcus pyogenes* は咽頭炎など比較的軽度の疾患から致死性の高い劇症型感染症まで、ヒトに多様な感染症を惹き起こす。*S. pyogenes* は宿主環境に適応するために、転写調節ネットワークを駆使して生理的状态を変化させる。しかし、*S. pyogenes* における転写因子は 40 個以上も推定されており、根底にある転写調節ネットワークを多面的に捉えることは困難であった。そこで本研究では、*S. pyogenes* における RNA-seq 解析データを公共のデータベースより収集し、独立主成分分析を実行した。これにより、*S. pyogenes* のモジュロン (複数の転写因子や環境要因による遺伝子発現制御の結果、ともに挙動する遺伝子群) を世界で初めて同定し、データベース上に公開した (imodulondb.org)。さらに、得られた 42 のモジュロン情報を、過去の文献で報告されているレギュロンおよびレギュロンのデータベースの情報と照合し、モジュロンの制御に寄与する転写因子を統計学的に算出した。得られた結果を、過去の RNA-seq 解析のデータ解釈に応用すると、グルコースの多糖体であるマルトースおよびマルトデキストリンの利用は、溶血毒素の発現に影響することが示唆された。そこで、溶血毒素であるストレプトリジン S (SLS) またはストレプトリジン O (SLO) の欠損株を用い溶血活性を測定した。その結果、菌がグルコースを利用する場合の溶血活性は SLO 依存的事であるのに対し、マルトース利用では SLS 依存的事、マルトデキストリン利用では SLO および SLS 依存的事であることが明らかとなった。本研究において同定した *S. pyogenes* における 42 のモジュロンは、未知の病原性発現機構を探索するために有用な情報を提供することが示唆された。

## P1-111

Extracellular vesicles from *Staphylococcus aureus* promote pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

○Phawinee Subsomwong<sup>1</sup>, 成田 浩司<sup>1,2</sup>, 河合 智明<sup>1</sup>, 中根 明夫<sup>3,4</sup>, 浅野 クリスナ<sup>1,3</sup> (1弘前大・院医・感染生体防御学, 2弘前大・院医・附属動物実験施設, 3弘前大・院医・生体高分子健康科学, 4弘前医療福祉大・保健・看護学科)

○Phawinee Subsomwong<sup>1</sup>, Kouji Narita<sup>1,2</sup>, Noriaki Kawai<sup>1</sup>, Akio Nakane<sup>3,4</sup>, Krisana Asano<sup>1,3</sup> (1Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 2Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 3Depart. Biopharm. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 4Hirosaki Univ. Health Welf.)

*Staphylococcus aureus* (Sa) and *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) co-infections are common in patients with chronic wounds, but little is known about their synergistic effect mediated by extracellular vesicles (EVs). In this study, we investigated the effect of EVs derived from Sa (SaEVs) on the pathogenicity of Pa. Here, our results showed that SaEVs did not promote growth and antibiotic susceptibility patterns of Pa. Interestingly, we found that SaEV pretreatment promoted Pa invasion and induced cell death of HaCaT cells. Differential proteomic analysis showed that PsIE, an exopolysaccharide biosynthesis-related protein in Pa was increased by SaEVs, consistent with the expression of the five psl polymerization-related genes (pslA/E/J/K/L) in Pa treated with SaEVs. In addition, SaEVs induced biofilm formation and prevented the phagocytosis of Pa from RAW 264.7 macrophages. The fusion of R18-labeled SaEVs with Pa was observed by fluorescence microscopy. Virulence-related factors, transcriptional regulators, ATP synthesis proteins, translation proteins, etc. were detected in SaEVs. Taken all together, bacterial communication via EVs can influence co-infection system. The SaEVs play a role as the mediator that promotes Pa pathogenicity by enhancing epithelial cell invasion, being involved in exopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, and preventing phagocytosis of macrophages.

## P1-112

## ウエルシュ菌 α 毒素による CD11b 抗原の発現増加

○竹原 正也, 小林 敬子, 永浜 政博 (徳島文理大・薬・微生物)

Up-regulation of CD11b by *Clostridium perfringens* α-toxin

○Masaya Takehara, Keiko Kobayashi, Masahiro Nagahama (Dept. Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ.)

A 型ウエルシュ菌によるガス壊疽は、筋壊死の進行が非常に早い重篤な感染症である。この筋壊死は、虚血性の循環障害により起こり、外毒素である α 毒素が血管内で血小板-白血球複合体の形成を誘導することが原因となる。これまでに、α 毒素は血小板の GPIIb/IIIa を活性化して複合体の形成を促進することが報告されているが、本毒素が白血球に与える影響は不明であった。今回、血小板 GPIIb/IIIa のレセプターとして白血球で発現する CD11b 抗原に着目し、CD11b 発現に与える α 毒素の影響について検討を行なった。

精製した α 毒素を処理したマウス骨髄好中球では、毒素の処理濃度依存的に CD11b の発現が増加することがフローサイトメトリー法により判明した。一方、DNA マイクロアレイや免疫ノブロット法による検討では、本毒素は細胞全体での CD11b の発現量に影響しなかった。また、免疫蛍光染色による検討では、α 毒素が CD11b の細胞内局在を細胞内から細胞膜へ変化させることが判明した。以上の結果より、本毒素が細胞内にある CD11b の細胞膜への表出を促進することが示唆された。さらに、セレウス菌由来ホスホリパーゼ C やスフィンゴミエリナーゼ、合成セラミドを用いた検討などにより、α 毒素は、そのスフィンゴミエリナーゼ活性によりセラミドの産生を促進し、産生されたセラミドが CD11b の細胞膜への表出を誘導することが示唆された。このように、α 毒素はセラミドを介した CD11b の発現増加を導くことで血小板-白血球複合体の形成を促進し、末梢の循環障害によりウエルシュ菌感染時の筋障害を誘導、または促進されると推察される。

## P1-113

ボルデテラが産生する Bcr4 は III 型分泌装置のロッドタンパク質のシャペロンである

後藤 雅貴<sup>1</sup>, ○桑江 朝臣<sup>1</sup>, 花輪 智子<sup>2</sup>, 鈴木 仁人<sup>3</sup>, 阿部 章夫<sup>1</sup> (1北里大・院・感染制御科学府, 2杏林大・医・感染症, 3国立感染症研・薬剤耐性研究センター)

### Bcr4 Is a Chaperone for the Inner Rod Protein in the Bordetella Type III Secretion System

Masataka Goto<sup>1</sup>, ○Asaomi Kuwae<sup>1</sup>, Tomoko Hanawa<sup>2</sup>, Masato Suzuki<sup>3</sup>, Akio Abe<sup>1</sup> (1Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ., 2Dept. Infect. Diseas., Kyorin Univ. Sch. Med., 3Antimicrobial. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Diseas.)

*Bordetella bronchiseptica* injects virulence proteins called effectors into host cells via a type III secretion system (T3SS) conserved among many Gram-negative bacteria. In a previous study, we identified a chaperone-like protein named Bcr4 that regulates T3SS activity in *B. bronchiseptica*. Bcr4 does not show strong sequence similarity to well-studied T3SS proteins of other bacteria, and its function remains to be elucidated. Here, we investigated the mechanism by which Bcr4 controls T3SS activity. A pulldown assay revealed that Bcr4 interacts with BscI, based on its homology to other bacterial proteins, to be an inner rod protein of the T3SS machinery. An additional pulldown assay using truncated Bcr4 derivatives and secretion profiles of *B. bronchiseptica* producing truncated Bcr4 derivatives showed that the Bcr4 C-terminal region is necessary for the interaction with BscI and activation of the T3SS. Moreover, the deletion of BscI abolished the secretion of type III secreted proteins from *B. bronchiseptica* and the translocation of a cytotoxic effector into cultured mammalian cells. Finally, we show that BscI is unstable in the absence of Bcr4. These results suggest that Bcr4 supports the construction of the T3SS machinery by stabilizing BscI. This is the first demonstration of a chaperone for the T3SS inner rod protein among the virulence bacteria possessing the T3SS.

## P1-114

【演題取り下げ】

【Withdrawn】

## P1-115

*Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼ遺伝子の発現調節因子の同定

○高橋 栄造<sup>1</sup>, 越智 定幸<sup>1</sup>, 西村 莉彩<sup>1</sup>, 小池 和輝<sup>1</sup>, 磯部 隆史<sup>1</sup>, 埴岡 伸光<sup>1</sup>, 小林 秀丈<sup>2</sup>, 清家 総史<sup>2</sup>, 山中 浩泰<sup>2</sup>, 岡本 敬の介<sup>3</sup> (1横浜薬大・薬, 2広島国際大・薬, 3岡山山大・インド感染症共同研究センター)

### Identification of regulatory protein on production of serine protease by *Aeromonas sobria*

○Eizo Takahashi<sup>1</sup>, Sadayuki Ochi<sup>1</sup>, Risa Nishimura<sup>1</sup>, Kazuki Koike<sup>1</sup>, Takashi Isobe<sup>1</sup>, Nobumitsu Hanioka<sup>1</sup>, Hidetomo Kobayashi<sup>2</sup>, Soshi Seike<sup>2</sup>, Hiroyasu Yamanaka<sup>2</sup>, Keinosuke Okamoto<sup>3</sup> (1Fac. Pharm. Sci., Yokohama Univ. Pharm., 2Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., 3Colla. Res. Cent. Infect. Dis. Ind., Okayama Uni.)

*Aeromonas* species, which are facultative anaerobic bacteria, inhabit in various aquatic environments. *Aeromonas* species cause diarrhea in both adults and children. We have studied the property of exotoxins produced by diarrhegenic *Aeromonas* species, such as hemolysin, proteases, lipase and so on. *A. sobria* secretes two types of extracellular proteases, serine protease (ASP) and metalloprotease (AMP). We found that the production of serine protease is higher under 25 degree than under 37 degree and that the addition of skim milk into liquid medium promotes the production of serine protease. The production of serine protease was related with the transcriptional level of serine protease gene detected by real time RT-PCR.

In this study, we searched the factors interacting with the promoter region of serine protease gene. We isolated the protein with molecular weight of 10kDa, using pull down assay. Subsequently, we determined the amino acid sequence at N-terminus of the protein, and identified the protein X by Blast search of GenBank. Next, we constructed the deletion mutant of the gene encoding protein X by homologous recombination. It was shown that deletion mutant produced more amount of serine protease outside of cell than wild strain. The result suggested that the protein X might inhibit the expression of serine protease gene.

## P1-116

バルトネラ属細菌がもつ血管新生オートトランスポーター BafA の菌種間比較

○塚本 健太郎<sup>1</sup>, 熊懷 香葉<sup>1</sup>, 鈴木 菜つみ<sup>1</sup>, 立松 薫<sup>1</sup>, 近藤 由佳<sup>1</sup>, 佐藤 真伍<sup>2</sup>, 丸山 総一<sup>2</sup>, 鈴木 匡弘<sup>1</sup>, 土井 洋平<sup>1</sup> (1藤田医大・医・微生物, 2日大・生物資源・獣医公衆衛生)

### Comparison of angiogenic autotransporter BafA in *Bartonella* species

○Kentaro Tsukamoto<sup>1</sup>, Kayo Kumadaki<sup>1</sup>, Natsumi Suzuki<sup>1</sup>, Kaoru Tatematsu<sup>1</sup>, Yuka Kondo<sup>1</sup>, Shingo Sato<sup>2</sup>, Soichi Maruyama<sup>2</sup>, Masahiro Suzuki<sup>1</sup>, Yohei Doi<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Fujita Health Univ. Sch. Med., 2Dept. Vet. Med., Coll. Bioresource Sci., Nihon Univ.)

バルトネラ属細菌は様々な動物を自然宿主としており、その宿主特異性や人に対する病原性は菌種により異なる。これらのうち *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis* は人に感染した際に血管新生を惹起し、血管腫を形成する。これまで人に血管腫を起こすのはこれら3菌種に限られると考えられていたが、近年、他の菌種による細菌性血管腫が報告されている。バルトネラが誘導する血管新生には、最近我々が同定したオートトランスポーター BafA が責任因子と考えられているが、そのアミノ酸配列は多様性に富み、*B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis* 以外の菌種に存在するオルソログの活性や発現については十分解明されていない。そこで本研究では、BafA の生物活性についてバルトネラ属内での菌種間比較を行った。

バルトネラ属菌のうちゲノム配列情報が得られたものから、BafA オルソログをコードする遺伝子 28 種類を大腸菌発現系ベクターに組み込み、組換えタンパク質として精製してヒト臍帯静脈内皮細胞に対する細胞増殖促進活性を検討した。その結果、細菌性血管腫の原因となった5菌種由来の BafA はいずれも細胞増殖を促進した。一方、他の23菌種のうち3菌種に由来する BafA は細胞増殖促進活性を全く示さなかったことから、BafA の活性レベルは菌種によって異なることが明らかとなった。さらに *B. henselae* の複数の菌株について感染時の細胞増殖能を調べたところ、同一配列の BafA を有しているも菌株によって細胞増殖能は異なり、BafA の発現あるいは分泌能に違いがあることが示唆された。現在、これらの菌種間および株間での BafA の発現、分泌の違いを調べるとともに、活性必須領域の特定を進めている。

## P1-117

新型ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素 SEIJ および SEIW は食中毒を引き起こすか

○小野 久弥<sup>1</sup>, 鈴木 康規<sup>2</sup>, 胡 東良<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北里大・獣医・人獣共通感染症学, <sup>2</sup>北里大・獣医・獣医衛生学)

**Can the novel staphylococcal enterotoxin-like toxins SEIJ and SEIW cause food poisoning?**

○Hisaya Ono<sup>1</sup>, Yasunori Suzuki<sup>2</sup>, Dong-Liang Hu<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Zoonoses, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ., <sup>2</sup>Lab. Vet. Hygiene, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) は典型的なスーパー抗原 (SAG) である一方、高い耐熱性と強い消化酵素耐性を有し、重要な食中毒原因毒素である。これまで、SEA~SEE 型が知られていたが、近年、新型 SE および SE-like toxin (SEL) が次々と発見され、現在までに SEG-SELZ, SEI01, 02, 26, 27 型が報告されている。しかし、SELJ は 1998 年に発見されたが、その生物活性および食中毒への関与が未だに明らかにされていない。また、近年発見された SEIW は MRSA が高率で保持し感染症への関与が示されたが、食中毒への関与は不明である。本研究では、SELJ および SEIW の安定性、SAG 活性および嘔吐誘導活性を解析し、食中毒への関与を検討した。まず、精製した SELJ および SEIW を 100°C で加熱処理、ペプシンまたはトリプシンと反応後の各毒素の変化を SDS-PAGE により調べた。SELJ は加熱、ペプシン・トリプシン処理に対し高い耐性を有した。一方、SEIW はトリプシンには耐性が示さなかった。次に、マウス脾細胞に対する細胞増殖とサイトカイン産生の誘導を測定し SAG 活性を調べたところ、両毒素とも SAG 活性を示した。また、霊長類嘔吐モデル・コモンマーモセットを用い各毒素の嘔吐誘導活性を検討した。SELJ は 7 頭中 3 頭に複数回の嘔吐反応を起こしたが、SEIW は 5 頭すべてに嘔吐を起こさなかった。以上の結果より、SELJ は典型的な SE の生物活性を有し、食品内で産生された場合、食中毒を引き起こすと考えられる。一方、SEIW は SAG 活性を有するが、嘔吐誘導活性を持たないため食中毒に関与しないことが示唆された。

## P1-118

*Aeromonas* セリンプロテアーゼによるタイトジャンクションの破壊は菌の感染により増強される

○小林 秀丈<sup>1</sup>, 清家 総史<sup>1</sup>, 高橋 栄造<sup>2</sup>, 岡本 敬之介<sup>3</sup>, 山中 浩泰<sup>1</sup> (<sup>1</sup>広島国際大・薬・分子微生物科学, <sup>2</sup>横浜薬科大・薬・感染予防学, <sup>3</sup>岡山大・インド感染症共同研究センター)

**Disruption of tight junction by *Aeromonas serine protease* is enhanced by the presence of bacteria**

○Hidetomo Kobayashi<sup>1</sup>, Soshi Seike<sup>1</sup>, Eizo Takahashi<sup>2</sup>, Keinosuke Okamoto<sup>3</sup>, Hiroyasu Yamanaka<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Labo. Mol. Microbiol. Sci., Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., <sup>2</sup>Labo. Med. Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Yokohama Univ. Pharm., <sup>3</sup>Colla. Res. Cent. Infect. Dis. Ind., Okayama Univ.)

*Aeromonas* is a pathogen causing food-borne illness. In immunocompromised patients, however, the symptoms may progress to severe extraintestinal diseases. To cause such extraintestinal diseases, *Aeromonas* must pass through the intestinal epithelial barrier. We have previously reported that extracellular serine protease (ASP) produced by *Aeromonas* contributes to the degradation of components of tight junctions (TJ) that form the epithelial barrier. Furthermore, experiments using purified ASP suggested that factors other than ASP may be involved in the degradation of TJ. In this study, we attempted to identify factors other than ASP involved in the degradation of TJ and to elucidate their mechanisms. First, we examined whether the promotion of TJ degradation by ASP was affected by the presence or absence of the viable bacteria. To examine whether bacterial factors other than ASP promote TJ disruption by ASP. We treated T84 intestinal epithelial cells cultured confluent with either *Aeromonas Δasp* or the culture supernatant solution from the mutant strain in the presence of purified ASP. As a result, promotion of TJs degradation by ASP was observed only in the presence of viable *Aeromonas Δasp*, but not in the addition of the bacterial culture supernatant. This result suggests that the presence of viable bacteria on the intestinal tissue facilitates the destruction of TJ by ASP.

## P1-119

宿主細胞内に侵入した肺炎球菌によるエンドソーム膜損傷の制御メカニズムに関する解析

○平石 早矢住<sup>1,2</sup>, 小川 道永<sup>1</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, 梁 明秀<sup>2</sup>, 大西 真<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>感染研・細, <sup>2</sup>横浜市大・医・微生物, <sup>3</sup>沖縄県中部保健所)

**Analysis of the regulatory mechanisms of endosome membrane damage during pneumococcal infection**

○Sayaka Shizukuishi<sup>1,2</sup>, Michinaga Ogawa<sup>1</sup>, Yukihiro Akeda<sup>1</sup>, Akihide Ryo<sup>2</sup>, Makoto Ohnishi<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Dept. Microbiol., Yokohama City Univ., Grad. Sch. Med., <sup>3</sup>Chubu Regional Public Health Center, Okinawa Prefecture)

肺炎球菌は小児や免疫力が低下した高齢者に対して敗血症や髄膜炎といった侵襲性感染を引き起こすことがあるが、侵襲経路の一つとして、菌が宿主細胞へ侵入し、膜孔形成毒素 Pneumolysin (Ply) によって endosome 膜を損傷することで endocytosis による殺菌を逃れ、血中や髄液へと移行する経路がある。一方で、過度な endosome 膜の損傷は宿主殺菌機構である autophagy 誘導の引き金ともなることから、今回我々は、肺炎球菌が細胞内生存戦略として Ply による endosome 膜損傷を制御している可能性について検証した。まず、luciferase assay により endosome 膜損傷を定量化するアッセイ系を構築し、それをベースに種々の肺炎球菌病原因子欠失変異株を感染させ endosome 膜損傷を抑制する病原因子の探索を行った。その結果、glycosidase 欠失変異株では野生株と比べて endosome 膜損傷の程度を示す発光強度の増強が認められた。さらに、その増強は glycosidase と Ply の二重欠失変異株では消失した。また、glycosidase 欠失変異株では野生株と比べて細胞内生存性が低下していたことから、これらの結果は肺炎球菌の glycosidase が Ply の強力な膜損傷活性を抑制することで、自らの細胞内生存性を向上させるという菌の新たな生存戦略の存在を示唆していると考えられた。

## P1-120

*Streptococcus anginosus* が産生する Streptolysin S に対する宿主細胞応答のメカニズム

○山森 優護<sup>1</sup>, 田端 厚之<sup>1,2</sup>, 友安 俊文<sup>1,2</sup>, 長宗 秀明<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>徳島大・生物資源産業・生物資源産業, <sup>2</sup>徳島大院・社会産業理工学・生物資源産業)

**Mechanism of host-cellular response to streptolysin S produced by *Streptococcus anginosus***

○Yugo Yamamori<sup>1</sup>, Atsushi Tabata<sup>1,2</sup>, Toshifumi Tomoyasu<sup>1,2</sup>, Hideaki Nagamune<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biosc. & Bioindust., Fac. Biosci. & Bioindust., Tokushima Univ., <sup>2</sup>Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】アンギノソーサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒト口腔内常在性の日和見レンサ球菌である。AGS に属する *S. anginosus* subsp. *anginosus* (SAA) の β 溶血株はペプチド溶血毒素 Streptolysin S (SLS) を産生するが、その細胞に対する作用の詳細は不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト口腔由来株化培養細胞 HSC-2 を被検細胞とし、SLS に対する HSC-2 の応答メカニズムについて検討した。

【方法】SAA 基準株 (NCTC 10713<sup>T</sup>) と基準株由来の SLS 遺伝子欠失株 (*ΔsaqAs*) を被検菌とし、ヒト血清アルブミン存在条件下で対数期まで培養した菌液から培養上清を調製した。培養上清を作用させた HSC-2 の応答反応については、SLS 依存性の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変動を Calcium Kit - Fura 2 を用いて評価した。また、SLS 依存性の遺伝子発現の変動については、RNA-seq 解析及びリアルタイム PCR により評価した。さらに、SLS 依存性のシグナル伝達に関与するタンパク質を免疫化学的に検討した。

【結果・考察】SLS の産生により溶血活性を示す培養上清を作用させた HSC-2 では、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇が確認された。また、リアルタイム PCR 解析の結果より、HSC-2 では SLS 依存性に複数種の Immediate early genes (IEGs) とサイトカイン遺伝子の顕著な発現亢進が確認され、IEGs の発現亢進は細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇に依存していた。以上の結果から、SLS の作用に伴うシグナル伝達は Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入が起点となることが明らかになったので、細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇から IEGs 発現亢進に至る経路をさらに明らかにすべく、引き続き検討を進めている。

## P1-121

### ボツリヌス CD 型モザイク神経毒素のマウスにおける毒素活性の解析

宮下 慎一郎<sup>1</sup>, 藤石 眞子<sup>1</sup>, 唐津 修羅<sup>2</sup>, 諸菱 環<sup>3</sup>, 長島 有希<sup>3</sup>, 〇畑 剛士<sup>3</sup>, 黄 インシュン<sup>2</sup>, 細谷 圭汰<sup>2</sup>, 相根 義昌<sup>1</sup> (1東京農大・生物産業・食香粧化学, 2東京農大・生物産業・生物産業, 3東京農大・生物産業・食香粧)

### Characterization of mosaic botulinum neurotoxin type CD in mice

Shin-Ichiro Miyashita<sup>1</sup>, Mako Fujiishi<sup>1</sup>, Shura Karatsu<sup>2</sup>, Tamaki Morobishi<sup>3</sup>, Yuki Nagashima<sup>3</sup>, 〇Tsuyoshi Hata<sup>3</sup>, I Hsun Huang<sup>2</sup>, Keita Hosoya<sup>2</sup>, Yoshimasa Sagane<sup>1</sup> (1Dept. Food Aroma Cosme. Chem., Fac. Bio-ind., Tokyo NODAI, 2Dept. Bio. Indust., Grad. Sch. Bio. Indust., Tokyo NODAI, 3Dept. Food. Cosme. Sci., Grad. Sch. Bio. Indust., Tokyo NODAI)

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は血清型により A~G 型 (BoNT/A-G) に分類される細菌性プロテアーゼである。BoNT は 3 つのドメイン (LC; 酵素活性, H<sub>N</sub>; トランスロケーション, H<sub>C</sub>; 受容体結合) から構成される。神経細胞に到達した BoNT は、神経伝達物質の放出に関わる SNARE タンパク質を切断し、ボツリヌス中毒として知られる弛緩性神経麻痺を引き起こす。BoNT は医療分野あるいは抗シワ物質とした美容分野で広く応用利用されている。しかし、同じ血清型の毒素投与は抗毒素抗体産生を誘導し、毒素の治療効果を減弱することが報告されている。本研究では、既存のボツリヌス毒素製剤の代替品として、キメラ毒素 BoNT/CD (LCH<sub>N</sub>/C-H<sub>C</sub>/D) の毒素活性を解析することを目的とした。BoNT/CD 標品はボツリヌス菌培養液から精製し、培養ラット大脳皮質神経細胞およびマウスを用いた局所麻痺モデルにより毒素活性を解析した。対照として、マウスにおいて長期神経麻痺を引き起こす BoNT/A および BoNT/C を用いた。BoNT/CD は培養神経細胞において SNARE タンパク質である Syntaxin および SNAP-25 を切断した。BoNT/C および BoNT/A と比較して、BoNT/CD は培養神経細胞において最も高い毒素活性を示した。BoNT/CD のマウス後肢筋肉への筋注射は、濃度依存的に局所麻痺を引き起こし、その麻痺は約 21 日間持続した。一方、BoNT/C は濃度依存的な局所筋肉麻痺を引き起こさず、毒素が注射部位から全身へ拡散しやすいことが推測された。BoNT/A は後肢に約 30 日間麻痺を引き起こした。BoNT/CD は BoNT/C と比較して、投与部位から全身への毒素拡散が少なかったことから、BoNT/D 由来の受容体結合ドメインが効果的な局所麻痺発現に関与することが示唆された。

## P1-122

### 織毛虫の殺滅現象を利用した Legionella pneumophila の新規病原因子の探索

〇大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

### Exploration of novel virulence factors of Legionella pneumophila using ciliate-killing phenomenon

〇Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

通性細胞内寄生性細菌 *Legionella pneumophila* (Lp) は原生動物内で増殖するが、その適応進化の過程で獲得した IV 型分泌装置 (T4SS) と関連エフェクターがヒト細胞内での増殖に不可欠な病原因子と考えられている。しかしゲノム遺伝子の約 30% がエフェクターと予想されるのでその全貌は明らかではない。私達は、T4SS 依存的に Lp に殺滅される織毛虫 *Anteglaucoma* sp. を下水から単離し、LpJR32 Tn 挿入変異株ライブラリーより殺滅能が喪失した変異株を選別した。変異株の多くは T4SS 構成タンパク Dot/Icm の遺伝子が破壊されていたが、3 株は T4SS との関与が知られていない遺伝子 (*lpg1859*, *lpg1206*, *lpg1343*) に変異があった。本研究ではこれら遺伝子の特徴をデータベース照合 (NCBI), 配列保存性 (塩基配列に基づく系統解析), ドメイン解析 (IntroPro), 相互作用予測 (STRING) から調査すると共に、これら変異株のヒト細胞 (HeLa) 内での動態も検討した。その結果、これら遺伝子は Lon (*lpg1859*), リボソーム関連因子 RaiA (*lpg1206*), 仮想蛋白 (*lpg1343*) の遺伝子と同定された。*lpg1343* は *Legionella* 属に広く保存されていた。ドメイン解析により芽胞形成関連リビート, リボソーム S30AE, AAA ATPase 等に関わるドメインが同定されたが、T4SS との相互作用を示唆するものは同定されなかった。一方、相互作用予測から *lpg1343* と T4SS 構成タンパク DotA の相互作用が示唆された。いずれの変異株も HeLa 細胞内で増殖できなかった。以上より、対象の遺伝子のうち *lpg1343* は T4SS と関与するものと考えられた。一方、*lpg1859* と *lpg1206* は未解明の経路で T4SS に関与する可能性がある。(非会員協力者 川代愛梨, 玄行理子, 田西梨沙)

## P1-123

### 薬剤応答タンパク Drp35 による黄色ブドウ球菌の病原性制御

〇佐々木 麻綾<sup>1</sup>, Vishal Gor<sup>2</sup>, 森川 一也<sup>2</sup> (1筑波大院・人間総合科学, 2筑波大・医・微生物)

### Virulence regulation by drug responsive protein (Drp35) in *Staphylococcus aureus*

〇Maaya Sasaki<sup>1</sup>, Vishal Gor<sup>2</sup>, Kazuya Morikawa<sup>2</sup> (1Grad. Sch. Com. Hum. Sci., Univ. Tsukuba, 2Div. Biomed. Sci., Fac. Med., Univ. Tsukuba)

黄色ブドウ球菌はヒト鼻腔内に常在するグラム陽性菌であるが、日和見感染や時にはトキシックショック症候群 (TSS) 等の致命的な感染症を引き起こす。このような二面性の背景には、本菌がバイオフィーム内等での慢性的な感染モードと、外毒素を産生する侵襲的な感染モードの 2 つを使い分けていることが挙げられ、クオラムセンシング系 (Agr 系) や SarA 転写因子などの制御因子群が関与している。薬剤応答タンパク質 Drp35 は細胞壁合成阻害剤や界面活性剤に応答して発現する。ヒトのラクトナーゼであるパラオキシナーゼと類似した 6 枚 β プロペラ構造を持つ酵素であり、実際ラクトナーゼ活性を持つことが示されている。先行研究では、N315 株において *drp35* 欠失によりバシトラシン感受性が増加したが、強毒株 MW2 では *drp35* 欠損によるバシトラシン感受性の変化が見られない。本研究では MW2 株において、*drp35* 欠失により複数の病原因子の発現レベルが変化することを示した。また、レポーターアッセイにより、MW2 の *drp35* 欠損株は病原因子の制御系 (Agr 系) の活性が変化していることを明らかにした。現在、Drp35 がどのように Agr 系に影響しているかを調べている。

## P1-124

### Bordetella 属細菌の産生するタンパク質 BteA と BopN の相互作用領域の解析

〇小河 俊伸, 桑江 朝臣, 阿部 章夫 (北里大・院・感染制御科学府)

### Interaction analysis between BteA and BopN produced by Bordetella

〇Toshinobu Ogawa, Asaomi Kuwae, Akio Abe (Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ.)

*Bordetella* 属細菌は III 型分泌装置と呼ばれる菌体外に突出したニードル複合体を介して病原因子を宿主細胞へと注入する。これらの病原因子はエフェクターと呼ばれ、宿主の生理機能を攪乱することで感染成立において重要な役割を担っている。*Bordetella* 属細菌の産生するエフェクターである BteA は菌体内で BopN と相互作用し複合体を形成して宿主細胞内に移行し細胞膜破壊を起こすが、BteA のいずれの領域が BopN との相互作用に関与しているか解明されていない。そこで本研究では、BteA の部分欠失変異体を作製し、BteA の BopN との相互作用領域の解析を行った。BteA の全長 658 アミノ酸 (FL), N 末端側 448 (N448), 248 (N248), 48 (N48) 及び 3 (N3) アミノ酸領域の宿主細胞内移行について解析を行った。BteA 部分欠失変異体とアデニル酸シクラーゼである CyaA の融合タンパク質をコードする DNA 断片をボルデテラ用発現ベクターに挿入した。これらのプラスミドを *Bordetella bronchiseptica* の BteA CyaA 欠損株と BteA CyaA BopN 欠損株に導入した。CyaA はカルモジュリン存在下でのみ ATP を cAMP に変換するため、菌を感染させた哺乳類細胞内の cAMP 濃度を測定することにより融合タンパク質の移行量を測定した。プラスミドを導入した *B. bronchiseptica* をラット肺由来の L2 細胞に感染させ、cAMP 濃度を測定した。その結果、N248, N48 は BopN の有無にかかわらず宿主細胞内に移行した。一方で N448 は BopN の存在下でのみ移行した。この結果から、BteA の 248~448 アミノ酸領域は BopN と相互作用し、移行制御を受けていると示唆された。

## P1-125

## Salmonella Typhimurium の侵入に誘発されるアクチン細胞骨格再編成の力学応答

○久保田 寛顕<sup>1</sup>, 下澤 東吾<sup>2</sup>, 小林 甲斐<sup>1</sup>, 水戸部 森歌<sup>1</sup>, 鈴木 康規<sup>3</sup>, 鈴木 淳<sup>1</sup>, 貞升 健志<sup>1</sup> (1都健安研・微生物部, 2東京大・理, 3北里大・獣医・獣医衛生学)

## Mechanical response of actin cytoskeleton remodeling induced by the Salmonella Typhimurium invasion

○Hiroaki Kubota<sup>1</sup>, Togo Shimozawa<sup>2</sup>, Kai Kobayashi<sup>1</sup>, Morika Mitobe<sup>1</sup>, Yasunori Suzuki<sup>3</sup>, Jun Suzuki<sup>1</sup>, Kenji Sadamasu<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 2Sch. Sci., Univ. Tokyo, 3Lab. Animal Hygiene, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Salmonella Typhimurium は腸管上皮細胞に侵入する際、アクチン細胞骨格の再編成を誘発する。この際、細胞膜には特徴的な波打ち構造 (Membrane Ruffle) が生まれ、細胞膜に接着した菌があたかも波の開閉に飲み込まれるかのような挙動を示す。その一方で、主要な感染部位である腸管では蠕動運動に起因する高粘度の消化物の流れが存在し、侵入中は粘性抵抗による負荷を受けると想定されるが、過去の研究ではこうした負荷を考慮しない実験系が一般的に用いられている。本研究では、S. Typhimurium 一個体を直接、あるいは直径 1µm のポリスチレンビーズを介して光ピンセットにより操作し、MDCK 細胞上に接着させて細胞内侵入を誘発するとともに、蛍光ナノボディを用いて細胞内アクチンのダイナミクスをリアルタイムで観察した。その結果、Ruffle 形成を反映した円環の広がりや蛍光標識したアクチンによって可視化され、ビーズを結合した個体によって誘発された Ruffle のサイズはビーズ未結合の場合に比べて小さかった。また、ビーズを光ピンセットで捕捉し続けることで侵入方向と逆向きに負荷を加えた場合はさらに小さい傾向にあった。加えて、条件によらず Ruffle のサイズは形成速度と良く相関しており、形成時間が 3 条件全てで一貫して 100 秒程度であることを反映した。これらの結果は、Ruffle のサイズは形成開始時に既に決定されており、その時点での力学的環境が特に影響することを示唆している。

## P1-126

## Helicobacter cinaedi の超硫黄代謝を介した持続的な骨髄内感染機構の解明

○松永 哲郎<sup>1</sup>, 守田 匡伸<sup>1</sup>, 西村 明<sup>2</sup>, 井田 智章<sup>1</sup>, 澤 智裕<sup>3</sup>, 本橋 ぼづみ<sup>4</sup>, 河村 好章<sup>4</sup>, 赤池 孝章<sup>1</sup> (1東北大・院医・環境医学, 2奈良先端大・先端科学技術・ストレス微生物科学, 3熊本大・院生命科学 (医)・微生物学, 4東北大・加齢医学・遺伝子発現制御, 5愛知学院大・薬・微生物)

## Dormant infection of Helicobacter cinaedi in bone marrow sustained by sulfur respiration

○Tetsuro Matsunaga<sup>1</sup>, Masanobu Morita<sup>1</sup>, Akira Nishimura<sup>2</sup>, Tomoaki Ida<sup>1</sup>, Tomohiro Sawa<sup>3</sup>, Hozumi Motohashi<sup>4</sup>, Yoshiaki Kawamura<sup>4</sup>, Takaaki Akaike<sup>1</sup> (1Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., 2Div. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci. Technol., NAIST, 3Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., 4Dept. Gene Exp. Regulation, IDAC, Tohoku Univ., 5Dept. Microbiol., Sch. Pharmacy., Aichi-Gakuin Univ.)

【目的】Helicobacter cinaedi は微好気性グラム陰性らせん状桿菌であり、近年、本菌と心血管疾患との関係性が注目されているが、本症の感染経路や病原性発現機構については依然不明な点が多い。本菌の近縁種 Wolinella succinogenes では硫黄呼吸によるエネルギー代謝の存在が報告されている。一方で、我々は、超硫黄分子がミトコンドリアの電子伝達系においてエネルギー代謝に寄与する、真核生物・ヒトの硫黄呼吸を見出した (Nat Commun, 2017&2021)。本研究では、本菌の超硫黄代謝を介した持続的な潜伏感染機構についてマウス感染系およびマクロファージ感染系を用いて解析を行なった。

【方法・結果】C57BL/6J マウスに本菌を腹腔内投与し各種臓器における感染の有無を本菌特異的 PCR 法により解析した結果、投与直後では全ての主要臓器から検出されたが、投与後、4 ヶ月にわたり骨髄のみから検出が認められた。感染マウスの骨髄試料から逆転写および本 PCR 解析の結果、本菌特異的な mRNA が検出された。本菌を感染させたマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いた免疫細胞染色の結果、菌体像とオートファジー関連タンパク質 p62 との共局在は観察されなかったが、硫黄呼吸を営むミトコンドリア近傍へのらせん状菌体の集積が認められた。

【考察】H. cinaedi は、感染細胞内においてオートファジーによる細胞内殺菌を回避し、ミトコンドリアの超硫黄型エネルギー代謝をハイジャックすることで細胞内寄生し、微好気環境である骨髄内に潜伏感染する可能性が示唆された。現在、生体内の主要な超硫黄分子生成酵素 CARS の遺伝子改変マウスを用いて、本菌の超硫黄分子を介した骨髄内潜伏感染について解析を進めている。

## P1-127

## 病原性クラミジア L2 はその細胞内増殖に芳香族炭化水素受容体と脱チロシン化チューブリンを要求する

○Saicheng Zhang<sup>1</sup>, 大久保 寅彦<sup>1</sup>, 中村 真二<sup>2</sup>, 東 秀明<sup>3</sup>, 山口 博之<sup>1</sup> (1北大・院・保健科学, 2順天大・院・医科学, 3北大・人獣リサーチセンター)

## Pathogenic Chlamydia L2 requires aryl hydrocarbon receptors and detyrosinated tubulin for its growth

○Saicheng Zhang<sup>1</sup>, Torahiko Okubo<sup>1</sup>, Shinji Nakamura<sup>2</sup>, Hideaki Higashi<sup>3</sup>, Hiroyuki Yamaguchi<sup>1</sup> (1Fac. Health Sc., Hokkaido Univ., 2Fac. Sch Med., Juntendo Univ., 3Fac. Human Beast Research Center, Hokkaido Univ.)

【目的】芳香族炭化水素受容体 (AhR) は細胞内の恒常性を司るリガンド依存的転写因子であるが、そのリガンドの一つインドール (IND) が Chlamydia trachomatis L2 434/Bu (CtL2) の細胞内増殖を抑制することを報告した。Ct の発育は細胞内骨格チューブリン (Tub) を利用するが、最近の研究で IND が Tub に結合しその動態を修飾することが明らかになった。本研究では、IND による CtL2 の細胞内増殖抑制機構への AhR と脱チロシン (dT) 化 Tub (Tub 動態に必須) の関与について精査した。【方法】GFP 発現 CtL2 を細胞 [HEp-2, HEpG2 AhR レポーター細胞, AhR ノックダウン (KD) 細胞] に感染させ AhR リガンド [IND, キヌレニン (LK: AhR アゴニスト), CH-223191 (CH: AhR アンタゴニスト)] の存在または非存在下で 48 時間培養。イメージングにて IND による AhR 核移行と dTTub 発現量を定性。AhR の活性化は AhR レポーター細胞を用いたルシフェラーゼ系で定量。IND による CtL2 の細胞内抑制機構における AhR と dTTub との関連性は、感染 AhR ノックダウン細胞と WB にて検討。【結果】IND および CH は CtL2 の細胞内増殖を抑制した。LK とは対照的に IND は AhR の核移行を促進しなかった。IND は LK による AhR の転写活性を抑制した。dTub の発現は Ct 感染で促進したが IND 存在下では抑制した。AhRKD 細胞では、CtL2 の発育は抑制し、dTub の発現も減衰した。【結論】CtL2 は、その細胞内増殖に AhR とその制御下にある dTTub を要求する。

## P1-128

## Rhodococcus equi のマクロファージ感染における重金属イオン輸送に関与する P 型 ATPase の役割について

○角田 勤, 福村 優人, Nuttapone Sangkanjanavanich, 鈴木 康規 (北里大・獣医・獣医衛生)

## A bacterial P-type ATPase is required for intracellular growth of Rhodococcus equi

○Tsutomu Kakuda, Yuto Fukumura, Nuttapone Sangkanjanavanich, Yasunori Suzuki (Lab. Animal Hygiene, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Rhodococcus equi は、グラム陽性好気性球桿菌で子馬に化膿性肺炎を引き起こす。本菌は、マクロファージ (Mφ) による殺菌を回避して増殖する細胞内寄生菌である。以前の研究で、金属イオン輸送 P 型 ATPase の 1 つが R. equi の Mφ 内増殖に関与していることが示唆された。本研究では、この P 型 ATPase をコードする遺伝子の欠損株と補完株を作製し、その表現型を解析した。相同組み換えにより P 型 ATPase 遺伝子 (以下 exp 遺伝子) 欠損株 (Δexp 株) を作製した。続いて、遺伝子導入用プラスミドにより exp 補完株を作製した。これらを用いて、各種重金属イオンを添加した培地における菌の増殖性を調べた。その結果、Cu<sup>2+</sup>および Co<sup>2+</sup>添加では野生株や補完株と比較して Δexp 株の増殖性に有意な低下が見られた。各種菌株に緑色蛍光蛋白遺伝子を導入し、Mφ 内感染像を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Δexp 株は野生株および補完株と比較して Mφ 内での増殖性が低下していた。ルシフェラーゼ遺伝子導入株を作製し、Mφ に感染させて発光量を測定したところ、Δexp 株を感染させた時の発光量は他 2 株を感染させた場合と比較して有意に減少していた。さらにルシフェラーゼ遺伝子導入株をマウスに尾静脈投与し IVIS により経時的に観察したところ、菌の増殖を示す肝臓での発光量が Δexp 株では野生株や補完株と比較して低かった。Mφ は、食胞の膜に存在するトランスポーターで食胞内の銅濃度を高めることにより菌にフェントン反応を惹起して傷害を与えることが知られている。本研究の結果から、R. equi は銅を排出する P 型 ATPase の働きにより、Mφ の銅を利用した殺菌作用に抵抗している可能性が示唆された。

## P1-129

偏性細胞内寄生性の *Chlamydia trachomatis* (L2 434/Bu) は低酸素で培養した宿主細胞環境を好む

○Ruiyu Li, Saicheng Zhang, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大院・保科・病態解析)

### Obligate intracellular *Chlamydia trachomatis* (L2 434/Bu) favors hypoxic cultured host cell condition

○Ruiyu Li, Saicheng Zhang, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

【目的】低酸素下の細胞は細胞死が抑制され ATP 産生と核酸合成が増すことで細胞の生存性は増す。一方、酸素分圧の上昇は、酸化ストレスを誘発し細胞死を伴う炎症応答に至る。すなわち多くの細胞内寄生性の病原体は低酸素を好みその環境に適応している可能性が高い。私達はリンパ肉芽腫を起こす偏性細胞内寄生性の病原性クラミジア (*Chlamydia trachomatis* L2 434/Bu: CtL2) が通常酸素と比べ 2% 低酸素で 100 倍程度細胞内菌数が増加することを発見した (Microbes Infect 2020, FCMJ 2022)。本研究では、通常酸素と 2% 低酸素での感染細胞内での CtL2 の動態を、低酸素暴露時間、封入体の成長度合い、メタボロームの比較解析を通して検証した。【方法】CtL2 感染あるいは非感染のヒト上皮系 HEp-2 を通常酸素と 2% 低酸素で 48 時間培養した (一部の試験では酸素分圧暴露時間を短くした)。発育阻害剤存在下での封入体面積をイメージング解析にて比較した。質量分析は CE-TOFMS にて行ない、検出ピークは代謝物質ライブラリーと照合した (HMT に外注)。PCA と階層クラスタリング解析より各群のメタボロームを比較した。【結果】低酸素暴露時間の増加に伴い細胞内菌数は増加した。低酸素では発育阻害物質存在下でも、封入体面積が増加した。メタボローム解析では、194 の代謝物質が同定されそれら代謝物質相対値は、CtL2 感染ならびに低酸素培養で有意に低下した。PCA とクラスタリング解析から CtL2 感染細胞と低酸素で培養した細胞の類似性が明らかになった。【結論】CtL2 は低酸素環境を好む。(非会員共同研究者: 黒岩青空)

## P1-130

薬剤耐性黄色ブドウ球菌は AIM2 インフラマソームを活性化し感染症を悪化させる

○原 英樹<sup>1,3</sup>, 坂本 啓<sup>2</sup>, 松田 泰幸<sup>1</sup>, 吉村 昭彦<sup>3</sup>, Gabriel Nunez<sup>4</sup> (1旭川医大・医・微生物, 2長崎大・医・病態解析, 3慶應大・医・微生物免疫, 4Dept. Pathol., Sch. Med., Univ. Michi.)

### Antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* activates AIM2 inflammasome to exacerbate infection

○Hideki Hara<sup>1,3</sup>, Kei Sakamoto<sup>2</sup>, Yasuyuki Matsuda<sup>1</sup>, Akihiko Yoshimura<sup>3</sup>, Gabriel Nunez<sup>4</sup> (1Dept. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ., 2Dept. Lab. Med., Sch. Med., Nagasaki Univ., 3Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Keio Univ., 4Dept. Pathol., Sch. Med., Univ. Michi.)

*Staphylococcus aureus* is a major human pathogen that causes bacteremia, pneumonia, and dermatitis. *S. aureus* has developed resistance to various antibiotics and has come to show high morbidity, therefore, antimicrobial-resistant *S. aureus* including methicillin- and vancomycin-resistant *S. aureus* is a crucial concern in both community- and hospital-onset infections. *S. aureus* is known to activate inflammasome, an intracellular sensing system against microbial components, however the mechanism of inflammasome activation and its role are well not understood. Here, we revealed that antimicrobial-resistant *S. aureus* activate AIM2 inflammasome as well as NLRP3. Inhibition of Aurora kinase A, which is known as a member of a family of mitotic serine/threonine kinases, suppressed caspase-1 activation and subsequent IL-1 $\beta$  production. Aurora A directly phosphorylated an inflammasome adaptor ASC to promote inflammasome activation. Importantly, pharmacological inhibition of Aurora kinase rescued mice from lethal infection of antimicrobial-resistant *S. aureus*. These results revealed an unrecognized inflammasome regulation pathway through Aurora A, and suggest a novel therapeutic target for antimicrobial-resistant bacteria infection.

## P1-131

結核菌感染マクロファージでは NF- $\kappa$ B p100 が殺菌作用を担う

○篠原 明莉<sup>1</sup>, 今宮 里沙<sup>2</sup>, 堀口 安彦<sup>3</sup>, 岡 真優子<sup>1</sup> (1京都府立大院・生命環境科・食環境安全性学, 2京都府大・生命環境・食品安全性, 3阪大微研・分子細菌学)

### NF- $\kappa$ B has a role of bactericidal in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*

○Akari Shinohara<sup>1</sup>, Risa Imamiya<sup>2</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>3</sup>, Mayuko Osada-Oka<sup>1</sup> (1Food Hyg. Env. Health., Grad. Sch. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., 2Food Hyg. Health., Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., 3Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ.)

結核の原因菌である結核菌は、マクロファージ (M $\phi$ ) の殺菌作用を回避して細胞内で増殖する。M $\phi$  の結核菌排除には、転写因子 NF- $\kappa$ B により誘導される炎症性メディエーターが関わっている。NF- $\kappa$ B は、RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 および p100/p52 の 5 つから構成され、これらがダイマーを形成することで転写活性を示す。結核菌感染 M $\phi$  では p65 依存的な Canonical 経路により、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) および腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) が誘導され、M $\phi$  内での結核菌の持続感染が阻害される。一方、p100/p52 依存的な Non-canonical 経路の活性およびそれによって誘導される遺伝子の役割については報告がない。そこで本研究では、結核菌感染 M $\phi$  における NF- $\kappa$ B の p100 に着目し、M $\phi$  内の結核菌に与える影響を解析した。マウス M $\phi$  (RAW264.7) にウシ型結核菌 *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) を感染させたところ、iNos およびサイトカイン (*Tnf- $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* ) の mRNA 発現が増大した。一方、p100 欠損株では、これらの発現が野生株に比べて 30-50% に抑制された。よって p100 は、結核菌の殺菌に重要な炎症性メディエーターの誘導に関与すると考えられる。さらに、BCG 感染 M $\phi$  の野生株から得た培養液を、非感染 M $\phi$  に作用させたところ、iNos が誘導された。一方、p100 欠損株から得た培養液を作用させた非感染 M $\phi$  の iNos mRNA 発現は、野生株由来の培養液に比較し、約 70% に抑制された。結核菌感染 M $\phi$  の培養液には、p100 を内包する細胞外小胞 (EV) が存在していたことから、結核菌感染により M $\phi$  で活性化された p100 が EV に内包され、非感染 M $\phi$  に輸送されることで炎症性メディエーターの誘導に関与する可能性がある。

## P1-132

枯草菌の酸化ストレス耐性機構の解析

○三好 裕介<sup>1</sup>, 石川 一也<sup>2</sup>, 古田 和幸<sup>2</sup>, 垣内 力<sup>2</sup> (1岡山大学・薬・分子生物学, 2岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・分子生物学)

### Genetic analysis of oxidative stress resistance in *Bacillus subtilis*

○Yusuke Miyoshi<sup>1</sup>, Kazuya Ishikawa<sup>2</sup>, Kazuyuki Furuta<sup>2</sup>, Chikara Kaito<sup>2</sup> (1Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., 2Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

体内に侵入した細菌はマクロファージなどに貪食されたのち、活性酸素種によって殺菌される。このような活性酸素種を介した自然免疫機構は多くの生物種に備わっている。一方、一部の細菌はマクロファージにより貪食された後に、殺菌作用から逃れ、増殖することで病原性を発現する。マクロファージ内では他の免疫細胞による作用が及ばないため、殺菌作用から逃れた細菌にとって増殖に適した環境となる。したがって、活性酸素種によるストレス (酸化ストレス) に対する細菌の耐性機構はその病原性発現において重要な役割をもつ。そこで本研究は、酸化ストレスに対する耐性に関わる細菌の遺伝的要因を同定することを目的とした。グラム陽性細菌のモデル生物である枯草菌の遺伝子欠損株ライブラリーを用いて、過酸化水素存在下での増殖能を指標とし、遺伝子欠損株のスクリーニングをおこなった。その結果、遺伝子欠損株ライブラリー 3967 株中、14 株が過酸化水素に対して耐性を示した。14 株の中には、酸化ストレス耐性への関与が知られる遺伝子の他に、機能未知遺伝子の欠損株が複数含まれていた。今後は、同定された遺伝子の欠損が酸化ストレス耐性を導く分子機構を解析する予定である。

**P1-133****How Streptococcus pyogenes is (or is not) targeted by autophagy in blood vessel endothelial cells**

○Shiou-Ling Lu, 野田 健司 (大阪大学・歯学研究所)

○Shiou-Ling Lu, Takeshi Noda (Grad. Sch. Dentistry, Osaka Univ.)

Group A Streptococcus (GAS: Streptococcus pyogenes) is a pathogenic bacterium detrimental to human health. Although GAS was identified initially as an extracellular bacterium, it became evident that some of them could invade cells. After internalizing through endocytosis, GAS escape into cytosol, but most of them were further captured by xenophagy, autophagy that selectively targets bacteria. Previously we specified that GAS have higher efficacies to internalize and replicate in endothelial cells than epithelial cells. We determined that xenophagy induction was insufficient in response to GAS/GAS-vacuoles in endothelial cells. Since blood vessel endothelial cells are relatively germ-free environments, specific stimuli may be necessary for sufficient onset of autophagy. Accordingly, we found that vascular endothelial growth factor (VEGF) promoted xenophagy and lysosomal activity against GAS in endothelial cells. Serum VEGF levels were low in a mouse model of invasive bacteremia and VEGF administration reverted the associated symptoms. We also found the other autophagy inducer, nicotinamide (vitamin B3), provided better bacterial clearance in endothelial cells. We will show our recent data regarding the nicotinamide-mediated antimicrobial effect in the endothelium.

**P1-134****ヒト口腔細菌叢移植マウスの急性肺障害誘導による誤嚥性肺炎マウスモデルの作製**

○林 真奈美, 森 美菜, 逸見 百江, 黒澤 実愛, 深町 はるか, 森崎 弘史, 桑田 啓貴 (昭和大・歯・口腔微生物)

**Aspiration pneumonia mice model induced by acute lung injury with human oral flora transplantation**

○Manami Hayashi, Mina Mori, Momoe Itsumi, Mie Kurosawa, Haruka Fukamachi, Hirobumi Morisaki, Hirota Kuwata (Dept. Oral. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Showa Univ.)

口腔には多様な細菌種による複雑な細菌叢が形成されている。近年、腸管などで細菌叢のバランスが崩れるとディスバイオーシスと呼ばれる状態となり、宿主免疫系のホメオスタシスが変化し、自己免疫疾患などの疾患の誘因となることが明らかとなってきた。口腔においても口腔疾患のみならず全身性疾患の誘因となることが明らかとなりつつある。高齢者における誤嚥性肺炎は、嚥下機能の低下により口腔細菌が肺へ流入することにより起こる。肺に流入した菌がどのような宿主応答の変化を引き起こすのかについては明らかにされていない。そのため、流入した口腔細菌の役割を明らかにするための適切な解析モデルが必要である。本発表では、ヒト口腔常在細菌叢を無菌マウスに移植したヒト口腔細菌叢移植マウスモデル (HOMA) を作製した。この HOMA マウスを用い、腹腔へ LPS を投与し急性肺障害を誘導した時の肺免疫系に対する影響について解析することで誤嚥性肺炎モデルとして適切に検討した。まず、通常飼育 (コンベ) マウスと HOMA マウスの肺への好中球集積についてミエロペルオキシダーゼ陽性細胞数を組織学的に比較した。その結果、LPS 投与 24 時間後において HOMA マウスの肺で好中球集積が顕著であった。HOMA マウスでは定常状態においても好中球が認められた。マウス血清中の TNF- $\alpha$  を測定し、炎症状態を比較したところ、定常状態では両群で差はなかったが、LPS 投与時では HOMA マウスで顕著な上昇を認めた。以上の結果より、HOMA マウスへ LPS 投与により急性肺障害を誘導した場合、コンベマウスと比べて顕著に誘導されており、ヒト高齢者で見られる誤嚥性肺炎を模したモデルマウスとして使用できるのではないかと考えられた。

**P1-135****口腔粘膜好中球の分化誘導における常在細菌叢の役割**

○森 美菜, 林 真奈美, 中村 夏野, 逸見 百江, 黒澤 実愛, 深町 はるか, 森崎 弘史, 桑田 啓貴 (昭和大・歯・口腔微生物)

**The role of commensal microflora on the neutrophil differentiation in the oral mucosal membrane**

○Mina Mori, Manami Hayashi, Natsuno Nakamura, Momoe Itsumi, Mie Kurosawa, Haruka Fukamachi, Hirobumi Morisaki, Hirota Kuwata (Dept. Oral. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Showa Univ.)

宿主常在菌は、免疫系の分化と維持に重要な機能を担う。これまで腸管免疫研究で細菌叢が健康の安定的維持に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。しかし、口腔においては、常在菌叢が口腔免疫系に及ぼす役割については十分解明されてこなかった。そこで、定常状態の口腔粘膜における免疫系と常在菌の相互作用を明らかにするため、無菌マウス (GF マウス) と通常飼育マウス (コンベマウス) の口腔粘膜から細胞を分離し、種々の免疫細胞へ特異的な抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。免疫系細胞の刺激には N-formyl-methionine-leucyl-phenylalanine および phorbol 12-myristate 13-acetate / ionomycin を用いた。その結果、コンベマウスと比べて、GF マウスの口腔粘膜では数多くの好中球が存在していた。GF マウスの好中球をソーターで分離し、核型を調べたところ大部分は未熟な表現型であり、好中球による感染防御に必須の活性酸素代謝酵素であるミエロペルオキシダーゼ活性も優位に低かった。マクロファージや T 細胞, B 細胞などの他の免疫細胞の分化については両群で顕著な差は見られなかった。これらより、常在菌叢は、定常状態の口腔粘膜において好中球の末梢分化を促進することが示唆された。よって、口腔粘膜の安定性維持には、常在菌叢の存在が重要であることがわかった。

**P1-136****アルテミアを利用した細菌のメダカへの投与の検討**○郷 龍希<sup>1</sup>, 彦坂 悠太<sup>2</sup>, 坂本 丞<sup>3,4</sup>, 亀井 保博<sup>3</sup>, 神谷 重樹<sup>1,2,5</sup> (<sup>1</sup>大府大・総リハ・栄養, <sup>2</sup>大府大院・総リハ・栄養, <sup>3</sup>基生研・超階層, <sup>4</sup>ExCELLS・バイオフォトリクス, <sup>5</sup>大公大院・生活科学・食栄養)**Investigation of Artemia-mediated administration of bacteria to Medaka**○Ryuki Sato<sup>1</sup>, Yui Hikosaka<sup>2</sup>, Joe Sakamoto<sup>3,4</sup>, Yasuhiro Kamei<sup>3</sup>, Shigeki Kamitani<sup>1,2,5</sup> (<sup>1</sup>Div. Clin. Nutr., Sch. Comp. Rehabil., OPU, <sup>2</sup>Div. Clin. Nutr., Grad. Sch. Comp. Rehabil., OPU, <sup>3</sup>Trans-Scale Biol. Cent, NIBB, <sup>4</sup>Biophotonics, ExCELLS, <sup>5</sup>Dept. Nutr., Grad. Sch. Hum. Life & Ecol., OMU)

【目的】歯周病は歯周病原細菌の感染により引き起こされる炎症性の疾患であり、糖尿病をはじめとする多くの全身性疾患との関連が示唆されている。近年、歯周病と骨粗しょう症との関連が報告されているが、モデル動物を用いた合併症あるいは増悪化や予防・抑制に関する実証はほとんど行われていない。そこで本研究では、遺伝子操作が容易かつ生理学的にも高等生物と同様であるメダカを用いて合併症モデルを作製することを目指し、アルテミアを媒介して歯周病原細菌をメダカに摂取させる方法の確立を目的とした。【方法】本研究では、慢性歯周病の病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)、またメダカへの生餌であるアルテミアを用いて実験を行った。蛍光標識した *P. gingivalis* をアルテミアに給餌することにより、アルテミアに取り込まれることを蛍光実体顕微鏡で観察した。さらにそのアルテミアを色素が欠損した透明メダカ (SKII) に投与し、麻酔後屠殺し、腸管を取り出して同様に観察した。【結果と考察】*P. gingivalis* を蛍光標識し、標識後も多くの菌が生存していることを確認した。標識した菌と孵化後 24 時間のアルテミアを 90 分混濁することにより、アルテミアが菌を取り込んだことを確認した。これをさらに透明メダカに給餌したところ、腹部で蛍光が見られた。腸管を取り出して観察したところ、腸管上部で消化中のアルテミアと取り込まれた標識菌の蛍光を観察することができた。以上の結果より、この方法によって歯周病原細菌を投与可能と考えられる。今後は疾患モデルメダカに投与して合併症や増悪化を検討する予定である。

## P1-137

### Genome-wide Screening Reveals Essential Genes Required by *Bordetella bronchiseptica* in Rat Infection

○Xingyan Ma<sup>1</sup>, Nugraga Dendi Krisna<sup>1</sup>, 堀口 安彦<sup>1,2</sup> (1阪大微研・分子細菌学, 2阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Xingyan Ma<sup>1</sup>, Nugraga Dendi Krisna<sup>1</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,2</sup> (1Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., 2CIDER, Osaka Univ.)

*Bordetella bronchiseptica* (Bb) is closely related to the causative agent of whooping cough, *Bordetella pertussis* (Bp). Despite sharing similar virulence factors, only Bb is known to infect a broad range of mammalian hosts, including some experimental animals, while Bp is specific to humans. Therefore, Bb infection model is often used to explore the pathogenicity of *Bordetella*. Our recent results showed that the multiple deletions of several virulence factors did not abrogate the infection process, indicating the existence of unknown factors during infection. Here, we adopted high-throughput transposon sequencing (Tn-seq) to identify genes essential for Bb rat infection. As a result, we picked up 151 candidate genes that may be essential or necessary for infection. Among these, 34 genes are related to the different metabolic pathways. 20 genes encode hypothetical proteins. Others are predicted to be transporters, chaperones, and elements involved in genetic information processing and intrabacterial signaling cascades. In order to confirm the involvement of candidates in Bb infection, we constructed deletion mutants of 10 candidates (selected based on possible function), subjected them to a competitive infection assay with Bb wild type, and found that a mutant of gene X was competed out by wild type after 5-day infection. We are now analyzing the role of gene X in Bb infection.

## P1-138

### *Fusobacterium nucleatum* は HSC-3 の上皮間葉転換を促進する

○中野 晋太郎<sup>1,2</sup>, 大内 千里<sup>2,3</sup>, 中村 主佑<sup>2,3</sup>, 長谷部 晃<sup>2</sup> (1北大・歯・口腔顎顔面外科, 2北大・歯・口腔分子微生物, 3北大・歯・口腔診断内科)

### *Fusobacterium nucleatum* promotes Epithelial-Mesenchymal Transition of HSC-3

○Shintaro Nakano<sup>1,2</sup>, Chisato Ouchi<sup>2,3</sup>, Keisuke Nakamura<sup>2,3</sup>, Akira Hasebe<sup>2</sup> (1Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad Sch. Dent Med., Hokkaido Univ., 2Dept. Oral Mol Microbiol., Grad Sch. Dent Med., Hokkaido Univ., 3Dept. Oral Diagnosis and Medicine, Grad Sch. Dent Med., Hokkaido Univ.)

【緒言】*Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) は口腔内に存在する偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、様々な歯性感染症の原因となる。近年、*Fn* と悪性腫瘍の関連が注目され、口腔癌との関連も多数報告されているが、*Fn* が口腔癌細胞に及ぼす影響は不明な部分も多い。上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) は、上皮細胞が細胞極性や細胞接着機能を失い、遊走能、浸潤能を得ることで間葉系様細胞へ変化する過程であり、癌細胞においては腫瘍増大や転移の促進を引き起こし、予後不良の原因となる。今回、*Fn* が口腔癌細胞へ及ぼす影響と EMT の惹起について調べたので報告する。【材料と方法】細胞はヒト舌扁平上皮癌細胞 HSC-3 (JSRB0623) を使用した。*Fn* (ATCC10953) は嫌気性条件下で 37°C で培養し使用した。10 cm dish で HSC-3 を 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で培養し、*Fn* を MOI=1000 で週 2 回加えて細胞を刺激し、4 週間刺激、2 週間刺激、無刺激の HSC-3 を用いて比較した。【結果】CCK-8 Assay にて HSC-3 の増殖能は期間依存的に増加していた。Wound Healing Assay にて期間依存的に創傷閉鎖は早まり、浸潤能は増加していた。Migration Assay にて期間依存的に遊走能は増加していた。Western Blotting にて E-Cadherin, Cytokeratin の発現は期間依存的に低下しており、N-Cadherin, Snail の発現は期間依存的に上昇していた。それぞれ細胞を位相差顕微鏡で観察すると期間依存的に細長い形態へと変化していた。【考察】以上の結果は EMT の所見であり、*Fn* の刺激により HSC-3 に EMT 起こっていることが示唆された。今後、EMT が促進される機序や経路を特定し、臨床的にも同経路の活性化を阻害できれば口腔癌治療の予後を改善が見込まれる。

## P1-139

### イノシシから分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の解析

○木全 恵子, 金谷 潤一, 磯部 順子, 大石 和徳 (富山衛研・細菌)

### Analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from wild boar

○Keiko Kimata, Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Kazunori Oishi (Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health.)

【目的】野生動物から分離される STEC のうち、イノシシ由来 STEC は分離例も少なく、詳細な解析報告はない。今回我々は、イノシシの STEC のヒトに対するリスクを検証するため、イノシシの糞便について STEC の保有状況調査と、分離株の遺伝子解析を行った。

【材料と方法】2014~2017 年に富山県で捕獲されたイノシシの糞便 104 検体から分離した STEC13 株を解析対象とした。分離株の志賀毒素遺伝子 *stx* および O 血清群の型別は PCR で、H 血清型は免疫血清で型別を行った。また、STEC12 株についてドラフトゲノム配列を取得し、病原因子遺伝子検索を行った。

【結果および考察】イノシシ糞便の *stx* 陽性率は 22.1% (23/104 検体)、STEC 分離率は 12.5% (13/104 検体) であった。分離株の血清型および *stx* 遺伝子型は Og8+OgSB17:H19 (*stx2e*) が 7 株、OgN-RK13:H21 (*stx2e*) が 3 株、Og148:H10 (*stx2g*)、Og4:H27 (*stx2g*)、Og105:H7 (*stx2f*) が各 1 株であった。分離株 12 株の病原因子遺伝子検索の結果、O157 やシカに多く検出される接着因子遺伝子 *eae* 等を保有する LEE 陽性 STEC は 1 株のみであった。また、O157 等ヒト由来 STEC に多い *stx2a* は検出されなかった。しかし、分離株は STEC 以外の病原性大腸菌 (毒素原性大腸菌、腸管外病原性大腸菌や鳥類の病原性大腸菌) の接着因子や線毛遺伝子の塩基配列が検出された。本解析から、イノシシ由来 STEC は、O157 等に比べてヒトへの病原性は比較的低いと予測された。しかし、これらの STEC は保有する接着因子や線毛を介してヒトの腸管に感染・付着する可能性が示唆された。(会員外共同研究者 綿引正則, 前西 絵美, 佐賀由美子)

## P1-140

### 血清型変換は豚レンサ球菌の病原性を変化させる

○大倉 正稔<sup>1</sup>, Jean-Philippe Auger<sup>2</sup>, 芝原 友幸<sup>1</sup>, Guillaume Goyette-Desjardins<sup>2</sup>, Marie-Rose Van Calsteren<sup>3</sup>, 丸山 史人<sup>4</sup>, 河合 幹彦<sup>5</sup>, Mariela Segura<sup>2</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>2</sup>, 高松 大輔<sup>1</sup> (1動衛研・農研機構, 2モントリオール大・獣医, 3カナダ農務省, 4広島大・IDEC, 5京大院・人間環境)

### Serotype switching can modulate virulence in *Streptococcus suis*

○Masatoshi Okura<sup>1</sup>, Jean-Philippe Auger<sup>2</sup>, Tomoyuki Shibahara<sup>1</sup>, Guillaume Goyette-Desjardins<sup>2</sup>, Marie-Rose Van Calsteren<sup>3</sup>, Fumito Maruyama<sup>4</sup>, Mikihiro Kawai<sup>5</sup>, Mariela Segura<sup>2</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>2</sup>, Daisuke Takamatsu<sup>1</sup> (1NIAH, NARO, 2Facul. Vet. Med., Univ. Montreal, 3Agri. Food Canada, 4IDEC Inst., Hiroshima Univ., 5Grad. Sch. Hum. Environ. Stud., Kyoto Univ.)

豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) は、豚やヒトに髄膜炎等の症状を引き起こす人獣共通感染症起因菌である。本菌は莢膜多糖の組成と構造に基づき血清型別されており、患者由来株のほとんどは血清型 2 型である。病豚においても、特に重篤な症状の個体からは 2 型株が高頻度に分離されるが、他の血清型も比較的高い頻度で分離される。2 型莢膜については、その重要性からよく研究されており、欠失により動物への病原性や抗食能、全血生残性が低下する一方で、上皮細胞への付着・侵入能や樹状細胞由来の炎症誘発因子産生能が上昇することが明らかになっている。しかし、他の血清型については情報が少なく、血清型の相違が病原性や表現型にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど分かっていない。本研究では、全ゲノム配列が決定されている血清型 2 型 P1/7 株より、血清型を 3, 4, 7, 8, 9 または 14 型に変換した血清型変換株を実験的に作出し、マウス及び豚への病原性や全血生残性、上皮細胞への付着・侵入能、樹状細胞由来の炎症誘発因子産生能などが、血清型の相違により、どのように変化するかを調べた。その結果、これらの特性が変換した血清型により様々に変換することを明らかにした。特に血清型 8 型への変換では、マウスへの病原性が高まり、血清型 3 型及び 4 型への変換では病原性が低下した。一方、血清型 7, 9 または 14 型への変換ではマウスへの病原性については、ほとんど影響がなかった。*S. suis* は遺伝子型別による解析より、野外で血清型が変換しうることを示唆されているが、本研究により、血清型変換が本菌の病原性や宿主細胞との相互作用に影響を及ぼすことを実証した。



**P1-141**

肺炎マイコプラズマはマクロファージに脂肪滴形成を誘導する

○山本 武司, 奥野 未来, 桑野 剛一, 小椋 義俊 (久米大・医・感染医学)

**Lipid droplets formation occurs after *Mycoplasma pneumoniae* infection**

○Takeshi Yamamoto, Miki Okuno, Koichi Kuwano, Yoshitoshi Ogura (Dept. Infect. Med., Sch. Med., Kurume Univ.)

【背景】動脈硬化は脂質の沈着によって血管内腔が狭窄し、血管壁の柔軟性が損なわれることであり、脳卒中や心筋梗塞などの重大な疾患の原因となる。この動脈硬化の進展には加齢やストレスなどが関与するが、病原微生物の持続的な感染がその要因となる場合がある。肺炎マイコプラズマ (MP) は主に呼吸器疾患を引き起こす細菌だが、動脈硬化病変部からの分離例が多数報告されており、マウス感染モデルにおいても動脈硬化病変の形成を促すことから、動脈硬化との関連が指摘されている。しかしながら直接的な病変形成誘導メカニズムについては明らかになっていない。

【目的】本研究では動脈硬化病変の形成に重要なマクロファージの脂肪滴形成を MP が誘導するかどうかについての検討を行った。

【結果】Raw264.7 マクロファージに MP を感染させたところ、脂肪滴の形成が観察された。この脂肪滴の形成は細胞外に脂質が存在する条件でのみ観察されたことから、肺炎マイコプラズマは脂質の取り込みを促すことが予想された。さらに詳細な検討を行った結果、過酸化水素の産生に関わる GlpD の欠損株では脂肪滴の形成を誘導する活性が顕著に低いこと、脂肪滴の形成には脂質の酸化が重要であること、また感染マクロファージでは酸化脂質の取り込みに関わる lectin-like oxidized LDL receptor (Lox)-1 の発現が顕著に増加していることが明らかとなった。

【結論】MP はマクロファージに動脈硬化病変の形成に重要な脂肪滴の形成を誘導することが明らかになった。また、脂肪滴の形成誘導には GlpD 依存的な過酸化水素の産生による脂質の酸化と酸化脂質の受容体である Lox-1 を介した脂質の取り込みが関与することが推測された。

**P1-142****Degradation of p120-catenin proteins during leptospiral disruption of the junctional complex**

Romina Tokumon, Isabel Sebastian, 山城 哲, ○Claudia Toma (琉大・院医・細菌学)

Romina Tokumon, Isabel Sebastian, Tetsu Yamashiro, ○Claudia Toma (Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. of the Ryukyus)

*Leptospira interrogans* disseminates hematogenously to reach the target organs by disrupting the epithelial junctional complexes (JCs). We have reported that this disruption is induced by E-cadherin endocytosis but the detailed mechanisms remains unknown.

In this study, we used a combination of proteomic and Western Blottings to analyze *L. interrogans*-infected RPTECs. This analysis showed the degradation of 2 proteins of the p-120 catenin subfamily (p0071 and p120-catenin) involved in E-cad membrane stabilization. Immunofluorescence analysis in infected cells showed their displacement from the JC and an increased cytoplasmic localization of p0071 within LAMP-1 positive vacuoles. However, lysosomal inhibitors (bafilomycin A or chloroquine) could not inhibit p0071 degradation. On the other hand, the synergistic action of lysosomal and proteasomal inhibitors prevented the degradation of p120-catenin. Concomitantly, its displacement from the JC and the decrease of transepithelial electrical resistance were also prevented. Our results suggested that *L. interrogans* manipulates cellular degradation pathways to decrease E-cadherin scaffold proteins of the p-120 catenin subfamily as a strategy of JC disruption.

**P1-143**

アシネトバクターはカスパーゼ-11 依存的膜傷害を介して NLRP3 インフラマソームを活性化する

○松田 泰幸, 森 健一郎, 原 英樹 (旭川医大・医・微生物)

***Acinetobacter baumannii* activates NLRP3 inflammasome through caspase-11-mediated membrane rupture**

○Yasuyuki Matsuda, Kenichiro Mori, Hideki Hara (Dept. Microbiol. Immunochem., Sch. Med., Asahikawa Med. Univ.)

Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRA), a Gram-negative bacterium, is an important cause of nosocomial infections. Although innate immunity is important as the first line of defense against MDRA infection, the mechanism by which MDRA activates inflammatory responses remains poorly understood. Here we investigated what inflammasome is activated after MDRA infection since inflammasome-mediated caspase-1 activation is essential for the production of pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and IL-18. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)- and caspase-11-deficient macrophages secreted less IL-1 $\beta$  in response to MDRA infection, indicating that MDRA activates NLRP3 inflammasome through caspase-11. Besides, the IL-1 $\beta$  secretion induced by MDRA infection was inhibited by a treatment with MitoTEMPO, a mitochondria-specific superoxide scavenger, suggesting that release of mitochondrial ROS is required for NLRP3 inflammasome activation after MDRA infection. Inflammasome also regulate inflammatory programmed cell death called pyroptosis, however, LDH release was not reduced in macrophages deficient for NLRP3. Notably, *Casp11*<sup>-/-</sup> macrophages showed less LDH release compared with wild-type cells. These results suggest that MDRA induces cell death via caspase-11, which triggers NLRP3 inflammasome activation through mitochondrial ROS in infected macrophages.

**P1-144**

黄色ブドウ球菌ファージ phiMR003 投与による MRSA 創部感染病態への影響

○田中 真由子<sup>1</sup>, 須田 智也<sup>2</sup>, 丹治 保典<sup>1,3</sup>, 松田 剛明<sup>2,4</sup>, 花輪 智子<sup>1</sup> (1杏林大・医・感染症学, 2杏林大・医・総合医療, 3東工大・生命理工学院, 4杏林大・医・救急医学)**Effects of phiMR003, *Staphylococcus aureus* phage, on MRSA wound infection**○Mayuko Tanaka<sup>1</sup>, Tomoya Suda<sup>2</sup>, Yasunori Tanji<sup>1,3</sup>, Takeaki Matsuda<sup>2,4</sup>, Tomoko Hanawa<sup>1</sup> (1Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ., 2Dept. Gen. Med., Sch. Med., Kyorin Univ., 3Sch. Life Sci. and Tech., Tokyo Inst. Tech., 4Dept. Traum. Crit. Care Med., Sch. Med., Kyorin Univ.)

【目的】近年多剤耐性菌が増加しており、抗菌薬治療の代替としてファージ療法が注目されている。治療の際はファージが宿主免疫系に与える影響を考慮する必要があるが、詳細は解明されていない。そこで本研究は、宿主免疫を介した創部感染病態へのファージの影響を解析した。【材料と方法】黄色ブドウ球菌ファージは、2018年に丹治らが都市部下水流入水より単離し MRSA 臨床分離株に広い宿主域を示す  $\phi$ MR003 を用いた。マウスの背部皮膚を切除し、 $\phi$ MR003 感受性 MRSA 株である KYMR116 および非感受性株である KYMR58 を接種 ( $2 \times 10^8$  CFU) して創傷感染モデルとした。 $\phi$ MR003 投与 ( $10^{10}$  PFU) の影響は、創部の観察と生菌数の測定、ELISA によるサイトカインの定量、HE 染色および蛍光免疫染色による好中球・線維芽細胞・マクロファージの検出により検討した。【結果と考察】KYMR116 感染に  $\phi$ MR003 を投与すると創部病態が改善して生菌数は  $1/10^5$  に減少し、線維芽細胞の増加、炎症性サイトカインおよび炎症性細胞の低下が確認された。一方、KYMR58 感染において  $\phi$ MR003 投与による生菌数の減少は  $1/10^3$  に留まったものの創部病態は改善、線維芽細胞の増加、炎症性サイトカインの低下が確認された。しかしながら多数の炎症性細胞が認められ、これらの中にはマクロファージが多く検出された。一般的に創傷治療過程では M2 マクロファージに極性変化する事が報告されているが、代表的な M2 マーカーである CD206+細胞は  $\phi$ MR003 非投与群の方が多い傾向がみられた。現在、ファージ投与によるマクロファージへの影響をさらに解析すると共に、これらの作用が  $\phi$ MR003 特有である可能性を考え、他の黄色ブドウ球菌ファージを用いた解析を進めている。

## P1-145

### 樹状細胞の抗原提示とサイトカイン産生に対する枯草菌生菌の影響解析

○橋木 洋平<sup>1</sup>, 古田 和幸<sup>1</sup>, 石川 一也<sup>1</sup>, 垣内 力<sup>1</sup> (<sup>1</sup>岡山大学・薬・分子生物学, <sup>2</sup>岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・分子生物学)

### Effects of *Bacillus subtilis* on antigen presentation factors in dendritic cells

○Yohei Chishaki<sup>1</sup>, Kazuyuki Furuta<sup>1</sup>, Kazuya Ishikawa<sup>1</sup>, Chikara Kaito<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., <sup>2</sup>Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

【目的】樹状細胞は、病原体を取り込み提示することで免疫応答を誘導する機能を持つ。腸内においては、樹状細胞は腸内細菌に対する免疫応答を制御している。枯草菌は病原性が低いため、腸内の免疫細胞に作用し機能を調節するプロバイオティクスへの利用が期待されているが、枯草菌と樹状細胞の相互作用は明らかではない。本研究では、樹状細胞の機能に対する枯草菌生菌の作用を解析した。【方法と結果】マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を枯草菌 (168 trpC2 株) 存在下で培養し、抗原提示分子の細胞表面発現を解析した結果、抗原提示の促進に働く CD80 と CD86、ならびに抗原提示の抑制に働く PD-L1 の発現上昇が見られた。枯草菌由来ペプチドグリカン (PGN) は抗原提示分子の発現上昇を引き起こしたが、その程度は枯草菌生菌で刺激した場合と比較して低かった。また、枯草菌による抗原提示分子の発現上昇は PGN 受容体である TLR2 阻害剤により抑制されなかった。さらに、サイトカイン産生を解析した結果、枯草菌で刺激した樹状細胞においては、IL-6 と IL-10 の産生量が増加していた。これらのサイトカイン産生は枯草菌由来 PGN によって誘導されたが、その発現量は枯草菌刺激の場合に比べて少なかった。【考察】枯草菌は抗原提示分子やサイトカインの発現量を変化させることにより、樹状細胞の機能を変化させると考えられる。枯草菌生菌による刺激は精製された PGN による刺激に比べて樹状細胞に対する効果が強かったこと、ならびに TLR2 阻害剤により枯草菌生菌刺激の効果がキャンセルされなかったことから、枯草菌の生菌による刺激は PGN 以外の分子を介していると推定される。

## P1-146

### 肺 MAC 症慢性化メカニズムにおける AIM の役割

○梶原 千晶<sup>1</sup>, 塩沢 綾子<sup>2</sup>, 館田 一博<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東邦大学・医・微生物・感染症学, <sup>2</sup>東邦大学・医・地域連携感染制御学)

### Role of AIM in the mechanism of chronic pulmonary MAC disease

○Chiaki Kajiwara<sup>1</sup>, Ayako Shiozawa<sup>2</sup>, Kazuhiro Tateda<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Infect. Dis., Sch. Med., Toho Univ., <sup>2</sup>Dept. Collab. Reg. IC., Sch. Med., Toho Univ.)

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria; NTM) による感染症が世界的に増加しており、中でも *M. avium* complex (MAC) は、NTM 症の原因菌の 8 割を占める。今回我々は、肺 MAC 症マウスモデルを用いて、病態慢性化メカニズムについて検討を行った。BALB/c マウスに *M. avium* (臨床分離株) を経鼻投与すると、肺内菌数の増加に伴いマクロファージ数が増加すること、さらに細胞質に脂質滴を含み肥大化した「泡沫化マクロファージ」に変化することがわかった。泡沫化マクロファージは、様々な慢性疾患で誘発されるが、動脈硬化においては血中の酸化コレステロールを取り込むことで誘導され、アポトーシス抵抗性を示し、動脈の血管内皮下層に蓄積して病態の進展に寄与することが知られている。このアポトーシス抵抗性の原因となる重要なファクターが、アポトーシス抑制因子 apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) である。AIM は、成熟したマクロファージが特異的に産生する分泌型タンパク質であり、血中 IgM と結合して安定化することで、定常状態でも豊富に血中に存在しており、様々な刺激で IgM と解離して機能を発揮するとされている。我々は、AIM が肺 MAC 症の病態形成に関与しているものと予測し、*M. avium* 感染マウスの AIM 値を測定したところ、血中の機能性 AIM、つまり IgM と解離した AIM が、徐々に増加していくことがわかった。そして *M. avium* 感染マウスにリコンビナント AIM を投与すると、泡沫化マクロファージ数および肺内菌数が有意に増加することを見出した。これらの結果から、*M. avium* を取り込んだマクロファージが AIM を介して不死化して蓄積し、肺 MAC 症の慢性化を引き起こしている可能性が示唆された。

## P1-147

### Lipopolysaccharide pre-conditioning enhances the bactericidal activity of Kupffer cells in mice

○中島 弘幸, 加藤 梓, Bradley Kearny, 中島 正裕, 木下 学 (防衛医科大学校・免疫・微生物学講座)

○Hiroyuki Nakashima, Azusa Kato, Bradley Kearny, Masahiro Nakashima, Manabu Kinoshita (Dept. Immunology and Microbiology, National Defense Medical College)

Septic shock is a life-threatening condition resulting from systemic inflammatory activation triggered by infection. Bacterial lipopolysaccharides (LPS) are presumed to contribute to the development of septic shock by activating the innate immune system. Pre-conditioning with repetitive administration of sublethal LPS doses improves the survival rate of mice when challenged with live bacteria, but the underlying mechanism of preventing septic shock through LPS pre-treatment remains unknown. Kupffer cells are macrophages that eliminate blood-borne bacteria and have been shown to contribute to the survival of septic shock. In this study, we sought to elucidate the impact of LPS pre-conditioning on Kupffer cells. Liver non-parenchymal cells from Male C57BL/6 mice were isolated after three days of LPS pre-conditioning. LPS pre-conditioning increased the number of F4/80 high-resident macrophages, most of which were Vsig4(-) Tim-4(-) non-classical bone marrow-derived Kupffer cells. In vitro phagocytosis analysis using pHrodo-labeled bacteria revealed that LPS pre-conditioning significantly up-regulated the bactericidal activity of Vsig4(+) Tim-4(+) classical Kupffer cells. We propose that one way that LPS pre-conditioning improves the survival rate in sepsis is through enhanced bactericidal activity of Kupffer cells.

## P1-148

### プロバイオティクス大腸菌キメラ由来メンブレンヴェシクルによる莢膜保有病原体に対するワクチン

○中尾 龍馬<sup>1</sup>, 岩淵 佑介<sup>1,2</sup>, 川原 一芳<sup>3</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, 大西 真<sup>4</sup> (<sup>1</sup>感染研・細菌学, <sup>2</sup>東医歯大・歯・小児/障害者歯科, <sup>3</sup>関東学院大学・理工, <sup>4</sup>感染研)

### Probiotic *E. coli* chimera-derived membrane vesicle vaccine against encapsulated pathogens

○Ryoma Nakao<sup>1</sup>, Yusuke Iwabuchi<sup>1,2</sup>, Kazuyoshi Kawahara<sup>3</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup>, Makoto Ohnishi<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Dept. Pediat. Dent./Special Need Dent., Tokyo Med. Dent. Univ., <sup>3</sup>Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ., <sup>4</sup>Natl. Inst. Infect. Dis.)

Vaccines against infectious diseases should elicit potent and long-lasting immunity, ideally even in those with age-related decline in immune response. Here we report a rational polysaccharide vaccine platform using probiotic *Escherichia coli*-derived membrane vesicles (MVs). First, we constructed a probiotic *E. coli* clone harboring the genetic locus responsible for biogenesis of serotype 14 pneumococcal capsular polysaccharides (CPS14) as a model antigen. The probiotic clone-derived MVs displayed the exogenous CPS14 at high density on the outermost surface, on which the CPS14 moiety was covalently tethered to a lipid A-core oligosaccharide anchor. The CPS14+MVs were structurally stable with heat treatment and immunization with the heat-treated MVs via subcutaneous route elicited CPS14-specific antibody responses in mouse serum to levels comparable to those of non-treated CPS14+MVs. The CPS14+MV-elicited humoral immune responses persisted for one year in both blood and lung with a Th1/Th2 balanced IgG subclass without any adjuvant. The CPS14+MV vaccine was widely efficacious in mice of different ages. Even in aged mice, vaccination resulted in robust production of CPS14-specific IgG that bound to the pneumococcal cell surface. Taken together, the present probiotic *E. coli* MVs-based vaccine platform offers a promising, generalizable solution against encapsulated pathogens.

**P1-149**

ウシ型結核菌弱毒株 BCG 由来メンブレンヴェシクルを用いた新規結核ワクチン開発

○山口 雄大<sup>1,2</sup>, 寒川 訓明<sup>2</sup>, 中尾 龍馬<sup>1</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>国立感染症研・細菌第一部, <sup>2</sup>大阪公大・医・薬理)

**Development of anti-tuberculosis vaccine using Mycobacterium bovis BCG-derived membrane vesicles**

○Takehiro Yamaguchi<sup>1,2</sup>, Noriaki Samukawa<sup>2</sup>, Ryoma Nakao<sup>1</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Dept. Pharmacol., Grad. Sch. Med., Osaka Metropolitan Univ.)

【目的】人類最古の感染症の一つである結核に対し、唯一の確立された予防法は、およそ 100 年前より接種が開始された Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) を用いたワクチン接種である。しかしながら、その有効性は小児期に限定的であり、また誘導された抗結核免疫は経時的に減衰する。さらに、免疫不全者においては BCG の播種性感染を引き起こすことなど、様々な問題点が知られている。本研究では、新たな結核ワクチン開発を目指し、BCG 由来の細胞外小胞 (メンブレンヴェシクル; MV) の有用性を検討した。【方法と結果】BCG Tokyo 株 I 型を攪拌あるいは静置培養して得られた培養上清から 2 種類の MV を精製した。それぞれの MV を用いて THP1 マクロファージ様細胞を刺激し、MV の免疫刺激活性を比較したところ、静置培養由来の MV で炎症関連遺伝子の発現が有意に亢進した。次に、6 週齢雌性 BALB/c マウスをそれぞれの MV で免疫し、BCG 特異的な抗体産生を ELISA にて評価したところ、静置培養由来 MV はアジュバント併用下で BCG 特異的な抗体 (経鼻接種では SIgA, 皮下接種では IgG) を誘導することが確認された。さらに、MV で誘導された抗結核免疫の有効性を BCG または MV で免疫したマウスへの BCG 感染実験により評価した。静置培養由来 MV で免疫したマウスは対照群のマウスに比べ肺内の菌量が有意に低下した。【結論】BCG 由来の MV は、培養条件によって宿主免疫への刺激活性が異なることが明らかとなった。BCG 由来の MV は、MV 単独での抗結核免疫誘導性は低いものの、アジュバント併用により BCG ワクチンと同等の感染防御効果が示された。

**P1-150**

ラクトフェリンが腔常在乳酸桿菌 *L. crispatus* の腔粘膜定着および恒常性維持に及ぼす影響の解明

○田端 里帆, 嶋田 真帆, 伊藤 雅洋, 岡田 信彦 (北里大・薬・微生物学)

**Impact of lactoferrin to the interaction between vaginal *L. crispatus* and vaginal epithelial cells**

○Riho Tabata, Maho Shimada, Masahiro Ito, Nobuhiko Okada (Dept. Microbiol., Sch. Pha., Kitasato Univ.)

ヒト成年期の腔粘膜には乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) が常在しており、乳酸を産生することで病原微生物の排除に関与するなど、女性生殖器の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。近年、ラクトフェリン (Lf) の経腔・経口投与は腔粘膜における乳酸桿菌の割合を高めると報告されている。本研究では、代表的な腔常在乳酸桿菌 *L. crispatus* を用いて、腔上皮細胞との相互作用に与える Lf の影響を明らかにすることを目的とした。分離源情報が公知である腔分離菌株 *L. crispatus* HM-638 について、ヒト Lf (hLf) 含有/非含有 MRS 液体培地にて 5%CO<sub>2</sub> 条件下 48 時間静置培養した。菌体を走査型電子顕微鏡またはクリスタルバイオレット (CV) 染色後に光学顕微鏡にて観察した。また、上記菌体をヒト腔上皮初代不死化細胞 (VK2/E6E7) と一定時間共培養後 (MOI50), 細胞に接着した細菌数を計測した。さらに、腔上皮細胞における恒常性の維持に関与することが知られているヒト β-ディフェンシン-2 (HβD-2) について、q-PCR を行い、mRNA 量を算出した。hLf 非含有培地での培養と比較し、hLf 含有培地での培養によって *L. crispatus* の菌体表面構造の変化が認められクリスタルバイオレット (CV) 染色性は大きく変化すること、腔上皮細胞に有意に接着すること、HβD-2 mRNA 量を有意に発現亢進すること、を確認した。*L. crispatus* と hLf より病原性微生物の定着を防ぐ環境の構築および女性生殖器恒常性の維持に寄与すると推察された。

**P1-151**

ランゲルハンス細胞由来 CCL5/RANTES 産生における Th1 サイトカイン IFN-γ の影響

○松井 勝彦, 茂木 琴音, 柴田 里紗 (明治薬大・臨床免疫)

**Effect of Th1 cytokine, IFN-γ on CCL5/RANTES production from Langerhans cells**

○Katsuhiko Matsui, Kotone Mogi, Risa Shibata (Dept. Clin. Immunol., Meiji Pharmaceut. Univ.)

**Objective:** In the chronic skin lesions of atopic dermatitis (AD) patients, Th1 cells appear in addition to Th2 cells, but it is unknown what role Th1 cells play for chronic skin inflammation. In this study, we examined CCL5 production from Langerhans cells (LCs) in the Th1 cytokine environment.

**Methods:** LCs were generated from mouse bone marrow cells, then stimulated by anti-CD40 antibody and Th1 cytokine, IFN-γ, and CCL5 production was measured. In addition, the LCs were incubated with naive Th cells from DO 11.10 TCR Tg mouse in the presence of ovalbumin peptide for 5 days, and then IFN-γ, interleukin-4 and CCL5 production was measured.

**Results:** When LCs were stimulated by an anti-CD40 antibody in the presence of IFN-γ, significant levels of CCL5 production were confirmed. Furthermore, when LCs carried out antigen-presentation to Th cells in the Th1 cytokine environment, significant levels of CCL5 production were induced. This CCL5 production was associated with IFN-γ activity and CD40L expression of Th cells in the culture.

**Conclusion:** Our present data showed that LCs augmented CCL5 production by responding to IFN-γ in the process of the antigen presentation to Th cells, and probably this augmentation of CCL5 production would contribute to infiltration of eosinophils and further Th1 cells to the skin lesions, and followed by expansion of chronic inflammation in the skin.

**P1-152**

Zinc metalloprotease (Zmp) 1 欠損 BCG の追加接種による肺炎誘導メカニズムの解明

○梅村 正幸<sup>1,2,3</sup>, 渡久地 ジュリア<sup>1,2</sup>, 吉里 真諒<sup>1,2</sup>, 下忠 龍生<sup>1,2</sup>, 高江洲 義一<sup>1,2,3</sup>, 松崎 吾朗<sup>1,2,3</sup> ( <sup>1</sup>琉球大・熱生研・分子感染防御, <sup>2</sup>琉球大院・医・生体防御, <sup>3</sup>琉球大・先端医学研・動物実験)

**Elucidation of pneumonia-inducing mechanism by additional inoculation of Zmp1-deficient BCG**

○Masayuki Umemura<sup>1,2,3</sup>, Julia Toguchi<sup>1,2</sup>, Masayori Yoshisato<sup>1,2</sup>, Ryusei Shimotada<sup>1,2</sup>, Giichi Takaesu<sup>1,2,3</sup>, Goro Matsuzaki<sup>1,2,3</sup> ( <sup>1</sup>Mol. Microbiol. Gr., TBRC, Univ. Ryukyus, <sup>2</sup>Dept. Host Defense, Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, <sup>3</sup>AMRC, Faculty Med., Univ. Ryukyus)

Th1 cells that produce IFN-γ are essential in eliminating *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). However, *Mtb* delays induction of the Th1 cells, and the delay cannot be avoided even by inoculating tuberculosis (TB) vaccine strain, BCG. Considering the above, TB control requires effectors other than IFN-γ, and IL-17A could be one of such candidates. On the other hand, the production of IL-1β, an IL-17A production inducer is suppressed by Zinc metalloprotease (Zmp) 1, a secretory protein of *Mtb*. In this study, effect of booster vaccination with airway Zmp1 deficient (ΔZmp1)-BCG inoculation were analyzed on IL-17A production of the mice primary vaccinated with intradermal WT-BCG inoculation. Mice were administered WT-BCG intradermally on their back skin and intratracheally administered with WT- or ΔZmp1-BCG after 8 weeks. As a result, the survival rate was decreased only in the group with booster inoculation of ΔZmp1-BCG after primary WT-BCG vaccination. The results in this study suggest that the primary inoculation of WT-BCG induced a systemic Th1 immune response, and the booster inoculation of ΔZmp1-BCG induced IL-1β production strongly, leading to the excessive production of inflammatory cytokine IL-17A that probably induced acute exacerbation of pneumonia with inflammatory cell infiltration, including excessive IFN-γ producing T cells and neutrophils.

## P1-153

### Vaccine-induced lung resident memory Th2 cells are protective against *Cryptococcus gattii* infections

○上野 圭吾<sup>1</sup>, 柘植 蒼一郎<sup>1,2</sup>, 清水 公徳<sup>2</sup>, 宮崎 義継<sup>1</sup> (国立感染症研・真菌部, <sup>2</sup>東京理科大学・先進工学・生命システム工学)

○Keigo Ueno<sup>1</sup>, Soichiro Tsuge<sup>1,2</sup>, Kiminori Shimizu<sup>2</sup>, Yoshitsugu Miyazaki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Fungal Infection, NIID, <sup>2</sup>Dept. Biol. Sci. Tec., Faculty Adv. Engin. Tokyo Univ. Sci.)

*Cryptococcus gattii* is fungal pathogen that cause cryptococcosis. No vaccines are available in clinical site, and it would provide fundamental insights for the vaccine development to identify protective memory T cells against the infection. In the present study, we developed novel intranasal vaccines using heat-inactivated whole cell antigens. These vaccines significantly ameliorated fungal burden in lungs and mortality after the infection challenge with *C. gattii* R265. Lung resident memory Th2 cells (lung TRM2) significantly increased in lungs of the immunized mice, and lung TRM2 secreted Th2-cytokines after the restimulation with *C. gattii* or Cda2 peptide. The protective effects of vaccination were retained in the immunized mice even if received the immunosuppressive agent FTY720 that reduce circulating lymphocytes, suggesting that circulating T cells were dispensable for the protection. Eosinophils and multinucleated giant cells were recruited in the immunized lungs after the infection, and lung granuloma enclosing fungal pathogen was also formed sufficiently even in IFN $\gamma$ -deficient mice. Adoptive transfer of lung TRM2 reduced fungal burden in Rag-1 knockout mice after the challenge, and the vaccine was not functional in IL-4/IL-13 double deficient mice. These findings have shown that vaccine-inducing lung TRM2 could be a protective memory subset against *C. gattii* infection.

## P1-154

### 過ヨウ素酸酸化による単糖型リポド A 誘導体の作製

○川原 一芳<sup>1</sup>, 大貫 晃宙<sup>1</sup>, 滝本 博明<sup>2</sup>, 尾之上 さくら<sup>1</sup> (<sup>1</sup>関東学院大・理工・生命, <sup>2</sup>北里大・理・生物科学)

### Construction of monosaccharide-type lipid A derivatives by periodate oxidation

○Kazuyoshi Kawahara<sup>1</sup>, Akira Onuki<sup>1</sup>, Hiroaki Takimoto<sup>2</sup>, Sakura Onoue<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ., <sup>2</sup>Dept. Biosci., Sch. Sci., Kitasato Univ.)

【目的】大腸菌リポド A はグルコサミン (GlcN) 2 分子, リン酸 2 分子, 脂肪酸 6 分子からなる構造を有し, 強い免疫活性を示すことが知られている。1980 年代の化学合成研究でリポド A 構造と免疫活性の関係が明らかになったが, 同時期の研究では, GlcN 1 分子, リン酸 1 分子, 脂肪酸 3 分子からなるリポド A の半分の構造をイメージした化合物も免疫活性を示すことが報告されていた<sup>1)</sup>。一方, 我々は大腸菌のリポド A 生合成変異株を作製し, その株に外来の脂肪酸転移酵素を導入することにより, 人工的なリポド A の作製を行ってきた。このようなリポド A 分子から単糖型誘導体の作製が可能であるが, 以前の報告<sup>1)</sup>から, このような誘導体は免疫活性を示す可能性が高いと考えられた。そこで本研究では化学処理による単糖型リポド A 誘導体の作製と精製を試みた。【方法と結果】分岐構造を形成する非ヒドロキシ脂肪酸としてミスチン酸 (C<sub>14:0</sub>) のみを有する変異株 (KGU0496 株および KGU0485 株) を使用した。リポド A の 1 位のリン酸を弱酸加水分解で除去した後に還元し, 還元末端側 GlcN を開環した。この糖アルコールの 4 位と 5 位の間に過ヨウ素酸で切断し, 2 種類の単糖型リポド A 誘導体を調製した。残存する二糖型リポド A を除くため, 薄層クロマトグラフィーで精製し, MALDI-TOF マススペクトロメトリーで分子量の確認を行った。その結果, KGU0496 株リポド A から C<sub>14:0</sub> を 1 分子含むリポド A 誘導体, および KGU0485 株リポド A から C<sub>14:0</sub> を 2 分子含むリポド A 誘導体が得られた。今後, これらの誘導体について各種サイトカインの産生誘導活性を調べ, リポド A との比較を行う予定である。1) Matsuura, M., et al., J. Biochem., 98, 1229-1237, (1985).

## P1-155

### Characterization and identification of inhibitors of malate:quinone oxidoreductase from *C. jejuni*

○Augustin T. Kabongo<sup>1,2</sup>, Rajib Acharjee<sup>2,3</sup>, Takaya Sakura<sup>1,2</sup>, Gloria M. Bundutidi<sup>2,3</sup>, Endah D. Hartuti<sup>2,3</sup>, Cadi Davies<sup>4</sup>, Ozan Gundogdu<sup>4</sup>, Tomoo Shiba<sup>5</sup>, Kiyoshi Kita<sup>1</sup>, Daniel K. Inaoka<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Glob. Health, Sch. Trop. Med. Glob. Health, Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Dept. Mol. Inf. Dynam., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., <sup>3</sup>Prog. Nurt. Glob. Lead. in Trop. and Emerg. Com. Dis., Grad. Sch. Biomed. Sc., Nagasaki Univ., <sup>4</sup>Fac. Inf. Trop. Dis., London Sch. Hyg. and Trop. Med., <sup>5</sup>Dept. Appl. Biol., Grad. Sch. Sc. and Tech., Kyoto Inst. Techn.)

The increasing incidence of *Campylobacter jejuni* infection and its resistance to antibiotics prompt the adoption of strategies to curb this trend, particularly by developing new drugs with new mode of actions. Malate:quinone oxidoreductase (MQO) has been reported as essential for survival of many bacteria and parasites. This enzyme is an attractive drug target as it is not conserved in mammals. As a preliminary step to investigate MQO from *C. jejuni* (CjMQO) as a potential new drug target, we purified an active recombinant CjMQO and conducted, for the first time, the biochemical analysis of an MQO from a pathogenic bacterium and identified ferulenol and embelin as nanomolar inhibitors. We demonstrate that both compounds are mixed-type inhibitors versus malate, and quinone, suggesting the existence of a third binding site to accommodate these inhibitors, a trait that seems conserved between mitochondrial and bacterial MQOs. Structural modelling study of CjMQO suggested the presence of hydrophilic and hydrophobic pockets as malate and quinone/inhibitor binding sites, respectively. Interestingly, ferulenol and embelin also inhibit the *in vitro* growth of *C. jejuni*, reinforcing the hypothesis that MQO is likely essential for *C. jejuni* survival and an important drug target.

## P1-156

### 枯草菌異種発現系を活用した beta-lytic protease の黄色ブドウ球菌溶菌活性の強化

○日置 貴大, 山下 大智, 高比良 早紀, 東畑 正敏, 遠藤 圭二, 川原 彰人, 奥田 光美, 小山 伸吾 (花王 (株))

### Heterologous expression of beta-lytic protease and improvement of staphylolytic activity

○Takahiro Hioki, Daichi Yamashita, Saki Takahira, Masatoshi Tohata, Keiji Endo, Akihito Kawahara, Mitsuyoshi Okuda, Shingo Koyama (Kao Corp.)

MEROPS データベースにおいて M23 ファミリーに属するプロテアーゼの多くは, 薬剤耐性株を含む黄色ブドウ球菌への溶菌活性を有することから, 抗菌剤としての応用が期待されている。M23B サブファミリーに分類されるリゾスタフィンについては抗菌剤としての応用研究例が多数報告されている。一方で, M23A サブファミリーに分類される酵素はリゾスタフィンと比較して広範な基質特異性を有し, 黄色ブドウ球菌に加えて他の *Staphylococcus* 属細菌にも溶菌活性を示すが, その応用研究の報告は乏しい。その一因として, 利用可能な異種発現系の欠如が挙げられる。M23A サブファミリーに分類されるプロテアーゼは前駆体として細胞外に分泌された後にプロセッシングを受け成熟化することが必須であるが, 自己成熟化能を有していないために異種宿主による成熟型酵素の生産が困難と報告されてきた。我々は枯草菌を宿主とする異種発現系を開発し, *Lysobacter enzymogenes* 由来の M23A プロテアーゼである beta-lytic protease (BLP) を成熟型で著量生産できることを見出した。異種発現した BLP をステンレスなどの硬質表面と接触させることで, 硬質表面に黄色ブドウ球菌の生菌付着抑制効果を付与できることを見出した。また, 枯草菌で異種発現を活用した BLP のタンパク質工学的改変を試みた結果, 薬剤耐性菌を含む黄色ブドウ球菌種への殺菌活性が大きく向上した Q116H 変異体の取得に成功した。本研究において枯草菌を用いることで BLP の安価生産および効率的な機能改良が初めて可能となり, BLP の産業利用の道が拓けた。今後 BLP を含む M23A サブファミリープロテアーゼの応用研究の発展に繋げたい。

**P1-157****ハスカップによるラクトバチルス属菌の抗菌活性増強効果**○南 正明<sup>1</sup>, 中村 峰夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>名市大院・医・細菌, <sup>2</sup>中村薬局)**Enhancement of antibacterial activity of *Lactobacillus* sp. by *Lonicera caerulea***○Masaaki Minami<sup>1</sup>, Mineo Nakamura<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya City Univ., <sup>2</sup>Nakamura Pharmacy)

【背景】北海道のアイヌ民族はハスカップを不老長寿の果実として利用してきた。我々は第95回細菌学会総会で *Lactococcus lactis* がハスカップ刺激により抗菌活性を増強させることを報告した。しかし *Lactococcus lactis* だけでなく、ラクトバチルス属菌でもグラム陽性菌を殺菌するバクテリオシンを産生する。そこで今回ハスカップの果実エキス刺激によるラクトバチルス属菌のバクテリオシン産生の影響を検討した。【方法と材料】HKP エキスは、厚真産ハスカップ果実をメタノール抽出した。HKP エキスを添加した MRS 液体培地でラクトバチルス属菌を 30°C 24 時間 5%CO<sub>2</sub> で培養した。羊血液寒天培地に indicator strain として *Micrococcus luteus* JCM1464 株を塗布した後、ラクトバチルス属菌を添加した抗菌ディスクを培地の上に置き、30°C 24 時間 5%CO<sub>2</sub> で培養し、抗菌ディスクの周囲の抑制帯を計測した。またラクトバチルス属菌に HKP エキスと <sup>3</sup>H-チミジン を添加して、MRS 培地で 30°C 12 時間 5%CO<sub>2</sub> 培養した後、<sup>3</sup>H-チミジンの細菌取り込み能を測定した。【結果】羊血液寒天培地上で JCM1464 株はラクトバチルス属菌添加ディスクの周囲に抑制帯を認め、コントロールと比較して HKP エキス添加で抑制帯は拡大した。また細菌へのチミジン取込能もコントロールと比較して HKP エキス添加により増加した。【結論】我々の結果から、ハスカップ刺激はラクトバチルス属菌でも *Micrococcus luteus* に対する抗菌効果やラクトバチルス属菌の細菌増殖能を増加させた。

**P1-158****メチオニンを添加したカビ培養液からの新規 LPS 機能阻害物質 myceliostatin の単離**○Yinzi Lin<sup>1</sup>, Yanhua Wu<sup>2</sup>, Liyan Wang<sup>3</sup>, 小嶋 尚<sup>4</sup>, 小出 直樹<sup>1</sup>, 梅澤 一夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>愛知医科大学医学部感染・免疫学講座, <sup>2</sup>愛知医科大学医学部分子標的医薬講座, <sup>3</sup>College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen Univ., <sup>4</sup>福友医学研究所)**Isolation of novel LPS function inhibitor myceliostatin from methionine-added culture of fungus**○Yinzi Lin<sup>1</sup>, Yanhua Wu<sup>2</sup>, Liyan Wang<sup>3</sup>, Shiori Kojima<sup>4</sup>, Naoki Koide<sup>1</sup>, Kazuo Umezawa<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Aichi Med. Univ., <sup>2</sup>Dept. Mol. Target, Sch. Med., Aichi Med. Univ., <sup>3</sup>College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen Univ., <sup>4</sup>Fukuyuu Med. Instu.)

最近、微生物からの新規物質の発見が難しくなり、深海微生物の利用や新しい培養法からの探索が注目されている。一方、敗血症、アトピーなど皮膚炎症疾患、炎症性腸疾患などに新しい非ステロイド抗炎症剤が求められている。今回、lipopolysaccharide (LPS) に活性化される NO 産生の阻害を指標にして、新しい抗炎症物質を天然から探索し、作用機構を調べた。カビ *Myceliophthora thermophila* カビに D, L-methionine を加えて培養したところ、HPLC 分析でいくつかの新しいピークがみられ、そのうちの二つを単離・構造決定した。二つの化合物は関連した構造で、いずれも新規 myceliothermophin 化合物であることがわかったので myceliostatin A および B と命名した。myceliostatin A と B は LPS に誘導されるマウス単球性白血病 RAW264.7 細胞の NO 産生を毒性のない濃度で同等に阻害した。機構解析には myceliostatin B を用いた。myceliostatin B は LPS に誘導される iNOS, IL-6, IL-1β の発現を抑え、さらに上流の NF-κB 活性化も阻害した。in vitro で recombinant p65 と DNA との結合を阻害したので新しい NF-κB 阻害剤であることがわかった。このように D, L-methionine を加えたカビ培養液から新規物質 myceliostatin A および B を発見し、myceliostatin B は新しい NF-κB 阻害剤として iNOS, IL-6, IL-1β 発現および ROS 産生を阻害した。

**P1-159****A 群レンサ球菌の表層蛋白質の機能を阻害する抗体の探索**○山脇 つくし<sup>1</sup>, 中木戸 誠<sup>2</sup>, 相川 知宏<sup>3</sup>, Jose Caaveiro<sup>4</sup>, 中川 一路<sup>3</sup>, 津本 浩平<sup>1,2,5</sup> (<sup>1</sup>東大院・工・化生, <sup>2</sup>東大院・工・バイオエンジ, <sup>3</sup>京大院・医・微生物感染分野, <sup>4</sup>九大・院薬, <sup>5</sup>東大・医科研)**The development of antibodies that regulates the function of surface proteins of *S. pyogenes***○Tsukushi Yamawaki<sup>1</sup>, Makoto Nakakido<sup>2</sup>, Chihiro Aikawa<sup>3</sup>, Jose Caaveiro<sup>4</sup>, Ichiro Nakagawa<sup>3</sup>, Kouhei Tsumoto<sup>1,2,5</sup> (<sup>1</sup>Dept. Chem. Biotech., Sch. Eng., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Dept. Bioeng., Sch. Eng., Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Sch. Med., Kyoto Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyusyu Univ., <sup>5</sup>Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo)

A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) が引き起こす感染症に対しては、抗生物質を用いる治療が主流であるが、耐性菌の出現が報告されており、これに代わる治療法が必要とされている。近年、薬剤耐性菌の出現を抑えるため、生存には必須ではないが、病原性を引き起こすのに必要な病原因子を標的とする手法が試みられている。その中でも炭水化物の利用に関与する蛋白質が有力な標的候補の一つとして考えられている。そこで本研究では、A 群レンサ球菌の表層にある糖関連蛋白質の機能を阻害する抗体を取得することを目的とした。具体的な標的として 2 種の糖関連蛋白質を選択した。1 つ目が細胞膜に局在し、マルトデキストリンを取り込むことで菌の増殖に寄与していると考えられる SPs0871 である。2 つ目が細胞壁に局在し、真核生物の細胞表面に存在する炭水化物に結合することで、細胞接着に寄与していると考えられている SPs1696 である。SPs0871 に関しては、アルバカ免疫およびファージディスプレイ法を用いたセレクションにより、高い親和性を持つ VHH 抗体を 1 つ獲得した。この抗体は、SPs0871 に対するマルトデキストリンの結合を阻害する一方で、菌の増殖を抑制することはできなかった。SPs1696 についても、様々なライブラリーからセレクションを行うことで複数の抗体を取得しており、解析を進めている。以上の 2 つの標的蛋白質とそれぞれに対する抗体について、分子レベルでの制御様式の違いと抗菌活性の相関に関して発表する。

**P1-160****M13 バクテリオファージを用いた RNA 分解酵素 MazF の発現による大腸菌の増殖抑制技術の開発**○長谷川 花菜<sup>1</sup>, 一色 理乃<sup>1,2</sup>, 宮本 龍樹<sup>1</sup>, 高杉 健一<sup>1</sup>, 野田 尚宏<sup>1,3</sup>, 常田 聡<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>早大・先進理工学・生命医科, <sup>2</sup>早大・ファージセラピー研, <sup>3</sup>産総研・バイオメディカル)**Development of *Escherichia coli* growth inhibition procedure by inducing MazF using M13 bacteriophage**○Hana Hasegawa<sup>1</sup>, Rino Isshiki<sup>1,2</sup>, Tatsuki Miyamoto<sup>1</sup>, Kenichi Takasugi<sup>1</sup>, Naohiro Noda<sup>1,3</sup>, Satoshi Tsuneda<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Phage Therapy Inst., Waseda Univ., <sup>3</sup>Biomed. Res. Inst., AIST)

【目的】近年、遺伝子組換えファージを用いた毒性タンパク質の発現により、病原性細菌の増殖を抑制する新規抗菌技術の開発が進められている。MazF は原核生物に広く保存された配列特異的な RNA 分解酵素であり、必須遺伝子の翻訳を阻害することで毒性を発揮する。MazF の切断配列や RNA 切断活性は生物種により異なることから、毒性の高い MazF を選択し異種発現させることで、標的細菌の増殖を効率よく抑制することが期待される。そこで本研究では、ファージを介して種々の MazF を過剰発現させ、標的細菌の増殖を抑制する基盤技術の開発を試みた。【方法】文献報告されている複数種の MazF を大腸菌 JM109 株内でプラスミドにより異種発現させ、増殖抑制効率が異なる MazF を選定した。次に、選定した MazF の標的切断配列数が異なる 3 遺伝子について、RT-qPCR により転写量を比較した。最後に、M13KO7 ファージを介して、選定した MazF を同株で発現させ、MazF の発現有無による増殖抑制 (コロニー形成能) の違いを平板培養により調査した。【結果・考察】各種 MazF の毒性を比較した結果、*Nitrosomonas europaea* 由来の MazF (MazFne1) による増殖抑制効果が高いことを明らかにした。また、MazFne1 の切断配列を多く含む遺伝子 (翻訳阻害効率が低いと推定される遺伝子) ほど転写量が低下していたことから、増殖抑制は MazFne1 の RNA 切断によるものであることを示した。さらに、M13KO7 ファージを介して大腸菌で MazFne1 を発現させることで、コロニー形成数が減少することを確認し、外来性 RNA 分解酵素である MazF をファージによって発現させることで標的細菌の増殖抑制が可能であることを例証した。

## P1-161

### Screening for compounds to control *Bordetella pertussis* infection by modulating the BvgAS system

○大田 菜都子<sup>1</sup>, 上野 俊哉<sup>1</sup>, 平松 征洋<sup>1</sup>, 堀口 安彦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大・微研・分子細菌学, <sup>2</sup>阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Natsuko Ota<sup>1</sup>, Toshiya Ueno<sup>1</sup>, Yukihiko Hiramatsu<sup>1</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Bacteriol., RIMD., Osaka Univ., <sup>2</sup>CIDER., Osaka Univ.)

Pertussis is a highly contagious respiratory disease caused by *Bordetella pertussis* (*Bp*). Macrolides are the first-line antibiotics to treat pertussis; however, macrolide-resistant *Bp* has emerged worldwide, which prompts the development of novel antibiotic-free therapies to control pertussis. *Bp* has two phenotypic phases; virulent Bvg<sup>+</sup> and avirulent Bvg<sup>-</sup> phases, the conversion of which is regulated by the BvgAS two-component system. *Bp* in the Bvg<sup>-</sup> phase is incapable of establishing infection. If one can arbitrarily convert *Bp* to the Bvg<sup>-</sup> phase, it may provide an antibiotic-free therapeutic measure. Thus, we attempted to screen for compounds that lead *Bp* to the Bvg<sup>-</sup> phase by modulating the BvgAS system by using newly-generated four distinct *Bp* reporter strains, which express GFP under the regulation by respective promoters for *ptx* and *fhaB* (Bvg<sup>+</sup>), and *virG* and *virG73* (Bvg<sup>-</sup>). The first screening of the FDA-approved drug library including 1,134 compounds based on the promoter activity for the *virG* gene, revealed five compounds. Further analyses using the four reporter strains demonstrated that compound X among the five candidates properly converted *Bp* to the Bvg<sup>-</sup> phase. The effect of compound X was also confirmed in several laboratory and clinical strains of *Bp*. This study proposes compound X as a candidate to control *Bp* infection by modulating the BvgAS system.

## P1-162

### 納豆菌株間での *Campylobacter jejuni* に対する抗菌活性比較

○門屋 亨介, 川嶋 琴音, 二階堂 朱華, 安田 佑加 (岡山女学園大・生活科学・管理栄養)

### Comparison of antibacterial activity against *Campylobacter jejuni* among *Bacillus natto*

○Ryosuke Kadoya, Kotone Kawashima, Ayaka Nikaido, Yuka Yasuda (Dept. Food and Nutrition, Sch. Life Stud., Sugiyama Jogakuen Univ.)

カンピロバクター食中毒は世界各国で発生している主要な食中毒であり, 下痢や嘔吐などを引き起こす。国内でも発症件数は, 年間約 300 件以上と非常に多く社会問題になっている。食卓の安全を確保するうえで本菌の汚染防止は緊急の課題である。主な原因菌はカンピロバクター属菌であり, 市販鶏肉が高率に汚染していることから, 調理段階での加熱処理しか有効な防御策はない。本研究では, 納豆菌が持つ抗菌活性機能に着目し, カンピロバクター食中毒の拡大を防止することを考えた。しかしながら, 納豆菌には多くの株が存在するため, どの株が *C. jejuni* 増殖抑制に効果があるかは未知である。そこで本実験では納豆菌 10 株準備し, *C. jejuni* に対する増殖抑制効果の比較検討と増殖抑制物質の特定を試みた。まずは *C. jejuni* を塗布した平板培地上での納豆菌生菌を用いた Well diffusion assay を行い, 菌株ごとの抗菌活性を測定した。興味深いことに, 全ての納豆菌株で抗菌活性があるわけではなく, また, その活性にも株により強弱があることが観察された。続いて, 培養後の培地上清を濾過滅菌後, カンピロバクター塗布プレートに滴下したところ, 株により増殖抑制効果に差があり, 3 株で強い増殖抑制効果があることを示した。さらに培地上清に対し硫酸沈殿や酢酸エチル抽出等を行った結果, この 3 株が生産する抗菌物質は水溶性の熱感受性が高い化学物質である可能性が示された。さらにこれら抗菌物質の他の食中毒細菌に対する抗菌活性を測定している。また, これら 3 株をマウスに摂取させ腸内細菌叢変化を測定し, 抗菌効果の高い納豆菌を接種することによる生体への影響を観察した。

## P1-163

### *Clostridioides difficile* の異なる CprABC アミノ酸配列のナイシン A 感受性に及ぼす影響

○井手 規暁<sup>1</sup>, 松尾 美樹<sup>2</sup>, Mi Nguyen Tra Le<sup>2</sup>, 久恒 順三<sup>5</sup>, 原 稔典<sup>3</sup>, 櫻山 誠也<sup>3</sup>, 横崎 典哉<sup>3</sup>, 大毛 宏喜<sup>4</sup>, 菅井 基行<sup>5</sup>, 小松澤 均<sup>2</sup> (1)広島大・歯・口腔総合診療科, (2)広島大・歯・細菌, (3)広島大・病院・検査, (4)広島大・病院・感染症, (5)国立感染研・薬剤耐性研究センター)

### Different CprABC aminoacid sequences affect nisinA susceptibility in *Clostridioides difficile*

○Noriaki Ide<sup>1</sup>, Miki Matsuo<sup>2</sup>, Mi Nguyen Tra Le<sup>2</sup>, Junzo Hisatsune<sup>5</sup>, Toshinori Hara<sup>3</sup>, Seiya Kashiyama<sup>3</sup>, Michiya Yokozaki<sup>3</sup>, Hiroki Ohge<sup>4</sup>, Motoyuki Sugai<sup>5</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Adv. Gen. Dent., Grad. Sch., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>Proj. Res. Cent. Nosoc. Infect. Disea., Hosp., Hiroshima Univ. Hosp., <sup>4</sup>Sect. Clinic. Lab., Divi. Clinic. Sup., hosp., Hiroshima Univ. Hosp., <sup>5</sup>Antimicrob. Resist. Res. Cent., Natio. Inst. Infect. Dise.)

*Clostridioides difficile* は腸内細菌の一つであり, 抗菌薬関連下痢症を惹起することで知られている。治療薬としてメトロニダゾールやバンコマイシンが用いられるが, 耐性菌の出現が確認されている。乳酸菌が生産する Nisin A は, *C. difficile* 感染症に有効であることが実証されている。今回, 臨床分離株 11 株を用いて Nisin A に対する感受性を検証し, 感受性に影響を及ぼす機序の解明を行った。【方法】*C. difficile* 臨床分離株 11 株を用いて, ナイシン A の感受性を最小発育阻止濃度の測定および NisinA 産生乳酸菌株を用いた Direct 法により検証した。臨床分離株のゲノムシーケンスを行い, ナイシン A の感受性に関する因子 CprABC と DltDABC の遺伝子の塩基配列の比較およびナイシン A 添加による遺伝子発現性を検証した。【結果と考察】Nisin A 感受性試験の結果, 臨床分離株 11 株において, NisinA 感受性が高い株と低い株の大きく 2 つのグループに分かれ, このグループは全ゲノム配列による系統樹解析でも同様のグループに分かれた。Nisin 添加による cprA 遺伝子発現は各グループで差はなく, 同様に発現誘導が認められた。dltD も各グループでの発現量に差は認めなかった。次に CprABC と DltA-D のアミノ酸配列を比較した結果, 各グループで共通の違いが認められた。このことから, CprABC のアミノ酸配列の違いが Nisin A 感受性に関係している可能性が推測された。

## P1-164

### Comprehensive analysis of bacteriocins produced by *Klebsiella pneumoniae* complex

○レ ミグエントラ<sup>1</sup>, Thao Huu-Huong Nguyen<sup>1</sup>, Tam Phuc-Bao Nguyen<sup>1</sup>, Van Minh Trinh<sup>1</sup>, 松尾 美樹<sup>1</sup>, 鹿山 静男<sup>2</sup>, 菅井 基行<sup>2</sup>, 小松澤 均<sup>1</sup> (1)広島大・医科学・細菌学, (2)感染研・薬剤耐性)

○Mi Nguyen-Tra Le<sup>1</sup>, Thao Huu-Huong Nguyen<sup>1</sup>, Tam Phuc-Bao Nguyen<sup>1</sup>, Van Minh Trinh<sup>1</sup>, Miki Matsuo<sup>1</sup>, Shizuo Kayama<sup>2</sup>, Motoyuki Sugai<sup>2</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Biomed., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. of Infect. Dis.)

**Background:** *Klebsiella* produces several kinds of bacteriocin, which show antibacterial effects against other species. Here, we comprehensively analyzed bacteriocin genes in 236 clinically isolated *Klebsiella pneumoniae* complex strains, and their antibacterial activity against a wide range of bacterial species.

**Methods:** Bacteriocin genes were detected using genome sequences. Soft agar overlay assay was used to test the antibacterial activity against indicators belonged to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and other species, including drug-resistant strains. Bacteriocin gene expression was quantified with qPCR.

**Results:** Bacteriocin genes were identified from 25% of isolates (55 *K. pneumoniae*, 2 *K. quasipneumoniae*, and 2 *K. variicola*), including microcin E492, microcin I47, and microcin M (44%), microcin S (5%), microcin B17 (2%), cloacin (22%), klebicin B (29%), and klebicin C (5%). Cloacin were detected with 5 variants of amino acid sequences. Microcin E492-carrying strains had a wide spectrum of antibacterial activity, including *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, and *Klebsiella*. Cloacin-positive strains showed activities mainly against *Klebsiella* and *E. coli*, while klebicin B-positive strains displayed almost no inhibitory effect against the tested indicators. Klebicin C-like bacteriocin exhibited mild activity against some *K. pneumoniae* and *K. variicola* strains.

## P1-165

## 細菌代謝機構を標的とした抗菌化合物のスクリーニング

○猪飼 真りえ<sup>1</sup>, 熊懷 香葉<sup>1</sup>, 平田 直<sup>1</sup>, 藤井 萌<sup>2</sup>, 坂入 孔明<sup>3</sup>, 美間 健彦<sup>2</sup>, 森田 雄二<sup>3</sup>, 佐藤 綾人<sup>4</sup>, 港 雄介<sup>1</sup> (藤田医大・医・微生物, <sup>2</sup>愛媛県立医療技術大・保健科学・微生物検査, <sup>3</sup>明治薬科大・感染制御学, <sup>4</sup>大・ITbM)

## Screening of compounds to identify antimicrobial compounds targeting bacterial metabolism

○Marie Ikai<sup>1</sup>, Kayo Kumadaki<sup>1</sup>, Nao Hirata<sup>1</sup>, Moe Fujii<sup>2</sup>, Komei Sakairi<sup>3</sup>, Takehiko Mima<sup>2</sup>, Yuji Morita<sup>3</sup>, Ayato Sato<sup>4</sup>, Yusuke Minato<sup>1</sup> (Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., <sup>2</sup>Dept. Microbiol., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., <sup>3</sup>Dept. Infection Control Science, Meiji Pharmaceutical Univ., <sup>4</sup>ITbM, Nagoya Univ.)

薬剤耐性 (AMR) 菌の拡大により, 我が国においても細菌感染症の難治化が進んでいる。そこで, AMR 菌に有効な新規作用機序をもつ治療薬の開発が求められている。本研究は, AMR が問題となっている ESKAPE 病原菌の一つである緑膿菌を対象に, 細菌代謝を標的とした抗菌化合物の同定を試みた。名古屋大学 ITbM 化合物ライブラリーの中から 800 化合物を選択し, 緑膿菌 PAO1 株から 4 種類の薬剤排出ポンプ遺伝子を欠失した薬剤感受性緑膿菌 YM64 株に対する抗菌活性を評価した。抗菌活性は, 最少栄養培地である M9 および M9 培地に種々の栄養素を添加した培地 (supplemented M9) を用いて調べた。その結果, M9 培地のみで抗菌活性を示した化合物 BAY11-7082 を同定した。BAY11-7082 は, 作用機序は不明であるが緑膿菌や黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示すことが以前報告されている。我々は, supplemented M9 培地に含まれる培地成分によって, BAY11-7082 の抗菌活性が拮抗されていると考え, supplemented M9 に含まれる栄養素を 1 種類ずつ M9 培地に添加した培地を作製し BAY11-7082 の抗菌活性を調べた。その結果, チロシンとグルタミン酸添加によって BAY11-7082 の抗菌活性が阻害された。このことから BAY11-7082 は, 緑膿菌のチロシン代謝とグルタミン酸代謝を標的としていることが示唆された。さらに, PAO1 株および YM64 株で欠失している薬剤排出ポンプを 1 種類ずつ保持する株の BAY11-7082 感受性を調べた結果, BAY11-7082 は *mexAB-oprM* を保持する株と PAO1 株において同程度に感受性が低下していた。このことから BAY11-7082 は, MexAB-OprM によって菌体外へと排出されていると考えられる。

## P1-166

## Bam 複合体を標的とした多剤耐性アシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発

○稲田 裕明<sup>1</sup>, 谷口 菜優<sup>1</sup>, 土屋 孝弘<sup>1</sup>, 宮本 勝城<sup>1</sup>, 駒野 淳<sup>1</sup>, 良原 栄策<sup>2</sup>, 辻坊 裕<sup>1</sup> (大阪医薬大・薬・感染制御, <sup>2</sup>東海大・医・臨床検査)

The developments of antibiotics targeting the Bam complex for multidrug-resistant *Acinetobacter*

○Hiroaki Inada<sup>1</sup>, Nayu Taniguchi<sup>1</sup>, Takahiro Tsuchiya<sup>1</sup>, Katsushiro Miyamoto<sup>1</sup>, Jun Komano<sup>1</sup>, Eisaku Yoshihara<sup>2</sup>, Hiroshi Tsujibo<sup>1</sup> (Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., <sup>2</sup>Dept. Lab. Med., Tokai Univ. Sch. Med.)

【目的】グラム陰性細菌の外膜タンパク質には薬剤排出ポンプなど様々なトランスポーターが含まれており, それらは薬剤耐性やバイオフィーム形成に必須である。これらの外膜タンパク質のフォールディングや外膜への挿入には Bam 複合体が重要な役割を担っている。Bam 複合体は BamA, B, C, D, および E から構成されており, BamA と BamD が直接結合している。我々はこの結合を阻害するペプチドを合成し, 細胞内に取り込みやすくするために, リジン残基を付加したペプチドを用いてアシネトバクターの増殖への影響, 殺菌活性, バイオフィーム形成阻害能およびマウスに対する致死活性を調べた。

【方法】*Acinetobacter baumannii* は基準株 ATCC19606 株, 臨床分離株 A112-II-a 株および多剤耐性株 MDRAb10569 株を用いた。種々の BamD 結合阻害ペプチドを用いて各実験を行った。本菌の増殖に及ぼす影響は 600nm における濁度を測定し, 殺菌活性はコロニー形成による生菌数を測定した。バイオフィーム形成能は静置培養後クリスタルバイオレットで染色した。マウスに対する致死活性は抗 Gr1 抗体を前投与したマウスに本菌を腹腔内に投与後, 阻害物質を投与し生存率を調べた。

【結果と考察】Bam 結合阻害ペプチドはリジン残基の付加数が多いほど増殖抑制およびバイオフィーム形成を低下させたが, いずれも殺菌活性は認められなかった。また, リジンを 7 残基付加したものは多剤耐性株の感染モデルマウスに対する治療効果も認められた。さらに多剤耐性株は阻害ペプチドとの併用によりこれまで耐性であった抗生物質に対し感受性となるものもあった。現在はペプチドの最適化を行うとともに低分子化合物のスクリーニングも行っている。

## P1-167

## ボルテゾミブによる特異的な宿主細胞死を介した性感染症クラミジア持続感染の排除

○伊藤 竜太, 栗原 悠介, 吉村 芳修, 廣松 賢治 (福岡大・医・微生物免疫)

Bortezomib Eliminates Persistent *Chlamydia* Infection through Specific Host Cell Apoptosis

○Ryota Itoh, Yusuke Kurihara, Michinobu Yoshimura, Kenji Hiromatsu (Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ.)

*Chlamydia trachomatis*, a parasitic intracellular bacterium, is a major human pathogen that causes millions of trachoma, sexually transmitted infections, and pneumonia cases worldwide. Previously, peptidomimetic inhibitors consisting of a hydrophobic dipeptide derivative exhibited significant inhibitory effects against chlamydial growth. Based on this finding, this study showed that both bortezomib (BTZ) and ixazomib (IXA), anticancer drugs characterized by proteasome inhibitors, have intensive inhibitory activity against *Chlamydia*. Both BTZ and IXA consisted of hydrophobic dipeptide derivatives and strongly restricted the growth of *Chlamydia* (BTZ, IC<sub>50</sub> = 24 nM). In contrast, no growth inhibitory effect was observed for other nonintracellular parasitic bacteria, such as *Escherichia coli*. BTZ and IXA appeared to inhibit chlamydial growth bacteriostatically via electron microscopy. Surprisingly, *Chlamydia*-infected cells that induced a persistent infection state were selectively eliminated by BTZ treatment, whereas uninfected cells survived. These results strongly suggested the potential of boron compounds based on hydrophobic dipeptides for treating chlamydial infections, including persistent infections, which may be useful for future therapeutic use in chlamydial infectious diseases.

## P1-168

Clarithromycin resistance by *mef(A)/mef(E)*-associated *msr(D)* in *Streptococcus pyogenes*

○立野 一郎, 井坂 雅徳, 長谷川 忠男 (名市大・医・細菌)

○Ichiro Tatsuno, Masanori Isaka, Tadao Hasegawa (Dept. Bacteriol., Shc. Med., Nagoya City Univ.)

The *mef(A)*- and its subclass *mef(E)* systems had long been considered to constitute one of the primary macrolide-resistant mechanisms in *Streptococcus pyogenes*. However, we have previously demonstrated that the *msr(D)* gene located immediately downstream of the *mef(A)/mef(E)* genes plays a predominant role in these systems. In previous studies, furthermore, *mef(A)*-associated *msr(D)*10-85 of an *S. pyogenes* strain (10-85) exhibited a greater increase in clarithromycin minimum inhibitory concentration (MIC) than *mef(E)*-associated *msr(D)*13-O-10 of another strain (13-O-10). Both *msr(D)* genes encode 487 amino acid residues, 13 amino acid residues of which are different from each other. In this study, we performed mutational analysis of the *msr(D)* genes and showed that a single-nucleotide polymorphism to cause a substitution of Asp238 with Gly is mainly associated with the greater increase in clarithromycin MIC by the *msr(D)*10-85 than by the *msr(D)*13-O-10 allele. In addition, another substitution of Ser with Arg at codon 194 is partially associated with the greater increase by the *msr(D)*10-85 than by the *msr(D)*13-O-10 allele.

## P1-169

### メロペネムおよびアミカシン耐性大腸菌の薬剤耐性因子解析

○中田 裕二<sup>1</sup>, 坂口 翔一<sup>2</sup>, 堀井 みゆ<sup>1</sup>, 藪田 陽子<sup>1</sup>, 横山 雛子<sup>1</sup>, 中野 隆史<sup>2</sup> (<sup>1</sup>藍野大・医療保健, <sup>2</sup>大阪医科大学・医・微生物学・感染制御学)

### Drug resistance analysis of meropenem and amikacin-resistant *Escherichia coli*

○Yuji Nakada<sup>1</sup>, Shoichi Sakaguchi<sup>2</sup>, Miyu Horii<sup>1</sup>, Yoko Yabuta<sup>1</sup>, Hinako Yokoyama<sup>1</sup>, Takashi Nakano<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Fac. Healthcare Sci., Aino Univ., <sup>2</sup>Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ.)

**Introduction:** In recent years, the increase of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) has evolved into a serious problem. Currently, most of the CRE detected in Japan are sensitive to amikacin - an aminoglycoside drug used as a therapeutic agent. However, we have confirmed the existence of strains that are resistant to both meropenem and amikacin. This study aimed to analyze the whole genome sequences of these strains and to clarify the resistance factors.

**Methods:** We targeted meropenem and amikacin-resistant *Escherichia coli* detected at a medical facility in the northern part of Osaka Prefecture. For each strain, we performed drug susceptibility test, estimation of these resistance genes by de novo analysis using NGS, and complementation test of the target genes.

**Results and discussion:** In the drug susceptibility test, two meropenem and amikacin-resistant *E. coli* strains were obtained. Whole-genome sequence analysis revealed that all strains were carrying a *bla*<sub>IMP-6</sub> gene and two aminoglycoside-(6)-N-acetyltransferase (*aac*(6')) genes on the plasmids. In addition, another carbapenem-resistant *E. coli* that was sensitive to amikacin in the drug susceptibility test also possessed a *bla*<sub>IMP-6</sub> gene and one *aac*(6') gene. These results suggested that more than one *aac*(6') genes are required in order to exhibit amikacin resistance.

## P1-170

### Genome analysis of colistin-resistant *Escherichia coli* from residents in Ecuador and Vietnam

○Hoa Hoang, 山本 眞由美, 山本 容正 (岐阜大学・大学院・連合創薬)

○Hoa Hoang, Mayumi Yamamoto, Yoshimasa Yamamoto (UGS-DDMIS, Gifu Univ.)

The dissemination of antimicrobial-resistant bacteria poses a challenge and a burden for healthcare systems. In particular, the spread of colistin-resistant (CR) bacteria among community residents poses a major threat. In this study, we performed comparative genome analysis to determine the structure and location of the *mcr*-transposon of *Escherichia coli* isolates from residents in Ecuador and Vietnam. CR *E. coli* strains were isolated from the feces of 84 healthy residents of Ecuador and Vietnam. The whole-genome sequences of all isolates were generated by hybrid de novo assembly using the Unicycler 0.4.8 pipeline and CLC Genomics Workbench 21.0.3 software. There was a similar prevalence of *mcr*-1-carrying *E. coli* strains in Ecuador and Vietnam. The frequency of chromosomal *mcr*-1 was lower in Ecuador (14.8%) than in Vietnam (37.8%). The rate of the Inc type of *mcr*-carrying plasmid was different between the two countries. That is, the dominant *mcr*-carrying Inc type plasmid was I2 in Ecuador and X1/X4 in Vietnam. Furthermore, all of the plasmid *mcr* transposon of the Vietnamese isolate had lost the IS element, ISAp1, compared to 41.8% of the Ecuadorian isolates. These results indicate that the Vietnamese *E. coli* isolates were exposed to colistin for a long period of time, and thus, the *mcr* transposon structures in these isolates were simple and stable.

## P1-171

### Screening for colistin-resistant bacteria contaminating retail meat in Vietnam by detecting *mcr* gene

○Yen Le, 井川 佳乃子, Hoa Hoang, 磯村 初恵, 田中 香お里, 山本 容正 (岐阜大学・大学院・連合創薬)

○Yen Le, Kanoko Ikawa, Hoa Hoang, Hatsue Isomura, Kaori Tanaka, Yoshimasa Yamamoto (UGS-DDMIS, Gifu Univ.)

Colistin (COL) is considered the last resort antibiotic for treating multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Besides therapeutic use, COL is widely employed as an additive in livestock feed worldwide. Since the mobile colistin resistance gene, *mcr*-1, was discovered, its variants have been reported from livestock food products, such as beef, chicken, and pork meats. Therefore, there is an urgent need to develop a simple method to monitor meat contamination. In this study, we developed a simple and rapid method to detect the *mcr* gene using multiplex real-time PCR; the results are obtained within one hour of sample processing. We determined the prevalence of *mcr*-1 and -3 in retail meat samples in Vietnam. A total of 86 samples (50 pork and 36 chicken meats) were collected from 28 domestic markets. For chicken meat, both *mcr*-1 and *mcr*-3 were found in 25% samples, while *mcr*-1 and *mcr*-3 were detected in 44% and 47% samples, respectively. For pork, *mcr*-1 and *mcr*-3 were detected in 12% and 32% samples, respectively; both the variants were found in 6% samples. Our results indicate that retail meats in Vietnam might be a reservoir of COL resistance genes, such as *mcr*-1 and *mcr*-3. Such livestock food products might spread a cocktail of multiple resistance genes implying an alarming risk to human health.

## P1-172

### クロストリジウム綱細菌の抗生物質耐性に寄与する ABCF 因子の同定

○尾花 望<sup>1,2</sup>, 高田 啓<sup>3,4</sup>, 野村 暢彦<sup>2,5</sup>, Gemma Atkinson<sup>4</sup>, Vasili Haurlyuk<sup>4</sup> (<sup>1</sup>筑波大・医・TMRC, <sup>2</sup>筑波大・MiCS, <sup>3</sup>京産大・生命, <sup>4</sup>Dept. Expt. Med. Sci., Lund Univ., <sup>5</sup>筑波大・生命環境)

### Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance of *Clostridia*

○Nozomu Obana<sup>1,2</sup>, Hiraku Takada<sup>3,4</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>2,5</sup>, Gemma Atkinson<sup>4</sup>, Vasili Haurlyuk<sup>4</sup> (<sup>1</sup>TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>MiCS, Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo Univ., <sup>4</sup>Dept. Expt. Med. Sci., Lund Univ., <sup>5</sup>Fac. Life. Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Bacterial antimicrobial resistance is a growing threat to human health. The F subfamily of ABC ATPases includes ribosome-associated antibiotic resistance (ARE) determinants, ARE-ABCF. We discover that some clostridial bacteria possess an ARE-ABCF resistance factor (*cplR*: clostridial pleuromutilin lincosamide resistance), encoded in genomes of an important human pathogen *Clostridioides difficile*, a causative agent of food poisoning *Clostridium perfringens*, as well as a commensal gut bacterium *Clostridium sporogenes*. We find that antibiotic treatment induces the *cplR* gene expression, which depends on the 5' leader region of the *cplR* gene. We demonstrate that the *cplR* genes contribute to the intrinsic resistance of these clostridia to lincosamides lincomycin, clindamycin, and pleuromutilin retapamulin. While the fully synthetic lincosamide iboxamycin can defeat lincosamide resistance mediated by *cplR*, the *cplR* gene provides high levels of iboxamycin resistance when the transposon-encoded *ermB* gene is present together in *C. difficile* genome. Given that clindamycin treatment is associated with *C. difficile* infection, this study of the *cplR*-mediated lincosamide resistance in *C. difficile* would be of clinical importance. Furthermore, the emergence and spread of ARE-ABCF genes in clostridia are one of the risk factors for defeating next-generation lincosamide.



## P1-173

Surveillance of multidrug resistance phenotypes in *S. aureus* and correlation with WGS findings

○矢原 耕史<sup>1</sup>, 保阪 由美子<sup>1</sup>, Adam Clarck<sup>2</sup>, 北川 浩樹<sup>3</sup>, 久恒 順三<sup>1</sup>, 菅井 基行<sup>1</sup>, 柴山 恵吾<sup>4</sup>, John Stelling<sup>2</sup> (1国立感染症研・薬剤耐性研究センター, 2WHO CC, Brigham and Women's Hospital, 3広島大学病院感染症科, 4名古屋大学・医・分子病原細菌)

○Koji Yahara<sup>1</sup>, Yumiko Hosaka<sup>1</sup>, Adam Clarck<sup>2</sup>, Hiroki Kitagawa<sup>3</sup>, Junzo Hisatune<sup>1</sup>, Motoyuki Sugai<sup>1</sup>, Keigo Shibayama<sup>4</sup>, John Stelling<sup>2</sup> (1AMR Research Center, NIID, 2WHO CC, Brigham and Women's Hospital, 3Dept. Infect. Dis., Hiroshima Univ. Hosp., 4Dept. Bacteriology, Nagoya Univ.)

Both phenotypic and genotypic monitoring are key to understanding and containing emerging resistant strains. Antimicrobial susceptibility test results of more than 40,000 *S. aureus* isolates from 213 participating hospitals from 2011 to 2019 were exported from a national database. Longitudinal and geographic distribution and prevalence of distinct multidrug resistance phenotypes ('resistance profiles') were examined among hospitals and prefectures. We further conducted a genome sequence analysis of strains with specific resistance profiles of concern. The overall prevalence of MRSA decreased from 40.3% to 35.1% from 2011 to 2019. However, among dozens of resistance profiles, only one profile of a type of MRSA, exhibited a statistically significant increase in inpatient frequency, exceeding 10% during the nine years. This MRSA profile showed resistance to oxacillin, erythromycin, and levofloxacin. Analysis of WGS results of isolates with this phenotype revealed that most belonged to clonal complex 8, and all carried SCCmec IV, typical of community-acquired MRSA. This study shows importance of tracking distinct resistance profiles, and provides a model for future epidemiological research on antimicrobial resistance correlating multidrug resistance phenotypes with selective genome sequencing, which can be applied to other bacterial species (*J. Hosp. Infection*, 2021).

## P1-174

## 黄色ブドウ球菌における菌体表層荷電を介した新規バクテリオシン耐性メカニズムの解明

○鈴木 優仁<sup>1</sup>, 松尾 美樹<sup>1,2</sup>, Mi Nguyen Tra Le<sup>1,2</sup>, 小松澤 均<sup>1,2</sup> (1広島大・医系科学研究科・細菌学, 2広島大・院内感染症プロジェクト研究センター)

A Novel Bacteriocin Resistance Mechanism Mediated by Cell Surface Charge in *Staphylococcus aureus*

○Yujin Suzuki<sup>1</sup>, Miki Kawada-Matsuo<sup>1,2</sup>, Mi Nguyen Tra Le<sup>1,2</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>1,2</sup> (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 2Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infect. Dis., Hiroshima Univ.)

【目的】黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, 以下 Sa) は、ヒトの皮膚などに常在しており、時に重篤な疾患を引き起こす病原性の高い細菌である。また近年では、薬剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が広く確認され、新規抗菌剤の開発や Sa のヒトへの定着を防ぐ方策が求められている。その候補の一つとして、細菌の産生する抗菌性物質であるバクテリオシンが知られているが、本研究では Sa におけるバクテリオシン耐性に関わる新規因子について検証した。

【方法】表皮ブドウ球菌 KSE112 株の産生するバクテリオシン "Pep5" への抵抗性における二成分制御系 (TCS) の役割を検証するため、各種遺伝子欠損株を用いて、Direct 法や MIC 法を用いた感受性の検証、定量 PCR による遺伝子発現解析、Cytochrome C を用いた菌体表層荷電解析を行った。

【結果】TCS シリーズの欠損株において、Pep5 感受性に大きな変化が見られたのは、 $\Delta$ apsR 株と  $\Delta$ srrA 株であった。 $\Delta$ srrA 株において、Nisin を含むバクテリオシンおよびゲンタマイシンなどに対しても感受性が低下していた。Cytochrome C を用いた菌体表層荷電解析により、 $\Delta$ srrA 株で菌体表層の陰性荷電が弱まっていることが判明した。また、細胞死に関わる遺伝子である cidC との二重欠損株で Pep5 感受性が回復し、菌体表層荷電も WT と同レベルに戻ることも判明した。

【考察】これまで、Sa における菌体表層荷電の制御は、dlt や mprF の関与が報告されているが、本研究では、新規に影響する因子として、TCS である SrrAB およびそれが抑制する CidC を発見した。CidC による菌体表層荷電への関与の報告はなく、今後、この遺伝子の発現条件の探索や機序の解析を行う予定である。

## P1-175

*Salmonella* Typhimurium のフルオロキノロン耐性に及ぼす GyrA および QnrB19 のアミノ酸置換の影響

○Pondpan Suwanthada<sup>1</sup>, Jeewan Thapa<sup>1</sup>, 中島 千絵<sup>1,2</sup>, 鈴木 定彦<sup>1,2</sup> (1Div. Bioresources, Hokkaido Univ., International Institute for Zoonosis Control, 2北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所)

Impact of mutations in GyrA and QnrB19 on resistance to fluoroquinolone in *Salmonella* Typhimurium

○Pondpan Suwanthada<sup>1</sup>, Jeewan Thapa<sup>1</sup>, Chie Nakajima<sup>1,2</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1,2</sup> (1Div. Bioresources, Hokkaido Univ., International Institute for Zoonosis Control, 2International Collaboration Unit, Hokkaido Univ., International Institute for Zoonosis Control)

Nontyphoidal *Salmonella* (NTS) is a critical global cause of diarrhea that can pass through the entire food chain and potentially cause lethal disease. Fluoroquinolones (FQs)-resistance has become an emerging problem since FQs are the drug of choice for the treatment of invasive NTS infections. The target of FQs is DNA gyrase, a necessary enzyme for the homeostatic control of DNA supercoiling. A single mutation in gyrA encoding DNA gyrase A subunit (GyrA) may confer high-level resistance to nalidixic; nevertheless, other resistant mechanisms are necessary to cause FQs resistance. High-level FQs resistance can occur by amino acid substitutions in GyrA and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes. QnrB19, a member of PMQR, has been reported as the highest prevalence among the Qnr family in *Salmonella* spp. This study aims to investigate the role of QnrB19 in FQs resistance acquisition.

Recombinant *S. Typhimurium* DNA gyrases (wild type and mutants including GyrA<sup>S83F</sup> and GyrA<sup>D87N</sup>), QnrB19, and fluoroquinolones were used in an *in vitro* DNA gyrase experiment. This study showed the ability of QnrB19 that could prevent *Salmonella* DNA gyrase from being inhibited by FQs and limit DNA gyrase supercoiling activity *in vitro* for the first time. Further studies are necessary to understand the mutual impact of mutation in DNA gyrase encoding genes and the PMQR.

## P1-176

Role of fluoroquinolone resistance-associated mutations in *Mycobacterium avium* gyrA to resistance

○Jeewan Thapa<sup>1</sup>, Joseph Yamweka Chizimu<sup>1,2</sup>, 北村 そよか<sup>3</sup>, Mwangala Lonah Akapelwa<sup>1</sup>, Pondpan Suwanthada<sup>1</sup>, 三浦 菜実<sup>1</sup>, Jirachaya Toying<sup>1</sup>, 中島 千絵<sup>1</sup>, 鈴木 定彦<sup>1</sup> (1北学・人獣共通感染症国際共同研究所, 2Zambian Nat. Pub. Health Inst., 3北大院・保科・病態解析)

○Jeewan Thapa<sup>1</sup>, Joseph Yamweka Chizimu<sup>1,2</sup>, Soyoka Kitamura<sup>3</sup>, Mwangala Lonah Akapelwa<sup>1</sup>, Pondpan Suwanthada<sup>1</sup>, Nami Miura<sup>1</sup>, Jirachaya Toying<sup>1</sup>, Chie Nakajima<sup>1</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1</sup> (1Int. Inst. Zoonosis Ctr., Hokkaido Univ., 2Zambian Nat. Pub. Health Inst., 3Fac. Health. Sci., Hokkaido Univ.)

*Mycobacterium avium*, a member of *M. avium* complex, is the major pathogen contributing to the non-tuberculous mycobacteria lung disease. The study aims to elucidate the role of amino acid substitution in the quinolone resistance determining region of *M. avium* gyrA for the development of FQ resistance. We found that the clinical isolates with Asp95Gly and Asp95Tyr mutation in *gyrA* were highly resistant to FQs and had higher minimum inhibitory concentration values for moxifloxacin (>3.9 µg/ml), levofloxacin (>7.9 µg/ml), and ciprofloxacin (>15.9 µg/ml) than the wild type isolates with moxifloxacin (<0.125 - 1 µg/ml), levofloxacin (<0.5 - 4 µg/ml), and ciprofloxacin (<0.5 - 2 µg/ml), respectively. In order to perform DNA gyrase supercoiling assay, we produced recombinant wild type gyrA, gyrB, and four gyrA mutants (Ala91Val, Asp95Ala, Asp95Gly, and Asp95Tyr) proteins by considering their potential role to FQs resistance. While all the mutant Gyrase contributed to the higher FQ-inhibited DNA supercoiling IC<sub>50</sub> values than the wild types, Asp95Tyr showed the highest IC<sub>50</sub> values with 35-fold for ciprofloxacin, 15-fold for moxifloxacin, and 23-fold for levofloxacin, respectively, than the wild type, indicating that this mutation significantly reduces interaction of FQs and DNA gyrase. Our *in vitro* results show that mutations in the gyrA of *M. avium* contribute to FQs resistance.

## P1-177

### Characterization of a novel plasmid in *S. marcescens* harbouring *bla*<sub>GES-5</sub> isolated from an outbreak

○中西 典子, 岩本 朋忠, 野本 竜平 (神戸市健科研・感染症部)

○Noriko Nakanishi, Tomotada Iwamoto, Ryohei Nomoto (Dept. Infec. Dis., Kobe Inst.)

*Serratia marcescens* is a major opportunistic pathogen known to cause nosocomial infections associated with high morbidity and mortality. As this bacterium shows resistance to widely used carbapenem classes of antibiotics, treatment options available for nosocomial infections are limited. The outbreak of *S. marcescens* harbouring the *bla*<sub>GES-5</sub> gene in an intensive care unit (ICU) occurred in 2020. In this study, we analyzed six carbapenem-resistant *S. marcescens* strains isolated from samples of three ICU patients collected between May and October 2020 to elucidate the molecular characterization. Whole genome sequencing revealed a high degree of genetic homogeneity, with zero to five SNPs consistent among these strains. Comparative genetic analysis revealed that the *bla*<sub>GES-5</sub>-encoding novel 23,921-bp circular unique plasmid is contributing to carbapenem resistance. The prevalence and transmission of GES-producing bacteria is largely underestimated due to their rare presence in clinical isolates. This study highlights the necessity of surveillance programs for monitoring novel, along with commonly occurring carbapenemases in clinical settings. (Non-member collaborators: Shoko Komatsu)

## P1-178

### 白癬菌 *Trichophyton indotineae* で見つかったアゾール系抗真菌薬に対する新たな低感受性化のメカニズム

○山田 剛<sup>1,2</sup>, 矢口 貴志<sup>3</sup> (<sup>1</sup>帝京大・真菌センター, <sup>2</sup>帝京大・アジア国際感染症制御研, <sup>3</sup>千葉大・真菌センター)

### A new mechanism of resistance to azole compounds in a dermatophyte *Trichophyton indotineae*

○Tsuyoshi Yamada<sup>1,2</sup>, Takashi Yaguchi<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Inst. Med Mycol., Teikyo Univ., <sup>2</sup>Asia Intl. Inst. Infect. Dis. Ctrl., Teikyo Univ., <sup>3</sup>Med. Mycol. Res. Ctr., Chiba Univ.)

皮膚糸状菌(白癬菌)の感染によって起こる皮膚糸状菌症(白癬)は、真菌感染症の中でもとりわけ患者が多く、我が国では国民病とまで言われる。病原微生物の薬剤耐性化が21世紀の問題として世界的にクローズアップされる中、白癬の原因菌である白癬菌においても薬剤低感受性化の問題が顕在化しつつある。2018年にインドで分離され、ヨーロッパを含む広い地域へと拡大を続けている高病原性白癬菌 *Trichophyton indotineae* は、体部白癬の原因菌として分離された当初、*T. interdigitale* と同定されていたが、その後行われた臨床的所見や生理的性状、遺伝子の塩基配列などの解析結果から、2020年に新種の白癬菌としての提案がなされた。本菌ではアリアルミン系抗真菌薬であるテルビナフィンの低感受性株に関する知見が散見される一方、アゾール系抗真菌薬に対する感受性に関する知見が少ない。演者を含む国際共同研究グループは、インドで分離された30株以上の *T. indotineae* を対象に、2種類のアゾール系抗真菌薬、イトラコナゾールおよびボリコナゾールへの感受性を調査し、アゾール低感受性化が認められる複数の株を見出した。そして、これらの株におけるアゾール低感受性化の原因の解析を進め、アゾールの作用標的分子の1つであるCYP51B (lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase) の過剰発現が絡む病原真菌の新たな薬剤低感受性化のメカニズムを発見するに至った。

## P1-179

### Molecular Characterization of Multidrug-resistant Mcr-positive Bacteria from Meat Sources in Japan

○Christian Xedzro<sup>1</sup>, 木村 友美<sup>2,3</sup>, 島本 敏<sup>1</sup>, 島本 整<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Food. Microbiol. Hyg, Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Lab. Food. Microbiol. Hyg, Grad. Sch. Bio. Sci., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>GeneDesign, Inc.)

○Christian Xedzro<sup>1</sup>, Tomomi Kimura<sup>2,3</sup>, Toshi Shimamoto<sup>1</sup>, Tadashi Shimamoto<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Food. Microbiol. Hyg, Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Lab. Food. Microbiol. Hyg, Grad. Sch. Bio. Sci., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>GeneDesign, Inc.)

The spread of mobile colistin resistance genes (*mcr*) is of grave concern since it jeopardizes the efficacy of colistin, one of last resort antibiotics for treating severe infections. Among the 10 reported *mcr* genes, *mcr-1* has been commonly reported especially in *Escherichia coli*. However, information regarding the presence and molecular features of some Mcr homologs are still lacking in certain bacterial species.

In this study, 303 bacterial isolates were obtained from 95 meat samples collected in Higashihiroshima, Japan in 2009. *mcr* genes were screened by multiplex PCR. Four *mcr*-positive strains, *E. coli* (*mcr-5*), *Acinetobacter baumannii* (*mcr-4*), *Enterobacter cloacae* (*mcr-9*), and *Enterobacter ludwigii* (*mcr-9*) were identified. We observed that all the isolates specified resistance to colistin (MIC, 8 to >64  $\mu$ g/mL). Conjugation experiments showed that three isolates successfully transferred their conjugative plasmids to the recipient *E. coli* J53. PCR-based replicon typing identified heterogeneous plasmids incompatibility types among the *mcr*-carrying isolates. Remarkably, the *mcr-5* and *-4* co-existed with *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>ADC-50</sub>, respectively, and conferred clinical resistance to cefotaxime (MIC, 4 or >32  $\mu$ g/mL) and ceftazidime (MIC, 8 or >128  $\mu$ g/mL). Therefore, it is of epidemiological importance to implement routine surveillance to prevent further spread of Mcr homologs in Japan.

## P1-180

### Photo-repair in *Escherichia coli* after inactivation by irradiation with 222 nm-UVC

○成田 浩司<sup>1,2</sup>, 浅野 クリスナ<sup>1,3</sup>, 福土 理沙子<sup>1,4</sup>, 山根 亨介<sup>5</sup>, 奥村 善彦<sup>5</sup>, 大橋 広行<sup>5</sup>, 五十嵐 龍志<sup>5</sup>, 中根 明夫<sup>1,3,4</sup> (<sup>1</sup>弘前大・院医・感染生体防御, <sup>2</sup>弘前大・院医・動物実験施設, <sup>3</sup>弘前大・院医・生体高分子健康科学, <sup>4</sup>弘前医療福祉大・保健・看護, <sup>5</sup>ウシオ電機)

○Kouji Narita<sup>1,2</sup>, Krisana Asano<sup>1,3</sup>, Risako Fukushi<sup>1,4</sup>, Kyosuke Yamane<sup>5</sup>, Yoshihiko Okumura<sup>5</sup>, Hiroyuki Ohashi<sup>5</sup>, Tatsushi Igarashi<sup>5</sup>, Akio Nakane<sup>1,3,4</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., <sup>2</sup>Inst. Animal Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., <sup>3</sup>Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., <sup>4</sup>Dept. Nursing, Sch. Health Sci., Hirosaki Univ. Health Welfare, <sup>5</sup>Ushio Inc.)

254 nm-UVC induces DNA lesions such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) in pathogens and elicits germicidal activity but is harmful to human. 222 nm-UVC elicits the germicidal activity and is less harm to human. It is reported that many pathogens have developed repair mechanisms to DNA damage caused by 254 nm-UVC, and that photo-repair activated by visible light is an important DNA repair. However, repair to DNA damage caused by 222 nm-UVC is not elucidated. *E. coli* ATCC 25922 strain suspended with phosphate-buffered saline was irradiated with 254 nm- or 222 nm-UVC and left to stand in bright place to induce photo-repair or in dark place to induce nucleotide excision repair (NER). Viable bacteria were significantly reduced by 254 nm-UVC irradiation but increased 1000 or 10000 times after standing in bright place but not dark place for 240 minutes. In contrast, bacterial count of *E. coli* irradiated with 222 nm-UVC was not increased after standing in either place. CPD was significantly detected in *E. coli* DNA immediately after irradiation with 254 nm-UVC and then repaired more effectively after standing in bright place than in dark place. 222 nm-UVC also induced CPD in *E. coli* DNA, and repair of CPD was same level in both standing in bright and dark conditions. These results indicated that 222 nm-UVC suppressed photo-repair but not NER in *E. coli*.

## P1-181

植物由来抗菌成分とイオンが *Candida albicans* に及ぼす影響

○西浦 英亀<sup>1,2</sup>, 田村 宗明<sup>3,4</sup>, 今井 健一<sup>3,4</sup> (1)日大・大学院・歯・応用口腔科学分野, (2)日大・歯・補綴科, (3)日大・歯・感発, (4)日大・総歯研・生体防御)

Effect of plant-derived antimicrobial components and ions on *Candida albicans*

○Hideki Nishiura<sup>1,2</sup>, Muneaki Tamura<sup>3,4</sup>, Kenichi Imai<sup>3,4</sup> (1)Div. Appl. Oral Sci., Nihon Univ. Sch. Dent. Grad. Sch. Dent., (2)Dept. Complete Denture Prosthodontics, Nihon Univ. Sch. Dent., (3)Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent., (4)Div. Immunol. Pathobiol., Dent. Res. Cent., Nihon Univ. Sch. Dent.)

【目的】日常的な口腔ケアの欠如によって起こる常在微生物の増加と叢の遷移は口腔のみならず全身疾患発症の起因となることから、口腔環境の改善と健康維持が重要である。*Candida albicans* は高齢者、特に義歯装着者の口腔から検出率が高い真菌で、口腔カンジダ症や全身性真菌症の原因菌である。この真菌の病原因子には付着能、バイオフィルム形成能、菌糸形変換などがある。今回、ワサビ成分のアリルイソチオシアネート (AITC) と S-PRG フィラーから放出されるイオンを供試し、*C. albicans* の発育および病原因子に対する抑制効果を検討した。【方法】被験菌は *C. albicans* ATCC18804 株と NUD202 株を供試した。被験菌を AITC 添加培地で培養後、発育に及ぼす影響を比濁法と改良型寒天拡散法で検討した。付着能では義歯床用レジンの付着を培養法で、バイオフィルム形成能は染色法にて、菌糸形変換能は flow cytometry 分析による菌形の変化を観察し、分泌型アスパラギン酸プロテアーゼ (SAP) 活性は比色定量法にてそれぞれ AITC の影響を評価した。また、これら病原因子に関連する mRNA の発現量の変化を real-time PCR 法で確認した。一方、イオンについては発育阻止効果を検討した。【結果と考察】AITC は濃度依存的に *C. albicans* 2 菌株の発育、レジンの付着能、バイオフィルム形成能、菌糸形変換および SAP 活性を抑制した。さらにこれら病原因子に関連する mRNA の発現量も減少していた。一方、イオンも発育抑制効果を示した。これらの結果から、AITC およびイオンは *C. albicans* が関与する疾患の発症予防に有用と考えられる。(学会会員外協力者 日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座 飯沼利光, 株式会社松風 中塚稔之)

## P1-182

## マダイの滑走細菌症に対するファージの治療効果

○楠本 晃子<sup>1,2</sup>, 石丸 克也<sup>3</sup>, 秀島 悠<sup>2</sup>, 中井 敏博<sup>4</sup>, 近藤 裕介<sup>4</sup> (1)中国学園大・現代生活学部, (2)帯広畜産大・動物・食品検査診断センター, (3)近畿大・水産研究所, (4)広島大・大学院統合生命科学研究科)

## Bacteriophage treatment of experimental tenacibaculosis of red seabream

○Akiko Kusumoto<sup>1,2</sup>, Katsuya Ishimaru<sup>3</sup>, Haruka Hideshima<sup>2</sup>, Toshihiro Nakai<sup>4</sup>, Yusuke Kondou<sup>4</sup> (1)Chugoku Gakuen Univ., (2)Diagnostic Ctr. for Animal Health & Food Safety, Obihiro Univ. of Agri. & Vet. Med., (3)Aquaculture Res. Inst., Kindai Univ., (4)Grad. Sch. Integrated Sciences for Life, Hiroshima Univ.)

滑走細菌症は滑走細菌 *Tenacibaculum maritimum* の感染による海水魚の感染症である。罹病魚では、体表のびらん、鰭や口唇の欠損が見られる。*T. maritimum* の宿主域は広く、海産増養殖魚種の多くで本病の発生が報告されており、特に稚魚期に発生すると大量死亡をもたらす。日本では、滑走細菌症に対する水産用ワクチンはなく、また治療に用いる水産用医薬品もないのが現状である。近年、薬剤耐性菌の蔓延の懸念から、抗菌薬に頼らない感染症の治療法として、ファージ療法が注目されている。本研究は滑走細菌症のファージ療法の実用化を目的として、*T. maritimum* に特異的な溶菌性ファージを分離して、実験感染魚に対するファージ療法の有用性を検討した。まず、ファージライブラリーを充実させる目的で、既報の *T. maritimum* ファージ株 (Kawato et al., 2020) に新たに分離した株を加えて、合計 14 株のファージ株の中から、宿主域が広く、溶菌効率が低いものとして、PTm10 株を選抜した。強病原性株 (Shirahama-1 株, Shirahama-3 株) を浸漬法により種苗生産・育成したマダイ (*Pagrus major*) の稚魚に実験感染させ、体表のびらんや鰭の欠損などの典型的な滑走細菌症の症状を呈した魚に対して、種々の濃度のファージ液への浸漬処理をおこなった。その結果、対照群と比較して、ファージ投与群では、稚魚の死亡率が有意に改善した。また、ファージ投与 5 日後の生存魚では、びらんや鰭の回復が顕著に認められた。浸漬投与法は稚魚などの小型魚を大量に処理する方法として実用性が高いことから、浸漬法を用いたファージ療法は稚魚期の滑走細菌症に対して有効であると考えられる。

## P1-183

## 緑膿菌の低濃度マクロライド効果は複数の薬剤排出ポンプによって阻害される

○鈴木 真<sup>1,3</sup>, 森田 雄二<sup>2</sup>, 石毛 昭太<sup>1</sup>, 甲斐 心皓<sup>1</sup>, 宮部 安規子<sup>3</sup>, 村田 正太<sup>3</sup>, 川崎 健治<sup>3</sup>, 松下一之<sup>3</sup>, 清水 健<sup>1</sup> (1)千葉大・院医・病原細菌制御学, (2)明治薬科大・感染制御学, (3)千葉大病院・検査部)

Multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa* represses the effect of sub-MIC of macrolide

○Shin Suzuki<sup>1,3</sup>, Yuji Morita<sup>2</sup>, Shota Ishige<sup>1</sup>, Kiyohiro Kai<sup>1</sup>, Akiko Miyabe<sup>3</sup>, Shota Murata<sup>3</sup>, Kenji Kawasaki<sup>3</sup>, Kazuyuki Matsushita<sup>3</sup>, Takeshi Shimizu<sup>1</sup> (1)Dept. Molecular Infectiology, Grad. Sch. Medicine, Chiba Univ., (2)Dept. Infection Control Science, Meiji Pharmaceutical Univ., (3)Dept. Laboratory Medicine, Chiba Univ. Hospital)

【目的】緑膿菌による慢性気道感染症の治療法として低濃度マクロライド療法が存在するが、近年の研究により緑膿菌には低濃度マクロライド処理によって一酸化窒素 (NO) に対する抵抗性が低下しない株が存在することが明らかになった。そこで緑膿菌の低濃度マクロライド効果を阻害する因子を明らかにすることを試みた。【方法】緑膿菌標準株である PAO1 株を親株として、薬剤排出ポンプ遺伝子の強制発現株を発現プラスミドを用いて作製した。マクロライドとして 10 μg/mL エリスロマイシン、NO donor として 100 μM DETA NONOate、排出ポンプ阻害剤として PAβN 10 μg/mL を用いた。薬剤排出ポンプ遺伝子発現はリアルタイム RT-PCR 法によって確認した。【結果】PAO1 株で排出ポンプ阻害剤を加えると低濃度マクロライド処理による NO 抵抗性の低下が亢進した。そこで PAO1 株由来の 4 種類の薬剤排出ポンプ遺伝子を欠失した変異株を親株として、それぞれの薬剤排出ポンプ遺伝子を保持した強制発現株、およびプラスミドコントロール株を作製し解析を行った。その結果、3 種類の薬剤排出ポンプ強制発現株 (*mexAB-oprM* 保持株, *mexCD-oprJ* 保持株, *mexXY, oprM* 保持株) で低濃度マクロライド効果が阻害された。一方, *mexEF-oprN* 保持株は低濃度マクロライド条件下で増殖自体が阻害されたため、この薬剤排出ポンプは低濃度マクロライド効果の阻害には関与していないことが明らかになった。

## P1-184

## 大腸菌ファージの生理学的特徴に基づいた効果的なカクテル作成手法の提案

○金子 知義<sup>1</sup>, 大坂 利文<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1,3</sup> (1)早大・先進理工学・生命医科, (2)東女医大・医・微生物免, (3)早大・ファージセラピー研)

Physical of long-lasting phage cocktail based on physiological properties of *E. coli* phages

○Tomoyoshi Kaneko<sup>1</sup>, Toshifumi Osaka<sup>2</sup>, Satoshi Tsuneda<sup>1,3</sup> (1)Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., (2)Dept. Microbiol. Immunol., Tokyo Wom. Med. Univ., (3)Phage Therapy Inst., Waseda Univ.)

【背景】近年、細菌感染症の治療戦略としてファージセラピーの有用性が見直されつつある。ファージセラピーでは、耐性菌の出現を考慮して複数のファージを混合したカクテルが利用される。しかし、実効性の高いファージカクテルの調製方法に関する科学的な指針はない。そこで本研究では、大腸菌ファージ株の生理学的特性に基づいて殺菌持続効果が高いファージカクテル (標的細菌: 大腸菌) の調製方法について検討した。

【方法】二重平板法を用いて、大腸菌 (マウス糞由来) を溶菌するファージを下処理場の排水から単離した (合計 29 株)。各ファージ分離株について、濁度を指標として大腸菌の溶菌動態を計測した。明確な溶菌特性を示した 13 株の大腸菌ファージを選定し、これらファージの生理学的特徴 (吸着定数, パーストサイズ, 一日培養後のタイター, 感染域) を調査した。これらの測定値と濁度計測における溶菌開始時間と溶菌持続時間を正規化して主成分分析を行った。さらに、各ファージの各主成分のユークリッド距離を算出し、階層クラスタリングを行った。同じあるいは異なるクラスターに属するファージを 2 株用いたカクテルを 78 パターン作成し、溶菌活性を評価した。また、各ファージの全ゲノム解析を行い、ゲノムの類似度を計算した。【結果・考察】生理学的特徴に基づくクラスタリングとゲノムの類似度によるグルーピングは 1 つの例外を除き一致した。カクテルを構成するファージのクラスターが互いに異なる場合、溶菌開始時間および溶菌持続時間はばらつきが大きくなる傾向があった。この結果は効果的なファージカクテルを調整するための必要条件を示唆している。

## P1-185

### Fundamental experiments on the creation of neuro-directed molecules using bacterial toxins

○大西 舞衣子, 鳥居 恭司 (東京農大 農・動物)

○Maiko Onishi, Yasushi Torii (Grad. Sch. Tokyo Univ of Agriculture)

【目的】運動神経疾患に対する薬剤を標的部位に効率よく送達する分子が求められており、細菌毒素である破傷風毒素が注目されている。この毒素は末梢神経で抑制性神経伝達物質を含むシナプス小胞からの放出を阻害するため、筋肉の痙攣やこわばりなど興奮性の症状が起こる。最も特徴的な機能は血行性およびリンパ行性的に末梢神経から侵入し、中枢神経へと逆行的に移動することである。この特徴を利用することで中枢神経系の疾患に対する薬剤を効率的に標的部位へ送達できるベクターとしての可能性がある。本研究では、毒性がない破傷風毒素フラグメント B および C を用いた抗破傷風抗体を N 末端に結合した神経指向性分子作製を目的とした。【方法】*Clostridium tetani* の培養を行ったのち、DNA を抽出した。フラグメント B および C の DNA 断片の増幅を PCR により行った。抗破傷風抗体可変部の cDNA の合成は破傷風トキソイドにより免疫した BALB/c マウス脾臓から RNA を抽出し、ファーストストランド cDNA および PCR 法により増幅させた。フラグメント B および C と抗体可変部をコードする配列を含むプラスミドを作製したのち、大腸菌を用いて目的タンパク質の産生を行い回収し目的のタンパク質が発現していることを確認した。その後、産生した毒素は破傷風毒素に対する中和効果を *in vitro* で確認し、マウスを用いた *in vivo* でも作用の確認を行った。【結果】今回作製した分子は神経を逆行する毒素に対して中和効果が期待され、*in vivo* による試験でも中和効果が期待でき、興奮性の症状を緩和できると考えている。

## P1-186

### 漬物由来乳酸菌 *Carnobacterium maltaromaticum* 株給餌が線虫 (*C. elegans*) の健康寿命に与える影響

○橋本 実奈<sup>1,2</sup>, 清水 利朗<sup>2</sup>, 和田 崇之<sup>1</sup>, 中台 (鹿毛) 枝里子<sup>1</sup> (1大阪公立大 生活科学, 2安田女子大 家政)

### The effect of *Carnobacterium maltaromaticum* isolated from pickles on healthspan in *C. elegans*

○Mina Hashimoto<sup>1,2</sup>, Toshiaki Shimizu<sup>2</sup>, Takayuki Wada<sup>1</sup>, Eriko Nakadai-Kage<sup>1</sup> (1Grad. Sch. Hum Life Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2Dept. Nutr. Sci., Fac. Home Ecol., Yasuda Women's Univ.)

【背景・目的】自家製の白菜の漬物から乳酸菌を分離し、生化学的性状検査により菌種の同定を行った結果、得られた菌株は *Carnobacterium maltaromaticum* であることが明らかとなった。*C. maltaromaticum* は、自然界や食品に広く存在する乳酸菌であり、これまでにチーズなどの乳製品や食肉、魚、環境中から分離されているが、漬物から分離された事例は我々の報告が初めてである。この菌種の特徴としては、*Listeria monocytogenes* など一部のグラム陽性菌に対するバクテリオシンを産生する株が複数報告されている。しかし、*C. maltaromaticum* が生体に与える影響を詳しく調べた研究はほとんどない。そこで本研究では線虫をモデルとして、*C. maltaromaticum* が生体に与える影響について検討した。

【方法】同時期に孵化した線虫 Bristol 株 N2 を標準的な餌である非病原性大腸菌株 OP50 (OP) を用いて線虫育成用寒天平板上で成虫となるまで飼育した。その後、*C. maltaromaticum* と OP を 3:7 の比率で混合した餌を給餌する群を設け、引き続き OP を与え続けた群と寿命を比較した。さらに運動能について、老齢期における線虫の運動性を 4 段階スコアで評価し、OP 給餌群と比較した。

【結果と考察】OP 給餌群と比較して、*C. maltaromaticum* と OP の混合給餌群で有意に線虫の寿命が延長したことから、漬物由来 *C. maltaromaticum* 株は抗老化作用を有する可能性が示唆された。また、老齢期における運動能についても *C. maltaromaticum* 給餌により改善が認められたことから、漬物由来 *C. maltaromaticum* 株は単に寿命を延長するだけでなく、健康寿命の延伸にも寄与している可能性が考えられる。

## P2-001

### 2 種の *Pantoea* 属新菌種にみられた異なる Siderophore 産生能

○久網 僚<sup>1</sup>, 秋山 徹<sup>2</sup>, 村松 由貴<sup>3</sup>, 富田 純子<sup>1</sup>, 菊池 賢<sup>4</sup>, 河村 好章<sup>1</sup> (1愛知学院大・薬・微生物, 2国立国際医療研究センター研究所・感染症制御, 3(独)製品評価技術基盤機構・NBRC, 4東京女子医大・医・感染症)

### Two novel species of the genus *Pantoea* showed different siderophore productivity

○Ryo Kutsuna<sup>1</sup>, Tohru Miyoshi-Akiyama<sup>2</sup>, Yuki Muramatsu<sup>3</sup>, Junko Tomida<sup>1</sup>, Ken Kikuchi<sup>4</sup>, Yoshiaki Kawamura<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ., 2Dept. Infect. Dis. Nat. Cent. Global Health Med., 3Biol. Resour. Ctr., Natl. Inst. Technol. Evaluation., 4Dept. Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical Univ.)

敗血症患者 (PAGU 2156) および土壌 (PAGU 2198) から、2 つのグラム陰性通性嫌気性菌が分離された。16S rRNA 遺伝子に基づき *Pantoea* 属に分類される 2 株は、複数のハウスキーピング遺伝子を用いた MLSA により、既存種とは異なる系統学的位置に存在することが明らかとなった。全ゲノムレベルでの比較により、PAGU 2156 は近縁種との相対値  $\leq 90.3\%$  を示し、PAGU 2198 は  $\leq 81.5\%$  を示したことから、それぞれが *Pantoea* 属の新菌種 (菌種判定の閾値 95%) であると認められた。既存種との表現型および生化学特性を比較したところ、至適発育 pH、菌体脂肪酸組成、糖類発酵能など、既存種とは明確に区別された。これらの有用な鑑別性状に基づき、2 株を *Pantoea* 属の新菌種として提案する予定である。これらの株は、CAS 培地での培養により Siderophore 産生を認め、CAS assay からは 2 株の Siderophore 産生量に差があることが明らかとなった。Siderophore は、鉄欠乏環境下にて細菌が産生する、周囲の微量鉄分を菌体内に取り込むためのキレート剤である。*Pantoea* 属菌種は、植物、水、土壌、食品、動物、ヒト組織など様々な環境に存在することから、この適応性は多様な Siderophore システムに基づくものであると考えられる。これまで 500 種類以上の Siderophore が発見され、金属キレート剤として様々な場面での応用が期待されている。今回見出された 2 つの新菌種が産生する Siderophore の詳細な解析によって、新たな利用法が見つかるかもしれない。

## P2-002

### 国内外の豚から分離された *Salmonella Choleraesuis* の遺伝学的系統とその性状

○新井 暢夫<sup>1</sup>, 玉村 雪乃<sup>1</sup>, 渡部 綾子<sup>1</sup>, 岩田 剛敏<sup>1</sup>, 桃木 杏奈<sup>1</sup>, 楠本 正博<sup>1,2</sup> (1農研機構・動衛研, 2大阪公立大 獣医)

### Phylogenetic characteristics of *Salmonella Choleraesuis* isolated from swine in Japan and overseas

○Nobuo Arai<sup>1</sup>, Yukino Tamamura<sup>1</sup>, Ayako Watanabe<sup>1</sup>, Taketoshi Iwata<sup>1</sup>, Anna Momoki<sup>1</sup>, Masahiro Kusumoto<sup>1,2</sup> (1Natl. Inst. Anim. Health, NARO, 2Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ.)

【目的】*Salmonella Choleraesuis* (SC, 7:c:1,5) は豚のサルモネラ症の主要な原因血清型であり、我が国の豚群には H2S 非産生の生物型 *Choleraesuis* (SCC) と H2S 産生の生物型 *Kunzendorf* (SCK)、さらに SC と抗原構造が類似した 7:c:- が分布している。一方で、我が国で分離される両生物型間および SC と 7:c:- 間における遺伝的な関係性は不明である。本研究では国内外で分離された SC の遺伝学的系統を解析し、家畜衛生上注視すべき特徴を持つ系統を明らかにすることを目的とした。

【方法】1990 年から 2021 年にかけて 25 道県の病豚、健康豚およびイノシシから分離された SC 250 株、7:c:- 15 株を収集し、Illumina HiSeq X Ten あるいは NovaSeq6000 でシーケンス、ドラフトゲノム情報を取得した。公共データベースより豚由来株を中心に SC 209 株のゲノム情報を取得し、コアゲノム内の一塩基多型に基づく系統解析を行った。国内分離株について、様々なカテゴリーの 22 薬剤に対する薬剤感受性を調査した。

【結果・考察】系統解析および hierBAPS によるクラスタリングの結果、SC は 5 つのクレードに分けられた。クレード 1-3 は主に SCK、クレード 4, 5 は SCC で構成され、両生物型は遺伝的に異なる系統であることが明らかとなった。7:c:- はクレード 1 の亜系統に集約され、SCK の単相変異株であると考えられる。国内株は両生物型ともにストレプトマイシン、サルファ剤に 60% を超える耐性率を示し、95% の SCC はテトラサイクリンに耐性を示した。さらに SCC ではアジスロマイシンに耐性を示す亜系統がクレード 5 に存在し、本系統は多剤耐性傾向が顕著であるため (3~9 剤・平均 7 剤)、薬剤耐性の観点から家畜衛生上の高リスク系統と考えられる。

## P2-003

## Whole Genome Analysis of Zoonotic Transmission of LA-MRSA from Pigs to Humans in Thailand

○Pawarut Narongpun<sup>1</sup>, チャンチャイトンパッタラット<sup>2</sup>, 山岸 潤也<sup>3</sup>, 中島 千絵<sup>1</sup>, 鈴木 定彦<sup>1</sup> (1北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・バイオリソース部門, <sup>2</sup>Dept. Vet. Microbiol., Fac. Vet. Sci., Chula Univ., <sup>3</sup>北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・国際協力教育部門)

○Pawarut Narongpun<sup>1</sup>, Patrarat Chanchaithong<sup>2</sup>, Junya Yamagishi<sup>3</sup>, Chie Nakajima<sup>1</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1</sup> (1Div. Bioresources, IIZC., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Dept. Vet. Microbiol., Fac. Vet. Sci., Chula Univ., <sup>3</sup>Div. Collab. Edu., IIZC., Hokkaido Univ.)

Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) is an emerging MRSA in livestock, particularly pigs. It possesses a mobile genetic element, termed staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). Therefore, it can acquire resistant genes against multiple antimicrobial classes. This study aims to determine the comparative genomics of LA-MRSA sequence type (ST) 398 from swine workers and their pigs in Central Thailand using whole-genome sequencing (WGS). We collected a total of 505 nasal swabs from pigs ( $n=467$ ) in 27 farms and volunteered farmers ( $n=38$ ) in 16 farms during May 2015- April 2017. Sixty-three LA-MRSA were isolated and characterized in Thailand. Consequently, the representatives of each group with unique characterization, including livestock isolates ( $n=13$ ) and human isolates ( $n=3$ ) were sequenced on Illumina Miseq sequencer in Japan. The phylogenetic analysis based on single nucleotide polymorphisms (SNP) in the core genomes revealed 2 different clusters of LA-MRSA ST398, meanwhile, human and swine isolates were closely related, differing by 3 to 11 SNPs. This finding supports the potential zoonotic transmission of ST398. Also, the small number of SNPs could indicate the recent transmission events between the two species. This study demonstrates the capability of WGS to identify zoonotic transmission of LA-MRSA.

## P2-004

国内流通冷凍野菜における *Listeria monocytogenes* 汚染状況

○岡田 由美子<sup>1</sup>, 鈴木 穂高<sup>2</sup>, 渡邊 愛<sup>2</sup>, 中庭 美玲<sup>2</sup>, 百瀬 愛佳<sup>1,2</sup> (1国衛研・食品衛生管理, <sup>2</sup>茨城大・農)

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in frozen vegetables retained in Japan

○Yumiko Okada<sup>1</sup>, Hodaka Suzuki<sup>2</sup>, Ai Watanabe<sup>2</sup>, Mirei Nakaniwa<sup>2</sup>, Yoshika Momose<sup>1,2</sup> (1Div. Biomedical Food Res., Nat. Inst. Health Sci., <sup>2</sup>Col. Agric. Ibaraki Univ.)

【背景・目的】*Listeria monocytogenes* (Lm) は主に食品を介してヒトに髄膜炎や敗血症、流産を引き起こす。国内ではリステリア症の報告義務がなく発生状況は不明であるが、欧米では様々な食品による集団事例が頻繁に発生している。2015~2018年には欧州5か国で冷凍コーンによる集団事例(患者47名, 死者9名)が発生した。本研究では、国内の市販冷凍野菜におけるLmの汚染状況を調べると共に、分離菌株と研究室保有株のMLST解析を行った。【方法】2020年から2021年に購入した市販の冷凍野菜97検体(枝豆38, コーン23, ほうれん草20, インゲン9, アスパラガス7)について、ISO 11290-1:2017(定性法)及びISO 11290-2:2017(定量法)に従ってリステリア属菌を分離し、分離されたLm菌株についてMLST解析を実施した。【結果・考察】97検体中3検体(3.1%)がLm陽性であり、いずれも汚染量は10 CFU/g未満であった。陽性コーン2検体はハンガリー原産で、2菌株の血清型は1/2a, 枝豆1検体は国産で、菌株は1/2bであった。MLST解析の結果、コーン由来2株は multi-locus sequence Type (ST) 8Clonal Complex (CC) 8, 枝豆由来株は ST429CC429であった。ハンガリー産コーンによる欧州集団事例の原因菌はST6だが、2019年の英国での調査でST8等に属する複数の菌株が分離されており、様々なSTの菌に汚染されたハンガリー産コーンが、集団事例発生後も日本を含む世界各国に流通していることが示された。

## P2-005

大腸菌における *astA* 遺伝子バリエーションの同定およびその分布

○大岡 唯祐<sup>1</sup>, 後藤 恭宏<sup>2</sup>, 林 哲也<sup>2</sup>, 西 順一郎<sup>1</sup> (1鹿児島大・医歯学・微生物, <sup>2</sup>九州大院・医・細菌学)

The identification and prevalence of the *astA* variants in *Escherichia coli*

○Tadasuke Ooka<sup>1</sup>, Yasuhiro Gotoh<sup>2</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>2</sup>, Junichiro Nishi<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.)

【背景と目的】近年、患者数2,529人にのぼる集団事例を筆頭に、*astA* 遺伝子(耐熱性エンテロトキシン EAST1をコードする)保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、食中毒予防対策が必要とされている。一方、複数の*astA* 遺伝子バリエーションが同定されているものの、その機能や病原性についても未解明な点が多い。本研究では、既に収集済みの下痢症患者由来大腸菌(約3,000株)、NCBIなど公開データベースに登録された大腸菌ゲノム配列(約9,000株)を対象に、*astA* 遺伝子陽性株を網羅的に同定し、その進化系統関係と*astA* 遺伝子バリエーションの分布を明らかにする。【方法】下痢症患者由来大腸菌3,000株について*astA* 遺伝子のPCRスクリーニングを実施し、陽性株についてMulti-locus sequence analysis (MLSA)による系統解析を行った。作成した系統樹から系統の異なる株を30株程度選定、MiSeqによりドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBIなど公開DB上に存在する大腸菌ゲノム配列(約9,000株)から*astA* 遺伝子保有株のゲノム配列を網羅的に取得した。前述の株と併せて大規模ゲノム比較解析・系統解析を行うとともに、*astA* 遺伝子バリエーションとの相同性や局在、また、そのコピー数を明らかにした。【結果と考察】分離株から194株、データベース登録株から713株の*astA* 遺伝子陽性株を同定した。これらデータベース登録株およびドラフトゲノム配列取得株のゲノム情報から、35種類の*astA* 遺伝子バリエーションを同定した。現在、これら*astA* 遺伝子バリエーションについて発現およびその機能の違いを含めた病原機構の解明を進めている。

## P2-006

Comparative Genomic Analysis of Macrolide Resistant *Bordetella pertussis* Isolated in Japan

○小出 健太郎<sup>1</sup>, 内谷 友美<sup>2</sup>, 山口 貴弘<sup>3</sup>, 大塚 菜緒<sup>1</sup>, 後藤 雅貴<sup>1</sup>, 見理 剛<sup>1</sup>, 蒲地 一成<sup>1</sup> (1国立感染症研究所・細菌第二部, <sup>2</sup>東京都健康安全研究センター・微生物部, <sup>3</sup>大阪健康安全基盤研究所・微生物部)

○Kentaro Koide<sup>1</sup>, Yumi Uchitani<sup>2</sup>, Takahiro Yamaguchi<sup>3</sup>, Nao Otsuka<sup>1</sup>, Masataka Goto<sup>1</sup>, Tsuyoshi Kenri<sup>1</sup>, Kazunari Kamachi<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriol. II., Natl. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Div. Microbiol., Tokyo Metropol. Inst. Public Health., <sup>3</sup>Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health.)

Macrolide resistant *Bordetella pertussis* (MRBP) has been prevailing in mainland of China and spreading to other Asian countries. In Japan, two isolates of MRBP, BP616 and BP625, were collected in 2018 in Osaka and Tokyo, respectively. The objective of this study was to clarify the genetic relationship of these MRBP isolates.

A whole genome single nucleotide variant (SNV) analysis was performed for BP616 and BP625 to infer phylogenetic relationships. Publicly available sequence data of Chinese and Japanese isolates were included in the analysis and SNV-based phylogenetic tree was constructed with a maximum parsimony method. Furthermore, genome structure was compared between BP616 and BP625. Genome sequences were aligned using progressiveMauve and colinear genomic regions were determined if alignments included no observable inversions or gaps of >1,500 bp.

In the phylogenetic tree, BP616 and BP625 belonged into a same clade which was consisted of Chinese MRBP. However, between BP616 and BP625, nine SNVs were detected in their coding regions, and their genome structures were not identical. Large-scale structural rearrangements involving inversions and translocation were identified between them, indicating that the two MRBP isolates were genetically distinct. This study provides evidence that the two Japanese MRBP isolates were imported individually from mainland China to Japan.

## P2-007

ペースメーカー関連菌血症患者から分離されたバンコマイシン中程度耐性 MRSA のゲノム解析

○漆原 範子, Meiji Soe Aung, 川口谷 充代, 小林 宣道 (札幌医科大学・医・衛生)

### GENOMIC ANALYSIS OF A VANCOMYCIN-INTERMEDIATE MRSA FROM PACEMAKER-ASSOCIATED SEPTICEMIA, HOKKAIDO

○Noriko Urushibara, Meiji Soe Aung, Mitsuyo Kawaguchiya, Nobumichi Kobayashi (Dept. Hygiene, Sch. Med., Sapporo Medical Univ.)

The molecular basis of intermediate vancomycin (VCM) resistance in *S. aureus* (VISA; minimum inhibitory concentration [MIC], 4-8 mg/L) is polygenic, involving stepwise mutations in multiple genes. We investigated the genomic changes related to reduced susceptibility to VCM in an MRSA from pacemaker-associated septicemia (HV2019-1) obtained in Hokkaido (Sakurada M *et al.*, 2020). The whole-genome sequence of HV-2019-1 was determined and compared with that of the VCM-susceptible MRSA strain (SH1966) obtained in Hokkaido (Aung MS *et al.*, 2018). Comparative analysis detected amino acid substitutions in following molecules: WalR (Ala38Val); WalK (Ile304Val); GraS (Ile18Leu). The regulatory genes *walKR* and *graSR* are most frequently implicated in VISA phenotype, and the identical substitution in GraS is reported from the United States (Hafer C *et al.*, 2012). In addition, nonsense mutation occurred in *yjbH* resulting in deletion of its C-terminal region. Contributions of the adaptor protein YjbH to reduced virulence gene expression/pigment production (Paudel A *et al.*, 2021), and VCM resistance (Renzoni A *et al.*, 2011) have been demonstrated in laboratory strains. HV-2019-1 formed smaller colonies with reduced pigmentation, and produced a smaller zone of haemolysis/proteolysis. Above genetic alterations in HV-2019-1 are consistent with prior works, and can have some impact on its phenotype.

## P2-008

### Phylogenetic analysis of a pathogen candidate "IOLA" detected in pediatric nasal discharge

○福田 和正<sup>1</sup>, 波呂 薫<sup>1</sup>, 山崎 啓<sup>2</sup>, 齋藤 光正<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産業医大・医・微生物学, <sup>2</sup>産業医大・医・呼吸器内科学)

○Kazumasa Fukuda<sup>1</sup>, Kaoru Haro<sup>1</sup>, Kei Yamasaki<sup>2</sup>, Mitsumasa Saito<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol., Sch. Med., UOEH Univ., <sup>2</sup>Dept. Respir. Med., Sch. Med., UOEH Univ.)

"IOLA" is a pathogenic bacterium candidate detected in BALF specimens derived from adult patients with chronic lower respiratory tract infection. Since the culture method for IOLA has not been established, its biological properties are still unclear. We conducted surveillance of IOLA in nasal discharge specimens from children. Nasal discharge specimens (1,920 samples) were collected from children with nasal discharge symptoms, and IOLA-positive specimens were screened using IOLA-specific PCR. Genetic diversity was analyzed based on IOLA 16S rRNA gene sequences. IOLA was detected in 5.4% frequency in pediatric nasal discharge samples. No significant differences in the frequency of detection due to patient's background were observed. However, regarding age, the frequency of detection significantly tended to be high at 2 to 3 years old and 6 years old. The phylogenetic analysis revealed that there are 5 phylotypes in the IOLA 16S rRNA gene sequences and the sequences detected in adult patients with respiratory infections were one of the 5 phylotypes. The involvement of IOLA in symptoms is not clear, but IOLA are detected with relatively high frequency in pediatric nasal discharge. It was suggested that IOLA is horizontally transmitted through group living in nursery schools and elementary schools and that there is a difference in pathogenicity among IOLA genotypes.

## P2-009

*Starmerella* 属の血流感染症起因菌二種と非病原性近縁種の抗真菌薬感受性プロファイル

○狩野 大樹<sup>1</sup>, 永塚 (半田) 由佳<sup>1</sup>, 伴 さやか<sup>2</sup>, 佐藤 雄己<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福山大・薬, <sup>2</sup>千葉大真菌セ)

### Antifungal susceptibility profiles of two fungemia-causing and one nonpathogenic *Starmerella* species

○Daiki Kano<sup>1</sup>, Yuka Nagatsuka<sup>1</sup>, Sayaka Ban<sup>2</sup>, Yuhki Sato<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Sch. Pharm. Sci., Fukuyama Univ., <sup>2</sup>Med. Mycology. Research. Center Chiba Univ.)

【背景および目的】薬剤感受性不明の広義カンジダ菌に起因する真菌血症に対する標的治療の実現を目指し、非病原性カンジダ菌を含む広義カンジダ菌について、分子系統分類と薬剤感受性との関連を検討してきた。本研究では、千葉大学真菌医学研究センターに保存される血液由来の広義カンジダ菌の菌種調査で見出した新規血流感染症起因菌 *Starmerella sorbosivorans* および、これに近縁な血流感染症起因菌 *S. magnoliae*、非病原性 *S. geochares* の薬剤感受性を比較することを目的とした。

【方法】供試菌株は、真菌血症患者の血液由来 IFM 62310 および IFM 65170 を含む *S. sorbosivorans* 計 5 株, *S. magnoliae* NBRC 0705<sup>T</sup>, *S. geochares* NBRC 10278<sup>T</sup> とした。薬剤感受性試験は微量液体希釈法 (CLSI, M27) に拠り、抗真菌薬 6 剤 (フルコナゾール, イトラコナゾール, ポリコナゾール, フルシトシン, アムホテリシン, ミカファンギン) を用いた。薬剤感受性試験の培養温度 35°C で生育しない *S. geochares* は 28°C で試験し, *S. sorbosivorans* および *S. magnoliae* は 35°C と 28°C で試験した。

【結果・考察】*S. sorbosivorans* および *S. magnoliae* の 6 株の MIC 値は、35°C と 28°C で類似しており、35°C で生育不可の株は 28°C で得た MIC 値を 35°C の MIC 値と比較可能と判断した。*S. sorbosivorans* および *S. magnoliae*、これに近縁な非病原性 *S. geochares* の計 3 種は類似した薬剤感受性プロファイルを示し、本分類群に起因する血流感染症に対する最適治療薬の候補はポリコナゾールおよびミカファンギンであると示唆された。

## P2-010

### Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in North-Eastern Parts of Nigeria Abstract

○David Barnes<sup>1</sup>, Mohammed Damina<sup>2</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1</sup>, Chie Nakajima<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Div. Bioresources, Grad. Sch. Infectious Diseases, Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Div. Bioresources, Grad. Sch. Infectious Diseases, Hokkaido Univ.)

Bovine Tuberculosis (bTB) is a chronic bacterial disease of animals with zoonotic potential caused primarily by *Mycobacterium bovis*. bTB remains a significant public health problem in Africa because of many factors such as lack of robust control strategies: test and slaughter of reactor cattle, unregulated livestock trade; the porous borders between Nigeria and neighboring countries. The knowledge of circulating strains of *M. bovis* is crucial for improving our understanding of bTB. In this study 17 isolates from suspected cattle tissue samples collected from abattoirs in two States (Adamawa and Gombe States) in north-eastern Nigeria that share borders were analyzed. Spoligotyping and MIRU-VNTR was used to interrogate different highly polymorphic markers in the *M. bovis* genome to identify lineages and relationships between these isolates. Spoligotyping identified 4 profiles with SB1025 & SB0944 being the dominant types (29.4% & 35.3% respectively). The MIRU-VNTR revealed a clustering rate of 0.53 and differentiated the 4 spoligotypes into 8 genotypes. We observed genetic similarities between isolates from this study and isolates from Ghana in a previous study, which suggests some transmission links may exist. This study gives crucial evidence for the creation of improved bTB control strategies.

## P2-011

Comparative genomic analysis of *Leptospira* spp. isolated from rats in East Asian countries

○小泉 信夫<sup>1</sup>, 森田 昌知<sup>1</sup>, 大西 真<sup>1</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, 三浦 こそえ<sup>2</sup> (1)感染研・細菌一, (2)東大院・農学生命科学)

○Nobuo Koizumi<sup>1</sup>, Masatomo Morita<sup>1</sup>, Makoto Ohnishi<sup>1</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup>, Kozue Miura<sup>2</sup> (1)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., (2)GSALS, Tokyo Univ.)

Leptospirosis is one of the most prevalent zoonotic diseases caused by pathogenic spirochetes of *Leptospira* spp. The disease has become a public health concern in urban localities in the tropics, where rats serve as significant reservoir animals for leptospirosis transmission. *L. borgpetersenii* serogroup Javanica (Lb Javanica) and *L. interrogans* serogroup Bataviae (Li Bataviae) are widely distributed in rats in East Asian. In this study, whole genome sequencing was performed on Lb Javanica and Li Bataviae isolates from six East Asian countries. The SNP-based phylogenetic trees showed that the Lb Javanica and Li Bataviae strains were grouped into eight and five clusters, respectively, based on their geographic location, indicating geographical structuring of genetic diversity in these strains. Phylogenetic analysis indicated that the Lb Javanica can infect various animal species, thus making these strains generalist pathogens, whereas Li Bataviae is a specialist for brown rats. The data indicate that the host specificities of Lb Javanica and Li Bataviae are different, but they can be genetically diversified in a geographic manner.

## P2-012

## Corynebacterium roxii におけるジフテリア毒素遺伝子保有毒素非生産株について

○油谷 雅広<sup>1</sup>, 菊池 俊<sup>2</sup>, 森田 昌知<sup>3</sup>, 岩城 正昭<sup>1,4</sup>, 妹尾 充敏<sup>1</sup> (1)細菌第二部・国立感染研, (2)細菌・千葉衛研, (3)細菌第一部・国立感染研, (4)安全実験管理部・国立感染研)

The first report of nontoxigenic tox-bearing strain of *Corynebacterium roxii*

○Masahiro Yutani<sup>1</sup>, Takashi Kikuchi<sup>2</sup>, Masatomo Morita<sup>3</sup>, Masaaki Iwaki<sup>1,4</sup>, Mitsutoshi Senoh<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol. II, National Inst. Infect. Dis., (2)Div. Bacteriol., Chiba Pref. Inst. Public Health, (3)Dep. Bacteriol. I, National Inst. Infect. Dis., (4)Management Dep. Biosafety, Lab. Animal, and Pathog. Bank, National Inst. Infect. Dis.)

Diphtheria is caused by diphtheria toxin produced by *Corynebacterium diphtheriae* toxigenic strains carrying diphtheria toxin gene. Pet cat had medical examination caused by skin lesion, and colonies were grown on culture media by cultivation of skin lesion tissue. The isolate was identified as *C. diphtheriae* by mass spectrometry at an inspection company. Then, the isolate was found to be positive for diphtheria toxin gene (*tox*) by LAMP method at Chiba Prefectural Institute of Public Health, and was sent to Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases for further analysis. PCR test was also positive for *tox* gene in NIID. However, the isolate did not produce diphtheria toxin according to the results of Vero cell test, indicating the strain as “nontoxigenic and toxin gene-bearing (NTTB) one”. Based on molecular phylogenetic analysis using *rpoB* sequences and pan-genomic analysis, the isolate was re-identified as *Corynebacterium roxii*. No *C. roxii* strain carrying *tox* gene has been previously reported. We thus report here the isolate as the first NTTB *C. roxii*.

## P2-013

## mP-BIT に基づく食中毒患者由来カンピロバクター菌株の特徴とバイオフィーム形成性

○中村 寛海<sup>1</sup>, 秋吉 充子<sup>1</sup>, 山本 香織<sup>1</sup>, 梅田 薫<sup>1</sup>, 小笠原 準<sup>1</sup>, 平井 佑治<sup>1</sup>, 野本 竜平<sup>2</sup>, 朝倉 宏<sup>3</sup> (1)大安研・微生物, (2)国立衛研・食品衛生管理, (3)神戸市健康研・感染症部)

mP-BIT typing of *Campylobacter* strains from food-poisoning patients and their biofilm formation

○Hiromi Nakamura<sup>1</sup>, Atsuko Akiyoshi<sup>1</sup>, Kaori Yamamoto<sup>1</sup>, Kaoru Umeda<sup>1</sup>, Jun Ogasawara<sup>1</sup>, Yuji Hirai<sup>1</sup>, Ryohei Nomoto<sup>2</sup>, Hiroshi Asakura<sup>3</sup> (1)Microbiology Section, Osaka Institute of Public Health, (2)Div. Biomed. Food Res., NIHS, (3)Dep. Infect. Dis., Kobe Inst. Health)

カンピロバクターによる食中毒は依然としてわが国の細菌性食中毒の中で最も事件数が多く、本菌による食中毒発生は制御できていない。本菌は好気性菌であるため、食中毒の発生には空気環境下での環境ストレスに適応する必要がある。本研究では、食中毒起因カンピロバクター菌株の特徴を知るため、multiplex PCR binary typing (mP-BIT) による型別を実施するとともに、これらのうちの主要なタイプについてバイオフィーム (BF) 形成試験を実施した。2011~20年に195事例から分離された655株の患者由来 *C. jejuni* および *C. coli* を mP-BIT に供した。mP-BIT の結果は対象とする19遺伝子の保有の有無に基づき任意にタイプ番号を付与した。BF 形成試験は Reuter, et al. (Appl Environ Microbiol., 2010) に従って実施し、染色されたクリスタルバイオレット量として定量した。mP-BIT の結果、655株中549株の *C. jejuni* は101タイプ (J-01~J-101), 106株の *C. coli* は14タイプ (C-01~C-14) に分類された。*C. jejuni* で最も多く検出されたタイプは J-27 で44事例由来146株 (26.6%)、次いで J-35 が18事例由来35株、J-72 が9事例由来34株であった。J-27 は ST-22, J-35 は ST-4526, J-72 は ST-52 に型別され、mP-BIT は MLST と高い相関性が確認された。BF 形成試験の結果、J-27 は J-35 及び J-72 に比べて BF 形成量が低く、環境適応性が低いことが示唆された。

## P2-014

野生アライグマにおける *Escherichia albertii* の宿主内多様性

○日根野谷 淳<sup>1,2,3</sup>, 山崎 萌子<sup>2</sup>, 徐 炳イ<sup>3</sup>, Sharda Awasthi<sup>1</sup>, 畑中 律敏<sup>1,2,3</sup>, 山崎 伸二<sup>1,2,3</sup> (1)大工大・獣医・獣医国際防疫, (2)大工大・生命・獣医国際防疫, (3)大工大・生命・獣医国際防疫)

Within-host diversity of *Escherichia albertii* in wild raccoons

○Atsushi Hinenoya<sup>1,2,3</sup>, Moeko Yamazaki<sup>2</sup>, Bingting Xu<sup>3</sup>, Sharda Awasthi<sup>1</sup>, Noritoshi Hatanaka<sup>1,2,3</sup>, Shinji Yamasaki<sup>1,2,3</sup> (1)Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Met. Univ., (2)Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., (3)Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

*Escherichia albertii* is an emerging zoonotic enteropathogen. Recently, we have reported raccoons as a natural reservoir of this pathogen. Here, we extensively investigated *E. albertii* isolates from individual raccoons to know the within-host diversity of this pathogen. Rectal swabs were collected from 276 wild raccoons in Osaka between February 2020 and June 2021. Using *E. albertii*-specific real-time PCR targeting *Eacdt* gene, *E. albertii* was detected in 100 (36%) samples. Swab suspensions from 59 samples having 3.0 or more log<sub>10</sub> CFU/ml of *E. albertii*, were spread onto XRM-MacConkey agar, and 50-100 potential colorless colonies were collected for their species identification. Ten to seventy-five *E. albertii* isolates were obtained from each of 18 samples. Intra-sample genetic diversity of the isolates was examined by ERIC-PCR and PFGE, and 3, 2 and 1 genotypes were found in 2, 5 and 11 samples, respectively. The 27 isolates selected from each genotype were assigned to 14 different EAO genotypes. All 27 isolates carried virulence genes of *eae* and *paa*, but not *stx* and *Ecdt-I*. They were susceptible to all the 17 tested antimicrobials from 11 classes. In conclusion, there was heterogeneity of *E. albertii* at genetic level in 40% (7/18) of the wild raccoons from which multiple *E. albertii* could be isolated. Maximum 3 diverse *E. albertii* clones were identified in an individual raccoon.

## P2-015

### 新潟県における ESBL 産生 *Escherichia coli* の分子疫学調査

○前山 佳彦 (株式会社 江東微生物研究所)

#### Molecular epidemiological study of ESBL-producing *Escherichia coli* in Niigata Prefecture

○Yoshihiko Maeyama (Kotobiken Medical Laboratories, Inc.)

【目的】 現在国内で感染症治療のために高頻度で使用されている第3世代セファロスポリン系薬に耐性を示す ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) 産生菌の院内および市中環境における蔓延が危惧されている。今回我々は、新潟県における ESBL 産生 *Escherichia coli* の実態を把握することを目的とし、分子疫学調査を行った。【対象および方法】 2021年4月~9月までに新潟県の医療関連機関15施設で喀痰、尿、膈分泌液、褥瘡より分離された ESBL 産生 *E. coli* 82株を対象とした。ESBL 産生株はシカジーニウス ESBL 遺伝子検出キット2 (関東化学) を用いて PCR より遺伝子型を判定した。さらに、菌株間の遺伝的類縁関係を推定するために PCR-based ORF typing (POT 法) を実施して得られたバンドパターンから POT 型を決定した。【結果】 ESBL の遺伝子型を調べた結果、blaCTX-M-9 group が44株 (53.7%) と最も多く、次いで blaCTX-M-1 group が35株 (42.7%)、blaCTX-M chimera が3株 (3.6%) であった。一方、POT 法より POT-1 値が49を示したことから、現在世界中に拡散している ST131 クローンと推定された菌株は69株 (84.1%) であった。また、同一 POT 型を示す入院または外来患者由来株が全部で10種類確認された。【考察】 本研究により、blaCTX-M-1 group および blaCTX-M-9 group 保有 ST131 クローンは新潟県下において拡散している可能性が示唆された。今後はこれらの耐性菌が院内のみならず、地域全体に広がっていることを前提としうえて感染対策を行っていく必要がある。また、本邦での報告が稀な blaCTX-M chimera が検出されたことから、今後も継続的な調査が必要であると考えられた。

## P2-016

### 新潟県における ESBL 産生 *Escherichia coli* の分子疫学調査

○前山 佳彦<sup>1</sup>、古俣 竜一郎<sup>1</sup>、涌井 直樹<sup>1</sup>、大塚 正之<sup>1</sup>、西山 晃史<sup>2</sup>、松本 壮吉<sup>2</sup> (<sup>1</sup>株式会社 江東微生物研究所、<sup>2</sup>新潟大学・医歯学総合・細菌)

#### Molecular epidemiological survey of ESBL-producing *Escherichia coli* in Niigata Prefecture

○Yoshihiko Maeyama<sup>1</sup>, Ryuichirou Komata<sup>1</sup>, Naoki Wakui<sup>1</sup>, Masayuki Otsuka<sup>1</sup>, Akihito Nishiyama<sup>2</sup>, Sohkiichi Matsumoto<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Kotobiken Medical Laboratories, Inc., <sup>2</sup>Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

【目的】 感染症治療抗菌薬として繁用されている第3世代セファロスポリン系薬に耐性を示す extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生グラム陰性桿菌の院内および市中環境における蔓延が世界的に危惧されている。今回我々は、新潟県における ESBL 産生 *Escherichia coli* の拡散の実態を把握する目的で分子疫学調査を行った。【対象および方法】 2021年4月~9月までに新潟県の医療関連機関15施設で喀痰、尿、膈分泌液、褥瘡より分離された ESBL 産生 *E. coli* 82株 (入院患者由来56株、外来患者由来22株、不明4株) を対象とした。ESBL 遺伝子型の検出にはシカジーニウス ESBL 遺伝子検出キット2 (関東化学) を用いた。また、菌株間の遺伝的関連性を推定するために PCR-based ORF typing (POT 法) を実施して得られたバンドパターンから POT 型を決定した。【結果】 ESBL の遺伝子型は、blaCTX-M-9 group が44株 (53.7%) と最も多く、次いで blaCTX-M-1 group が35株 (42.7%)、blaCTX-M chimera が3株 (3.6%) であった。一方、82株中69株 (84.1%) が POT 法で POT-1 値が49を示し、現在世界中に拡散している ST131 流行クローンと推定された。また、入院、外来患者由来の間で5種類の POT 型が共有されていた。【考察】 本研究により、blaCTX-M-1 group および blaCTX-M-9 group 保有 ST131 クローンは新潟県下における医療施設の入院、外来患者の間で拡散している可能性が示唆された。今後は、本クローンをはじめ ESBL 産生 *E. coli* の拡散動向を監視していく必要がある。また、本邦での報告が稀な blaCTX-M chimera 保有株が3株検出されたことが注目され、遺伝子型の特異性を行う必要がある。

## P2-017

### バイオフィーム形成緑膿菌が産出する膜小胞へのリポトキシンの選択的封入

○竹井 奎多<sup>1</sup>、羽田 圭介<sup>2</sup>、菅野 美月<sup>1</sup>、二又 裕之<sup>1,3</sup>、田代 陽介<sup>1,4</sup> (<sup>1</sup>静大院・総合科研、<sup>2</sup>静大・工、<sup>3</sup>静大・グリーン研、<sup>4</sup>JST さきがけ)

#### Selective encapsulation of lipotoxin into membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

○Keita Takei<sup>1</sup>, Keisuke Haneda<sup>2</sup>, Mizuki Kanno<sup>1</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,3</sup>, Yosuke Tashiro<sup>1,4</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ., <sup>4</sup>JST PRESTO)

細菌の細胞膜表層から放出される直径20-400 nmの球状構造体「膜小胞」は細菌と同様の表層構造をもち、病原性因子やシグナル伝達物質などの成分を内包している。膜小胞は、細菌が集合し細胞外マトリクスによって内包された「バイオフィーム」を形成した際に産出量が増加し、また、多くの病原性因子が内包されていることが知られている。このため細菌は宿主への感染時に、病原性因子を多く内包する膜小胞を大量に産出することで宿主免疫を活性化し、炎症反応を引き起こしていることが考えられる。しかし病原性因子の封入メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株がバイオフィーム形成時に放出する膜小胞への病原性因子の選択的封入機構を明らかにすることを目的とした。浮遊およびバイオフィーム由来膜小胞のプロテオーム解析を実施したところ、バイオフィーム由来膜小胞に「リポトキシン」と呼ばれる炎症性毒素として作用するリポタンパク質である LptF が選択的に封入されていることが確認された。LptF-GFP 融合タンパク質発現株を作製し、膜小胞放出過程を蛍光顕微鏡観察したところ、固体表面への接着が膜小胞内への LptF 封入を活性化することが示唆された。また LptF 欠損株において膜小胞生産量およびバイオフィーム形成量が変化しなかったことから、膜小胞やバイオフィームを形成する過程で LptF が関与しないにも関わらず、選択的に内包することで何らかの機能を付与していることが考えられた。現在は LptF 欠損株を用いて膜小胞における LptF の機能探索を進めている。

## P2-018

### 硬ダニ媒介性回帰熱群ボレリア菌の表面抗原変換メカニズムの解明

○竹内 友陽<sup>1</sup>、後藤 恭宏<sup>2</sup>、林 哲也<sup>2</sup>、川端 寛樹<sup>3</sup>、高野 愛<sup>1</sup> (<sup>1</sup>山口大・獣医・疫学、<sup>2</sup>九州大・医、<sup>3</sup>感染研・細菌)

#### Mechanism of surface antigen conversion in hard tick-born relapsing fever group *Borrelia* spp.

○Tomohi Takeuchi<sup>1</sup>, Yasuhiro Gotoh<sup>2</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>2</sup>, Hiroki Kawabata<sup>3</sup>, Ai Takano<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Epi., Vet. Med., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Dept. Bacterial, Kyushu Univ, <sup>3</sup>Bacteriology-I, Nat. Inst. Infect. Dis)

*Borrelia miyamotoi* は1995年に北海道で最初に分離され、2011年に新興回帰熱の起原菌としてロシアで報告された後、日本を含むアジア、ヨーロッパ、アメリカ等で患者が報告されている。回帰熱群ボレリアが保有する表面抗原蛋白 Vlp/Vsp は、哺乳類体内で組換えが起こり、菌の表面抗原が変化することで宿主免疫からの回避に関与していることが知られている。しかしながら *B. miyamotoi* における Vlp/Vsp の病原性への関与や組換えメカニズムは不明であるため、これを明らかにすることを目的とした。マダニ分離株をクローニングして得た MYK2 A9 株、MYK4 C8 株をそれぞれ C57BL/6 マウスと SCID マウスに  $2 \times 10^5$  腹腔内接種し、経時的に全血を採取しリアルタイム PCR にて DNA copy 数を定量すると共に、TA cloning により発現カセットを解析した。また肝臓あるいは全血から再分離した株をクローニングし、発現カセットの解析を行った。最後に、接種株と再分離株についてパルスフィールドゲル電気泳動とサザンブロットを行い、プラスミド長の解析を行った。その結果、C57BL/6 マウスでは接種後15日以降は全血から菌が検出されなかったのに対し、SCID マウスは接種後31日まで菌血症が持続した。また、C57BL/6 マウスでは接種後5日目以降は発現カセットが変化しなかった一方、SCID マウスは接種後10日目以降は発現カセットが変化しなかった。接種後5日目に C57BL/6 マウスから分離された株は親株と比較してプラスミド長が大きく変化していた。これらの結果から、哺乳類体内にて比較的短時間で発現カセットが大きく変化していることが明らかとなった。今後は親株と再分離株のプラスミド解析を進め、組換えメカニズムの解明を目指す。



## P2-019

腸管出血性大腸菌 O157 における亜テルル酸耐性遺伝子 *tehA* 上の単一塩基置換による耐性の増強機序の究明

○李 謙一<sup>1</sup>, 本庄 颯人<sup>1,2</sup>, 赤坂 龍矢<sup>1,2</sup>, 松本 裕子<sup>3</sup>, 小泉 充正<sup>3</sup>, 佐藤 寿夫<sup>4</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, 大西 真<sup>1</sup>, 伊豫田 淳<sup>1</sup> (1)感研研・細1, (2)東京バイオテクノロジー専門学校, (3)横浜市衛生研究所, (4)株式会社 日本微生物研究所)

A point mutation on *tehA* increases tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

○Ken-ichi Lee<sup>1</sup>, Hayato Honjo<sup>1,2</sup>, Ryuya Akasaka<sup>1,2</sup>, Yuko Matsumoto<sup>3</sup>, Mitsumasa Koizumi<sup>3</sup>, Sumio Sato<sup>4</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup>, Makoto Ohnishi<sup>1</sup>, Sunao Iyoda<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol., Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Tokyo Coll. Biotech., (3)Yokohama Inst. Pub. Health, (4)Japan Biosciences Co., Ltd.)

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の多くは亜テルル酸カリウム (PT) への耐性遺伝子群 (*ter* オペロン) を有するため, 分離には選択剤として PT を含む培地が用いられている。2018 年に分離された同菌を PT 含有培地に塗抹したところ, 大小異なるコロニーが認められた。全ゲノム配列解析を行った結果, 両コロニーの株とも *ter* オペロンを保有せず, 大コロニーの株には別の PT 耐性遺伝子 (*tehA*) 上に 1 か所の塩基置換が存在した。そこで, 同変異が PT 耐性に与える影響の解析を行った。【材料・方法】Y32821 (小コロニー, Sakai と同様の *tehA*) または Y32859 (大コロニー, 変異型 *tehA*) が有する *tehAB* 発現プラスミドを Y32859 *tehAB* 欠失変異株に導入し, 相補株を作製した。同様の方法を *tehA* および *tehB* でも行い, それぞれの相補株を作製した。これらを用いて, PT への最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。次に, Y32821 および Y32859 における *tehA* および *tehB* の mRNA 発現量を定量 RT-PCR にて測定した。【結果・考察】Y32859 は *ter* オペロンを有する Sakai 株と同等の MIC 値を示した一方で, Y32821 は低い値を示した。*tehAB* 欠失変異株では MIC 値は低下し, 変異型 *tehAB* 相補株では PT 耐性が回復した。*tehA* 相補株では SNP の影響は見られず, *tehB* 相補株では SNP を上流に有する場合に, PT 耐性の上昇が認められた。定量 RT-PCR では, *tehA* の発現量に差はなかった一方, Y32859 における *tehB* の発現量は Y32821 に比べて約 160 倍高かった。*tehA* の SNP は *tehB* のプロモーター上にあり, 同 SNP がプロモーターを介して *tehB* の発現を高めることが示唆された。*tehA* の同変異は稀であるが, *ter* オペロン非保有大腸菌での PT 耐性につながるため EHEC 分離の上で注意が必要と考えられた。

## P2-020

## 大腸菌に感染する広域宿主域バクテリオファージの単離と性状解析

○小島 新二郎<sup>1</sup>, 田村 あずみ<sup>1</sup>, 山下 和可奈<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>1</sup>, 近藤 恒平<sup>2</sup>, 中村 暢宏<sup>1</sup>, 岩野 英知<sup>3</sup>, 高橋 宜聖<sup>1</sup>, 渡土 幸一<sup>1</sup>, 氣賀 恒太郎<sup>1</sup> (1)国立感染症・治ワク, (2)国立感染症・薬剤耐性研究センター, (3)酪農学園大学・獣医学科・獣医化学)

Isolation and Characterization of a Novel Broad-host-range Bacteriophage Infecting *Escherichia coli*

○Shinjiro Ojima<sup>1</sup>, Azumi Tamura<sup>1</sup>, Wakana Yamashita<sup>1</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>1</sup>, Kohei Kondo<sup>2</sup>, Tomohiro Nakamura<sup>1</sup>, Hidetomo Iwano<sup>3</sup>, Yoshimasa Takahashi<sup>1</sup>, Koichi Watashi<sup>1</sup>, Kotaro Kiga<sup>1</sup> (1)Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., (2)AMR Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., (3)Lab. Vet. Biochem. Dept. Vet. Med., Rakuno Gakuen. Univ.)

近年, 薬剤耐性菌による死亡者数が増加しており, 世界的な問題となっている。2020 年には薬剤耐性菌を起因とする死亡者数が年間 1,000 万人に達すると見積もられている。新たな抗菌薬の開発による治療は困難な状況にあり, 抗菌薬治療に依存しない治療方法が模索されている。これまでに, 抗菌薬治療の代替治療法として, 細菌を特異的に殺菌するウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)を用いたファージ療法が開発が試みられている。ファージ療法に成功した例がある一方で, 治療に最適な病原菌とファージの組み合わせを選択する工程は大変な労力を要しており, いまだに高効率で信頼性の高いファージ療法の実現には至っていない。そこで本研究では, 多くの抗菌薬治療に利用できるファージ, つまり広宿主域バクテリオファージの単離を目指した。令和 4 年度より関東地方の 6 ヶ所の施設から定期的に下水サンプリングを回収し, 環境中に生息する野生ファージの採取を行い, およそ 300 種類のファージを収集した。収集したファージの宿主域のスクリーニングや全ゲノム解析を並行して行い, 多種多様なファージが採取されていることを確認した。ファージの宿主域に限界はあったが, 宿主域に特徴のあるファージの単離に成功した。これらのファージは, これまで抗菌薬もファージ療法も効かなかった薬剤耐性菌に効果を発揮する可能性がある。

## P2-021

Characterization of *Rodentibacter* sp. that is closely related to *Rodentibacter haemolyticus*

○佐々木 啓<sup>1</sup>, 上芝 秀博<sup>2</sup>, 柳澤 直子<sup>2</sup>, 石川 裕樹<sup>3</sup>, 伊與田 雅之<sup>3,4</sup>, 池 郁生<sup>5</sup> (1)順天堂大スポーツ健康, (2)女子医大微生物免疫, (3)昭和大微生物免疫, (4)昭和大腎臓内科, (5)理研BRC)

○Hiraku Sasaki<sup>1</sup>, Hidehiro Ueshiba<sup>2</sup>, Naoko Yanagisawa<sup>2</sup>, Hiroki Ishikawa<sup>3</sup>, Masayuki Iyoda<sup>3,4</sup>, Fumio Ike<sup>5</sup> (1)Dept. Health Sci., Sch. Health Sci., Sports Sci., Juntendo Univ., (2)Dept. Microbiol. Immunol. Sch. Med., Tokyo Women's Med. Univ., (3)Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Showa Univ., (4)Div. Nephrol., Sch. Med., Showa Univ., (5)Riken BRC)

*Rodentibacter* spp. are opportunistic pathogens that cause lethal pneumonia in immunodeficient rodents. A new species, *R. haemolyticus*, has recently been classified in the genus, and a very closely related strain, *Rodentibacter* sp. strain JRC, has been isolated in Japan. This study focused on strain JRC by performing genomic and pathogenic analyses. Draft genome sequencing of strain JRC identified several genes coding for putative virulent proteins, including hemolysin and adhesin. Furthermore, we found a new RTX toxin gene in the genome, which was predicted to produce a critical virulence factor termed as RTXIA. We extracted the 110 kDa RTXIA from the strain JRC culture supernatant and showed that RTXIA had high cytotoxicity toward RAW264.7. Pre-incubation with anti-CD11a attenuated the cytolysis, suggesting that the RTXIA is cell surface LFA-1 mediated cytolysin. Experimental infection of strain JRC intranasally with BALB/c-*Rag2*<sup>-/-</sup> mice showed 60% lethality and was not significantly different from that of type strain *R. pneumotropicus* ATCC 35149<sup>T</sup> using the log-rank test. Combined with our finding that RTXIA has an almost identical amino acid sequence to that of *R. haemolyticus* 1625/19<sup>T</sup>, these results strongly suggest that RTXIA-producing strain JRC is pathogenic to immunodeficient rodents, and both agents should be excluded in laboratory rodent colonies.

## P2-022

## 魚類感染症を引き起こす抗酸菌の脂質生化学的特徴

○藤原 永年<sup>1</sup>, 中屋 慎<sup>2</sup>, 綾田 稔<sup>3</sup>, 深野 華子<sup>4</sup>, 星野 仁彦<sup>4</sup>, 前田 伸司<sup>5</sup> (1)帝塚山・現代生活学・食物栄養, (2)大阪公立大・研究推進機構, (3)大阪公立大・医・ウイルス学, (4)国立感染症研究所ハンセン病センター, (5)北海道科学大・薬学部・薬学科)

## The lipidic feature of fish-infected acid-fast bacteria

○Nagatoshi Fujiwara<sup>1</sup>, Makoto Nakaya<sup>2</sup>, Minoru Ayata<sup>3</sup>, Hanako Fukano<sup>4</sup>, Yoshihiko Hoshino<sup>4</sup>, Shinji Maeda<sup>5</sup> (1)Dept. Food and Nutrition, Facul. Contemporary Human Life Science, Tezukayama Univ., (2)Organization for Res. Promotion, Osaka Metropolitan Univ., (3)Dept. Virol., Osaka Metropolitan Univ. Grad. Sch. Med., (4)Leprosy Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis., (5)Facul. Pharm., Hokkaido Univ. Sci.)

There has been a global increase in reports of fish mycobacteriosis. *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, and *M. marinum* were isolated in fishes. These Mycobacteria are closely related with *M. ulcerans* which causes Buruli ulcer, a severe human skin lesion. The aquatic acid-fast bacteria cause systemic disease in fish but produce localized skin infections. In this report, we showed the lipidic feature of Mycobacteria isolated in an aquatic environment. The bacteria were cultured in 7H11 medium, and total lipids were extracted by Folch method. The mycolic acids were extracted after alkali-hydrolysis of bacteria. The lipid composition of each bacterium was compared by thin-layer chromatography. The major glycolipids were purified and analyzed by mass spectrometry. The cord factor and phenoglycolipid (PGL) were detected. The structure of PGL was different from that of BCG strain. The structure of phthiocerol dimycocerosate in PGL was affected. Deletion of PGL was detected in some clinical isolates of *M. marinum*. The mycolic acid composition of *M. pseudoshottsii* showed same pattern of *M. tuberculosis*, and the carbon-chain length was shorter in 4-10 species. We checked the mycolactone toxin. Although *M. ulcerans* has mycolactone A/B type, *M. pseudoshottsii* produced a unique type F of mycolactone. Fish mycobacteriosis appears to pose a risk of human infection and a threat to food safety.

## P2-023

### 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発

○廣瀬 昌平<sup>1</sup>, 中村 由紀子<sup>2</sup>, 新井 沙倉<sup>1</sup>, 工藤 由起子<sup>1</sup> (1国立衛研・衛微,<sup>2</sup>大津市保健所)

### The development of a selective enrichment for the detection of *Escherichia albertii* in food

○Shouhei Hirose<sup>1</sup>, Yukiko Nakamura<sup>2</sup>, Sakura Arai<sup>1</sup>, Yukiko Hara-Kudo<sup>1</sup> (1Div. Microbiol., Natl. Inst. Health Sci.,<sup>2</sup>Otsu City Public Health Center)

【目的】下痢原性を有する新興食中毒細菌である *E. albertii* の選択増菌培地の開発を目的とした。【方法】各種濃度のセフィキシム (CFIX) および亜テルル酸カリウム (PT) 添加 modified EC 培地 (mEC) での *E. albertii* 3 株および腸内細菌科菌群 4 株の 42°C での増殖性を OD590 で、鶏肉中に接種した *E. albertii* 3 株および鶏肉由来雑菌の 42°C での増殖性を分離培養法および本菌特異的リアルタイム PCR 法で解析し、添加薬剤の至適濃度を決定した。至適濃度の CFIX および PT を添加した mEC (CT-mEC) およびノボピオシン添加 CT-mEC (CT-NmEC) で 195 株の *E. albertii* および 20 株の腸内細菌科菌群の 42°C での増殖性を確認した。また、*E. albertii* 食中毒事例の食品検体培養液を mEC, ノボピオシン添加 mEC (NmEC), CT-mEC および CT-NmEC で二次増菌培養し、本菌特異的リアルタイム PCR 法で *E. albertii* を検出し、分離培地で *E. albertii* を分離した。【結果と考察】50 µg/L の CFIX 及および 2.5 mg/L の PT を mEC へ添加した条件では、*E. albertii* の増殖は抑制されず、腸内細菌科菌群および鶏肉由来雑菌の増殖が抑制されたため、本濃度を至適濃度とした。CT-mEC および CT-NmEC では、195 株全ての *E. albertii* の増殖が抑制されなかった。また、CT-mEC では、20 株中 15 株の腸内細菌科菌群、CT-NmEC では 20 株中 13 株の腸内細菌科菌群の増殖が抑制された。食中毒事例検体の二次増菌培養液では、CT-mEC で増菌した培養液のリアルタイム PCR 法の Ct 値が最も低く、本培養液から *E. albertii* が分離された。以上より、CT-mEC が *E. albertii* の選択増菌培地として有用であることが示された。

## P2-024

### カルバペネマーゼ産生グラム陰性細菌に対するラテラルフローイムノアッセイとマルチプレックス PCR の評価

○西田 智<sup>1</sup>, 斧 康雄<sup>1,2</sup>, 吉野 友祐<sup>1</sup> (1帝京大・医・微生物,<sup>2</sup>帝京平成大・健康メディカル)

### Evaluation of a lateral-flow immunoassay for multiple carbapenemase-producing Gram-negative bacteria

○Satoshi Nishida<sup>1</sup>, Yasuo Ono<sup>1,2</sup>, Yusuke Yoshino<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ.,<sup>2</sup>Faculty Health Med. Sci., Teikyo Heisei Univ.)

カルバペネマーゼ産生グラム陰性菌 (CPO) は、しばしば多剤耐性を獲得し、治療法の選択肢に限界をもたらす。このような CPO の保菌や感染症は、臨床的に重症患者において重要なリスクとなっている。また、プラスミド上のカルバペネマーゼ遺伝子が多くのグラム陰性菌に転移し、これらの菌が蔓延することにより、薬剤耐性が世界的に懸念されている。CPO の分子迅速診断法 (mRDT) は、重症患者の治療において緊急に必要とされている。本研究では、集中治療室を含む大学病院の患者から分離された CPO に対する迅速ラテラルフローイムノアッセイ (LFIA) を評価し、マルチプレックス PCR と比較検討した。NG-test CARBA 5 は、臨床分離株で発現する複数のカルバペネマーゼ KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP の産生菌を検出した。クイックチェイサー IMP は IMP 産生菌を検出した。LFIA は寒地培地上の臨床分離株に対して感度・特異性ともに 100% を示した。また、CTX-M, SHV, TEM といった ESBL 産生菌とは交差反応を示さなかった。一方、マルチプレックス PCR では非 IMP-1 グループに属する IMP-7 産生菌の検出に限界があり、IMP 産生菌に対する感度は 97%、特異度は 100% であった。これらの結果から、LFIA は CPO の mRDT として有用であり、検出時間と非 IMP-1 グループに対する感度が優位性があることが示された。また、LFIA は CPO の核酸増幅検査を補完することができた。以上、グラム陰性菌のカルバペネマーゼ産生を検出する高感度かつ特異的な LFIA を評価した。今後、LFIA は医療においてカルバペネマーゼを迅速に検出できる POCT の 1 つとなることが期待される。

## P2-025

### *Legionella pneumophila* 血清型別マルチプレックス PCR 法の改良

○前川 純子<sup>1</sup>, 森中 りえか<sup>2</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup> (1感染研・細菌1,<sup>2</sup>(株)ファスマック)

### Improvement of PCR-serotyping of *Legionella pneumophila*

○Junko Amemura-Maekawa<sup>1</sup>, Rieka Morinaka<sup>2</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.,<sup>2</sup>Fasmac Co., Ltd.)

*L. pneumophila* は 15 血清群に分けられるが、血清群特異的配列プライマーを用いたマルチプレックス PCR (M-PCR) により、血清群をグループ分けすることができる。この M-PCR は 2 段階から成り、1 段階目の M-PCR で、血清群 (SG) 1, 2, 3/15, 5, 6/12, 7, 8, 9, 11, 13, 14 の判定ができる (SG3 と 15, SG6 と 12 は区別することができない)。いずれの SG のバンドも得られなかった場合は、SG4/10 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する (バンドが得られた場合、SG4 か 10 と判定される。SG4 と 10 は区別できない)。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目のいずれかで血清群特異的なバンドが確認できる。スライド凝集反応でいずれの免疫血清にも凝集せず、UT と判定される菌株も M-PCR ではいずれかに分類される。免疫血清による群別と区別するため、PCR による血清型別は、SG の後に g を加えて、SGg1 のように記載する。M-PCR には *Legionella* 属特異的プライマーも加えていて、供試菌株が *Legionella* 属菌であることを確認するとともに、PCR 反応が正しく行われているか確認できる。今回、SG8, 1, 3, 2, 6, 14 の 6 株と、SG5, 11, 13, 9, 7 の 5 株の 2 組の抽出 DNA を等量混合し、それぞれ PCR 反応を行い、得られたラダーバンドがポジティブコントロールかつサイズマーカーとなることを確認できたので報告する。その際に SG13 のバンドが検出されない不具合があったので、プライマー配列を改定し、その不具合を解消することができた。

## P2-026

### Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による *Corynebacterium ulcerans* 迅速検出法の開発

○木村 美幸<sup>1</sup>, 岩城 正昭<sup>2</sup>, 山本 明彦<sup>2</sup>, 見理 剛<sup>1</sup>, 妹尾 充敏<sup>1</sup> (1国立感染症研・細菌第二部,<sup>2</sup>国立感染症研・安全実験管理部)

### Loop-Mediated Isothermal Amplification system for rapid detection of *Corynebacterium ulcerans*

○Miyuki Kimura<sup>1</sup>, Masaaki Iwaki<sup>2</sup>, Akihiko Yamamoto<sup>2</sup>, Tsuyoshi Kenri<sup>1</sup>, Mitsutoshi Senoh<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases,<sup>2</sup>Management Dept. Biosafety, Laboratory Animal, and Pathogen Bank, National Institute of Infectious Diseases)

【目的】*Corynebacterium ulcerans* は、*C. diphtheriae* の近縁菌でジフテリアと区別が困難な感染症を引き起こす。近年、ジフテリアの流行がない先進国で感染例が増加し、国内では 2016 年に死亡例が発生した。日本では、ウルセランス感染症は感染症法の対象外であるため、二類感染症のジフテリアと迅速に鑑別する必要がある。しかしながら、現状では菌を分離・培養しなければ同定できないため、鑑別に時間を要する。そこで、本研究では迅速にジフテリアとの区別が可能なウルセランス感染症の診断法確立を目的とする。【方法】Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による検出を行った。*C. diphtheriae* との菌種区別のため phospholipase D 遺伝子 (*pld*)、毒性確認のためジフテリア毒素遺伝子 (*tox*) を標的遺伝子とした。【結果・考察】純培養液における LAMP 法での検出限界ゲノムコピー数は、*pld*, *tox* とともに 100 コピーであった。*tox* の有無が既知の *C. ulcerans* 株と *C. diphtheriae* 株において、*C. ulcerans* 株は *pld* 陽性、*C. diphtheriae* 株は陰性であり、両菌種が区別できた。また、*tox* 有無の判別も可能であった。さらに、複数の臨床検体で LAMP 法と PCR 法による検出結果が一致した。今回、LAMP 法による *C. ulcerans* の検出および *C. diphtheriae* との鑑別が可能であった。今後、LAMP 法がウルセランス感染症検査法の選択肢の一つとなることが期待される。

**P2-027****ジフテリアトキソイド無毒化試験の in vitro 法の開発**

○妹尾 充敏<sup>1</sup>, 岩城 正昭<sup>2</sup>, 山本 明彦<sup>2</sup>, 嶋崎 典子<sup>3</sup>, 見理 剛<sup>1</sup> (1感染研・細<sup>2</sup>, 2感染研・安全, 3感染研・ウ3)

**Development of in vitro method for specific toxicity test of diphtheria toxoid**

○Mitsutoshi Senoh<sup>1</sup>, Masaaki Iwaki<sup>2</sup>, Akihiko Yamamoto<sup>2</sup>, Noriko Shimasaki<sup>3</sup>, Tsuyoshi Kenri<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriol. II, Natl. Inst. Infect. Dis., 2Mgmt. Dept. Biosafety, Lab. Anim., and Pathog. Bank, Natl. Inst. Infect. Dis., 3Dept. Virol. III, Natl. Inst. Infect. Dis.)

ワクチン等の生物学的製剤の品質管理試験において、動物愛護の観点などから 3Rs: Reduction (動物数の削減), Refinement (苦痛の軽減), Replacement (代替法への移行) が強く求められている。ジフテリアトキソイドは安全性を確認するため、ウサギおよびモルモットを用いて毒素活性を失っていることを評価している。本研究では、Replacement を果たすことを目的とし、ジフテリア毒素活性の in vitro 測定系を開発した。

ジフテリア毒素は 2 本の S-S 結合で結合された 2 つのサブユニットからなる約 58kDa のタンパク質で、強い細胞毒性を有する。その作用機序は、NAD 存在下で EF-2 (Elongation Factor 2) を ADP リボシル化し、タンパク質の合成を阻害する。現在、ジフテリアトキソイド無毒化試験では、ウサギおよびモルモットにトキソイドを接種することで毒素活性の有無を判断しているが、本研究では、動物を使用しない in vitro 法として、培養細胞を用いた方法 (Vero 細胞にジフテリア毒素を加え、一定期間培養し、生細胞数をカウントすることで毒素活性を測定) を開発した。培養細胞を用いた方法では、モルモットよりも感度が良いウサギでの試験よりもさらに感度が高く、アジュバントであるアルミニウムの影響も受けにくいことが示された。現在、実際のワクチンにおいて、本法が使用可能であるか検討を進めている。

**P2-028****非結核性抗酸菌の網羅的迅速同定**

○松本 悠希<sup>1</sup>, 福島 清春<sup>2</sup>, 元岡 大祐<sup>1</sup>, 金城 武士<sup>3</sup>, 木田 博<sup>4</sup>, 中村 昇太<sup>1</sup> (1大阪大・微・メタゲノム, 2大阪大・iFReC・自然免疫, 3琉球大・第一内科, 4大阪刀根山医療センター・呼吸器内科)

**Comprehensive and Rapid Identification of Nontuberculous Mycobacterium**

○Yuki Matsumoto<sup>1</sup>, Kiyoharu Fukushima<sup>2</sup>, Daisuke Motooka<sup>1</sup>, Takeshi Kinjo<sup>3</sup>, Hiroshi Kida<sup>4</sup>, Shota Nakamura<sup>1</sup> (1Dept. Infection Metagenomics, RIMD, Osaka Univ., 2Dept. Host Defence, iFReC, Osaka Univ., 3Univ. of Ryukyus, 4Osaka Toneyama Medical Center)

非結核菌抗酸菌 (NTM) 症は、難治性の呼吸器疾患でありわが国の近年の罹患数は結核を超える事態となっている。200 種を超える病原体から引き起こされるため、その治療においてまず必要となるのは菌種の正確な同定である。しかし現状ではそのために複数の検査を組み合わせ、場合によっては亜種レベルまでの同定を行う必要が求められる。特に日本で多い MAC (Mycobacterium avium complex) 以外の菌種については検査のために培養が必要となることから検査フローが煩雑になり、同定までの期間が長期化することも問題となっている。この問題に対して、我々は Oxford Nanopore Technologies 社の MinION シーケンサーを用いたリアルタイム解析システムを開発することで、高精度かつ迅速な菌種同定・薬剤耐性の予測を実現した。この手法により同定までの期間は喀痰検体の採取から約一日に短縮されたことで、早期に治療を開始することが可能となり、予後改善が期待される。

**P2-029****腸管出血性大腸菌 O157:H7 の検出を可能とするバクテリオファージの合成**

○田村 あずみ<sup>1,2,3</sup>, アザム アアハエルマン<sup>1</sup>, 小島 新二郎<sup>1</sup>, 近藤 恒平<sup>1,4</sup>, 中村 暢宏<sup>1</sup>, 山下 和可奈<sup>1</sup>, 渡士 幸一<sup>1</sup>, 高橋 宜聖<sup>1</sup>, 四柳 宏<sup>2,3</sup>, 氣賀 恒太郎<sup>1,5</sup> (1国立感染研・治ワク, 2東大・院新領域・メディカル情報生命, 3東大・医科研・感染症分野, 4国立感染研・薬剤耐性研究センター, 5自治医科大・医学部・細菌学部門)

**Synthesis of Bacteriophages Enabling the Detection of Escherichia Coli O157:H7**

○Azumi Tamura<sup>1,2,3</sup>, Aa Haeruman Azam<sup>1</sup>, Shinjiro Ojima<sup>1</sup>, Kohei Kondo<sup>1,4</sup>, Tomohiro Nakamura<sup>1</sup>, Wakana Yamashita<sup>1</sup>, Koichi Watashi<sup>1</sup>, Yoshimasa Takahashi<sup>1</sup>, Hiroshi Yotsuyanagi<sup>2,3</sup>, Kotaro Kiga<sup>1,5</sup> (1Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dept. Comp. Biol. Med. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Univ. of Tokyo, 3Div. Infect. Dis., Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo, 4AMR Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., 5Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

腸管出血性大腸菌 O157:H7 は、出血性の腸炎や溶血性尿毒症症候群を引き起こす重要な食中毒起因菌である。健康被害および社会的・経済的な損失を防ぐため、食品における大腸菌 O157:H7 の検出は重要であるが、従来の培養法では労力や時間、コストがかかるため、迅速かつ簡便な検出方法が求められている。そこで本研究では、ペプチドタグを付加したファージを合成し、O157:H7 臨床分離株の検出を行った。

合成に使用したファージは O157:H7 に高い特異性があり、臨床分離株に対しても溶菌活性を示した。またペプチドタグを付与した合成ファージは、天然ファージと同等の溶菌活性を有した。さらに、O157:H7 培養液に合成ファージを加えると、2 時間の培養で 10<sup>2</sup> CFU/ml の O157:H7 を特異的に検出できることを確認した。

本研究により、大腸菌 O157:H7 に感染するファージを迅速かつ容易に合成できることが示された。また O157:H7 に特異的に感染するファージを用いることで、よりの確に O157:H7 を検出できることが明らかとなった。

**P2-030****MVOCs を用いた深在性真菌症の早期診断法の開発**

○近藤 瑞穂, 岩口 伸一 (奈良女大・理・生物科学部)

**Development of the early diagnosis of Deep Mycosis with Microbial Volatile Organic Compounds (MVOCs)**

○Tamao Kondo, Shinichi Iwaguchi (Dept. Bio. Sci., Nara Women's Univ.)

私たちの体や周囲の環境には、多くの微生物が主に日和見性で生息しており、これら微生物のいくつかは、深在性真菌症などの深刻な健康被害をもたらす。しかし、この深在性真菌症は一般的に診断に時間がかかり、同定には専門的な知識や技術が必要とする。また、診断のための生検そのものが患者の負担になるという問題点もある。そのため、素早い診断や適切な治療は高齢者や免疫不全患者にとって重要であり、深在性真菌症の非侵襲的な診断法の開発が期待されている。

病気によって異常化した細胞は特定のニオイを発生することが古くから知られている。また、カビをはじめとする微生物は特徴的なニオイを発生する。これらは微生物由来揮発性有機化合物 (MVOCs) と言われる二次代謝産物である。本研究では MVOCs を利用して、深在性真菌症、特にカンジダ血症の早期診断が可能かどうかについて検討した。

ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地と合成 (SD: synthetic dextrose) 液体培地で Candida albicans SC5314 株をバイアル瓶で培養し、定常期の培養サンプルのヘッドスペース部分の気体を SPME に捕集後、GC-MS によって MVOCs を分析した。BHI 培地からは 5 個、SD 培地からは 6 個の菌特異的 MVOCs が検出された。C. albicans のクオラムセンシング分子である farnesol は BHI 培地上と SD 培地上で検出されたが、3-methyl-1-butanol は BHI 培地のみで検出された。今後はマウスのカンジダ血症についても検討を加える。(会員外共同研究者: 首藤明子, 立本行江/奈良県産業振興総合センター)

## P2-031

### F 型ボツリヌス毒素産生 *Clostridium baratii* によるボツリヌス症と菌の性状

○門間千枝, 上原さとみ, 岡田若葉, 古田菜摘, 齊木大, 前田雅子, 赤瀬悟, 尾畑浩魅, 横山敬子, 貞升健志(東京都健安研・微生物)

### Botulism caused by botulinum neurotoxin type F(BoNT/F)-producing *Clostridium baratii* in Tokyo, Japan

○Chie Monma, Satomi Uehara, Wakaba Okada, Natsumi Furuta, Dai Saiki, Maeda Masako, Satoru Akase, Hiromi Obata, Keiko Yokoyama, Kenji Sadamasu (Dept. Microbiol., Tokyo Metropolitan Institute of Public Health)

Botulism is caused by *Clostridium botulinum*, but rarely by *C. butyricum* or *C. baratii*, which produce botulinum toxin (BoNT). This report focuses on the first case of botulism caused by BoNT/F-producing *C. baratii* in Tokyo, Japan.

In May 2021, examinations for botulism were performed on samples from a patient (50s, male) with ptosis and dyspnea. BoNTs were tested by mouse method and Endo-pep MS method. BoNT-producing organisms were isolated using GAM agar with egg yolk and CW agar with egg yolk. BoNT-producing isolates were confirmed BoNT gene by PCR and were identified using MALDI-TOF MS, 16S rRNA sequences and biochemical characteristics.

BoNT/F was detected in serum and fecal specimens. Although no botulinum-like colonies were found, *C. baratii* isolates from fecal specimens on day 14 were presumed to be the causative agent because BoNT/F productivity was positive. The BoNT/F gene of the isolates was not detected by PCR using standard PCR primers, but PCR using primers for subtype F7 was positive for the BoNT/F7 gene of the isolates the sequences were matched with BoNT/F7 gene, and BoNT/F7-related genes were also positive. Based on these results, the causative organism in this case was confirmed to be *C. baratii*, which produces BoNT/F7.

It is important to consider botulism caused by organisms other than *C. botulinum* and to pay attention to isolation and identification by PCR.

## P2-032

### 若齢ネコにおける歯肉炎とスピロヘータとの関連

○橋理人<sup>1</sup>, 山本誠也<sup>2,3</sup>, 八村寿恵<sup>2</sup>, 小川祐生<sup>2</sup>, 鐘ヶ江晋也<sup>2</sup>, 網本宏和<sup>2</sup>, 渡邊健太<sup>3,4</sup>, 度会雅久<sup>3,4</sup>, 網本昭輝<sup>2</sup> (1)山口大・大研推, 2)アミカベッククリニック, 3)山口大・院・連獣, 4)山口大・共獣・公衆衛生)

### Association between gingivitis and oral spirochetes in young cats

○Masato Tachibana<sup>1</sup>, Seiya Yamaki<sup>2,3</sup>, Hisae Hachimura<sup>2</sup>, Masao Ogawa<sup>2</sup>, Shinya Kanegae<sup>2</sup>, Hirokazu Amimoto<sup>2</sup>, Kenta Watanabe<sup>3,4</sup>, Masahisa Watarai<sup>3,4</sup>, Akiteru Amimoto<sup>2</sup> (1)Org. Res. Initiatives, Yamaguchi Univ., 2)Amica Pet Clinic, 3)Joi. Grad. Sch. Vet. Med., Yamaguchi Univ., 4)Lab. Vet. Pub. Heal., Joi. Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

Although gingivitis frequently occurs in young cats, spirochetes are often found in the early stages of periodontal disease. In this study, epidemiological investigations were conducted to determine the association between gingivitis and oral spirochetes in young cats.

A total of 68 cats and 31 dogs under one year of age were assessed from a diagnosis of gingivitis in representative teeth and tested for plaque. To detect spirochetes or *Porphyromonas gulae* (Pg) in plaque samples, 16S rRNA gene was amplified by PCR using specific primers. All data were analyzed using Fisher's exact probability test and odds ratio with a 95% confidence interval.

The prevalence of gingivitis was significantly higher in young cats than in young dogs. The positive rate of spirochetes by PCR in gingivitis cases was 85.4% in young cats and 15.4% in young dogs, and the positive rate of Pg was 66.7% in young cats and 15.4% in young dogs. Both results were significantly higher in young cats than in young dogs. In young cats, spirochetes were significantly associated with gingivitis, but Pg was not. These results suggest that spirochetes may play an essential role in the early stages of periodontal disease in cats.

## P2-033

### Bacteria-host interactions mediated by membrane vesicles produced by gut microbiota

○松下 未来<sup>1</sup>, 菊池 薫<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>2,3</sup>, 野村 暢彦<sup>3,4</sup> (1)筑波大・生命環境・生物資源, 2)筑波大・医学医療系・TMRC, 3)筑波大・MiCS, 4)筑波大・生命環境系)

○Miku Matsushita<sup>1</sup>, Kaoru Kikuchi<sup>1</sup>, Nozomu Obana<sup>2,3</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>3,4</sup> (1)Coll. Agro-Biol. Resour. Sci., Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2)TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, 3)MiCS, Univ. Tsukuba, 4)Fac. Life Environ., Sci Univ. Tsukuba)

ヒトの腸管に存在する腸内細菌叢は、宿主の免疫恒常性や炎症反応など様々な機能性を有していることが明らかになってきている。この腸内細菌叢-宿主間相互作用には、細菌が細胞外に放出する代謝産物、タンパク質およびメンブレンベシクル (membrane vesicle: MV) が寄与する。MV とは細菌が放出する直径 20 から 400 nm の球状膜構造体であり、内包する様々な菌体成分を周囲の細胞に輸送している。これまでに、単離した腸内細菌を用いた先行研究によって、細菌由来の MV が宿主の生理機能の調節に関与することが示唆されている。しかし、実際の腸管内においてどのような細菌種がどのような活性を有する MV を産生しているかについては未だ不明な点が多い。本研究では腸管内で産生されている MV を解析するために、MV を豊富に含むと考えられる便から細菌由来 MV を単離・精製した。次に、腸内で MV を産生する細菌を特定するため、便由来 DNA と MV 由来 DNA の細菌叢を 16S rRNA アンプリコンシーケンスにより比較した。その結果、MV 由来の DNA では、便由来 DNA と比較して、特定の細菌分類群の相対的存在量が高いことが示された。これらの細菌は腸管で豊富に MV を産生していると予想される。さらに、異なる週齢のマウスより MV を単離し、細菌叢解析を実施したところ、高齢マウスの MV 画分で高頻度に検出される細菌群を同定した。本研究より、宿主腸管内において特定の細菌種が MV を産生していることが示唆された。今後は異なる週齢のマウス腸内細菌叢から産生される MV の特性を解析する予定である。

## P2-034

### 嫌気性細菌 *Fusobacterium nucleatum* はマウス NMuMg 乳がん細胞の EMT を促進する

○中村 彰宏<sup>1</sup>, 堀内 大<sup>1</sup>, 鈴木 興秀<sup>2</sup>, 吉田 明弘<sup>3</sup>, 村上 孝<sup>1</sup> (1)埼玉医大・医・微生物, 2)埼玉医科大学総合医療診療センターゲノム診療科消化管・一般外科, 3)松本歯科大学口腔細菌学講座)

### *F. nucleatum* promotes epithelial-mesenchymal transition in murine NMuMg breast cancer cells

○Akihiro Nakamura<sup>1</sup>, Yutaka Horiuchi<sup>1</sup>, Okihide Suzuki<sup>2</sup>, Akihiro Yoshida<sup>3</sup>, Takashi Murakami<sup>1</sup> (1)Dept. Microbiol., Sch. Med., Saitama Medical Univ., 2)Dept. Digestive Tract and General Surgery., Sch. Med., Saitama Medical Univ., 3)Dept. Oral Microbiol., Matsumoto Dental Univ.)

口腔内嫌気性細菌 *Fusobacterium nucleatum* は歯周病の原因菌として知られているが、近年では大腸癌をはじめとする種々のがん組織から検出され、がん進展との関連が強く示唆されている。我々はがん細胞に対する *F. nucleatum* の影響を明らかにする目的で、マウス乳がん細胞株 NMuMg との共培養を行なった。その結果、共培養した NMuMg 細胞は形態変化とともに、上皮細胞マーカー E-cadherin 量が減少し、間葉系細胞のマーカー遺伝子 Slug および  $\alpha$ SMA の発現上昇が確認された。さらに、培養を継続すると細胞集塊が形成された。上皮細胞の形態変化と間葉系マーカー遺伝子の発現上昇から、*F. nucleatum* と共存した NMuMg 細胞では上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) の誘導が示唆された。そこで、EMT シグナルに伴う細胞密度の変化を調べるため、Hippo シグナル経路の役割に着目した。Hippo シグナル調節の中核因子 Yes-associated protein (YAP) は、その活性化状態で細胞質に局在しており、不活性化状態では核内に局在する。NMuMg 細胞における YAP タンパク質の細胞内局在を免疫染色法にて解析した結果、*F. nucleatum* との共培養前の細胞高密度状態では YAP は細胞質に局在していたが、共培養下では核内移行が観察された。これらの結果は、*F. nucleatum* は共存するがん細胞の Hippo 経路を不活性化し、細胞密度の低下とともに EMT を促進することを示唆している。

## P2-035

ホソヘリカメムシ共生細菌は狭い通路の中をドリル戦車で移動する

○吉岡 青葉<sup>1</sup>, 菅 哲朗<sup>2</sup>, 菊池 義智<sup>3</sup>, 中根 大介<sup>1</sup> (1)電通大・基盤理工, (2)電通大・機械知能, (3)産総研・生物プロセス)

### Symbiotic bacteria pass through narrow space with flagella wrapping

○Aoba Yoshioka<sup>1</sup>, Tetsuo Kan<sup>2</sup>, Yoshitomo Kikuchi<sup>3</sup>, Daisuke Nakane<sup>1</sup> (1)Dept. Eng. Sci., UEC, (2)Dept. Mech. and Int. Sys. Eng., UEC, (3)Dept. BPRI, AIST)

多くの共生・感染性細菌は自身よりも遙かに大きな高等生物へ侵入し、共生・感染を成立させる。しかし、複雑な生体組織内において細菌1匹がどのように動いて目的地に到達するのか、これまで直接観察されたことはない。我々は昆虫・細菌共生系であるホソヘリカメムシ・*Caballeronia (Burkholderia) insecticola*の実験モデルを対象に、宿主腸内を移動する共生細菌のリアルタイムイメージングを試みた。GFPを発現した共生細菌を宿主に投与すると、細菌は宿主消化管に発達する菌体1匹がぎりぎり通過するほどの狭小空間(狭窄部)内で、方向転換を繰り返しながら毎分20 μmの速さで一方向的に移動し、共生器官(M4)に到達することが判明した。次に、我々はこの通路を模倣した幅1 μmの微小流体デバイスを作成し、その中で遊泳する共生細菌および近縁種の動態を高時間分解能で観察した。宿主と共生関係を構築できる種はデバイス内で、方向転換を繰り返しながら毎分90 μmの速さで一方向的に移動していた。しかし、共生関係を構築できない種は培地中では運動性を示すにも関わらず、デバイス内では運動性をほとんど示さなかった。べん毛を蛍光色素で標識したところ、デバイス内で運動できる種はべん毛繊維を体に巻き付けて移動するドリル戦車形態をとることが明らかになった。以上の結果から、ホソヘリカメムシ共生細菌は、べん毛逆回転時にドリル戦車になることで、宿主体内に存在するような狭小空間を効率的に移動し、他細菌種では到達が難しい場所での独占的な生態的地位の獲得を図っていると考えられる。

## P2-036

デュアルモーターがIV型線毛依存的な走流性を可能にする

○上村 直輝<sup>1</sup>, 玉腰 雅忠<sup>2</sup>, 中根 大介<sup>1</sup> (1)電通大・基盤理工, (2)東京薬大・生命科学部)

### Dual motors enable Type-IV-pilus dependent rheotaxis

○Naoki Uemura<sup>1</sup>, Masatada Tamakoshi<sup>2</sup>, Daisuke Nakane<sup>1</sup> (1)Dept. Eng. Sci., UEC., (2)Dept. Mol. Biol., TUPLS.)

細菌の運動性や病原性、バイオフィーム形成に関与するIV型線毛(T4P)装置では、1種類の伸長ATPaseと2種類の収縮ATPaseが広くみられる。しかし、この収縮デュアルモーターの役割分担の詳細は明らかになっていない。我々は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において、収縮ATPase PilT1 PilT2の機能を調べるために、実環境に近い状況で本菌の運動性を可視化した。光学顕微鏡下で観察チャンパーの温度を70°Cまで上昇させることで1個体レベルの運動の観察に成功した。さらに、自作の流体チャンパーとシリジポンプにより精密な水流の流れを与えると、本菌は流れに逆らって進む正の走流性を示した。流れがないときには、片方の極で直立した菌体はランダムな方向に移動するが、89 μm/sの流れを与えると、直立した菌体の93%が流れの方向に傾き、水流に逆らって移動した。pilT1破壊株とpilT1 pilT2二重破壊株では、同様の実験で走流性はみられなかった。一方、pilT2破壊株では、流れを受けると直立した菌体の3%のみが走流性を示した。直立した菌体の足場から伸びたT4P繊維をその構成タンパク質であるPilAの免疫蛍光標識により可視化した。野生株では流れと反対方向にピンと張った2 μm未満のT4P繊維が伸びており、流れの方向には弛緩した6 μm以上のT4P繊維がみられた。一方、pilT2破壊株では、ピンと張った6 μm以上のT4P繊維が水流の向きに関わらず放射状に伸びていた。これらの結果から、PilT2がT4P繊維を固体表面から外すことで流れに逆らうように菌体を再配置し、PilT1がT4P繊維を力強く収縮することで、デュアルモーターによる走流性というメカノセンシングな応答を示すと考えられる。

## P2-037

制御された住環境における微生物量と細菌群集への影響要因分析

○Hou Jianjian<sup>1</sup>, 中嶋 麻起子<sup>2</sup>, 藤吉 奏<sup>1,4</sup>, 西内 由紀子<sup>1</sup>, Ishara Uhanie Perera<sup>1</sup>, 小久保 舞香<sup>3</sup>, 小椋 大輔<sup>3,4</sup>, 丸山 史人<sup>1,4</sup> (1)広島大・IDEC, (2)広島工業大・工・建築工学, (3)京都大・院・工学, (4)広島大・CHOBE)

### Influencing factors against microbiome in a controlled built environment

○Kenken Ko<sup>1</sup>, Makiko Nakajima<sup>2</sup>, So Fujiyoshi<sup>1,4</sup>, Yukiko Nishiuchi<sup>1</sup>, Ishara Uhanie Perera<sup>1</sup>, Makoto Kokubo<sup>3</sup>, Daisuke Ogura<sup>3,4</sup>, Fumito Maruyama<sup>1,4</sup> (1)IDEC Inst., Hiroshima Univ., (2)Facu. Engineer., Hiroshima Insti. Tech., (3)Grad. Sch. Engineer., Kyoto Univ., (4)CHOBE, Hiroshima Univ.)

現代の生活において人は90%近い時間を室内で過ごすため、住環境がヒトの健康に与える影響は大きい。カビなどの一部を除く微生物については研究が進んでいる一方で、その他の微生物が人に及ぼす影響については明らかではない。本調査では、現代住宅を模した実験居室において微生物量と群集を把握し、微生物と温湿度および住まい方の関係を明らかにすることを目指した。【方法】鉄筋コンクリート造の建物内に3種類の実験居室(無人, 有人, 有人+水槽)を用意、各居室の温湿度を測定した。各居室で1名ずつ合計2名が1ヶ月間過ごした後、4箇所(扉表面, 主寝室のエアコンフィルター・吹出口, 浴室シャワーヘッド)をスワブで採取、その他浴室の水, エアロゾル, 床の埃の計148試料をDNA抽出に供した。【結果と考察】2021年5月-2022年6月の結果を解析したところ、主成分分析から、エアロゾルと扉表面のDNA量に正の相関が見られ、DNA量はサンプリング期間により有意に異なることが明らかとなった(P<0.05)。シャワーヘッドのDNA量は絶対湿度と正の相関が見られ、湿度の影響を受けやすいことが示唆された。エアコンフィルターと扉表面のDNA量は居室の種類ごとに有意差が見られたが(P<0.05)、サンプリング期間の影響が明確でなかった。一方、浴室の水とシャワーヘッドのDNA量は居室の種類の影響が明確でなかったが、サンプリング期間により有意に異なった(P<0.05)。従って、住空間のエアロゾル供給源としてのDNA量の影響要因に違いが生じていると考えられた。本発表では、さらに温湿度および住まい方とリアルタイムPCRにより定量した病原菌の量、新型シーケンスを用いた細菌群集との関係についても議論する。

## P2-038

Sphingomonad科細菌の細胞外膜における植物由来芳香族化合物取り込みメカニズムの解明

○藤田 雅也<sup>1,2</sup>, 柴田 昂耀<sup>2</sup>, 菱山 正二郎<sup>3</sup>, 田辺 幹雄<sup>1</sup>, 千田 俊哉<sup>1</sup>, 上村 直史<sup>2</sup>, 政井 英司<sup>2</sup> (1)高エネ研・物構研・構造生物学研究センター, (2)長岡技大・物質生物, (3)森林総合研究所)

### The outer membrane uptake mechanism for plant-derived aromatics in Sphingomonadaceae

○Masaya Fujita<sup>1,2</sup>, Koki Shibata<sup>2</sup>, Shojiro Hishiyama<sup>3</sup>, Mikio Tanabe<sup>1</sup>, Toshiya Senda<sup>1</sup>, Naofumi Kamimura<sup>2</sup>, Eiji Masai<sup>2</sup> (1)SBRC, IMSS, KEK, (2)Dept. Mater. Sci. Biotechnol., Nagaoka. Univ. Technol., (3)Fore. Res. Manag. Org.)

植物細胞壁の構成成分であるリグニンは、地球上に最も豊富に存在する芳香族資源であり、環境中では真菌による低分子化の後、細菌により無機化される。近年、これら微生物の代謝システムを利用したリグニンからの物質生産が高い注目を集めている。細菌によるリグニン由来低分子芳香族化合物の代謝システムは、*Sphingobium* sp. SYK-6株において最も良く解析され、近年、代謝の第一段階である細胞外膜においてビフェニル型化合物5,5'-dehydrodivanillate (DDVA)の取り込みをTonB-dependent transporter (TBDT)であるDdvTが関与することを明らかにした。TBDTは内膜のTonB複合体から伝達されるエネルギーを利用し、外膜でシデロフォアなどを特異的に輸送する。本研究では、リグニン由来の芳香族化合物であるdehydrodicoumaroyl alcohol (DCA)の取り込みシステムの解明を主な目的とし、DCAにより転写誘導を受けるTBDT遺伝子について解析を行った。当該遺伝子の破壊株について、DCAおよび下流代謝中間体の変換能を測定したところ、phcT破壊株が代謝中間体のDCA-C変換能に顕著な低下を示した。また、等温滴定熱測定によって、PhcTとTonB1の相互作用が検出されたため、PhcTがTonB1からエネルギーを受け取りDCA-Cを取り込むことが示された。PhcTによる取り込み機序を明らかにするために、クライオ電顕を用いた単粒子解析を行ったところ、12オングストロームの分解能で、β-barrel型の構造を取るPhcTの概形を確認できた。

## P2-039

### 日本人男女における腸内細菌叢と脂質異常症の関連と推定因果関係の検討

○宮島由奈<sup>1</sup>, 唐島成宙<sup>2</sup>, 大貝和裕<sup>1</sup>, 小倉康平<sup>3</sup>, 南保英孝<sup>4</sup>, 米田隆<sup>2</sup>, 辻口博聖<sup>5</sup>, 中村裕之<sup>5</sup>, 原章規<sup>5</sup>, 岡本成史<sup>1,3</sup> (1金沢大院・医薬保・病態検査学, 2金沢大院・医薬保・未来健康増進医学, 3金沢大・新学術創成研究機構, 4金沢大院・自然科学研究科・人工知能研究室, 5金沢大・環境生態医学・公衆衛生学)

### Effect of gut microbiota on dyslipidemia and inferred causal relationship in Japanese men and woman

○Yuna Miyajima<sup>1</sup>, Shigehiro Karashima<sup>2</sup>, Kazuhiro Ogai<sup>1</sup>, Kohei Ogura<sup>3</sup>, Hidetaka Nambu<sup>4</sup>, Takashi Yoneda<sup>2</sup>, Hiromasa Tsujiguchi<sup>5</sup>, Hiroyuki Nakamura<sup>5</sup>, Akinori Hara<sup>5</sup>, Shigefumi Okamoto<sup>1,3</sup> (1Dept. Clin. Lab. Sci., Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ., 2Dep. Health Prom. and Med. of the Future, Kanazawa Univ., 3Adv. Health Care Sci. Research Unit, Inst. for Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., 4Sch. Elect., Inform., Commun. Eng., sch. Sci. Eng., Kanazawa Univ., 5Dept. Environ. Prev. Med., Adv. Prev. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

【背景】近年の研究において、腸内細菌叢 (GM) 構成の変化が種々の生活習慣病に影響を及ぼし得ることが示唆されているが、脂質異常症 (DL) と GM の変化との関連性については明らかでない。今回我々は、石川県羽咋郡志賀町の住民を対象に行なった「志賀町スーパー予防医学検診」を利用し、GM の変化と DL との関連性について検討した。【方法】2020 年 1 月に実施した「志賀町スーパー予防医学検診」に参加し各種検体検査および糞便採取を行った 40 歳以上の被験者 234 人のうち、DL の薬物治療中でない 40 歳以上の男性 79 名、女性 82 名 (DL 該当男性 : 34 名・女性 : 36 名, DL 非該当男性 45 名, 女性 : 46 名) を対象とした。対象者の糞便から細菌ゲノム DNA を抽出し、16S rRNA の V3V4 領域に対して PCR を行った上で MiSeq にて次世代シークエンスを行った。GM の解析には、Qiime2 を用いた。【結果と考察】統計解析の結果、男女間のいくつかの細菌が DL と関連する可能性が示された。線形非ガウス非循環モデル (LiNGAM) では、男女の異なる細菌と血中脂質の間に推定因果関係が示された。男性では、Prevotella 9 と Bacteroides が、女性では、Akkermansia と Escherichia/Shigella の 2 種の細菌が血中脂質と推定的な因果関係を持つことが示された。現在はこれらの腸内細菌属と脂質代謝の関連性について詳細に調べるために、疾患マウスモデルを用いた実験を検討中である。

## P2-040

### MPS マウスを用いた *Helicobacter pylori* 感染モデルにおける消化管内細菌叢の変化について

○北条 史<sup>1</sup>, 米澤 英雄<sup>2</sup>, 岡 健太郎<sup>3</sup>, 高橋 志達<sup>3</sup>, 蔵田 訓<sup>4</sup>, 花輪 智子<sup>5</sup>, 神谷 茂<sup>3</sup>, 三戸部 治郎<sup>5</sup>, 大崎 敬子<sup>5</sup> (1杏林大・医・実験動物施設, 2東京歯科大・歯・微生物, 3ミヤリサン製薬・中央研究所, 4杏林大・保健・臨床検査微生物, 5杏林大・医・感染症学)

### Changes in gastrointestinal microflora in the *Helicobacter pylori* infection model using MPS mice

○Fuhito Hojo<sup>1</sup>, Hideo Yonezawa<sup>2</sup>, Kentaro Oka<sup>3</sup>, Motomichi Takahashi<sup>3</sup>, Satoshi Kurata<sup>4</sup>, Tomoko Hanawa<sup>5</sup>, Shigeru Kamiya<sup>3</sup>, Jiro Mitobe<sup>5</sup>, Takako Osaki<sup>5</sup> (1Inst. Lab. Anim. Facilit., Kyorin Univ. Sch. Med., 2Dept. Microbiol., Tokyo Dental Col., 3Central Research Inst., Miyarisan Pharma. Co., Ltd., 4Div. Microbiol., Dept. Med Technol., Fac. Health Sci., Kyorin Univ., 5Inst. Lab. Anim. Facilit., Kyorin Univ. Sch. Med.)

【目的】*Helicobacter pylori* はヒトの胃に感染し、除菌治療が施されない限り生涯にわたって持続感染している。本研究は、*H. pylori* 長期持続感染マウスモデルを用いて、感染がマウスの胃内細菌叢にどのように影響するかを明らかにする目的で実施した。

【方法】動物モデルは細菌感染高感受性の ICR 系の MPS マウスに *H. pylori* を経口感染させることで作成した。感染期間終了後、胃粘膜中の DNA を抽出し、細菌 16S リボソーム DNA の V3-V4 領域を標的とする 16S メタゲノム解析を行った。

【結果】Chao1index, Shannon index を指標とした  $\alpha$  多様性解析の結果、感染後 8 週目では感染マウスの胃内細菌叢  $\alpha$  多様性は非感染マウスと比較して有意に低いことが明らかになった。以降のマウスでも非感染マウスでも胃内細菌叢の多様性は低下しており、感染の他にも加齢による細菌叢構成の変化が考えられた。ユニフラック距離を元にした  $\beta$  多様性解析の結果、感染、非感染群で有意に違いが認められた。LEfSe 解析の結果、投与した *Helicobacter* 属の他、*Blautia* 属が感染群を特徴づける細菌として挙げられた。盲腸内容物を同様に解析した結果と共に報告する。

【結語】以上の結果から、*H. pylori* 感染 MPS マウスモデルにおいて本菌感染は胃内細菌叢に影響すると考えられ、同モデル内の感染群に特徴的な細菌を明らかにすることができた。本感染マウスモデルはスナネズミモデルと異なり、激しい炎症を認めず慢性持続感染を維持できるモデルとして有用であると考えられた。

## P2-041

### 潰瘍性大腸炎患者における血清 IgG の腸内細菌叢に対する反応性

○今大路 治之<sup>1</sup>, 高橋 功一<sup>1,2</sup>, 多田 彩乃<sup>1</sup>, 桑原 知巳<sup>1</sup> (1香川大・医・微生物, 2香川大附属病院・薬剤部)

### Reactivity of serum IgG to fecal microbes in ulcerative colitis patients

○Haruyuki Imaohji<sup>1</sup>, Koichi Takahashi<sup>1,2</sup>, Ayano Tada<sup>1</sup>, Tomomi Kuwahara<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., 2Dept. Pharmacy, Kagawa Univ. Hospital)

【背景および目的】炎症性腸疾患の発症要因の一つに腸内細菌叢に対する異常な免疫応答が挙げられる。潰瘍性大腸炎 (UC) においては、活動度に応じて便中の IgG 結合細菌が増加することが報告されている。しかしながら、UC 患者の血清 IgG の腸内細菌に対する反応性と活動度との関連性は十分に解析されていない。本研究では、UC 患者および健康人の糞便サンプルを用い、血清 IgG との反応性が高い細菌種を同定し、疾患活動性との関連性を調べた。

【方法および結果】37 名の UC 患者および 4 名の健康人から得た便検体から DNA を抽出し、16S メタゲノム解析により便検体の菌組成を比較した。また、各患者の血清 IgG と便検体を混和し、Protein G 共役磁気ビーズを用いて IgG 結合細菌を回収した。回収した IgG 結合性細菌の同定は 16S メタゲノム解析により行った。その結果、UC の重症度に応じて IgG と特異的に結合する細菌レパートリーに差異が認められた。活動期にある便サンプルでは *Acidaminococcus* 属や *Prevotella* 属など、主に上部消化管に定着する細菌の占有率が優位に高かった。また、寛解期の便サンプルでは *Planococcaceae* 科および *Pseudomonadaceae* 科に属する細菌が血清 IgG との結合率が高かった。一方、健康人サンプルでは、UC 患者と比較し、血清 IgG との反応性が高い細菌は同定できなかった。以上の結果は、上部消化管に定着する腸内細菌群に対する免疫応答の差が UC の疾患活動性に影響を与えることが示唆された。

## P2-042

### 出生後の児の便中細菌叢および有機酸濃度の経時的变化と影響要因

賀川 紗夕子<sup>1</sup>, 石川 隆司<sup>1</sup>, 安井 敏之<sup>2</sup>, 櫻井 明子<sup>1</sup>, 〇片岡 佳子<sup>1</sup> (1徳島大・医・微生物遺伝子解析学, 2徳島大・医・生殖更年期医療学)

### Changes of fecal microbiota and organic acid concentrations in baby and influencing factors

Sayuko Kagawa<sup>1</sup>, Ryuji Ishikawa<sup>1</sup>, Toshiyuki Yasui<sup>2</sup>, Akiko Sakurai<sup>1</sup>, ○Keiko Kataoka<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol. Genetic Anal., Sch. Health Sci., Tokushima Univ., 2Dept. Reprod. Menopos. Med., Sch. Health Sci., Tokushima Univ.)

【目的】腸内菌叢と様々な疾患の発症リスクとの関連が注目されているが、健康保持に必要な安定な菌叢や腸内環境の形成過程には十分に解明されていない。そこで、出生直後からの便中の細菌叢と有機酸濃度を経時的に調べ、ヒト腸内菌叢形成過程に影響する要因を検討した。

【方法】研究計画 (徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会承認番号 2092) に従い、2018 年 1 月から 2020 年 3 月の間に、健康な母子 13 組の同意を得て、母親の出産前後、児の出生直後 (胎便)、生後 2~3 日、1 週間、2 週間、3 週間、以後は 1 歳まで毎月と 2 歳時の自然排便の提供を受けた。菌叢構成は T-RFLP 法 (長島法)、便中の *Bifidobacterium* 属の菌量は菌種特異的定量 PCR により調べた。便中有機酸濃度は外部委託した。【結果・考察】参加登録者のうち 10 組は自然分娩、3 組が帝王切開 (C/S) で、低体重児・早産児はいなかった。生後 2 ヶ月までは分娩様式による菌叢構成の相違がみられた。自然分娩の児では生後 1 週間までに *Bifidobacterium* の T-RF ピークが出現し、生後 1~2 ヶ月で *Actinobacteria* 門が優勢であった。C/S の児では生後 2~3 ヶ月で *Bifidobacterium* が出現し、その後は分娩様式による差はみられなくなった。便中 *Bifidobacterium* 菌量についても同様であった。児の便中有機酸濃度を分娩様式別に各 3 例で比較すると、生後 2~3 日、1 週間、3 ヶ月で帝王切開の児よりも有意に高かった。生後 2 か月から 1 歳までの菌叢のクラスター分析では、離乳食開始や抗菌薬使用が菌叢構成に影響する傾向がみられた。

**P2-043****Relationship between tongue microbiota composition of elderly adults and tooth loss**

○朝川 美加季<sup>1</sup>, 竹下 徹<sup>1,2</sup>, 影山 伸哉<sup>1</sup>, 古田 美智子<sup>1</sup>, 山下 喜久<sup>1</sup> (九州大・歯・口腔予防, <sup>2</sup>九州大・歯・OBT研究センター)

○Mikari Asakawa<sup>1</sup>, Toru Takeshita<sup>1,2</sup>, Shinya Kageyama<sup>1</sup>, Michiko Furuta<sup>1</sup>, Yoshihisa Yamashita<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Sect. of Prev. Dent. Fac. Dent. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>OBT Res. Cen., Fac. Dent. Sci., Kyushu Univ.)

Tongue microbiota is a primary source of the microbial populations ingested with saliva among distinct microbial communities formed on various oral niches. Thus, the microbiota status needs careful attention when considering a maintenance of health of vulnerable individuals such as elderly adults. This study investigated the tongue microbiota of 62 independent community-dwelling elderly adults participating in community special support projects. Their bacterial and fungal amount and composition were determined using a next-generation sequencing and quantitative PCR based on 16S rRNA gene or rRNA inter transcribed spacer (ITS) region and compared among the individuals with different numbers of present teeth (0, 1-19, ≥20). Total fungal amounts of the tongue microbiota increased in the individuals with less teeth. *Candida* species including *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* were present in the tongue microbiota with higher amounts of fungi. In contrast, significantly lower bacterial richness was observed in the microbiota of individuals with less teeth, whereas there was no significant difference in total bacterial amount. These results suggest that the number of present teeth of the elderly adults is associated with their tongue microbiota status.

**P2-044****16S rRNA 遺伝子全長解析による一歳半児の口腔マイクロバイオームの細菌構成**

○影山 伸哉, 古田 美智子, 馬 佳楽, 竹下 徹, 朝川 美加季, 山下 喜久 (九大・院歯・口腔予防)

**Oral microbiota profiles in 1.5-year-old infants by full-length 16S rRNA gene analysis**

○Shinya Kageyama, Michiko Furuta, Jiale Ma, Toru Takeshita, Mikari Asakawa, Yoshihisa Yamashita (Sect. Prevent. Dent. Public Health, Grad. Sch. Dent., Kyushu Univ.)

Acquisition of oral bacteria in early infancy is considered to have a key role in the establishment of oral microbiota. In this study, we examined tongue swab samples collected from 216 infants aged 1.5 years, with mother-infant paired samples when they were 4 months old. The bacterial composition of each sample was determined using PacBio single-molecule long-read sequencing of the full-length 16S rRNA gene and amplicon sequence variant (ASV) analysis. The bacterial composition at 1.5 years of age was classified into three microbiota profiles; *S. salivarius*-dominant profile (SSP), *Neisseria*-dominant profile (NP), and infant profile (IP) which was dominated by ASVs specific only in infants at 4 months of age. In infants with IP, the rates of the current lactation, dental caries or suspected caries, and poor oral hygiene status were significantly higher than infants with the other two profiles. Comparing infants with SSP and NP, tableware sharing with adult, low intake of fruits or dairy product, and frequent intake of sweetened beverage were significantly associated with SSP. Our findings demonstrated that extended lactation was associated with delayed maturation of infant oral microbiota and found that frequent exposure to adult oral bacteria or dietary habit determine the bacterial profile of oral microbiota at 1.5 years of age.

**P2-045****つまようじ由来成分は枯草菌のペリクル形成を促進する**

○小崎 智己<sup>1</sup>, 石川 一也<sup>2</sup>, 古田 和幸<sup>2</sup>, 垣内 力<sup>2</sup> (岡山大学・薬・分子生物学, <sup>2</sup>岡山大学・医歯薬学総合研究科・分子生物学)

**Bioactive compounds from toothpicks promote pellicle formation of *Bacillus subtilis***

○Tomoki Kosaki<sup>1</sup>, Kazuya Ishikawa<sup>2</sup>, Kazuyuki Furuta<sup>2</sup>, Chikara Kaito<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., <sup>2</sup>Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

バイオフィームは、多糖類、タンパク質、核酸で構成される細胞外マトリックスに埋め込まれた細菌の集合体であり、外部環境と細菌との相互作用において重要な役割を果たす。ペリクルとはバイオフィームの形態の一つで、気-液界面に形成される膜状のバイオフィームのことを指す。枯草菌はペリクル形成能力を持つ細菌であるが、実験室株として用いられている 168 *trpC2* 株はペリクル形成能力が低いことが知られている。本研究では、液体培養液につまようじを加えると枯草菌 168 *trpC2* 株のペリクルの形成が促進されることを発見した。他の木質材料について検討したところ、竹、稲藁、割り箸、おがくずによっても、168 *trpC2* 株のペリクル形成が促進されたことから、枯草菌のペリクル形成を促進する物質は様々な木質材料に存在していると考えられた。試行した材料の中でつまようじが最もペリクル誘導能が高かったため、つまようじを用いて、ペリクル形成を促進する物質の精製をおこなった。つまようじからメタノール可溶性成分を抽出し、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、分画分子量 3.5 kDa の透析、ゲル濾過クロマトグラフィーをおこなったところ、糖類のピークとペリクル形成促進活性のピークが重なった。以上の結果から、つまようじ中の枯草菌のペリクル形成を促進する成分は 3.5 kDa 以上の可溶性多糖類であることが示唆された。今後は、多糖類の構造決定を行うとともに、ペリクル形成が促進される分子メカニズムを解析する予定である。

**P2-046****鶏農場における衛生管理強化は有害微生物低減に有効か**

○山本 倫也<sup>1</sup>, 豊福 肇<sup>2</sup>, 溝手 朝子<sup>1</sup> (山口県立大・栄養, <sup>2</sup>Dept. Vet., Yamaguchi Univ.)

**Is Strengthening Hygiene Management on Chicken Farms Effective in Reducing Pathogenic Microbes?**

○Tomoya Yamamoto<sup>1</sup>, Hajime Toyofuku<sup>2</sup>, Tomoko Mizote<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Food Nutrition Yamaguchi Prefect. Univ., <sup>2</sup>Dept. Human Nutrition, Yamaguchi Prefect. Univ.)

**Purpose:** Campylobacter food poisoning occurs frequently, and chicken is the main source. However, the route of invasion and diffusion of Campylobacter and Salmonella are unknown. In this study, we focused on the relationship between the implementation of the revised Standards for Feeding Hygiene Management (SFHM) and contamination with these two pathogens in broilers, and examined the effectiveness of these standards. **Methods:** Term of Oct. 2018-Oct. 2022, the contamination status in chicken farms in Chugoku-region were monitored, and two houses, an intervention house (IH) and a control house (CH), at one broiler farm were investigated on a continuous basis. In the IH, the bedding was changed and disinfected after broiler shipping-out, and the revised SFHM were implemented and intervention measures were taken as necessary. Both had the same structure and number of birds. The detection of both bacteria using cecum, breast meat, and environmental samples, were performed in accordance with ISO methods, with drug-susceptibility-testing performed and genotyping by MLST analysis. **Results and Discussion:** The prevalence of both bacteria decreased remarkably after the complete implementation of the SFHMS. MLST analysis revealed that long-established genotypic strains had entered the broiler house. No differences were found between interventions and prevalence. (MAFF18072554)

## P2-047

### D-フルクトースが *Fusobacterium nucleatum* の細胞付着性に与える影響

○多田 彩乃, 今大路 治之, 桑原 知巳 (香川大・医・分子微生物)

### Effect of D-fructose on the adhesive property of *Fusobacterium nucleatum* to host cells

○Ayano Tada, Haruyuki Imaohji, Tomomi Kuwahara (Dept. Microbiol., Med., Kagawa Univ.)

【目的】口腔内は多種多様な細菌の共凝集により歯面や歯周組織、舌上に複雑なバイオフィームを形成する。*Fusobacterium nucleatum* は初期定着細菌と後期定着菌の橋渡しをする歯周病関連細菌であり、口腔バイオフィーム形成において中心的役割を担う。我々は、D-フルクトースが *F. nucleatum* の凝集能に影響を与える環境要因であることを明らかにしている。本研究では、D-フルクトースが *F. nucleatum* の宿主細胞への付着性に与える影響を調べた。【方法】*F. nucleatum* ATCC25586 株および ATCC23726 株を BHIS 培地および D-フルクトース (0.5%) を添加した BHIS 培地で培養後、歯肉癌細胞である Ca9-22 や大腸癌細胞である HCT116 および HT29 細胞に対する付着性を比較した。また、大腸細胞株については細胞増殖に与える影響についても調べた。【結果および考察】0.5%D-フルクトース添加 BHIS 培地で培養した *F. nucleatum* は菌体が縮小し、菌体内顆粒が多数形成された。また、歯肉癌細胞である Ca9-22 に対する細胞付着性が亢進し、大腸がん細胞である HCT116 細胞に対しては、細胞増殖を促進した。*F. nucleatum* の細胞付着性や細胞増殖に与える D-フルクトースの影響は菌株により差が認められた。以上の結果から、*F. nucleatum* は微小栄養環境に応じて付着能を変化させ、宿主細胞の生理機能に影響を与えることが示唆された。

## P2-048

### Gene expression analysis during the conversion from a VBNC to culturable state in *Vibrio cholerae*

○Alafate Ayibieke<sup>1</sup>, 西山 紋恵<sup>1</sup>, 妹尾 充敏<sup>2</sup>, 濱端 崇<sup>1</sup> (<sup>1</sup>国立国際医療研究センター・感染症制御研究部, <sup>2</sup>感染研・細菌第二)

○Alafate Ayibieke<sup>1</sup>, Ayae Nishiyama<sup>1</sup>, Mitsutoshi Senoh<sup>2</sup>, Takashi Hamabata<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Dis., NCGM, <sup>2</sup>Dept. Bact. II, NIID)

*Vibrio cholerae* is the causing agent of the disease cholera and can transition to a viable but non-culturable (VBNC) state in an unfavorable environment. VBNC cells have virulence and colonization potential and the ability to convert to a culturable state under optimal conditions. Catalase treatment is one of these conditions that promote VBNC to culturable transformation. The current study aimed to identify genes involved in the conversion of *V. cholerae* VBNC to a culturable state by comparing gene expression profiles of VBNC treated with catalase with those of untreated VBNC cells. *V. cholerae* cells were maintained at 4°C until a complete VBNC microcosm was obtained. The resulting VBNC microcosm was divided into catalase treatment and non-treatment groups and sampled bihourly for culturability testing and microarray gene expression analysis. VBNC cells regained culturability 2 h after catalase treatment. A total of 16 genes were upregulated at 2 and 4 h after treatment. At 6 h, a high number of ribosomal genes were upregulated, indicating that the transformed cells were beginning to proliferate. The genes upregulated in the early stage of transformation included the stress response genes *pspABC*, *dinG*, *rpoE*, *rseA*, and *iscR*, etc. These results provide valuable insights into understanding the mechanisms involved in the conversion of VBNC to a culturable state in *V. cholerae*.

## P2-049

### Competition between *Staphylococcus aureus* and commensal bacteria modulated by free fatty acids

○田嶋 亜紀子<sup>1,2</sup>, 金城 雄樹<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>慈恵医大・細菌, <sup>2</sup>慈恵・バイオフィーム研究センター)

○Akiko Tajima<sup>1,2</sup>, Yuki Kinjo<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., The Jikei Univ. Sch. Med., <sup>2</sup>Jikei Ctr. Biofilm Sci. & Tech)

The human skin protects against pathogens by producing innate immunity components, antimicrobial peptides, and free fatty acids (FFAs). And commensal bacteria have been shown to promote skin health by restricting pathogen colonization and have the potential to biosynthesize molecules that can mediate host-microbe and microbe-microbe interactions. We hypothesized that commensal bacteria antagonize pathogens by cooperating with host molecule such as FFAs. We found that *Corynebacterium* sp., a common skin and nasal commensal, inhibited growth of *Staphylococcus aureus* during side-by-side cocultivation on agar plate in the presence of subinhibitory concentration of FFAs. The growth inhibition was observed in the presence of unsaturated FAs such as palmitoleic acid, oleic acid and cis-vaccenic acid, whereas saturated fatty acids or trans-vaccenic acid did not induce growth inhibition, suggesting cis-unsaturated fatty acids, but not their saturated or trans-unsaturated counterparts, were potent inhibition activators. *Corynebacterium* sp. inhibited growth of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *Bacillus subtilis*, but did not affect the growth of gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. These results suggested that unsaturated FFAs induce bacterial competition between commensal *Corynebacterium* sp. and *S. aureus*.

## P2-050

### 枯草菌 *ytpI* 遺伝子欠損による大腸菌増殖阻害メカニズム

○狩野 智徳<sup>1</sup>, 石川 一也<sup>2</sup>, 古田 和幸<sup>2</sup>, 垣内 力<sup>2</sup> (<sup>1</sup>岡山大学・薬・分子生物学, <sup>2</sup>岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・分子生物学)

### The *ytpI* knockout *Bacillus subtilis* inhibit *Escherichia coli* growth

○Tomonori Kano<sup>1</sup>, Kazuya Ishikawa<sup>2</sup>, Kazuyuki Furuta<sup>2</sup>, Chikara Kaito<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., <sup>2</sup>Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

枯草菌は、食中毒の原因となる病原性大腸菌やその他の病原性細菌の増殖を阻害することから、プロバイオティクスとしての利用が期待されている。しかし、増殖抑制の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。本研究は、プロバイオティクスとして有用な枯草菌株を作出するための基礎知見を得るため、大腸菌の増殖阻害に関わる枯草菌の遺伝的要因を同定することを目的とした。枯草菌遺伝子欠損株ライブラリ 3967 株の各株と、GFP を発現する大腸菌を共培養することで、蛍光強度の変動を指標に大腸菌の生育を変化させる遺伝子を探索した。その結果、大腸菌の蛍光強度を減少させる株として、6 株が得られた。次に、同定された 6 株について、共培養により大腸菌の生菌数を減少させるか確認した。その結果、*ytpI* 遺伝子欠損した枯草菌株が、最も大腸菌の生菌数を減少させた。*ytpI* 遺伝子欠損株の増殖は枯草菌の親株と同程度であったことから、*ytpI* 遺伝子欠損株による大腸菌の増殖阻害は枯草菌の増殖が亢進することによるものではないと判断された。*ytpI* 遺伝子は、ファージ由来の遺伝子であり、Holin タンパク質をコードしていると推定されている。Holin タンパク質は、宿主細菌の細胞膜に穴を開けることで、ファージの溶菌サイクルに関わるとともに、宿主細菌のタンパク質分泌にも影響を与える。今後は、*ytpI* 遺伝子欠損による枯草菌のタンパク質分泌の変化が大腸菌に対する増殖阻害に寄与するのではないかと考え、解析を行う予定である。



**P2-051****Campylobacter jejuni 感染へのコハク酸の影響**

○牧本 真奈<sup>1</sup>, 福島 志帆<sup>1</sup>, 山中 咲季<sup>1</sup>, 下畑 隆明<sup>1,2</sup>, 上番増 喬<sup>1</sup>, 馬渡 一論<sup>1</sup>, 高橋 章<sup>1</sup> (1徳島大・院医歯薬学研究所・予防環境栄養, 2福井県立大・海洋生物資源)

**The effect of succinic acid on *Campylobacter jejuni* infection**

○Mana Makimoto<sup>1</sup>, Shiho Fukushima<sup>1</sup>, Saki Yamanaka<sup>1</sup>, Takaaki Shimohata<sup>1,2</sup>, Takashi Uebanso<sup>1</sup>, Kazuaki Mawatari<sup>1</sup>, Akira Takahashi<sup>1</sup> (1Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch., 2Marine Bio., Fukui Prefect Univ.)

**Background:** *Campylobacter jejuni* (Cj) is a cause of gastrointestinal foodborne disease in human. Since Cj is known to have a unique energy metabolism mechanism, including a preference for certain amino acids, it is suggested that Cj also undergoes a unique metabolism and produces metabolites in the human intestinal tract. To reveal the relation between metabolism and virulence in Cj infection, in this study, we estimated Cj significance metabolites, and investigated contribution of virulence changes during Cj infection in vitro model. **Method:** Cj culture supernatant was analyzed by GC-MS. In addition, we assessed the effect of metabolite on the Cj virulence, adhesion and invasion to host cells by gentamycin protection assay. Gene expression of Cj virulence factors was examined by RT-PCR. **Results & Discussion:** In culture supernatant of Cj, we found Cj consumed amino acid and excreted succinic acid into culture medium. The production of succinic acid was abolished in amino acid free medium, and its production was recovered in aspartic acid and glutamic acid supplementation. Also, Cj adhesion and invasion to the host cells was facilitated by succinic acid stimulation. Our results suggest that Cj alters own virulence by secreting and sensing succinic acid.

**P2-052****青枯病菌の細胞内への二価鉄取り込みへの ferrisiderophore 受容体の関与**

○寺澤 夕貴<sup>1</sup>, 館田 宇宙<sup>1</sup>, 辻 澤乃<sup>1</sup>, 木場 章範<sup>1</sup>, 大西 浩平<sup>1</sup>, 甲斐 建次<sup>2</sup>, 都筑 正行<sup>1</sup>, 曳地 康史<sup>1</sup> (1高知大・農林海洋, 2阪公大院・農)

**Involvement of ferrisiderophore receptors in Fe(II) uptake in *Ralstonia pseudosolanacearum***

○Yuki Terazawa<sup>1</sup>, Sora Tateda<sup>1</sup>, Mion Tsuji<sup>1</sup>, Akinori Kiba<sup>1</sup>, Kouhei Ohnishi<sup>1</sup>, Kenji Kai<sup>2</sup>, Masayuki Tsuzuki<sup>1</sup>, Yasufumi Hikichi<sup>1</sup> (1Fac. Agric. & Marine Sci., Kochi Univ., 2Grad. Sch. Agric., Osaka Met. Univ.)

グラム陰性植物病原細菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* (青枯病菌) OE1-1 株は、シデロフォア (Sd) として Micacocidin と Staphyloferrin B を産生・分泌する。それらの Sd が、環境中の三価鉄 [Fe(III)] とキレート結合し、ferrisiderophore (fSd) を形成する。本研究では、fSd から細胞内へ二価鉄 [Fe(II)] を取り込む機構を解明することを目的とした。450nM Fe(II) 存在下または 4.5μM Fe(III) 存在下で培養した OE1-1 株の培養液の Fe(III) キレート活性 (Sd 活性) は、Fe 非存在下で培養した場合と比較して顕著に低下した。すなわち、細胞内への Fe(II) 取り込み量が増加するにつれて、Sd 活性が低下すると考えられた。450nM Fe(II) 存在下あるいは Fe 非存在下で培養した OE1-1 株のトランスクリプトームを RNA-seq 法により解析した。450nM Fe(II) 存在下での培養と比較して、Fe 非存在下で培養した OE1-1 株では、Sd 産生に関わると推定される遺伝子とともに、外膜に局在する fSd 受容体をコードすると推定される 6 遺伝子の発現が上昇した。そこで、6 遺伝子の中で *RSc0800* 遺伝子の欠損株 ( $\Delta RSc0800$ ) を作製した。そして、その Sd 活性の結果を基に、細胞内への Fe(II) の取り込みについて検討した。その結果、Sd 活性は、Fe 非存在下培養  $\Delta RSc0800$  > Fe 非存在下培養 OE1-1 株 > 4.5μM Fe(III) 存在下培養 OE1-1 株  $\approx$  4.5μM Fe(III) 存在下培養  $\Delta RSc0800$  となった。すなわち、*RSc0800* 遺伝子の欠損は、fSd から細胞内への Fe(II) の取り込みの減少をもたらした。以上の結果から、*RSc0800* は fSd 受容体として Fe(II) の取り込みに関与すると考えられた。*RSc0800* 以外の 5 つの fSd 受容体の細胞内への Fe(II) の取り込みへの関与についても併せて報告する。

**P2-053*****Brevibacillus brevis* DnaK シャペロンシステムの機能解析**

○岡本 涼太<sup>1</sup>, 友安 俊文<sup>1,2</sup>, 田端 厚之<sup>1,2</sup>, 長宗 秀明<sup>1,2</sup> (1徳島大・創成科学研究科・生物資源学, 2徳島大・社会産業理工学・生物資源産業界)

**Functional analysis of DnaK chaperone system in *Brevibacillus brevis***

○Ryota Okamoto<sup>1</sup>, Toshifumi Tomoyasu<sup>1,2</sup>, Atsushi Tabata<sup>1,2</sup>, Hideaki Nagamune<sup>1,2</sup> (1Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., 2Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

**【目的】** *B. brevis* (BB) は、タンパク質の分泌能力が高いことからタンパク質の分泌生産に利用されている。分子シャペロン DnaK は、その機能にコシャペロン DnaJ と GrpE を必要とするので DnaK シャペロンシステム (DnaK-CS) と総称される。DnaK-CS は、新生タンパク質の折りたたみや熱ストレスなどで変性したタンパク質の折りたたみを行う。これまでの報告から、DnaK-CS の要求性は種によって異なり大腸菌 (EC) やレンサ球菌は 37°C 以上の生存に必須であるが、枯草菌は 50°C まで要求性を示さないことがわかっている。そこで、BB の DnaK-CS の特性を解析する目的で BB DnaK-CS のクローニングとその構成因子の精製を試みた。

**【方法と考察】** BB DnaK-CS 発現ベクターで EC *dnaK* 破壊 ( $\Delta dnaK$ ) 株を形質転換し、この株の温度感受性を検討した。また、His タグを付加した BB DnaK, BB DnaJ, BB GrpE を過剰産生する株を作製し Ni-NTA カラムを用いて精製した。

**【結果と考察】** BB DnaK-CS を発現させた EC  $\Delta dnaK$  株の 42°C での温度感受性は部分的にしか回復せず、この条件下では強いシャペロン活性を示さない可能性があることがわかった。また、BB 野生株の温度感受性を調べた結果、49°C 以上になると成長が遅くなることがわかった。現在、精製した BB DnaK-CS と EC DnaK-CS の特性の比較をおこなっている。また、高温下での BB DnaK-CS のタンパク質活性保護作用を解析するために、熱に弱いクレアチンホスホラーゼの代わりに好熱性シアノバクテリアの polyphosphate kinase を使用した ATP 再生産系の構築も進めている。

会員外共同研究者：福村 京平 (徳島大学 生物資源産業界部)

**P2-054****Pyruvate kinase mediates fosfomycin resistance in *Streptococcus pneumoniae***

○田口 厚志, 中島 良介, 西野 邦彦 (大阪大・産業科学研究所)

○Atsushi Taguchi, Ryosuke Nakashima, Kunihiro Nishino (SANKEN (The Institute of Scientific and Industrial Research), Osaka Univ.)

*Streptococcus pneumoniae* is a major cause of death associated with antimicrobial resistance, and understanding how this pathogen develops resistance to various antibiotics is important for establishing new strategies to overcome this problem. We investigated how *S. pneumoniae* becomes resistant to fosfomycin, a phosphonic acid antibiotic that inhibits the MurA enzymes responsible for the first committed step in peptidoglycan synthesis. Analysis of resistant mutants revealed that compromising mutations in pyruvate kinase (SpPYK), which catalyzes the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate, confer fosfomycin resistance to *S. pneumoniae*. By biochemically reconstituting the activity of SpPYK, we identified fructose 1,6-bisphosphate (F16BP) as the allosteric activator for this enzyme. We successfully obtained SpPYK crystal structures in the apo-state and F16BP-bound state, which allowed structural characterization of the SpPYK activation mechanism. Notably, the F16BP binding site in SpPYK differs from effector binding sites reported in eukaryotic pyruvate kinases, and we characterized key residues that are necessary for SpPYK effector recognition. Our work points to a foundational role of SpPYK in mediating metabolic flux in both glycolysis and peptidoglycan synthesis.

## P2-055

### 血清アルブミンによる VBNC 結核菌の再活性化機構

○森重 雄太<sup>1</sup>, 村瀬 良朗<sup>1</sup>, 近松 絹代<sup>1</sup>, 山田 博之<sup>1</sup>, 青野 昭男<sup>1</sup>, 五十嵐 ゆり子<sup>1</sup>, 高木 明子<sup>1</sup>, 御手洗 聡<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>結核研・抗酸菌部, <sup>2</sup>長崎大・院・歯歯薬総研・基礎抗酸菌疫)

### Reactivation effects of serum albumin to viable but non-culturable *Mycobacterium tuberculosis*

○Yuta Morishige<sup>1</sup>, Yoshiro Murase<sup>1</sup>, Kinuyo Chikamatsu<sup>1</sup>, Hiroyuki Yamada<sup>1</sup>, Akio Aono<sup>1</sup>, Yuriko Igarashi<sup>1</sup>, Akiko Takaki<sup>1</sup>, Satoshi Mitarai<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mycobac. Ref. Res., Res. Inst. Tubercul., JATA, <sup>2</sup>Dept. Basic Mycobacteriol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

【背景・目的】VBNC 状態とは、種々のストレスに抵抗性を示す休眠状態の一つである。休眠結核菌の再活性化機構には未だ不明な点が多い。我々は、VBNC 結核菌の再活性化に培地中の血清アルブミンが作用することを見出した。本研究では、その作用機序の解明を試みたので報告する。

【方法】電子伝達系阻害薬 DPI を用いて結核菌 H37Rv 株を VBNC 状態へ誘導した。この菌集団を 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) 及びヒト血清アルブミン (HSA), または卵白アルブミン (OVA) を含む Dubos 培地に 1/10 量接種し、37°C で 20 日間 5% CO<sub>2</sub> 培養し、7H10 培地におけるコロニー形成能 (CFU/mL) を指標として再活性化能を調べた。また、細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP の影響を調べるため、Adenyl cyclase 阻害薬 SQ22536 及び Ser/Thr Protein kinase 阻害薬 H89, Staurosporine による再活性化阻害実験を行った。

【結果】再活性化初日の CFU は約 10<sup>2</sup> CFU/mL であった。これは VBNC 誘導前の全菌数の約 0.01% に相当する。再活性化 20 日目には約 10<sup>7-8</sup> CFU/mL に増加した。この再活性化促進効果は BSA 及び HSA では認められたが、OVA では認められなかった。また、BSA による再活性化は 30 μM H89 及び 10 μM Staurosporine によって阻害されたが、SQ22536 は 10mM まで全く影響を及ぼさなかった。

【考察】DPI 処理 VBNC 細菌に対する血清アルブミンの再活性化機構は、結核菌の Ser/Thr Protein kinase (Pkn) によって制御される細胞壁合成や分裂の再活性化に対して血清アルブミンが正に作用している可能性が示唆された。現在、血清アルブミンと結核菌 Pkn の相互作用機序について解析を進めている。

## P2-056

### 海洋性ビブリオ菌におけるべん毛形成制御因子 FlhF と MS リング構成因子 FliF の相互作用

○福岡 優理亜, 本間 道夫, 小嶋 誠司 (名大・院理・生命理学)

### Interaction of an initiation factor *Vibrio* FlhF for flagellar formation with a MS ring protein FliF

○Yuria Fukushima, Michio Homma, Seiji Kojima (Div. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

*Vibrio alginolyticus* forms a single flagellum at cell pole. It is known that the formation is mainly regulated by two proteins, FlhF and FlhG. FlhF, which belongs to the signal recognition particle (SRP) type GTPase family, localizes at cell pole and is an initiation factor to generate flagella. On the other hand, FlhG works negatively to regulate the flagellar number. The MS-ring formation in flagellar basal body seems to be initiation step to assemble flagella. MS ring is formed by a single protein FliF, that has two transmembrane (TM) segments with a large periplasmic region. We have shown that FlhF is required for the polar localization of *Vibrio* FliF, and FlhF facilitated the MS-ring formation when FliF is overproduced in *E. coli* cell. These suggest that FlhF interacts with FliF to facilitate MS ring formation. Here, we tried to detect the interaction using *Vibrio* FliF fragments fused to GST in *E. coli*. We found that a FliF N-terminal 108 residues, including first TM segment and following periplasmic region, could pull FlhF down. SRP and its receptor are involved in protein targeting of the first step to the translocon in the membrane and FlhF might have a similar function. SRP binds to the region rich in hydrophobic residues, so our results suggest that the hydrophobic residues of this region may be important for FlhF-FliF interaction.

## P2-057

### *Spiroplasma* swimming mechanism suggested by fluorescently labeled MreB in a synthetic bacterium

○田中 芳樹<sup>1</sup>, 木山 花<sup>1</sup>, 田原 悠平<sup>1,2</sup>, 上野山 敦子<sup>1</sup>, 宮田 真人<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大・院理, <sup>2</sup>大阪公大・複合先端)

○Yoshiki Tanaka<sup>1</sup>, Hana Kiyama<sup>1</sup>, Yu-hei Tahara<sup>1,2</sup>, Atsuko Uenoyama<sup>1</sup>, Makoto Miyata<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., <sup>2</sup>OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

*Spiroplasma*, parasitic bacteria for arthropods and plants swim by switching its handedness of helical cell body. The handedness switch is driven by an internal ribbon structure, which includes some MreBs, bacterial actin and *Spiroplasma* specific "fibril" protein. Previously, our group reconstituted *Spiroplasma* swimming in JCVI-syn3B, a minimal synthetic bacterium, by expressing MreB4 and MreB5 (Kiyama H et. al. 2022 SciAdv). In the present study, we studied the behavior of MreB5 in the cells by fluorescence microscopy. mCherry was fused immediately after tyrosine 218 of the total 350 amino acids in MreB5. The cells swam like the original strain without fusion, and fluorescent signals were found throughout the entire cell length. Next, MreB5 was induced with tetracycline additionally in cells expressing MreB4. The fluorescence reached saturation in a dozen hours, and filamentous and moving cells appeared after the 65% fluorescence saturation. Some fluorescent cells did not show any morphological changes or movements. A few filamentous cells contained a fluorescent, moving part and a nonfluorescent, static part. These results suggest that MreB5 molecules cooperatively form stable filaments with MreB4 and achieved conformational change and movement. We are analyzing more details using TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) Microscopy and removal of cell membrane.

## P2-058/W11-8

### *Bordetella pertussis* mechanosensing upregulates small RNA contributing to bacterial colonization

○平松 征洋<sup>1</sup>, 西田 隆司<sup>1</sup>, Dendi Nugraha<sup>1</sup>, 堀口 安彦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大・微研・分子細菌学, <sup>2</sup>阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Yukihiro Hiramatsu<sup>1</sup>, Takashi Nishida<sup>1</sup>, Dendi Nugraha<sup>1</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., <sup>2</sup>CiDER, Osaka Univ.)

The virulence of *Bordetella pertussis* had long been considered to be regulated by the BvgAS two-component system; however, recent studies indicated that the profiles of BvgAS-regulated genes differ significantly between *in vitro* and *in vivo* conditions, suggesting complex mechanisms that regulate *in vivo* gene expression. Here, we identified 9 types of novel small RNAs (sRNAs) designated Bpr1-9 that were highly expressed upon the bacterial colonization of mouse tracheas. Among them, 8 sRNAs were transcribed independently of the BvgAS system. We found that Bpr4, the expression of which is 118-fold higher *in vivo* than *in vitro*, contributes to *B. pertussis* infection by post-transcriptionally upregulating filamentous hemagglutinin (FHA), a major adhesin of the bacteria. Bpr4 bound to the 5'-untranslated region of *fhaB* mRNA encoding FHA and inhibited its degradation mediated by RNaseE. Our results also demonstrated that Bpr4 upregulation is triggered by the interference of flagellar rotation after the interaction of flagellin and gangliosides on the host cells. Subsequently, MotA, a flagellar stator, was disengaged from the flagellar complex and activated a diguanylate cyclase to generate cyclic di-GMP, which induces Bpr4 upregulation through the RisK/RisA two-component system. Our findings indicate that a flagellum-triggered sensory system contributes to *B. pertussis* infection.

**P2-059/W11-2****腸炎ビブリオの腸内代謝物への走化性の解析**

○寺島 浩行, 児玉 年央 (長崎大・熱研・細菌学)

**Analysis of chemotaxis to metabolites of intestinal bacteria in *Vibrio parahaemolyticus***

○Hiroyuki Terashima, Toshio Kodama (Dept. Bacteriol., Inst. Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ.)

腸炎ビブリオ感染症は、腸炎ビブリオによって引き起こされる炎症性の下痢を伴う感染症である。本菌の病原性には、耐熱性溶血毒 TDH と III 型分泌装置が重要な働きをする。III 型分泌装置は、宿主細胞に直接エフェクターを注入することから、宿主細胞にアクセスすることが機能を発揮するための重要なステップであると考えられる。細菌の移動は走化性によって制御されている。走化性は、より好ましい化学物質が存在する環境に移動する能力であるので、腸管上皮細胞の周囲には本菌を誘引する物質が存在することが予想される。そこで、腸炎ビブリオが、腸管内のどのような物質を感知して感染場所を決定し、そこまで到達するのか明らかにすることを目的とした。まず、細菌叢の代謝物や腸管表面の物質に対して走化性を示すかどうか調べた。短鎖脂肪酸や乳酸・コハク酸、ムチンを構成する糖類、アミノ酸やその誘導体に対して、軟寒天培地中での広がりによって走化性を評価した。その結果、乳酸やセリンの存在時に広がり示した。走化性受容体 VP0183 はビルビン酸との共結晶構造が既に報告されていることから、VP0183 が乳酸に対する受容体ではないかと考えた。受容体のメチル化アッセイを行った結果、乳酸によって VP0183 はメチル化されたことから、乳酸を認識していることが示唆された。次に、精製タンパク質を用いた等温滴定カロリメトリーによって解析した結果、VP0183 はビルビン酸とは相互作用したが、乳酸とは相互作用しなかった。現在、VP0183 と乳酸の相互作用についてさらなる解析を行うと共に、スクリーニングした走化性物質を認識する受容体の同定をおこなっている。

**P2-060/W11-1*****Klebsiella pneumoniae* の外膜小胞は菌体内 small RNA を宿主細胞内へ送達する**○椿 翔吾<sup>1</sup>, 松崎 潤太郎<sup>2</sup>, 吉岡 祐亮<sup>3</sup>, 荒木 琢磨<sup>4</sup>, 津川 仁<sup>1</sup> (東海大・医・生体防御学, <sup>2</sup>慶應大・薬・薬物治療学, <sup>3</sup>東京医大・医総研・分子細胞, <sup>4</sup>東海大・医・生命科学統合支援)**Small RNA delivery by extracellular vesicles in *Klebsiella pneumoniae***○Shogo Tsubaki<sup>1</sup>, Juntaro Matsuzaki<sup>2</sup>, Yusuke Yoshioka<sup>3</sup>, Takuma Araki<sup>4</sup>, Hitoshi Tsugawa<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Host Defense., Sch. Med., Tokai Univ., <sup>2</sup>Dept. Pharmacotherapeutics., Sch. Pharm., Keio Univ., <sup>3</sup>Dept. Mol. Cell. Med., Inst. Med., Tokyo Medical Univ., <sup>4</sup>Dept. Med. Sci. Coll. Office., Sch. Med., Tokai Univ.)

【目的】細菌の small RNA (sRNA) は動物細胞内で機能する。しかし、細菌 sRNA がどの様に宿主細胞内へ送達されるか明確ではない。本研究は、消化管内共生菌であるが高齢者に肺炎や肝膿瘍を誘発する *Klebsiella pneumoniae* の sRNA の宿主細胞内送達機序を解析した。

【方法】*K. pneumoniae* の産生する外膜小胞 Extracellular Vesicles (EV) を超遠心法にて回収した。sRNA が EV によって細胞内へ送達されるかを評価する目的で、特定の single guide RNA (sgRNA) が細胞内へ導入されたとき lacZ を発現する lacZ reporter AGS 細胞を構築した。同時に、lacZ 発現を誘導する sgRNA を *K. pneumoniae* に形質転換した (Kp-sgRNA 株)。

【結果】Kp-sgRNA 株では *K. pneumoniae* 野生株に比べ粘稠度の低下と、TEM 電顕解析により莢膜の消失が確認された。Kp-sgRNA 株から抽出した EV でも莢膜の低下が確認された。qPCR 解析により Kp-sgRNA 株の EV 内に形質転換した sgRNA が内包されていることが示された。Kp-sgRNA 株の EV を lacZ reporter AGS 細胞に添加すると lacZ 陽性細胞が確認された。トランスウエルインサートを介して Kp-sgRNA 株を lacZ reporter AGS 細胞へ感染させても lacZ 陽性細胞の発生が認められ、*K. pneumoniae* は莢膜に関係なく EV により菌体内 small RNA を宿主細胞内へ送達できると考えられた。

**P2-061/W11-4****比較トランスクリプトーム解析を用いた植物病原細菌青枯菌 OE1-1 株の感染機構の解析**○都筑 正行<sup>1</sup>, 竹村 知夏<sup>1</sup>, 瀬沼 和香奈<sup>1</sup>, 寺澤 夕貴<sup>1</sup>, 館田 宇宙<sup>1</sup>, 阿部 悠里<sup>1</sup>, 木場 章範<sup>1</sup>, 大西 浩平<sup>1</sup>, 甲斐 建次<sup>2</sup>, 曳地 康史<sup>1</sup> (<sup>1</sup>高知大・農林海洋, <sup>2</sup>阪公大・院農)**Comparative transcriptomics for the infection mechanism of *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1**○Masayuki Tsuzuki<sup>1</sup>, Chika Takemura<sup>1</sup>, Wakana Senuma<sup>1</sup>, Yuki Terazawa<sup>1</sup>, Sora Tateda<sup>1</sup>, Yuri Abe<sup>1</sup>, Akinori Kiba<sup>1</sup>, Kouhei Ohnishi<sup>1</sup>, Kenji Kai<sup>2</sup>, Yasufumi Hikichi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. Agric. Marine Sci., Kochi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Osaka Met. Univ.)

Soil-borne Gram-negative bacteria *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) are a family of plant pathogenic bacteria causing a severe wilt disease on a wide-range of host crop plants. *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1 utilizes 3OH-MAME as a quorum sensing (QS) signal and forms a mushroom-type biofilm during infection. Although it is found that QS is essential for the pathogenicity of the strain OE1-1, roles during infection remain unknown. To understand how gene expression profile is changed during QS, we performed a comparative transcriptomic analysis using eight QS-signaling pathway mutants. By the combination of clustering and Gene Ontology enrichment analysis, we obtained the gene clusters strongly affected by QS-dependent gene regulation in both positive and negative manners. Some QS-signaling mutants showed different expression patterns suggesting the QS-dependent gene regulation is accomplished in a complicated manner via regulation of PhcA function. It is also indicated that the presence of iron switches the global gene expression patterns. Taken together, our study suggests that the strain OE1-1 switches the gene expression patterns during infection with the specific gene regulatory modules dependently on the environmental signals.

**P2-062****サルモネラ特異的走化性受容体 Tcp のクエン酸認識における二価カチオンの関与**○大森 楓河<sup>1</sup>, 松田 茉莉子<sup>1</sup>, 今田 勝巳<sup>2</sup>, 田島 寛隆<sup>3,4</sup>, 川岸 都朗<sup>1,3,4</sup> (法政大・院理工・生命機能, <sup>2</sup>大阪大・院・理学研究科, <sup>3</sup>法政大・生命科学・生命機能, <sup>4</sup>法政大・ナノテクセンター)**Divalent cations are involved in citrate recognition by the *Salmonella*-specific chemoreceptor Tcp**○Fuga Omori<sup>1</sup>, Mariko Matsuda<sup>1</sup>, Katsumi Imada<sup>2</sup>, Hiroataka Tajima<sup>3,4</sup>, Ikuro Kawagishi<sup>1,3,4</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. and Engin., Hosei Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., <sup>3</sup>Dept. Biosci. and Appl. Chem., Hosei Univ., <sup>4</sup>Res. Cen. Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium は、クエン酸に対する誘引応答を媒介する走化性受容体 Tcp をもつ。その特徴的な点は、クエン酸に対して適応した後に二価金属イオンを添加すると再び誘引応答を媒介することである。二価金属イオン単独では誘引応答を引き起こさないことから、Tcp はクエン酸-二価金属イオン複合体をクエン酸とは異なる誘引物質として認識するとされてきた。しかし、Tcp-クエン酸共結晶では、クエン酸結合部位に Zn<sup>2+</sup> が配位していた。そこで本研究では、EDTA のクエン酸応答に対する影響を観察した。Tcp を唯一の走化性受容体として発現する大腸菌を異なる濃度の EDTA を含む緩衝液に懸濁し、クエン酸またはクエン酸-Mg<sup>2+</sup> を添加して、菌の遊泳を直接観察した。EDTA 濃度が上昇するとクエン酸応答が弱くなったが、さらに Mg<sup>2+</sup> を加えるとクエン酸応答が回復した。一般に、走化性受容体は誘引応答を媒介後、メチル化されて適応を引き起こす。そこで、上述の菌にクエン酸などを与えてイムノプロットングで調べたところ、確かにクエン酸、クエン酸-Mg<sup>2+</sup> によりメチル化レベルが進行した。一方、クエン酸とクエン酸-Mg<sup>2+</sup> に対する応答に関して可能な 4 種類全ての表現型を示す変異型 Tcp が得られている。そこで、これらを用いて走化性応答、メチル化を調べた。その結果、一部の表現型 Tcp は、Mg<sup>2+</sup> 親和性低下により説明できる挙動を示した。また、Tcp ペリプラズムフラグメントを調製し、リガンド結合解析を行ったところ、クエン酸のみには結合しなかったが、Mg<sup>2+</sup> 存在下では結合した。以上の結果は、Tcp がクエン酸認識に二価金属イオンを必要とすることを示唆している。

## P2-063

### **Campylobacter jejuni**における情報伝達系とストレス抵抗性との関連

○江口 陽子<sup>1,2</sup>, 濱口 幹太<sup>1</sup>, 上山 真央<sup>2</sup>, 櫻井 優亜<sup>2</sup>, 寺田 結香<sup>2</sup>, 高松 萌菜<sup>2</sup> (1近畿大院・生物工学, 2近畿大・生物理工・食品)

### Connecting signal transduction and stress tolerance in *Campylobacter jejuni*

○Yoko Eguchi<sup>1,2</sup>, Kanta Hamaguchi<sup>1</sup>, Mao Ueyama<sup>2</sup>, Yua Sakurai<sup>2</sup>, Yuika Terada<sup>2</sup>, Moena Takamatsu<sup>2</sup> (1Grad. Sch. BOST, Kindai Univ., 2Dept. Sci. Tech. Food Safety, BOST, Kindai Univ.)

カンピロバクター菌は世界中で多くの食中毒を引き起こしているが、本菌の環境ストレスに対する抵抗性メカニズムについては不明の部分が多く残されている。二成分情報伝達系 (TCS) は細菌に広く保存される情報伝達系であり、その多くが環境変化への応答に関わる。標準株である *Campylobacter jejuni* NCTC11168 株には、TCS として、ヒスチジンキナーゼ (HK) が7種、レスポンスレギュレーター (RR) が12種報告されている。本研究では、*C. jejuni* TCS 破壊株コレクションを構築し、様々な環境ストレスに対する応答を測定することで、TCS とストレス抵抗性との関連について新しい知見を得ることを目指している。NCTC11168 株に対して、7種のHK破壊株および9種のRR破壊株 (12種のうち2種は増殖に必須) を作成し、酸ストレス (無機酸、有機酸)、塩ストレス、乾燥ストレスに対する感受性を野生株と比較した。その結果、塩酸添加による酸ストレスおよび塩化ナトリウム添加による塩ストレスに対して感受性が増大したRR破壊株は認められなかったが、酢酸およびギ酸の添加において *racR* 破壊株で感受性の増大を認めた。乾燥ストレスに対しては *racR*, *flgR*, *recJ* 破壊株において感受性の増大を認めた。*RacR* RR のペアとなるセンサー *RacS* HK をコードする *racS* 破壊株でもギ酸ストレスや乾燥ストレスに対する感受性の増大を認めた。*RacS/RacR* TCS は、ニワトリ腸内への定着に関する TCS であり、有機酸ストレスへの抵抗性は本菌の宿主内定着を有利にしているのかもしれない。現在、高空気ストレス (好気条件での振盪培養)、熱ストレス、胆汁酸ストレスに対する感受性の測定も行っている。

## P2-064

### 大腸菌の細胞壁合成に関わる脂質フリッパーゼ MurJ の構造と機能

○甲賀 栄貴, Napathip Lertpreedakorn, 田中 良樹, 吉海江 国仁, 谷口 勝英, 藤本 圭, 竹田 弘法, 宮崎 亮次, 塚崎 智也 (奈良先端大・バイオ)

### Structure and Function of MurJ flippase essential for peptidoglycan synthesis

○Hidetaka Kohga, Napathip Lertpreedakorn, Yoshiki Tanaka, Kunihiro Yoshikaie, Katsuhide Taniguchi, Kei Fujimoto, Hironori Takeda, Ryoji Miyazaki, Tomoya Tsukazaki (Nara Inst. of Sci. and Tech.)

真正細菌の脂質フリッパーゼ MurJ は、細胞質で合成されるペプチドグリカン前駆体 (LipidII) をペリプラズム側に反転させる役割を持ち、細胞壁合成における必須なステップを担うため、MurJ の機能阻害は細胞溶解を引き起こす。近年では、あるファージ由来の溶菌ペプチド *Lys<sup>M</sup>* が MurJ を阻害することで大腸菌の溶菌を促すことが報告されており、MurJ は新たな抗生物質のターゲットとなりうることを示唆されている。MurJ は、膜タンパク質であり細胞質に V 字型に開いた Inward 構造、ペリプラズム側に開いた Outward 構造を交互に繰り返すダイナミックな構造変化を伴いながら LipidII を輸送するとされている。これまでに Inward 構造、Outward 構造の詳細構造のみが報告されていたが、これらの構造変化過程の詳細は不明であった。

本研究では、LipidII を含む条件下での MurJ の結晶化、X線結晶解析を行うことで MurJ のより詳細な輸送メカニズムの解明を試みた。大腸菌 MurJ を精製し、Lipidic Cubic Phase (LCP) 法を用いて結晶化に成功した。大型放射光施設 SPring-8 BL32XU にて X線回折実験を行い MurJ の新規構造を決定したところ、Inward 構造、Outward 構造のどちらでもない中間状態の Squeezed 型の構造を得た。詳細な構造比較からアップデートした MurJ による LipidII の輸送モデルを提唱した。さらに、MurJ と溶菌ペプチド *Lys<sup>M</sup>* の関係性についても詳細に調べており、本会では *Lys<sup>M</sup>* の MurJ 阻害メカニズムに関する新たな知見を報告する。

共同研究者: MD シミュレーション担当 森貴治 (理化学研究所), LipidII 提供 Lisa Fritz, Tanja Schneider (Univ. of Bonn)

## P2-065

### 細胞壁のない細菌の細胞分裂タンパク質の相互作用解析

○笠井 大司<sup>1</sup>, 田原 悠平<sup>2</sup>, 宮田 真人<sup>2</sup>, 塩見 大輔<sup>1</sup> (1立教大・理・生命理, 2大阪公立大・院理・生物)

### Analyzing cell division protein's interaction of cell wall-less bacteria

○Taishi Kasai<sup>1</sup>, Yu-hei Tahara<sup>2</sup>, Makoto Miyata<sup>2</sup>, Daisuke Shiomi<sup>1</sup> (1Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ., 2Dept. Bio., Grad. Sch. Sci., Osaka Met. Univ.)

The regulation of cell division is essential for cell growth. The bacterial cell division is driven by a ring like structure (Z-ring). The Z-ring is composed of the tubulin homolog FtsZ protein. FtsZ forms polymers in a GTP-dependent manner and recruits other cell division proteins and regulates the synthesis of the cell wall. FtsZ polymer is stabilized by SepF protein. *Spiroplasma eriocheiris* are helical, cell wall-less bacteria. *S. eriocheiris* lacks almost genes involved in cell wall synthesis except *ftsZ* and *sepF* genes. Thus, FtsZ and SepF must have functions unrelated to cell wall synthesis although the characteristics of these cell division proteins is not clear. In the present study, we have analyzed the interaction between *S. eriocheiris* FtsZ (SeFtsZ) and SepF (SeSepF). First, we measured the effect of SeSepF on GTPase activity of SeFtsZ. The GTPase activity was estimated from released phosphate in sample solution. The rate of GTP hydrolysis by SeFtsZ was increased in the presence of SeSepF. The Leu-272 mutation affects the polymerization of SeFtsZ. The SeFtsZ<sup>L272E</sup> mutant reduced the GTPase activity. Next, we measured the binding affinity of SeSepF for SeFtsZ by the bio-layer interferometry. The affinity to the SeFtsZ monomer was higher than the affinity to polymer. These results suggested the SeSepF binds to the SeFtsZ monomer and activates the polymerization of SeFtsZ.

## P2-066

### A 群レンサ球菌の金属恒常性タンパク質 AdcAII は亜鉛の獲得と病原性に必要である

○相川 知宏, 清水 玲秀, 村瀬 一典, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大院・医・微生物)

### AdcAII of Group A Streptococcus is required for zinc acquisition and virulence

○Chihiro Aikawa, Akihide Shimizu, Kazunori Murase, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【目的】遷移金属イオンは、転写、DNAの合成や修復に必須なタンパク質を触媒するため、細菌は金属イオン感知機構とその制御下にある獲得機構を用いて菌体外の金属イオンの利用可能量の変化に対応する。A群レンサ球菌 (GAS) は亜鉛獲得機構として Adc レギュロンと呼ばれる分子群を保持し、このうち、高い配列同源性を持つ AdcA と AdcAII が本機構の主要分子である。AdcA はグラム陽性、陰性の幅広い細菌種に保存されるが、AdcAII は *Streptococcus* 属細菌内でのみ認められる。これまでに両分子の亜鉛獲得における重要性は示されてきたが、亜鉛獲得と本菌の病原性の関連性はほとんど明らかでない。そこで、本研究では GAS の生育と病原性における両分子の役割を明らかにすることを目的とした。【方法】AdcA 及び AdcAII の遺伝子欠損株を作成し、亜鉛をキレートした培養液中でそれらの増殖を観察した。また、欠損株の好中球及びマウスへの感染により、両分子の病原性への寄与を評価した。【結果と考察】野生株と比較して、亜鉛をキレートした培養液中での AdcA と AdcAII の各欠損株の増殖はわずかに抑制された。一方で、両分子の二重欠損株の増殖は顕著に抑制されたことから、2つの分子が亜鉛獲得において冗長的に機能していることが示唆された。好中球においては、AdcAII 欠損株の生存率が顕著に減少した一方で、AdcA の生存率は野生株のものと同程度であった。また、野生株と AdcA 欠損株の感染ではマウスの生存率は認められなかったが、AdcAII 欠損株のマウスへの病原性は顕著に低下した。以上より、AdcA と AdcAII は亜鉛獲得により GAS の生育に寄与するが、AdcAII は宿主での本菌の病原性にも貢献することが示唆された。

**P2-067****緑膿菌バイオフィルムのライフサイクルと膜小胞産生の連関**

○菅野 美月<sup>1</sup>, 二又 裕之<sup>1,2</sup>, 田代 陽介<sup>1,3</sup> (1静大院・総合科技, 2静大・グリーン研, 3JSTさきがけ)

**Relationship between membrane vesicle production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa***

○Mizuki Kanno<sup>1</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,2</sup>, Yosuke Tashiro<sup>1,3</sup> (1Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ., 3JST PRESTO)

細菌は自身の細胞膜から直径 20-400 nm の球状構造体である膜小胞 (Membrane vesicles: MVs) を放出する。膜小胞はリン脂質二重層など細胞膜由来の成分で構成されており、病原因子運搬やシグナル伝達など細胞間情報伝達媒体として働く。また微生物が集合して作るバイオフィルムにおいて膜小胞産生が増加することが知られている。細菌は感染時に宿主細胞上でバイオフィルムを形成し、多量に放出した膜小胞により宿主の免疫応答を誘導する。そのためバイオフィルム特有の膜小胞産生誘発機構の存在が考えられるが、その全容は明らかとなっていない。そこで本研究では日和見感染菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 を用い、バイオフィルムにおける膜小胞産生誘発機構の解明を目指した。

PAO1 株ゲノムへのトランスポゾン挿入により緑膿菌ランダム遺伝子変異株を 8024 株獲得し、バイオフィルム状態での膜小胞産生量を比較したところ 72 株において産生量低下 (野生株産生量の 1/3) が見られた。これら膜小胞低産生株を解析した結果、べん毛運動 (Flg, Mot) や細胞外多糖 (Psl) 合成が深く関与する「表面付着」の要素や、バイオフィルム形成自体が膜小胞多量産生に寄与することが示唆された。一方、バイオフィルムの脱離を担う遊離脂肪酸シグナル *cis*-2-デセン酸の合成因子 *DspI* も膜小胞産生を誘発することが明らかとなった。宿主への感染後、細菌の生存においてバイオフィルム形成は外部脅威から身を守るために効果的な戦略である。本研究の結果によりバイオフィルム形成の各段階における膜小胞産生誘発の様子が明らかとなり、膜小胞産生制御によるバイオフィルム形成および細菌感染症制御への応用が期待される。

**P2-068****細菌が放出する膜小胞の特性と表層ストレスとの連関解明**

○鈴木 絵梨性<sup>1</sup>, 二又 裕之<sup>1,2</sup>, 田代 陽介<sup>1,3</sup> (1静大院・総合科技, 2静大・グリーン研, 3JSTさきがけ)

**Characteristics of membrane vesicles are altered by stresses on cell surface in *Escherichia coli***

○Erika Suzuki<sup>1</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,2</sup>, Yosuke Tashiro<sup>1,3</sup> (1Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ., 3JST PRESTO)

細菌の膜小胞は、細胞膜のリン脂質二重層から構成された直径 20-400 nm のリボソーム様球状構造体であり、細胞表層においてストレスが生じるとその部位を切り離すように膜小胞が放出される。また、膜小胞は多様な特性を有し、核酸や病原因子などを内包して他細胞へ輸送することからワクチンなどへの医療応用が期待されている。しかし、放出される膜小胞は均一ではなく、安定した機能の膜小胞を利用するためには、細胞表層ストレスと生じる膜小胞特性との関係性の理解が重要である。そこで本研究では、大腸菌の様々な変異株の膜小胞を解析することで、膜小胞特性とその形成を誘発する表層ストレスとの連関解明を目指した。本研究では、大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 のべん毛欠損株を親株とし、膜小胞形成に関連する遺伝子との二重変異株を作製した。どの変異株も親株より膜小胞形成量の増加が確認されたが、特に外膜タンパク質、タンパク質輸送遺伝子、架橋遺伝子の欠損株においてその増加が顕著であった。また、膜透過性測定を行ったところ、変異株ごとに透過性は異なり、 $\Delta$ tolA は膜透過性が高いことが示された。さらに、膜小胞の透過電子顕微鏡観察とナノ粒子トラッキング解析の結果、サイズ分布は同等であるものの膜小胞の形状に差異があり、細胞壁合成不全の特性を持つ  $\Delta$ nlpI では二重膜小胞、膜透過性の高かった  $\Delta$ tolA では多重膜小胞が確認された。以上の結果から、変異株ごとに形成量や膜透過性、形状は異なり、細胞表層へのストレスの違いによって異なる膜小胞が形成されることが示された。今後は膜小胞一粒子ごとの組成解析を実施し、細菌表層ストレスと膜小胞特性の多様性との連関解明を目指す。

**P2-069****ニワトリ糞便から分離した *Lactobacillus* 属細菌が産生する S-layer タンパク質の多様性と機能**

○三崎 彩, 梶川 揚申 (東農大・応生科・農化)

**Diversity and function of S-layer proteins produced by *Lactobacillus* sp. isolated from chicken feces**

○Aya Misaki, Akinobu Kajikawa (Dept. Agr. Chem., Appl. Bio. Sci., Tokyo Univ. Agr.)

動物腸管内に生息する乳酸菌が産生する S-layer タンパク質は腸管定着や粘膜免疫系との相互作用において重要な役割を果たす。S-layer タンパク質の構造は多様性に富むことが分かっており、その機能性にも大きな差異があることが知られている。また、S-layer タンパク質に異種抗原を挿入した抗原運搬体への利用も検討されるなどの応用研究も試みられている。本研究では、ニワトリの糞便試料から S-layer タンパク質を産生する乳酸菌株を分離し、それらの機能性を探ることで有用な S-layer 産生乳酸菌株を取得することを目的とする。

九州および北海道の養鶏場からニワトリの糞便を採集し、単離したコロニーから SDS-PAGE により S-layer タンパク質を産生すると思われる菌株のみを選抜し、16S rRNA 遺伝子配列の解析を行ったところ、*Lactobacillus crispatus* など 4 菌種が推定された。これらの分離菌株を持つ推定 S-layer タンパク質のうち、*L. crispatus* KJCC40 株がもつものは突出して分子量が大きく、これを SlpH と命名した。ドラフトゲノム配列の取得後、LC-MS 解析により *slpH* 遺伝子を同定した。AlphaFold2 による立体構造予測を行ったところ、SlpH には他の多くの乳酸菌由来 S-layer タンパク質にはない N 末端ドメイン (NO ドメイン) を保持していることが推定された。現在、他の分離菌株由来 S-layer タンパク質との機能性を比較するとともに、NO ドメインを欠失した変異株の作製を試みており、今後当該部位がどのような役割を持つのかを検討していく。

**P2-070****磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 細胞内で新規に合成されたマグネトソームの配置機構**

○下茂 梨乃<sup>1</sup>, 田岡 東<sup>2,3</sup> (1金沢大・院・自然科学, 2金沢大・理工・生命理工, 3金沢大・ナノ生命)

**Mechanism for de novo synthesized magnetosome positioning in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1**

○Rino Shimoshige<sup>1</sup>, Azuma Taoka<sup>2,3</sup> (1Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., 2Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., 3NanoLSI, Kanazawa Univ.)

磁性細菌はマグネトソームと呼ばれる膜オルガネラを持つ。磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 では、マグネトソームはらせん状細胞の重心軸に沿って直鎖状に配置されるが、その配置機構は不明である。本研究では、マグネトソーム合成を薬剤誘導できる磁性細菌株 ( $Q_{ind}$  株) を用いて、新規に細胞内で合成されたマグネトソームの配置過程の生細胞イメージングを行った。マグネトソームマーカーである GFP-MmsF の蛍光シグナルをタイムラプス撮影することで、 $Q_{ind}$  株におけるマグネトソーム配置過程を動画観察した。その結果、誘導開始後 4 時間まではマグネトソームを示す蛍光スポットが細胞内を動的に不均一に拡散したが、6 時間後には細胞中央に静的に配置された。次に、マグネトソーム配置に関わるアクチン様細胞骨格 MamK を欠損した  $Q_{ind}$  株 ( $\Delta$ delta-mamK  $Q_{ind}$  株) を用いて、観察を行った。新規に合成されたマグネトソームは、誘導後 6 時間後までは、野生型  $Q_{ind}$  株のマグネトソームと同様に不均一な拡散が観察された。しかし、 $\Delta$ delta-mamK  $Q_{ind}$  株では、8 時間後以降もマグネトソームは固定されず、動的に拡散を続けた。興味深いことに、マグネトソームは細胞中心軸に沿って拡散していた。このことから、2 つの機構がマグネトソーム配置を担っていることが示唆された。1 つは MamK 依存的な機構で、マグネトソームの静的な直鎖状配置を担うと考えられる。もう 1 つは、MamK 非依存的にマグネトソームを細胞中心軸に比較的弱いアフィニティーで配置させる機構である。現在、MamK 非依存的機構を担う分子の特定を目指した研究を行っており、その結果を報告する。

## P2-071/W11-5

### Role of the cytoplasmic ATPase complex in export switching of the flagellar protein export apparatus

○南野 徹<sup>1</sup>, 木下 実紀<sup>1</sup>, 難波 啓一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大・生命機能, <sup>2</sup>理研・Spring-8)

○Tohru Minamino<sup>1</sup>, Miki Kinoshita<sup>1</sup>, Keiichi Namba<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Spring-8, RIKEN)

Bacteria employ the flagellar type III secretion system (FT3SS) to construct flagella on the cell surface. Flagellar assembly begins with the basal body, followed by the hook and finally the filament. The C-terminal cytoplasmic domains of FlhA (FlhA<sub>C</sub>) and FlhB (FlhB<sub>C</sub>) forms a docking platform for export substrates and, together with the cytoplasmic ATPase complex of the FT3SS, provide order to flagellar assembly. The FT3SS infrequently secretes the FliK ruler protein to measure the hook length during hook assembly, and the C-terminal domain of FliK (FliK<sub>C</sub>) binds to FlhB<sub>C</sub> to switch substrate specificity of the FT3SS from hook-type to filament-type when the hook length reaches about 55 nm in *Salmonella*. As a result, the FlhA<sub>C</sub> ring structure is highly cooperatively remodeled via the FliK<sub>C</sub>-FlhB<sub>C</sub> interaction, thereby terminating hook assembly and initiating filament assembly. However, the export switching mechanism of the FT3SS remains unclear. Here we provide experimental evidence suggesting that the FlhA<sub>C</sub> ring requires the energy derived from ATP hydrolysis by the cytoplasmic ATPase complex to induce its structural remodeling in a FliK-dependent manner.

## P2-072

### In vivo 部位特異的光架橋法による BamA-BamC 相互作用解析

○丸野 友希, Thewasano Nakajohn, Edward Germany, 塩田 拓也 (宮崎大・テニユアトラック推進室)

### Analysis of BamA-BamC interactions by in vivo site-specific photo-crosslinking

○Yuki Maruno, Thewasano Nakajohn, Edward Germany, Takuya Shiota (Inst TT Promo., Univ of Miyazaki)

大腸菌の外膜にはβバレル型膜タンパク質が存在する。βバレル型膜タンパク質のほとんどは、Beta-Barrel Assembly Machinery (BAM) 複合体と呼ばれる分子装置によって、立体構造形成と膜組込(アセンブリー)が行われる。BAM複合体は、BamA, B, C, D, Eの5つのサブユニットから構成されており、様々な状態の立体構造が解かれている。その中で、BamCは、BAM複合体のペリプラズム側に存在しているが、構造状態によって相互作用部位や、見えている構造領域が大きく異なる。またin vivoでは、BamCの一部が細胞表面に露出している可能性を示唆する報告もあり、BamCがBAM複合体中でどのように相互作用しているかについての結論は得られていない。本研究では、この問題を解決するため、BamCとBAM複合体の中心的サブユニットであるBamAの相互作用状態をin vivo部位特異的光架橋法により解析した。この手法は、光架橋性側鎖を持つ非天然アミノ酸 p-benzoyl-L-phenylalanine (pBPA)を用いて、アミノ酸残基レベルの空間分解能での相互作用解析をin vivoで行える。解析の結果、BamCは、BamAのペリプラズム領域だけでなく、膜貫通領域や細胞表面でも相互作用することを明らかにした。また、基質存在時には、BamAとBamCの相互作用に変化が見られた。すなわち、BamCは、基質輸送時に、BAM複合体内で構造変化するサブユニットであることが示された。当日は、得られた結果をもとに構造機能相関について議論したい。

## P2-073

### 多剤排出ポンプの膜環境下における構造変化の探索

○田辺 幹雄 (構造生物学研究センター・物構研・高エネ機構)

### Exploring conformational changes of multidrug efflux pumps in the membrane environment

○Mikio Tanabe (Struct Biol. Res. Ctr. Inst. Mater. Struct. Sci. KEK)

細菌ゲノム上には多剤排出輸送体をコードする遺伝子が数多く潜在し、抗菌薬等の菌体の生育に有害な物質を細胞膜外に排出し、細菌を様々な化合物に対して耐性化させる。これら多剤排出輸送体はH<sup>+</sup>やイオン輸送と共役して薬剤を排出する二次性能動輸送体であり、各々が異なる分子骨格の多数の薬剤を排出することが知られている。しかしながら同定された基質の中にはMICアッセイにおいて薬剤感受性に影響を与える、もしくはin vitro実験系での輸送活性の確認されたという事実にも留まっているもの、またアッセイ系の問題で化合物が膜に付着し輸送活性が正確に見積もられていないなど、実際の基質輸送にどの程度直接的に関与したのか曖昧な基質も存在する。また同時に近年では脂質のタンパク質への影響や、脂質とタンパク質の相互作用により活性が制御される等の報告例も多く挙げられており、これまでの精製タンパクを用いた実験系からより膜上に近い形で輸送体かどのように機能しているかをより詳細に検討する必要がある。そこで本研究は膜輸送とその阻害機構をより正確に明らかにするため、膜に埋まっている状態の膜タンパクの構造を明らかにし、膜と輸送体の関係についてより詳細に検討することを目標にした。MFS型、RND型の代表的な薬剤排出輸送体を大量発現させた大腸菌膜、リボソームに再構成させた状態の輸送体を抗体によってラベルし、クライオ電顕単粒子法を用いて解析することでより天然状態に近い膜タンパク質の動態、構造解析を目標にして解析を進めている。本発表では単粒子解析の現在の進捗とリボソームへの再構成実験について発表する。

## P2-074/W11-6

### 抗抗菌ヒストン様タンパク質は天然変性領域を介して核酸との相分離を誘導する

○西山 晃史, 目黒 佳未, 真鍋 陸, 加藤 成祥, 尾関 百合子, 立石 善隆, 松本 壮吉 (新潟大院・医歯学総合・細菌)

### Phase separation of DNA via intrinsically disordered region of mycobacterial histone-like protein

○Akihito Nishiyama, Yoshimi Meguro, Riku Manabe, Shigetada Kato, Yuriko Ozeki, Yoshitaka Tateishi, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

*Mycobacterium tuberculosis* has the property prone to become a dormant persister, which is known to be tolerant to anti-tuberculosis therapy and highly related to latent infections. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) is a histone-like protein highly expressed in the stationary and dormant phases. MDP1 has a unique histone tail-like intrinsically disordered region (IDR) which is absent in most of other bacterial histone-like proteins. We have reported that MDP1 induces the dormancy phenotypes of mycobacteria including chromosome compaction and growth suppression, in which the function of IDR is essential. In addition, we also elucidated the molecular dynamic mechanism of IDR-mediated DNA crosslinking process. Recently, it has been reported the significant roles of phase separation of the biomacromolecules in the various cellular functions and diseases. IDR is known as an inducer of phase separation. In this study, we investigated the phase separation between MDP1 and DNA as a possible mechanism involved in chromosome compaction. MDP1 induced phase separation of DNA in a dose- and time-dependent manner. IDR played a crucial role in this phase separation. Our data suggest that a series of IDR-mediated DNA crosslinking and phase separation are involved in MDP1-induced chromosome compaction which contributes to dormant cell formation.

**P2-075/W11-3****腸菌由来の細胞外小胞が A 群レンサ球菌に与える生物学的影響**

○河岸 優, 村瀬 一典, 中川 一路 (京都大・医・微生物感染症)

**Biological Effects of Escherichia coli derived extracellular vesicles on Group A Streptococcus**

○Yu Kawagishi, Kazunori Murase, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【背景・目的】細胞外小胞 (Extracellular vesicle: EV) は細菌が細胞外へ産生する 20-400 nm の球状の構造体である。EV は細菌由来分子であるタンパク、脂質、核酸分子等を内包しており、それら分子を宿主へと運び、感染戦略の一旦を担っていることも多数報告されている。しかしながら、異なる細菌種間における EV の役割については未だ不明な点が多い。これまでに我々は、A 群レンサ球菌 (group A Streptococcus; GAS) 培養時に大腸菌由来の EV を添加すると、GAS の増殖が有意に抑えられるという結果を得た。本研究では、この増殖抑制機構を明らかにするとともに、異なる細菌間における EV の生物学的影響の解明を目的とする。

【方法】大腸菌 EV を添加した際の GAS の増殖に関わる遺伝子の発現量を qPCR により測定した。また、透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて GAS の形態的变化を観察した。さらに、より詳細な増殖抑制機構を明らかにするために、RNA-seq を用いて網羅的な遺伝子発現変動の解析を行った。

【結果・考察】qPCR の結果、EV 添加群では特に DNA 複製、細胞分裂に関わる遺伝子発現量が低下していた。さらに、SEM、TEM を用いた形態的観察の結果、EV の添加群では非対称的な形態変化、細胞隔壁の多重形成が起こっていることが示された。このことから、EV は DNA 複製と細胞分裂の少なくとも二つの経路に干渉していることが示唆された。さらに RNAseq の結果、EV 添加群では病原性、代謝に関わる遺伝子などグローバルな遺伝子発現抑制が見られたことから、異種間の細菌では EV によって幅広い生物学的な影響を及ぼしていることが明らかとなった。

**P2-076****緑膿菌における細胞壁が損傷した細胞の解析**○原田 潤<sup>1</sup>, 兼松 周作<sup>1</sup>, 野村 暢彦<sup>2,3</sup>, 豊福 雅典<sup>2,3</sup> (筑波大・生命環境科学, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系, <sup>3</sup>筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター)**Characterization of stress-induced cell wall deficient bacterial cells in Pseudomonas aeruginosa**○Jun Harada<sup>1</sup>, Shusaku Kanematsu<sup>1</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>2,3</sup>, Masanori Toyofuku<sup>2,3</sup> (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ., Tsukuba, <sup>2</sup>Fac. Life Environ. Sci., Univ., Tsukuba, <sup>3</sup>Mics, Univ. Tsukuba)

多くの細菌は、ペプチドグリカン (以下 PG) から構成される細胞壁を持つ。細胞壁は、菌体を浸透圧ストレスから保護し、生存に重要な役割を果たす。さらに、細胞壁はβ-ラクタム系薬剤などの抗生物質のターゲットとなるため、感染症治療においても重要な構造である。当研究室の先行研究から、緑膿菌の細胞集団中において、細胞壁が分解されている球状細胞 (以下 Round-cell; R-cell) が出現することがわかってきた。R-cell は DNA ストレスや嫌気条件において誘導される PG 分解酵素のエンドリシンによって自身の PG 層が分解されることによって形成される。こうして形成された R-cell は破裂し、メンブレンベシクル (MV) を放出するものと破裂しないものまで多様に観察されている。R-cell は細胞壁が分解されているために、細胞壁が欠落した状態で分裂、増殖し続けることが可能な L-form に類する特異な細胞形態であると考えられる。したがって、R-cell は L-form において見られる細胞壁をターゲットとする抗生物質に耐性をもつ可能性が考えられる。さらに、R-cell はシプロフロキサシン等のニューキノロン系抗生物質や、マイトマイシン C など、DNA 損傷を引き起こす薬剤によっても誘導される。ゆえに、このような性質を持った R-cell の存在が緑膿菌による感染症の慢性化や、薬剤耐性能の獲得に寄与していることが考えられる。さらに、R-cell 形成を誘導するエンドリシンはほとんどの細菌のゲノムに広く保存されているため、この R-cell 形成機構は細菌共通のメカニズムであることが示唆される。しかし、R-cell はこれまで研究されていないため、本研究では R-cell の性質や機能を明らかにすることを旨とする。

**P2-077****生体内イメージングに向けた長波長発光膜小胞の作製**○木本 万結<sup>1</sup>, 小根山 千歳<sup>2,5</sup>, 中尾 龍馬<sup>3</sup>, 二又 裕之<sup>1,4</sup>, 田代 陽介<sup>1,5</sup> (静大院・総合科技, <sup>2</sup>愛知がん七研・腫瘍抑制, <sup>3</sup>感染研・細菌一, <sup>4</sup>静大・グリーン研, <sup>5</sup>JST さきがけ)**Long-wavelength luminescent membrane vesicles for in vivo imaging**○Mayu Kimoto<sup>1</sup>, Chitose Oneyama<sup>2,5</sup>, Ryoma Nakao<sup>3</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,4</sup>, Yosuke Tashiro<sup>1,5</sup> (Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Div. Cancer Cell Reg., Aichi Cancer Ctr. Res. Inst., <sup>3</sup>Dep. Bacteriol. I, NIID, <sup>4</sup>Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ., <sup>5</sup>JST PRESTO)

膜小胞は、細菌が細胞外に放出している直径約 100 nm の微粒子であり、細胞膜由来のリン脂質二重層や膜タンパク質、リポ多糖で構成されている。膜小胞は病原性因子を運搬する役割を持ち、優れた運搬能力からワクチン担体として注目されている。動物生体内において細菌膜小胞は由来細菌の生息部位から離れた場所まで行き、宿主の健康・疾患を調節することから、宿主-細菌間相互作用を理解する上で膜小胞の動態を非侵襲で観察する技術の確立が求められている。また、ワクチン利用での免疫活性化メカニズムの解明が重要となっている。そこで本研究では、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を生じて長波長の光を発する Antares2 を膜小胞内に内包し、生体深部での膜小胞を観察可能な発光膜小胞の作製を目指した。プロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 の外膜タンパク質 OmpA における膜貫通ドメインの C 末端に Antares2 を融合させ、外膜側に Antares2 を局在させたところ、膜小胞内への Antares2 内包が促進された。また、抗生物質に短時間曝した際の培養上清からは発光が検出された。これより、培養上清から膜小胞検出が可能であること、さらに膜小胞形成誘発抗生物質を短時間曝した際に放出される微量な膜小胞の検出にも有効であることが示された。本研究の結果より、生体透過性の高い長波長での発光を行う膜小胞の生体内イメージングへの有用性が示された。今後は、マウスを使った動物実験により生体深部における Antares2 内包膜小胞をモニタリングし、生体内における膜小胞機能のさらなる理解を目指す。

**P2-078****AAQiT: バクテリアゲノムに対するアノテーションの質向上を図る簡便なオンラインツールの開発**○小貫 友暉<sup>1</sup>, 千葉 明生<sup>1,2</sup>, 馬場 有夢<sup>1</sup>, 山田 ほのり<sup>1</sup>, 谷澤 靖洋<sup>3</sup>, 金城 雄樹<sup>1,2</sup> (慈恵医大・医・細菌学, <sup>2</sup>慈恵医大・バイオフィルム研究センター, <sup>3</sup>遺伝研・情報研究系)**AAQiT: a user-friendly, web-based tool to improve the quality of bacterial genome annotation**○Yuki Onuki<sup>1</sup>, Akio Chiba<sup>1,2</sup>, Amu Baba<sup>1</sup>, Honori Yamada<sup>1</sup>, Yasuhiro Tanizawa<sup>3</sup>, Yuki Kinjo<sup>1,2</sup> (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Jikei Univ., <sup>2</sup>Jikei Ctr. Biofilm Sci. & Tech., <sup>3</sup>Dept. Inform., Natl. Inst. Genet.)

**BACKGROUNDS:** With the increasing affordability of next-generation sequencers, genomic data are now more readily available than ever before, even to researchers who do not specialize in bioinformatics. However, the assembly and annotation of whole genomes from the raw data requires relatively advanced and specialized knowledge and effort. In this situation, DFAST, a web-based annotation tool provided by the National Institute of Genetics in Japan, allows anyone to easily annotate and report genome sequences. However, since DFAST searches only the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database, it may not provide annotations of sufficient quantity and quality. **METHODS:** In this report, we have developed a web-based tool, AAQiT, to improve the quality of annotations by DFAST in combination with NCBI BLAST, a genome sequence searching tool provided by National Center for Biotechnology Information, or AureoWiki, a genome sequence database specific to *Staphylococcus aureus*. **RESULTS:** Annotation of *Staphylococcus aureus* NCTC8325 strain standard sequences using AAQiT resulted in higher annotation rates than when using DFAST alone (with DFAST alone: products 86.9%, genes 34.8%; with AAQiT: products 90.0%, genes 58.7%). **CONCLUSIONS:** AAQiT, a web-based tool that anyone can use by simply uploading sequence data, can improve the quality of annotation of bacterial genomes.

## P2-079

比較ゲノム解析による LT 産生 *Escherichia fergusonii* の遺伝的特徴の解明

○奥野 未来<sup>1</sup>, 水流 奈己<sup>2</sup>, 吉野 修司<sup>2</sup>, 後藤 恭宏<sup>3</sup>, 山本 武司<sup>1</sup>, 林 哲也<sup>3</sup>, 小椋 義俊<sup>1</sup> (1久留米大・医・感染医学, 2宮崎衛研・微生物, 3九大・医・細菌学)

### Comparative genomic analysis reveals genetic feature of LT-producing *Escherichia fergusonii*

○Miki Okuno<sup>1</sup>, Nami Tsuru<sup>2</sup>, Shuji Yoshino<sup>2</sup>, Yasuhiro Gotoh<sup>3</sup>, Takeshi Yamamoto<sup>1</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>3</sup>, Yoshitoshi Ogura<sup>1</sup> (1Dept. Infectious Med., Kurume Univ. Sch. Med., 2Dept. Microbiol. Miyazaki Pref. Inst. Public Health and Env., 3Dept Bacteriology, Fac. Med. Sci., Kyushu Univ.)

*Escherichia fergusonii* は 1985 年に新種命名されて以降、菌血症、尿路感染、下痢症を呈したヒトから分離されているが、病原因子が特定されておらず、ヒトに対する病原性は明らかになっていない。2014 年、宮崎県内の病院において患者の便サンプルから LT (Heat-labile enterotoxin, 易熱性エンテロトキシン) 産生能を持つ *E. fergusonii* (30038 株) が分離され、*E. fergusonii* がヒトに対して病原性を示す可能性が示唆された。本研究では、(1) *E. fergusonii* の集団構造と病原因子の分布、(2) ヒト由来 LT 産生株の遺伝的特徴を明らかにするために、公開データを活用した比較ゲノム解析を実施した。

30038 株については、Oxford Nanopore MinION と Illumina Miseq を用いて完全ゲノム配列を決定した。30038 株と NCBI から取得した 195 株のゲノムを用いて、core-genes による系統解析を実施したところ、様々な系統群が確認されたが、分離地域や分離源による系統的な偏りは見られなかった。また、30038 株では、LT をコードするプラスミド由来の配列が IS15DI を介して染色体に融合したことが公開データとの比較から明らかになり、LT の安定的な維持に寄与している可能性が示唆された。これまで、病原因子が特定された *E. fergusonii* の臨床症例はなく、本研究から LT 産生性が *E. fergusonii* の病原機構の一つである可能性が示された。ゲノム解析は行われていないが、養鶏場の糞便サンプルから LT 陽性 *E. fergusonii* が複数株検出されたという報告もあり、今後、LT 陽性 *E. fergusonii* の拡大とそれを起因菌とする感染症に注視する必要があると考えられる。

## P2-080

Genome diversity of *Streptococcus dysgalactiae* and the evolutionary process with host switching

○村瀬 一典, 柘植 亮佑, 中川 一路 (京都大・医・微生物)

○Kazunori Murase, Ryosuke Tsuge, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sc. Med., Kyoto Univ.)

*Streptococcus dysgalactiae* is a gram-positive bacterium and belongs to the group of beta-hemolytic streptococci. *S. dysgalactiae* has been classified into the two subspecies; equisimilis (SDSE), and dysgalactiae (SDSD). Especially in the SDSE, this subspecies often causes necrotizing fasciitis and bacteraemia, showing similar diseases to *Streptococcus pyogenes* infection. Therefore, SDSE is being increasingly recognized as a clinically important pathogen. Although SDSE and SDSD show distinctly different phylogenetic divergence, their genetic diversities within the species and host-range differences in evolutionary phylogenetic relationships remain unclear. In this study, we performed comprehensive phylogenetic and pan-genome analysis using 764 genomes available in public database. *S. dysgalactiae* population can be phylogenetically separated into mainly 3 groups, SDSE group consisting of human isolates, SDSD group consisting of animal isolates (mainly bovine and ovine), and intermediate group consisting of various isolates including human, animal, and so on. BEAST analysis with Markov jump model revealed that *S. dysgalactiae* has undergone extensive ancient and recent host-switching events, with animals acting as a major hub. Our findings could be an important clue to give us a deep understanding of *S. dysgalactiae* intraspecific evolutionary processes with host switching.

## P2-081

侵襲性に関する *emm89* 型化膿レンサ球菌の因子の探索と分子生物学的解析

○大野 誠之<sup>1</sup>, 山口 雅也<sup>1</sup>, 元岡 大祐<sup>2</sup>, 広瀬 雄二郎<sup>1</sup>, 東 孝太郎<sup>1</sup>, 秋山 徹<sup>3</sup>, 住友 倫子<sup>1</sup>, 池辺 忠義<sup>4</sup>, 奥野 ルミ<sup>5</sup>, 川端 重忠<sup>1</sup> (1阪大・院歯, 2阪大・微研, 3国際医療研究セ・感染症制御, 4感染研・細菌第一部, 5東京健安研セ・微生物)

### Exploration and validation of mutations related to invasiveness of *Streptococcus pyogenes emm89*

○Masayuki Ono<sup>1</sup>, Masaya Yamaguchi<sup>1</sup>, Daisuke Motooka<sup>2</sup>, Yujiro Hirose<sup>1</sup>, Kotaro Higashi<sup>1</sup>, Tohru Miyoshi-Akiyama<sup>3</sup>, Tomoko Sumitomo<sup>1</sup>, Tadayoshi Ikebe<sup>4</sup>, Rumi Okuno<sup>5</sup>, Shigetada Kawabata<sup>1</sup> (1Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 2Res. Inst. Microb. Dis., Osaka Univ., 3Pathogenic Microbe Lab., Dept. Infectious Diseases, NCGM, 4Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., 5Dept. Microbiol., Tokyo Inst. Pub. Heal.)

化膿レンサ球菌は咽頭炎などの非侵襲性感染症に加え、壊死性筋膜炎やレンサ球菌性毒素性ショック症候群など致死的な侵襲性感染症の原因菌である。近年、*emm89* 型化膿レンサ球菌による侵襲性感染症が世界的に増加している。本研究では、日本および海外で分離された *emm89* 型株の全ゲノム情報から、侵襲性感染症の発症に寄与する因子の探索を行った。新規に国内の臨床分離株 150 株を収集し、全ゲノム情報を解読した。既に保有している日本国内外で分離された株と合わせて、侵襲性由来 420 株、非侵襲性由来 246 株の計 666 株で解析を実施した。プログラム Roary を用いてコアゲノムならびにパンゲノムを算出したのち、細菌ゲノムワイド関連解析 (GWAS) プログラム Pyseer で病態と関連する一塩基多型 (SNP) と遺伝子を探索した。またプログラム DBGWAS により複数塩基にわたる変異を検出できる k-mer を全ゲノムから抽出し、GWAS を実施した。

GWAS の結果、90 箇所の SNP、140 の遺伝子、および全ゲノム上の 5 箇所が存在する変異の存在がそれぞれ病態に相関することが示された。そのうち *yfiZ* 遺伝子における SNP は、日本で分離された株にのみ存在する変異であった。AlphaFold2 を用いたタンパク質立体構造予測から、*yfiZ* 遺伝子の SNP により鉄イオントランスポーター YfiZ における、細胞外領域に露出鉄輸送タンパク FhuD との相互作用に関連する可能性のあるアミノ酸残基が置換されていることが予想された。侵襲性由来株に非侵襲性株型の SNP を導入すると、ヒト血液における菌の増殖が有意に低下した。以上から、*yfiZ* 遺伝子における SNP は鉄輸送機能の変化から血中における菌の生存に影響し、病原性に寄与する可能性が示された。

## P2-082

タヌキから分離された *Helicobacter cinaedi* 近縁菌種のゲノム解析

○後藤 恭宏<sup>1</sup>, 谷口 喬子<sup>2</sup>, 中村 佳司<sup>1</sup>, 三澤 尚明<sup>2</sup>, 林 哲也<sup>1</sup> (1九州大・医・細菌学, 2宮崎大・CADIC)

### Genomic analysis of *Helicobacter cinaedi*-like bacteria isolated from raccoon dogs

○Yasuhiro Gotoh<sup>1</sup>, Takako Taniguchi<sup>2</sup>, Keiji Nakamura<sup>1</sup>, Naoaki Misawa<sup>2</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriology, Fac. Med. Sci., Kyushu Univ., 2CADIC, Univ. Miyazaki)

*Helicobacter cinaedi* は腸肝ヘリコバクターであり、ヒトで菌血症や蜂窩織炎を起こす。*H. cinaedi* の近縁菌種は様々な動物から分離されるが、これまでにゲノム解析が行われた株はヒト由来株 (狭義の *H. cinaedi*) やイヌ・齧歯類の由来株に限られており、近縁菌種の実態はよく分かっていない。本研究では、宮崎県で収集したタヌキ糞死体 (2 体) から分離されたグラム陰性らせん菌の解析を行った。3 株は 16S rRNA や *cdtB* 遺伝子配列から *H. cinaedi* の近縁菌種であることが示唆された。MinION と MiSeq をもちいて完全長ゲノム配列を決定し、腸肝ヘリコバクターに属する 155 株との配列相同性を調べたところ、3 株間の相同性は 98.6%以上であるのに対し、他の株とは 91.2%以下であった。つぎに、universal single-copy genes による系統解析では、3 株は *H. cinaedi* と近縁であるが別の系統に位置した。同一個体由来の 2 株はゲノム相同性が 98.7%以上であり激しいゲノム再編がみられたが、その原因になりうるリピート配列等は見つからなかった。3 株のゲノム配列には、染色体や環状プラスミド以外に線状配列が 1~2 本含まれた (計 5 本; 67.7~95.2 kb)。各配列には *rep* 遺伝子がコードされ、PFGE 解析で配列長と同程度のバンドが確認されたので、線状プラスミドであると考えられる。線状プラスミドは配列相同性から 2 タイプに分けられた。片方はイヌやハムスター由来株でも見つかったり近縁菌種に広く分布していると考えられた。もう一方は VI 型分泌系をコードしており、その構成遺伝子群は *H. cinaedi* のものと類似していた。この結果は、*H. cinaedi* の近縁菌種では線状プラスミドが遺伝子水平伝播の一端を担っている可能性を示唆する。



**P2-083****Plasmidome in the *Serratia marcescens* complex**

○Debora Satie Nagano, 小野 友行, 後藤 恭宏, 中村 佳司, 谷口 愛樹, 林 哲也 (九大院・医・細菌学)

○Debora Satie Nagano, Tomoyuki Ono, Yasuhiro Gotoh, Keiji Nakamura, Itsuki Taniguchi, Tetsuya Hayashi (Dept. Bacteriology, Sch. Med., Kyushu Univ.)

Plasmids are important viewpoints in public health surveillance due to their carriage and intra- and inter-species transmission of antimicrobial resistance (AMR) genes. The aim of this study is to systematically characterize plasmids of the *Serratia marcescens* complex using a large set of closed genomes phylogenetically covering the entire complex (n=142; 67 were obtained in this study). We identified 133 plasmids in the set and typed them by several tools. AMR genes were identified by AMRFinderPlus. Mash distance-based clustering separated the plasmids into 23 clusters and 51 singletons. PlasmidFinder identified 22 types of replicon in 69 plasmids (51.9%) and MOBScan identified 6 types of MOB in 87 plasmids (65.4%). MOB-Typer identified 13 replicon types in 83 (62.4%) and the same 6 MOB types in 103 (77.4%), implying the lack of good agreement between them. Of note, no significant difference in the average number of plasmids carried by strains was detected between clinical and other isolates, indicating a wide distribution of diverse plasmids across the complex. However, the average number was significantly higher in a hospital-adapted clade than in the other clades. Further analyses, such as detailed comparison of typing tools, potential mobility of each plasmid, and distribution patterns of plasmid in the context of host strain phylogeny, are underway.

**P2-084****Outer membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 specifically contains Pf4 prophage DNA**

○武縄 聡<sup>1</sup>, 奥村 春樹<sup>2</sup>, 高野 壮太郎<sup>3</sup>, 菅野 美月<sup>3</sup>, 田代 陽介<sup>3</sup>, 岡本 章 玄<sup>1</sup> (1NIMS. MANA., 2静岡大・工, 3静岡大院・総合科技)

○Satoshi Takenawa<sup>1</sup>, Haruki Okumura<sup>2</sup>, Sotaro Takano<sup>1</sup>, Mizuki Kanno<sup>3</sup>, Yosuke Tashiro<sup>3</sup>, Akihiro Okamoto<sup>1</sup> (1NIMS. MANA., 2Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng., Shizuoka Univ., 3Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

微生物の放出する膜小胞は、脂質で形成された直径 100nm-200nm 程度の微粒子であり、栄養獲得、細胞間コミュニケーションなど、様々な機能を有するとされる。近年特に、膜小胞内に存在する DNA が着目されており、膜小胞が遺伝子水平伝播の一旦を担う可能性が示唆されているが、その機能は解明されていない。本研究で我々は、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の膜小胞内に存在する DNA に着目し、1 粒子解析を用いて膜小胞内に含まれる DNA を解析した。その結果、PAO1 株の膜小胞内から DNA が多量に検出され、その配列がプロファージである Pf4 転写領域由来であることを特定した。Pf4 は繊維状ファージに分類され、染色体上の DNA からファージミドを転写、複製された線状の ssDNA を細胞膜上でパッケージングすることで溶菌せずに放出されることが知られている。我々は、このホストの細胞膜上でパッケージングを行う Pf4 の特性に着目し、PAO1 株の膜小胞内に存在する DNA は Pf4 のパッケージングの際に移動した DNA であると考えた。そこで、Pf4 の転写領域を欠損した PAO1 株 ( $\Delta$ Pf4 株) を作製し、野生株と  $\Delta$ Pf4 株の膜小胞を回収、膜染色と核酸染色を行い、粒子トラッキング装置を用いて膜小胞数、DNA を持つ粒子数を確認した。結果、 $\Delta$ Pf4 株では DNA を持たない膜小胞がより多く放出されることが確認された。よって、PAO1 株の膜小胞には、ランダムな DNA 断片ではなく、Pf4 由来の特定の DNA 領域が内包される事が判明し、膜小胞を用いたプロファージ遺伝子の新たな伝播経路の一端を担う可能性が示唆された。

**P2-085****Delivery of prophage DNA through outer membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1**

○奥村 春樹<sup>1</sup>, 武縄 聡<sup>2</sup>, 高野 壮太郎<sup>3</sup>, 菅野 美月<sup>3</sup>, 二又 裕之<sup>3</sup>, 岡本 章 玄<sup>2</sup>, 田代 陽介<sup>3</sup> (1静岡大・工, 2NIMS. MANA., 3静岡大院・総合科技)

○Haruki Okumura<sup>1</sup>, Satoshi Takenawa<sup>2</sup>, Sotaro Takano<sup>2</sup>, Mizuki Kanno<sup>3</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>3</sup>, Akihiro Okamoto<sup>2</sup>, Yosuke Tashiro<sup>3</sup> (1Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng., Shizuoka Univ., 2NIMS. MANA, 3Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

膜小胞は、脂質膜で形成された微粒子を指す。微生物の放出する膜小胞は、栄養獲得、バイオフィーム形成など、様々な機能を有するとされる。特に近年、膜小胞内に DNA が内包されていることが注目されており、遺伝子の水平伝播に膜小胞が寄与することが示唆されているが、詳細な機構は不明である。我々は *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の膜小胞内の DNA を解析したところ、PAO1 株の膜小胞内に、繊維状ファージの一種である Pf4 ファージの DNA が多量に内包されている知見を得た。本研究では膜小胞を用いた遺伝子水平伝播を介して、Pf4 ファージが感染すると仮説付け、新たな感染経路としてその検証を行った。Pf4 ファージは PAO1 株の染色体 DNA 内にプロファージとして存在し、通常は CoaB と呼ばれるカプシドタンパク質を用いて自身の ssDNA をコートし感染能を持つとされる。本研究では PAO1 の coaB 欠損株 ( $\Delta$ coaB 株) を作製し、Pf4 ファージの形成阻害を、プラークアッセイ法で証明した上で、Pf4 ファージが膜小胞を介した遺伝子水平伝播を行っている可能性を検証した。実験では PAO1 野生株と  $\Delta$ coaB 株から膜小胞を抽出し、それぞれ PAO1 株の Pf4 領域を欠損した  $\Delta$ Pf4 株と混合し、プロファージの DNA が  $\Delta$ Pf4 株内へ伝播されるかを PCR 法で検証した。結果、Pf4 DNA を欠損したはずの  $\Delta$ Pf4 株内で PAO1 野生株と  $\Delta$ coaB 株、どちらの膜小胞を混合した場合でも、Pf4 プロファージ DNA が増幅された。この結果より、Pf4 ファージはカプシドを形成できない場合でも、その DNA を宿主である PAO1 株の膜小胞へと内包させることで、カプシド形成を伴わないファージ DNA の水平伝播機構を持つことが明らかとなった。

**P2-086****プロファージ誘発によるリボソームレスキュー経路切替えとプロテオーム再編成**

小野 寺 悠<sup>1</sup>, 丹羽 達也<sup>1,2</sup>, 田口 英樹<sup>1,2</sup>, 茶谷 悠平<sup>2</sup> (1東工大・生命理工学院, 2東工大・研究院)

**Prophage excision switches primary ribosome rescue pathway and rearranges the proteome in *E. coli***

Haruka Onodera<sup>1</sup>, Tatsuya Niwa<sup>1,2</sup>, Hideki Taguchi<sup>1,2</sup>, Yuhei Chadani<sup>2</sup> (1Dept. Life Sci. and Tech., Tokyo Tech., 2IIR, Tokyo Tech.)

*Escherichia coli* has multiple pathways to release nonproductive ribosome complexes stalled at the 3' end of nonstop mRNA: tmRNA (SsrA RNA)-mediated *trans*-translation and stop codon-independent termination by ArfA/RF2 or ArfB (YaeJ). The *arfA* mRNA lacks a stop codon and its expression is repressed by *trans*-translation. Therefore, ArfA is considered to complement the ribosome rescue activity of *trans*-translation, but the physiological situations in which ArfA is expressed have not been elucidated. Here, we found that the excision of CP4-57 prophage adjacent to *E. coli* *ssrA* leads to the inactivation of tmRNA and switches the primary rescue pathway from *trans*-translation to ArfA/RF2. This "rescue-switching" rearranges not only the proteome landscape in *E. coli* but also the phenotype such as motility. Furthermore, among the proteins with significantly increased abundance in the ArfA+ cells, we found ZntR, whose mRNA is transcribed together as the upstream part of nonstop *arfA* mRNA. Repression of ZntR and reconstituted model genes depends on the translation of the downstream nonstop ORFs that triggers the *trans*-translation-coupled exonucleolytic degradation by polynucleotide phosphorylase (PNPase). Namely, our studies provide a novel example of *trans*-translation-dependent regulation and re-define the physiological roles of prophage excision.

## P2-087

### Regulation of sRNA1 expression by ArcB/ArcA two-component regulatory system in *Vibrio alginolyticus*

○美間 健彦<sup>1</sup>, 藤井 萌<sup>1</sup>, 後藤 和義<sup>2</sup>, 山本 由弥子<sup>2</sup>, 松下 治<sup>2</sup> (<sup>1</sup>愛媛県立医療技術大・保健科学・微生物検査, <sup>2</sup>岡山大・院医菌薬・病原細菌)

○Takehiko Mima<sup>1</sup>, Moe Fujii<sup>1</sup>, Kazuyoshi Gotoh<sup>2</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>2</sup>, Osamu Matsushita<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., <sup>2</sup>Dept. Bacteriol., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci.)

VarS/VarA two-component regulatory system controls the expression of target genes via regulating the transcription of multiple small RNAs (sRNAs). *Vibrio alginolyticus* possesses four sRNAs (sRNA1, 2, 3, and 4). Our previous studies suggested that the expression of sRNAs is also controlled by regulators other than VarS/VarA system. Pull-down experiment revealed that several proteins specifically bound to each sRNA promoter. ArcA, a response regulator of ArcB/ArcA two-component system that mediates adaptation to anaerobic growth conditions, was pulled down when sRNA1 promoter was used as bait. Electromobility shift assay with recombinant ArcA confirmed that ArcA bound to the predicted ArcA binding sequence on the sRNA1 promoter region, but not to other sRNA promoter regions. Both transcriptional activity and amount of sRNA1 were decreased in the *arcA* deletion mutant when cells were grown under anaerobic condition. But neither was changed under aerobic condition. Furthermore, transcriptional activity of sRNA1 were also decreased in the *arcB* deletion mutant when cells were grown under anaerobic condition. These results demonstrate that expression of sRNA1 is regulated by ArcB/ArcA system. It seems likely that expression of sRNAs is controlled by multiple environmental signals.

## P2-088

### *Streptococcus mutans* ロイテリサイクリン産生の発現メカニズムの解析

○米澤 英雄<sup>1</sup>, 国分 栄仁<sup>1</sup>, 菊池 有一郎<sup>1</sup>, 三戸部 治郎<sup>2</sup>, 石原 和幸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京歯大・微生物, <sup>2</sup>杏林大・医・感染症)

### The role of two-TetR regulator in Reutericyclin production of *Streptococcus mutans*

○Hideo Yonezawa<sup>1</sup>, Eitoyo Kokubu<sup>1</sup>, Yuichiro Kikuchi<sup>1</sup>, Jiro Mitobe<sup>2</sup>, Kazuyuki Ishihara<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Col., <sup>2</sup>Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ.)

【目的】*Streptococcus mutans* は種々のバクテリオシンを産生することが報告されている。そのうちの1つであるロイテリサイクリンは、transporter (MucI), 2つの TetR Regulator (MucG および MucH), HXXEE モチーフを持つ metalloprotease (MucF), そして Polyketide synthase (MucF) と non-ribosomal peptide synthase (MucD), そして修飾酵素として働く MucA, MucB および MucC の9つの ORF からなる遺伝子クラスター産物である。遺伝子クラスター内の2つの tetR regulator である MucG および MucH の遺伝子発現制御メカニズムは明らかにされていない。今回われわれは MucG および MucH の遺伝子発現メカニズムに関する検討を行った。【方法】*S. mutans* ロイテリサイクリン産生株である KYTMD69 株を使用した。本株 MucG および mucH 欠損株を作製し、遺伝子発現解析を確認した。【結果と考察】*mucG* 欠損株は *mucH* の発現が低下しているのに対して *mucH* 欠損株は *mucG* の発現は上昇していた。*mucH* 欠損株ではクラスター内の遺伝子すべての発現が減少しているのに対して *mucG* 欠損株ではクラスター内遺伝子の発現は上昇していた。以上よりロイテリサイクリン産生は、MucH が positive regulator, MucG は negative regulator として働き、相互に関与しながらその産生をコントロールしていることが示唆された。現在それぞれのプロモーター活性やプロモーター領域への結合能について確認する予定である。

## P2-089

### 大腸菌 GcvB sRNA による芳香族アミノ酸代謝の転写後調節

○神田 健<sup>1</sup>, 関島 舜子<sup>2</sup>, 宮腰 昌利<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>筑波大・医, <sup>2</sup>筑波大院・人間総合科学)

### Small RNA GcvB governs the metabolism of the three aromatic amino acids in *Escherichia coli*

○Takeshi Kanda<sup>1</sup>, Toshiko Sekijima<sup>2</sup>, Masatoshi Miyakoshi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Fac. Med., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>GIP-TRIAD, Univ. Tsukuba)

Small regulatory RNAs (sRNAs) are important factors of bacterial adaptation to environmental changes. sRNAs act as major post-transcriptional regulators which affect translation initiation and/or mRNA stability through direct base-pairing with target mRNAs. GcvB is the master sRNA regulator of metabolism and transport of amino acid in a wide range of Gram-negative bacteria including *Escherichia coli*. We previously identified the massive regulon of GcvB, raising the number of direct targets to >50 genes in *E. coli*. In this study, we further analyze the possible regulation of GcvB on the metabolism of aromatic amino acids (AAAs): Phe, Tyr, and Trp. By following the combined method of in-silico analysis and reporter assay, we identified new targets in the biosynthetic pathways, *aroG*, *pheA*, *tyrA*, *trpA*, and *trpC*, in addition to the previously validated targets, *aroC* and *trpE*. We further show that translation of all the transporters of AAAs, AroP, PheP, TyrP, Mtr, and TnaB are repressed by GcvB. Overexpression of GcvB delayed growth of *E. coli* cells grown in minimal media supplemented with AAAs compared to non-overexpressing control. These results indicate that GcvB fine-tunes the expression of both biosynthetic enzymes and transporters of AAAs in *E. coli*.

## P2-090

### 枯草菌を用いた様々な細菌種の主要シグマ因子の機能比較解析

○矢野野 終介, 朝井 計 (東農大・生命・バイオ)

### Comparison of function of the primary sigma factors among various bacteria in *Bacillus subtilis*

○Shusuke Yahano, Kei Asai (Dept. Biosci., Sch. Life., Tono Univ.)

細菌の RNA ポリメラーゼ ホロ酵素は、4つのサブユニットからなるコア酵素とシグマ因子から構成されている。シグマ因子はプロモーターの認識と転写の開始を担う重要な転写制御因子である。なかでも主要シグマ因子 RpoD/SigA は全ての細菌に保存される必須遺伝子であり、認識プロモーター配列は幅広い細菌種で保存されている。一方でドメインによっては種ごとに多様な配列を持つ。本研究ではこの生物学的意義解明を目的として主要シグマ因子の解析を行った。主要シグマ因子は必須であるため、通常は欠損させることができない。そこで、高い形質転換能を持つ枯草菌を宿主として、CRISPR interference による枯草菌主要シグマ因子 SigA 抑制系と異種細菌主要シグマ因子誘導発現系を組み合わせた主要シグマ因子部分置換による、主要シグマ因子の評価系を構築した。主要シグマ因子部分置換時の枯草菌の増殖速度を比較したところ、枯草菌と近縁種の主要シグマ因子では高い増殖速度を示した一方、遠縁種になるにつれて増殖速度が低下した。枯草菌が属する Firmicutes 門細菌の主要シグマ因子においては、枯草菌 SigA 欠損による主要シグマ因子完全置換が可能であった。本発表では主要シグマ因子完全置換株のなかで、部分置換と比較して顕著に増殖速度が遅延した難培養腸内細菌 segmented filamentous bacteria (SFB) 主要シグマ因子完全置換株の継代で得られた、増殖速度亢進変異株の解析結果について報告する。

**P2-091****Transcriptome Complexity of *Vibrio parahaemolyticus* revealed by direct RNA sequencing**

○アルカディムハマド<sup>1</sup>, 石井英治<sup>2</sup>, Tat Truong Dang<sup>3</sup>, 元岡大祐<sup>3</sup>, 松田重輝<sup>2</sup>, 飯田哲也<sup>2</sup>, 児玉年央<sup>4</sup>, 奥崎大介<sup>1</sup> (1)阪大・微生物病・ヒト免疫学, (2)阪大・微生物病・細菌感染分野, (3)阪大・微生物病・感染症メタゲノム, (4)長崎大・熱研・細菌学分野)

○Mohamad Al Kadi<sup>1</sup>, Eiji Ishii<sup>2</sup>, Tat Truong Dang<sup>3</sup>, Daisuke Motooka<sup>3</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>2</sup>, Tetsuya Iida<sup>2</sup>, Toshio Kodama<sup>4</sup>, Daisuke Okuzaki<sup>1</sup> (1)Hum. Immunol., IFREC, Osaka Univ., (2)Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ., (3)Dept. Infect. Meta., RIMD, Osaka Univ., (4)Dept. Bac., Inst. Tropical Med., Nagasaki Univ.)

Genome annotation is performed computationally. In bacteria, it is mainly done by searching for open reading frames. However, non-coding genes that lack such translational features are more difficult to discover, mainly when no homology is found. Other important features such as untranslated regions and operons are usually ignored. RNA sequencing (RNA-seq) has been a revolutionary tool that has enabled us to examine the transcriptome directly by detecting gene expression in an organism. This has significantly improved transcriptome annotation and gene discovery over the last decade. However, standard RNA-seq requires RNA fragmentation leading to gene structure loss. This makes identifying transcriptomic features challenging given the compact nature of bacterial genomes, especially in regions that have complex transcriptome landscapes. Direct RNA sequencing is a technology that sequences the RNA directly without processing. We used direct RNA-seq to fully annotate *Vibrio parahaemolyticus* transcriptome. *V. parahaemolyticus* is one of the leading causes of seafood poisoning. We processed direct RNA sequencing data and produces transcriptome features including novel genes (intergenic and anti-sense), untranslated regions, and operon maps. Our results revealed transcriptional complexity in some regions that would have not been discovered by standard RNA sequencing.

**P2-092****H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of T3SS2 in *Vibrio parahaemolyticus***

○Andre Pratama<sup>1</sup>, 石井英治<sup>1</sup>, 児玉年央<sup>2</sup>, 飯田哲也<sup>1,3</sup>, 松田重輝<sup>1</sup> (1)阪大・熱研・細菌感染, (2)長崎大・熱研・細菌学, (3)阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Andre Pratama<sup>1</sup>, Eiji Ishii<sup>1</sup>, Toshio Kodama<sup>2</sup>, Tetsuya Iida<sup>1,3</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>1</sup> (1)Dept. Bac. Infect., RIMD, Osaka Univ., (2)Dept. Bac., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., (3)Cent. for Infect. Dis. Edu. Res., Osaka Univ.)

*Vibrio parahaemolyticus* is a marine bacterium that causes seafood-borne gastroenteritis in humans. A major virulence determinant of *V. parahaemolyticus* is the type III secretion system 2 (T3SS2) encoded on a pathogenicity island, Vp-PAI. The T3SS2 gene expression is affected by environmental cues such as changes in temperature and salinity: it is induced at 37°C and 0.1 M NaCl (permissive condition) but is silenced at lower temperatures or higher salinity (non-permissive conditions). However, its underlying mechanism remains elusive. Here, we show that histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) regulates T3SS2 gene expression through transcriptional repression of T3SS2 regulator, *vtbB*, under non-permissive conditions. The H-NS silences its target gene transcription by binding and subsequent multimerization to form filaments and/or bridges nucleoprotein complex. The H-NS bound to the *vtbB* promoter, and the binding region within the *vtbB* promoter was partially shared by two positive regulators of *vtbB*, VtrA, and ToxR, which may block transcriptional activation of *vtbB*. Mutations at the dimerization domain of H-NS impeded repression of VtrB production, suggesting that H-NS multimerization is essential for VtrB repression. Together, these findings demonstrate that H-NS plays a pivotal role in the temperature- and salinity-dependent T3SS2 regulation in *V. parahaemolyticus*.

**P2-093****A trick method enabling packaging of Staphylococcal pathogenicity islands into desired phage capsids**

○タンシンイー, 氣駕恒太郎, 渡邊真弥, 宮永一彦, 相羽由詞, Kanate Thitiananpakorn, 崔龍洙 (自治医大・感染・免疫講座・細菌学部門)

○Xin-Ee Tan, Kotaro Kiga, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyana, Yoshifumi Aiba, Kanate Thitiananpakorn, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immun., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Staphylococcal pathogenicity islands (SaPIs) are mobile genetic elements residing passively within *S. aureus* chromosome. These elements can excise, replicate and be packaged into phage capsids. SaPIs can therefore be used as natural vectors to deliver bactericidal cargo (e.g. CRISPR-Cas) in *S. aureus*. However, SaPIs and bacteriophages maintained a cognate relationship: one particular type of SaPI could only hijack specific phages for its packaging and transduction. Here, we reported an approach to 'trick' a phage into recognizing and packaging any types of SaPIs. The packaging of a non-cognate SaPI-phage pair was made possible by simply substituting SaPI-encoded *terS* (genetic determinant directing SaPI packaging into cognate phage capsid) with native *terS* encoded by a phage of interest. With this single gene alteration, SaPIs of different origins, SaPII (clinical stains) and SaPIbov2 (bovine mastitis case), were able to drive a non-cognate phage into packaging and transducing their respective genetic elements. Moreover, the packaging of SaPIbov2 carrying CRISPR-Cas13a by non-cognate phage was also shown feasible. This study demonstrated a novel strategy that breaks the traditional 'one phage-one SaPI' rule, bypasses the trouble of screening for cognate phage/SaPI vector and contributes to clinical application in which the search for candidate phages is challenging.

**P2-094****枯草菌を用いたセグメント細菌ゲノムの機能解析**

○朝井計<sup>1</sup>, 田中 晃起<sup>1</sup>, 荻野 竜司<sup>1</sup>, 小椋 義俊<sup>2</sup>, 桑原 知巴<sup>3</sup> (1)東農大・バイオ, (2)久留米大・医・感染症医, (3)香川大・医・分子微生物)

**Functional analysis of Segmented filamentous bacteria genome in *Bacillus subtilis***

○Kei Asai<sup>1</sup>, Kouki Tanaka<sup>1</sup>, Ryuuji Ogino<sup>1</sup>, Yoshitoshi Ogura<sup>2</sup>, Tomomi Kuwahara<sup>3</sup> (1)Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agricul., (2)Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med., (3)Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ.)

segmented filamentous bacteria (SFB) は、免疫活性化への関与が示唆される腸内細菌で、数種の SFB において全ゲノム塩基配列が決定されているが、難培養性のため、機能解析が進んでいない。 *Bacillus subtilis* (枯草菌) は、自身のゲノムへの異種 DNA 組み込みの許容力が高く、遺伝学的解析が容易なので、SFB ゲノムを導入し、その機能解析を試みた。胞子形成の開始は、二成分制御系で制御されていて、Spo0A が鍵レギュレータータンパク質である。 *Bacillus* 属では、Spo0A のリン酸化は複数のリン酸転移酵素による多成分制御なのに対し、 *Clostridium* 属では、センサーキナーゼが直接 Spo0A をリン酸化する。クロストリジウム属に近縁の SFB のゲノムにはリン酸転移酵素は見出されていない。枯草菌の Spo0A (BsSpo0A) を SFB の Spo0A (SfbSpo0A) に置換した株は、枯草菌と同程度の頻度で胞子形成した。SFB の遺伝子は、枯草菌内で発現し、相補可能なことが判明した。一方、枯草菌のセンサーキナーゼを残し、リン酸転移酵素を欠失させると、枯草菌野生株・Spo0A 置換株ともに、胞子形成能が失われ、BsSpo0A だけでなく、SfbSpo0A に対しても枯草菌のキナーゼは機能しないことが示唆された。そこで、SFB ゲノム上のセンサーキナーゼ遺伝子をリン酸転移酵素欠失株に導入し、人工的に転写誘導したところ、SFBM\_0504 遺伝子について、胞子形成能の回復が見られた。しかし、SfbSpo0A については、BsSpo0A より回復度が弱かった。腸管への定着や免疫活性化に関わる SFB の走化性・鞭毛形成遺伝子群、約 60kbp を、5kbp 程の断片に分けて、相同組換えにより段階的に枯草菌ゲノムに集約し、機能解析を試みているので、合わせて報告する。

## P2-095

### 細菌 mRNA に対応した高感度シングルセル RNA シーケンスの開発

○西村 美都<sup>1</sup>, 竹山 春子<sup>1,2,3,4</sup>, 細川 正人<sup>1,2,3,4</sup> (1早大院・先進理工, 2早大・ナノライフ創新研, 3産総研・早大 CBBDOIL, 4早大・生命動態研)

### Development of highly sensitive bacterial single-cell RNA sequencing method

○Mika Nishimura<sup>1</sup>, Haruko Takeyama<sup>1,2,3,4</sup>, Masahito Hosokawa<sup>1,2,3,4</sup> (1Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 2Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., 3CBBDOIL, AIST-Waseda Univ., 4Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Bacterial populations form functionally differentiated subpopulations by varying their gene expression patterns. Comprehensive gene expression profiling is required to reveal the generation and variation of the subpopulations. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a powerful tool for achieving the profiling. However, the application of bacterial scRNA-seq has been limited due to the technical issues specific to bacterial mRNA. Some methods have been reported recently, but the transcript detection sensitivity remains challenging. Therefore, we aimed to develop a highly sensitive bacterial scRNA-seq method.

We developed an approach based on the highly sensitive eukaryotic scRNA-seq method and validated its applicability with *E. coli* samples. The method detected about twice as many genes as another eukaryotic scRNA-seq method by maintaining a high mapping rate for low input RNA. Furthermore, when applied the method to a single *E. coli* cell, the number of detected genes was about 4-fold higher than that of previous bacterial scRNA-seq methods. Based on these evaluations, we applied the method to elucidate different transcriptional states associated with *E. coli* culture conditions. As a highly sensitive bacterial scRNA-seq technology, our proposed method will be further improved and applied to reveal heterogeneity in clonal bacterial populations or environmental bacteria.

## P2-096

### 環境 DNA ウイルスの機能解明に向けたウイルス 1 粒子レベルでのゲノム解析技術の開発と応用

○西川 洋平<sup>1,2</sup>, 我妻 竜太<sup>1,3</sup>, 細川 正人<sup>1,2,3,4</sup>, 竹山 春子<sup>1,2,3,4</sup> (1産総研・早大 CBBDOIL, 2早大・ナノライフ創新研, 3早大院・先進理工, 4早大・生命動態研)

### Single-virus genomics platform for elucidating the functions of environmental DNA viruses

○Yohei Nishikawa<sup>1,2</sup>, Ryota Wagatsuma<sup>1,3</sup>, Masahito Hosokawa<sup>1,2,3,4</sup>, Haruko Takeyama<sup>1,2,3,4</sup> (1CBBDOIL, AIST-Waseda Univ., 2Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., 3Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 4Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Environmental viruses (primarily bacteriophages) are known as the most abundant biological agents and are considered to be even more diverse than environmental microbiome which is called microbial dark matter. Recently, approaches to engineering various functions of viruses, such as phage therapy, have again attracted attention, but only a few features of environmental viruses have been identified and utilized so far. Toward the elucidation of functions of environmental novel viruses, we have developed a technology platform that can analyze DNA virus genome sequences at the single-particle level. By encapsulating individual DNA virus particles in microfluidic-generated gel capsules and performing whole-genome amplification, high-throughput and accurate single-virus genome sequencing can be achieved. So far, we have performed the single-virus genomics targeting river water and sweater DNA viruses and shown that it is possible to obtain viral genomes from diverse lineages that are overlooked by metagenomic analysis and that there is genomic diversity even within the same viral species. We are currently adapting our single-virus genome sequencing platform to diverse environments and are expanding the genomic data of unknown viruses. In this presentation, we will provide details of the technologies involved in single-virus genomics and some examples of their applications.

## P2-097

### 大腸菌を用いたモルヒネ生産

○中川 明<sup>1,2</sup>, 南 博道<sup>1,2</sup> (1石川県大・資源研, 2ファーメランタ株式会社)

### Morphine production using engineered *Escherichia coli*

○Akira Nakagawa<sup>1,2</sup>, Hiromichi Minami<sup>1,2</sup> (1Res. Inst. Biores. Biotech. Ishikawa Pref. Univ., 2Fermelanta, Inc.)

モルヒネをはじめとするベンジルイソキノリンアルカイド (BIA) は医薬品として利用されている天然物であり, これからも様々な薬効成分の発見が期待されている. しかし, 実用 BIA 生産は植物からの抽出に頼っており, 比較的高価である. また, 天然には微量にしか存在しないものが多く, その薬効研究も難しい. 近年, 微生物を用いた BIA 生産系がいくつか報告されている. 微生物の培養は植物に比べ, 空間的・時間的なコストが安くすみ, 生産能向上等が容易であると考えられている. 本研究では, 安価な BIA 生産系の構築を目的とし, モルヒネ生産系をモデルとして, 大腸菌を用いた BIA 生産基盤技術の開発を行っている. BIA の殆どは(S)-レテクリンを中間体として生成されたため, 我々は, まず, 様々な BIA 生産系構築を目指せるプラットフォーム株, (S)-レテクリン生産菌を開発した. 更に, 本プラットフォーム株を用いて, 多数の遺伝子の導入法の開発や発現の難しい P450 酵素の機能的な発現等いくつかの工夫を施し, 実用 BIA であるモルヒネの生産を試みた. その結果, グルコースからのモルヒネ生産に世界で初めて成功した. その量はまだまだ少ないが, 様々な改良を加え, モルヒネを含め, バルベリン, テバイン, アボルフィン等の有用な BIA の実用生産を構築したい. 参考: Nakagawa et al., Nat Commun, 2011; Nakagawa et al., Nat Commun, 2016

## P2-098

### 枯草菌を供与体とした接合伝達による DNA 導入系の構築と利用

○須田 和奏<sup>1</sup>, 板谷 光泰<sup>2</sup>, 朝井 計<sup>1</sup> (1東農大・生命・バイオ, 2信州大・工・物質化学)

### Construction and utilization of DNA transduction system by conjugation using *B. subtilis* as a donor

○Wakana Suda<sup>1</sup>, Mitsuhiro Itaya<sup>2</sup>, Kei Asai<sup>1</sup> (1Dept. Bio., Sch. Lifesci., Tono Univ., 2Dept. Materials Chem., Sch. Eng., Shinshu Univ.)

*Bacillus* 属には, グラム陽性菌のモデル生物である枯草菌や納豆菌等の有用細菌に加え, 極限環境細菌や病原菌など研究や産業・医薬の観点から重要な細菌が存在する. しかしその一方で自然形質転換効率が低い種や株も多く, 研究や利用を進めるうえで障壁となっている. 我々は, この課題解決のために, 自然界で普遍的に観察される DNA の受け渡し機構である接合伝達に着目した. グラム陽性細菌のモデル生物として広く研究され, 遺伝学的操作の容易な枯草菌を宿主として DNA を調整し, これを供与菌とし, 接合伝達により対象受容菌に調整した DNA を導入する系の構築を目的とした. 納豆菌由来 pLS20 (約 66kb) プラスミドは, 接合伝達により *Bacillus* 属間で移送されることが既知である. また, 黄色ブドウ球菌由来の広宿主域プラスミド pUB110 は, pLS20 の接合伝達系に認識される, 移送開始点 oriT 配列と, oriT を認識し, dsDNA にニックを入れて ssDNA を生成, リクルートを行うタンパク質 relaxase をコードする遺伝子の二つの因子を有している. pLS20 は巨大かつ低コピーのため実験操作が難しい. そこで pUB110 を基本に枯草菌-大腸菌で複製可能な遺伝子クローニング用シャトルベクター pCJ (約 6.5kb) を構築した. この pLS20 と pCJ を, 枯草菌 168 株に導入した株を供与菌とし, pLS20 依存的に受容菌へ pCJ が枯草菌及び納豆菌に移送されることを確認した. 現在, 同種間・異種間における pCJ 移送頻度の向上を図るとともに, 相同組換えにより受容菌の遺伝子組換えを行う系の構築に取り組んでいる.

## P2-099

DNA gyrase inhibitor, TsbT expressed by *Staphylococcus aureus*

○加藤 文紀<sup>1,2</sup>, 山口 良弘<sup>3</sup>, Masayori Inouye<sup>2</sup> (<sup>1</sup>広島大院・医系科学, <sup>2</sup>Dept. Biochem. & Mol Biol., Rutgers Univ., <sup>3</sup>大阪公立大・理・分子微生物)

○Fuminori Kato<sup>1,2</sup>, Yoshihiro Yamaguchi<sup>3</sup>, Masayori Inouye<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Biomed. Hlth. Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Dept. Biochem. Mol. Biol., Rutgers Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ.)

Bacterial toxin-antitoxin (TA) system consists of a toxin that inhibit the synthesis of DNA, RNA, proteins, and ATP, which are essential for the bacteria's own cell functions, and an antitoxin that neutralize its cognate toxin. TA system is known to be involved in bacterial cell death, protection against bacteriophages, biofilm formation, pathogenicity and antibiotic persistence. We are interested in elucidating the functions of unannotated genes on the genome of *Staphylococcus aureus*. In this study, we focus on TA system and research on the functions of small hypothetical proteins. We found TsbA/TsbT TA system that TsbT toxin consists of 50 amino acid residues and inhibits DNA gyrase. Site-directed mutagenesis showed that the 27th and 37th amino acid residues of TsbT toxin play an important role in the activity. Furthermore, various amino acid mutagenesis analyzes revealed that the 27th amino acid residue is either Glu or Gln, and that the 37th amino acid residue is either Asp or Glu, which is necessary for maintaining strong toxicity. In addition, secondary-structure prediction demonstrated that the 22nd-32nd residues of TsbT form an  $\alpha$ -helix structure, and that the Glu27 residue is located around the center of the  $\alpha$ -helix segment. These findings give new insights not only into *S. aureus* TA systems, but also into bacterial toxins targeting DNA gyrases.

## P2-100

口腔環境の変化に应答する *Porphyromonas gingivalis* の発現遺伝子の検索

○桑原 紀子<sup>1</sup>, 平塚 浩一<sup>2</sup>, 齋藤 真規<sup>1</sup>, 瀧澤 智美<sup>1</sup>, 小林 良喜<sup>1</sup>, 泉福 英信<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日大・松戸歯・感染免疫, <sup>2</sup>日大・松戸歯・生化学・分子生物学)

Analysis of gene expression levels of *P. gingivalis* in response to changes of oral environment

○Noriko Kuwahara<sup>1</sup>, Koichi Hiratsuka<sup>2</sup>, Masanori Saito<sup>1</sup>, Tomomi Hashizume-Takizawa<sup>1</sup>, Ryoki Kobayashi<sup>1</sup>, Hidenobu Senpuku<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, <sup>2</sup>Dept. Biochem. Mol. Biol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

ヒトの口腔内は温度や湿度、pH など環境条件が常に変化している。これらの環境変化は口腔細菌叢および宿主の応答性にそれぞれ影響を及ぼしあっていることが知られており、特に歯肉溝内の pH 変化は歯周炎の発症や進行に関連性があると報告されている。今回、慢性歯周炎の主要な病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* について pH 変化に应答する発現遺伝子について網羅的に検索した。【方法】*P. gingivalis* W83 株を液体培地にて培養、集菌後、pH7.5 および pH5.0 に調製した緩衝液にそれぞれ懸濁した。37°C で 15 分後にそれぞれ total RNA を抽出し、rRNA を除去した RNA を調製した。遺伝子発現量の検討は W83 株の全ゲノム配列をもとに作成したカスタムアレイにて行った。コントロールに対して発現量が 2 倍以上変化した遺伝子を検討の対象とした。【結果】pH7.5 をコントロールとした時に、pH5.0 で発現量が 2 倍以上の変化した遺伝子数は 1,017 個であり、増加は 498、減少は 519 個であった。発現量の増加が見られた遺伝子ではシャペロンや熱ショックタンパク質などの他に、細菌の外敵からの防御機能である CRISPR-Cas に関連するものが含まれていた。また主要な *P. gingivalis* の病原因子をコードする遺伝子について検索したところ *fimA*, *rgpA*, *rgpB* で発現量の減少が見られた。歯肉溝内の pH は歯周病原細菌の増殖や病原性に影響をおよぼしていると考えられていることから今回、弱酸性の環境は、歯周炎の発症や進行を抑制し歯周病の予防と陽りうる可能性が示唆された。[会員外共同発表者; 田中陽子, 矢口学 (日大松戸歯・障害者歯科)]

## P2-101/W8-5

## 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子の脂質膜認識機構

○飯森 南斗<sup>1</sup>, 沖 大也<sup>2</sup>, 今井 友也<sup>3</sup>, 松田 重輝<sup>2</sup>, 吉田 卓也<sup>4</sup>, 大久保 忠恭<sup>4,5</sup>, 飯田 哲也<sup>2,5</sup>, 中村 昇太<sup>2,5</sup>, 河原 一樹<sup>4,5</sup> (<sup>1</sup>阪大・薬, <sup>2</sup>阪大・微研, <sup>3</sup>京大・生存研, <sup>4</sup>阪大院・薬, <sup>5</sup>阪大・CiDER)

The membrane recognition mechanisms of colonization factors from Enterotoxigenic *Escherichia coli*

○Minato Iimori<sup>1</sup>, Hiroya Oki<sup>2</sup>, Tomoya Imai<sup>3</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>2</sup>, Takuya Yoshida<sup>4</sup>, Tadayasu Ohkubo<sup>4,5</sup>, Tetsuya Iida<sup>2,5</sup>, Shota Nakamura<sup>2,5</sup>, Kazuki Kawahara<sup>4,5</sup> (<sup>1</sup>Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>RIMD, Osaka Univ., <sup>3</sup>RISH, Kyoto Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>5</sup>CiDER, Osaka Univ.)

腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) の病原性発現には、定着因子を介した宿主腸管粘膜への定着が必須である。現在までに同定された 25 種類の定着因子のうち、定着因子抗原 III (Colonization factor antigen III: CFA/III) と Longus の 2 種類は IV 型に分類される線毛システムにより形成される。先行研究から、CFA/III を保有する ETEC の定着には、*cof* オペロンと呼ばれる CFA/III 産生に関わる遺伝子群にコードされた分泌タンパク質 CofJ が必要であり、菌外において線毛と相互作用し定着に関わることが報告されている。同様の分泌タンパク質をコードする遺伝子は、Longus 産生に関わるオペロンにも見出されており、またケニアの下痢症患者から最近分離された ETEC から発見された CFA/III バリエントのオペロン内にも確認された。興味深いことに、配列比較解析の結果、高度に保存されている線毛構成タンパク質とは対照的に、これらの定着因子のアミノ酸配列相同性は低いことも明らかになった。

本研究では、CFA/III、CFA/III バリエント、Longus の各 IV 型線毛システム由来分泌タンパク質の X 線単結晶構造解析を行い、それらの腸管定着における役割を考察した。その結果、いずれの分泌タンパク質も膜孔形成毒素ファミリーと類似した基本構造を採っていたが、立体構造から推定された脂質膜認識部位を構成するループ領域の長さ、構造、構成するアミノ酸に明確な違いが認められ、ETEC の宿主認識機構の多様化が示唆された。本発表では、脂質膜を模倣する人工膜小胞を用いた透過型電子顕微鏡観察および超遠心分析による結合アッセイの結果と併せて、各分泌タンパク質の詳細な脂質膜認識機構を議論する。

## P2-102

## ウエルシュ菌の線毛構成タンパク質 CppB と CppA の生化学および構造学的解析

○玉井 栄治<sup>1</sup>, 神島 成弘<sup>2</sup>, 有村 菜由<sup>1</sup>, 松波 梨佐<sup>1</sup>, 関谷 洋志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>松山大・薬・感染症学, <sup>2</sup>香川大・医・研基セ)

## Biochemical and structural characterization of the C. perfringens pili proteins CppB and CppA

○Eiji Tamai<sup>1</sup>, Shigehiro Kamitori<sup>2</sup>, Nayu Arimura<sup>1</sup>, Risa Matsunami<sup>1</sup>, Hiroshi Sekiya<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infec. Dis., Col. Pharm. Sci., Matsuyama Univ., <sup>2</sup>Res. Faci. Cent. Sci. & Tec. Facul. Med., Kagawa Univ.)

ウエルシュ菌は、グラム陽性嫌気性桿菌でガス壊疽や食中毒の原因菌である。グラム陽性菌の細胞壁には様々な表面タンパク質が共有結合しており、その一つに線毛がある。線毛は、tip-protein と複数の shaft-protein が共有結合により重合した柔軟な繊維状構造体であり、宿主への感染やコロニー形成に関与している。ウエルシュ菌には、3 つの線毛関連遺伝子 (*cppB*, *cppA*, *srtC*) があり、それぞれ、tip-protein, shaft-protein, これらを共有結合させる cysteine transpeptidase をコードしている。これまで、CppA と SrtC の構造と機能を明らかにしたが、CppB に関してはほとんど明らかにされていない。Bioinformatics 解析により、CppB は 5 つのコラーゲン結合ドメイン (D1-D5) から構成されていることが示唆されている。本研究では、CppB および CppB-CppA 複合体の構造及び機能を明らかにすることを目的とした。

【結果】様々な CppB ドメイン変異体のコラーゲン結合能を測定した結果、D1D2 ドメインが重要な働きをしていることがわかった。また、X 線結晶構造解析によりコラーゲン結合ドメイン (CppB-D1D2) は L 型構造をしていることを明らかにした。さらに、コラーゲンペプチドと CppB-D1D2 の結合モデリング解析及びアミノ酸置換変異体を用いたコラーゲン結合活性により、コラーゲン結合メカニズムを提唱することができた。一方、CppB-CppA 複合体に関しては大腸菌を用いた発現系でその発現に成功し、各種クロマトグラフィーを用いて精製に成功している。今後、クライオ電顕を用いてその構造を明らかにしていく予定である。

## P2-103

### Environmental RNAs serve as building materials in *Staphylococcus aureus* biofilms

○千葉 明生<sup>1,2</sup>, 杉本 真也<sup>1,2</sup>, 関 真秀<sup>3</sup>, 鈴木 稯<sup>3</sup>, 水之江 義充<sup>1</sup>, 金城 雄樹<sup>1,2</sup> (1)慈恵医大・医・細菌学, (2)慈恵医大・バイオフィーム研究センター, (3)東大・新領域・メディカル情報)

○Akio Chiba<sup>1,2</sup>, Shinya Sugimoto<sup>1,2</sup>, Masahide Seki<sup>3</sup>, Yutaka Suzuki<sup>3</sup>, Yoshimitsu Mizunoe<sup>1</sup>, Yuki Kinjo<sup>1,2</sup> (1)Dept. Bacteriol., Sch. Med., Jikei Univ., (2)Jikei Ctr. Biofilm Sci. & Tech., (3)Dept. Comput. Biol. and Med. Sci., Grad. Sch. Front. Sci. Univ. Tokyo)

*Staphylococcus aureus* forms biofilms on indwelling intravascular catheters and other devices, causing intractable infections. Elucidating the mechanism of biofilm formation is important for establishing new countermeasures against biofilm-related infections. Hence, various analyses have been conducted on polysaccharides, proteins, and DNA, which are components of biofilms. Although the presence of RNA in biofilms has been reported, the details have not been clarified so far. Therefore, we analyzed the characteristics of RNA as a component of biofilm using MR10, a clinical strain of MRSA isolated from the Jikei University Hospital. Since MR10 produces a large amount of polysaccharides in the biofilm, we focused on the relationship between polysaccharides and RNA. Using confocal laser microscopy, we confirmed that RNA co-localized with polysaccharides in the biofilm. Furthermore, interaction analysis by surface plasmon resonance revealed direct binding between polysaccharides and RNA. Next-generation sequencing analysis of the RNA in the biofilm identified the RNA as originating from the culture medium. In addition, we found that RNA extracted from human blood promoted biofilm formation in a model of intravascular catheters. These results suggest that *S. aureus* takes up RNA from the environment via interaction with polysaccharides and utilizes it in biofilms.

## P2-104

### *Helicobacter pylori* の sRNA を介した外膜タンパク質の発現制御

○西田 叶<sup>1</sup>, 木下 遼<sup>1</sup>, 舘坂 裕美<sup>1</sup>, 氣 篤 恒太郎<sup>2</sup>, 柴山 恵吾<sup>1</sup> (1)名古屋大 院・医・細菌学, (2)国立感染症研・治ワク)

### sRNA-mediated regulation of outer membrane protein expression in *Helicobacter pylori*

○Kana Nishida<sup>1</sup>, Ryo Kinoshita-Daitoku<sup>1</sup>, Hiromi Ajisaka<sup>1</sup>, Kotaro Kiga<sup>2</sup>, Keigo Shibayama<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., (2)Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis.)

*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は、生涯にわたる胃粘膜への感染を成立させ、胃炎や胃がんを誘発する。我々はこれまで、ピロリ菌の保有する small RNA (sRNA) の一つが、ピロリ菌感染による胃がん発症に関与していることを明らかにしてきた。しかし、80 種類以上も報告されているピロリ菌の sRNA の多くは機能未知である。そこで本研究では、ピロリ菌の sRNA の役割を明らかにするため、ピロリ菌で発現が確認された sRNA 欠損株を作製し、その標的探索を行った。細菌が保有する sRNA は、標的とする転写産物に配列特異的に結合し、翻訳抑制などの転写後調節を行うことが知られる。RNA-seq により、我々が着目した sRNA の欠損株における遺伝子発現パターンを野生株と比較したところ、外膜タンパク質を含む、いくつかの病原性遺伝子の発現が有意に低下していることを見出した。sRNA の標的候補として同定された当該外膜タンパク質は、ピロリ菌の付着因子と類似性が高く、ピロリ菌の感染初期に役割を担っていると考えられている遺伝子である。以上のことから、本 sRNA がピロリ菌の感染成立に関与していることが示唆された。詳細な解析は現在進めているが、我々の研究から、ピロリ菌の持続感染には複数の sRNA が協調的に関与していることが明らかになりつつある。

## P2-105

### 腸管系病原菌が形成する IVb 型線毛を介した定着因子の分泌機構

○沖 大也<sup>1</sup>, 飯森 南斗<sup>2</sup>, 西海 遥夏<sup>3</sup>, 丸野 孝浩<sup>3</sup>, 内山 進<sup>3</sup>, 松田 重輝<sup>1</sup>, 飯田 哲也<sup>1,4</sup>, 河原 一樹<sup>2,4</sup>, 中村 昇太<sup>1,4</sup> (1)阪大・微研, (2)阪大院・薬, (3)阪大院・工, (4)阪大・CIDER)

### Secretion mechanism of the colonization factor via Type IVb pilus of pathogenic enteric bacteria

○Hiroya Oki<sup>1</sup>, Minato Iimori<sup>2</sup>, Haruka Nishimi<sup>3</sup>, Takahiro Maruno<sup>3</sup>, Susumu Uchiyama<sup>3</sup>, Shigeaki Matsuda<sup>1</sup>, Tetsuya Iida<sup>1,4</sup>, Kazuki Kawahara<sup>2,4</sup>, Shota Nakamura<sup>1,4</sup> (1)RIMD, Osaka Univ., (2)Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., (3)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., (4)CIDER, Osaka Univ.)

重篤な下痢症の原因となるコレラ菌の腸管定着には、コレラ毒素陽性株が共通して保有するコレラ毒素共発現線毛 (toxin-coregulated pilus: TCP) が必須となる。TCP は IVb 型線毛 (T4bP) に分類され、tcp オペロンから発現される菌体表面上の繊維状タンパク質である。TCP は線毛の大部分を構成するタンパク質であるメジャーピリン TcpA と、線毛先端部に位置し線毛の伸縮を制御するマイナーピリン TcpB から構築される。さらに、効率的な腸管定着には菌体外に分泌されるタンパク質 TcpF も必要であることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、TcpF が TCP フィラメント最上部に位置する TcpB と相互作用することを明らかにし、TcpB-TcpF 複合体の結晶構造を決定した。構造解析の結果、TcpF が TcpB を認識する仕組み、そして、TcpB に依存した TCP の伸長・収縮を介した TcpF の分泌機構が明らかとなった。TcpF は溶液中で単量体であるが、TCP に結合すると花弁のような構造のホモ三量体を形成した。三量体形成能を失った変異体はコロニー形成できなくなることから、TcpB と結合することで形成される三量体構造がコロニー形成に重要であることが明らかとなった。また、TcpF の可動性の高い N 末端は TcpB の三量体界面に挟まるように結合していた。この N 末端配列を除くと TcpF は TcpB に全く結合しなくなることから、この領域が T4bP の分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

## P2-106

### LEE 非保有の腸管出血性大腸菌における細胞付着性の解析

○窪村 亜希子<sup>1</sup>, 李 謙一<sup>1</sup>, 伊豫田 淳<sup>1</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, EHEC Working Group<sup>2</sup> (1)国立感染症研究所, (2)全国地方衛生研究所)

### Analysis of cell adhesion in LEE-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*

○Akiko Kubomura<sup>1</sup>, Ken-ichi Lee<sup>1</sup>, Sunao Iyoda<sup>1</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup>, EHEC Working Group<sup>2</sup> (1)National Institute of Infectious Diseases, (2)Local Health Research Institute)

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) は毎年約 3000 名もの感染者が報告される公衆衛生上重要な病原性細菌である。EHEC の主要な血清群では、保有する病原性遺伝子領域 LEE がコードする 3 型分泌装置による宿主細胞への付着が発症に関わっている。しかし LEE を保有しない EHEC (LEE-neg EHEC) による重症例や死亡例も国内外で報告されているが、重症化因子等について十分な研究がされていない。本研究では LEE-neg EHEC の培養細胞への付着性と細胞付着関連遺伝子に着目して解析を行い、発症との関連性について評価を行った。

【方法】2007-2021 年に国内で分離された LEE-neg EHEC 313 株を供試菌株とした。全供試株について培養細胞への付着の有無と付着形態の確認、さらに全ゲノム配列 (WGS) 解析により保有する遺伝子の網羅的な検出を行った。細胞付着性試験は HEp-2 細胞と 1% マンノース加 DMEM を使用して実施した。

【結果・考察】細胞付着性試験の結果、細胞への付着が確認されたのは 313 株のうち 19 株 (6.1%) のみであった。さらに有症者と無症者別の分離株で付着率に大きな差は認められなかった (9.1% と 5.4%)。WGS 解析結果から、付着株で有意に検出される付着遺伝子は *eibG* のみであったが、既知の付着遺伝子を保有しない付着株も複数検出された。本研究では LEE-neg EHEC の HEp-2 細胞への付着性と発症との関連性は示されなかった。LEE-neg EHEC の付着性については HEp-2 細胞のみでは検出できない可能性もあるため、他の細胞株への付着性の解析や、付着性以外の因子について発症との関連性を評価していく必要があると考えられる。

**P2-107/W8-8****S. mitis 由来新規 5 ドメイン型コレステロール依存性細胞溶解毒素 Discoidinolysin の分子特性**

○田端 厚之<sup>1,2</sup>, 松本 愛理<sup>2,3</sup>, 藤本 あい<sup>2</sup>, 友安 俊文<sup>1,2</sup>, 高尾 亜由子<sup>4</sup>, 大國 寿士<sup>5</sup>, 長宗 秀明<sup>1,2</sup> (1徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, 2徳島大・院先端技術科学教育・物質生命システム工学, 3鹿児島大・院医歯学総合・口腔微生物学, 4鶴見大・歯・口腔微生物学, 5株式会社保健科学東日本・総合ラボ)

**Molecular characteristics of novel 5-domain type cholesterol-dependent cytolysin, discoidinolysin**

○Atsushi Tabata<sup>1,2</sup>, Airi Matsumoto<sup>2,3</sup>, Ai Fujimoto<sup>2</sup>, Toshifumi Tomoyasu<sup>1,2</sup>, Ayuko Takao<sup>4</sup>, Hisashi Ohkuni<sup>5</sup>, Hideaki Nagamune<sup>1,2</sup> (1Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., 2Dept. Biol. Sci. & Tech., Grad. Sch. Adv. Tech. & Sci., Tokushima Univ., 3Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. & Dent. Sci., Kagoshima Univ., 4Dept. Oral Bacteriol., Tsurumi Univ., 5Health Sci. Res. Inst. East Japan Co. Ltd.)

【目的】 ヒト口腔常在性の日和見レンサ球菌である *Streptococcus mitis* は、血液寒天上で  $\alpha$  溶血性を示す。一方、近年、 $\beta$  溶血性を示す *S. mitis* 株も確認されており、その  $\beta$  溶血因子として、グラム陽性病原性細菌の膜孔形成毒素であるコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) が見出されている。興味深いことに、*S. mitis* が産生する CDC には構造的・作用的な多様性が確認されている。本研究では、これまで ExD-CDC として報告してきた 5 ドメイン構造の新規 CDC について、分子 N 末追加ドメイン内の discoidin 領域に基づき discoidinolysin (DLY) と命名し、その分子特性について検討を行った。

【方法】 DLY を産生する *S. mitis* 臨床株 Nm-76 を対象とし、DLY 欠失株を構築して、ヒト赤血球やヒト株化細胞を対象とした DLY 依存的な細胞障害性を検討した。また、大腸菌発現系を用いて DLY 及びその変異体を調製し、溶血活性や細胞障害性、ヒト由来細胞との相互作用やヒト赤血球凝集活性の詳細を検討した。

【結果及び考察】 Nm-76 の DLY 欠失株は非溶血性を示し、野生株と比較して有意な細胞障害性の低下も確認された。さらに、DLY 組換え体は、discoidin 領域を含む N 末追加ドメインに依存的なヒト由来細胞間の相互作用のみならず、ヒト赤血球凝集活性も示した。*S. mitis* Nm-76 株は川崎病患児由来の分離株であり、DLY に確認された上記の諸特性は川崎病に特徴的な病態との関連からも興味深い。DLY 依存的な *S. mitis* の病原性の詳細について明らかにすべく、更なる検討を進めている。

**P2-108/W8-2****ベア型レジオネラエフェクターによるミトコンドリア ADP/ATP 交換輸送体の可逆的制御機構**

○久堀 智子<sup>1</sup>, Junup Lee<sup>2</sup>, Hyunmin Kim<sup>2</sup>, 山崎 浩平<sup>1</sup>, 西川 将成<sup>1</sup>, 北尾 公英<sup>1</sup>, Byung-Ha Oh<sup>2</sup>, 永井 宏樹<sup>1</sup> (1岐阜大・医・病原体制御, 2Dept. Biol. Sci., KAIST)

**Reversible modification of mitochondrial ADP/ATP translocases by paired Legionella effector proteins**

○Tomoko Kubori<sup>1</sup>, Junup Lee<sup>2</sup>, Hyunmin Kim<sup>2</sup>, Kohei Yamazaki<sup>1</sup>, Masanari Nishikawa<sup>1</sup>, Tomoe Kitao<sup>1</sup>, Byung-Ha Oh<sup>2</sup>, Hiroki Nagai<sup>1</sup> (1Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., 2Dept. Biol. Sci., KAIST)

Mitochondria are organelles of the central metabolism that produce ATP and play fundamental roles in eukaryotic cell function and thereby become targets for pathogenic bacteria to manipulate. We found that the intracellular bacterial pathogen, *Legionella pneumophila*, targets mitochondrial ADP/ATP translocases (ANTs), the function of which is linked to the mitochondrial ATP synthesis. This is achieved by a pair of effector proteins, Lpg0080 and Lpg0081, which have opposing enzymatic activities as an ADP-ribosyl transferase (ART) and an ADP-ribosyl hydrolase (ARH), respectively, coordinately regulating the chemical modification of ANTs upon infection. Our structural analyses indicate that Lpg0081 is an ARH with a non-canonical macrodomain, whose folding topology is distinct from that of the canonical macrodomain of known eukaryotic, archaeal, and bacterial proteins.

**P2-109/W8-6****Endogenous production and neurotoxicity of novel botulinum neurotoxin (BoNT/X) in a clinical isolate**

○松村 拓大, 阿松 翔, 小林 伸英, 藤永 由佳子 (金沢大・医・細菌)

○Takuhiro Matsumura, Sho Amatsu, Nobuhide Kobayashi, Yukako Fujinaga (Dept. Bacteriol., Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

Botulinum Neurotoxins (BoNTs), which are produced by *Clostridium botulinum* and related species, are the most potent toxins known and the causative agents of the potentially lethal neuroparalytic disease botulism in humans and animals. BoNTs are traditionally classified into seven serotypes (A - G) based on their antigenicity. *C. botulinum* strain 111 was isolated from an infant botulism case in Japan in 1996, and serotype testing indicated that the strain 111 produces type B BoNT (BoNT/B). Zhang S *et al.* have reported that strain 111 encodes two BoNTs (Nat Commun, 2017). BoNT/B is encoded on a large plasmid, and a novel putative BoNT (BoNT/X) is encoded on the chromosome. BoNT/X shows no cross-reactivity with antibodies raised against these serotypes, suggesting that BoNT/X is a unique serotype. However, it is unclear whether BoNT/X is actually produced by strain 111 and contributes to the onset of botulism. In this study, we analyzed the production and toxic activity of native BoNT/X from strain 111. For analysis of BoNT/X, plasmid cured strain 111 which show no expression of BoNT/B was generated by serial passage. BoNT/X was detected in culture supernatant of plasmid cured strain 111 by western blot. These results indicate that strain 111 does produce BoNT/X. Now, we are investigating the toxic activity of BoNT/X in substrate cleavage assay and mouse bioassay.

**P2-110/W8-1****レジオネラによる型破りなユビキチン修飾を介した宿主 v-SNARE の操作**

○北尾 公英<sup>1</sup>, 飯田 里奈<sup>1</sup>, 久堀 智子<sup>1,2</sup>, 永井 宏樹<sup>1,2</sup> (1岐阜大・医・病原体制御, 2岐阜大・G-CHAIN)

**Legionella co-opts a host v-SNARE using noncanonical ubiquitination**

○Tomoe Kitao<sup>1</sup>, Rina Iida<sup>1</sup>, Tomoko Kubori<sup>1,2</sup>, Hiroki Nagai<sup>1,2</sup> (1Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., 2G-CHAIN, Gifu Univ.)

*Legionella pneumophila* utilizes an arsenal of effector proteins delivered by the bacterial type IV secretion system to establish its replicative niche, known as *Legionella*-containing vacuole (LCV) during infection. A host v-SNARE Sec22b from the endoplasmic reticulum is recruited to the bacterial phagosome and forms noncanonical SNARE pairings with t-SNAREs from the host plasma membrane for LCV biogenesis. We previously identified that Sec22b is polyubiquitinated at the early stage of *L. pneumophila* infection, then a *Legionella* deubiquitinase LotB deconjugates the polyubiquitin to promote the dissociation of noncanonical SNARE pairing between v-SNARE and t-SNARE at the later stage of infection. However, the ubiquitination mechanism of Sec22b remained unknown. In this study, we identified a *Legionella* ubiquitin ligase that ubiquitinates Sec22b. This ligase conjugates the first ubiquitin to the serine residue of Sec22b by a unique mechanism distinct from the host ubiquitin ligase and the polyubiquitin chain appears to be formed on it. Furthermore, the Sec22b mutant, in which the ubiquitination site is substituted, is not ubiquitinated at the early stage of infection and is significantly less recruited to LCV than wild-type Sec22b. These results highlight a bacterial strategy manipulating the dynamics of host SNARE using noncanonical post-translational modifications.

## P2-111

### ヒト血清アルブミンによる Streptolysin S の細胞傷害活性の安定化

○横畑 修人<sup>1</sup>, 大倉 一人<sup>2</sup>, 長宗 秀明<sup>1,3</sup>, 友安 俊文<sup>1,3</sup>, 田端 厚之<sup>1,3</sup> (徳島大院・創成科学研究科・生物資源学, <sup>2</sup>鈴鹿医療科学大院・薬学, <sup>3</sup>徳島大院・社会産業理工学・生物資源産業学)

### Human serum albumin stabilizes streptolysin S secreted by streptolysin S-producing streptococci

○Shuto Yokohata<sup>1</sup>, Kazuto Ohkura<sup>2</sup>, Hideaki Nagamune<sup>1,3</sup>, Toshifumi Tomoyasu<sup>1,3</sup>, Atsushi Tabata<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov. Tokushima Univ., <sup>2</sup>Div. Pharm. Sci., Suzuka Univ. Med. Sci. Grad. Sch., <sup>3</sup>Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】口腔レンサ球菌は歯肉溝などに生息し、病原因子を産生することで宿主細胞に傷害を与える。Streptococcus anginosus subsp. anginosus (SAA) を筆頭に、ヒト口腔内の日和見病原体の中には、病原因子として Streptolysin S (SLS) を産生する株の存在が知られている。また、これら口腔レンサ球菌は、歯周病や歯科治療を契機に、血流中へ移行する可能性がある。そこで本研究では、β 溶血性 SAA の SLS 依存性の細胞傷害性について、血中における異所性環境下での生育条件を想定して検討を行った。

【方法】様々な血液由来成分の添加条件下で β 溶血性 SAA を培養し、得られた培養上清における SLS 依存性の溶血活性/細胞傷害性を検討した。また、HSA が及ぼす SLS コード遺伝子の転写発現への影響を、逆転写定量 PCR (RT-qPCR) で検討した。

【結果・考察】β 溶血性 SAA では、培養液中への血液由来成分の添加により SLS の溶血活性が安定化し、特にヒト血清アルブミン (HSA) の SLS 安定化効果が顕著であった。なお RT-qPCR の結果より、SLS コード遺伝子の発現量は HSA 存在下で有意に亢進したが、培養上清の溶血性が確認されない HSA 非存在条件においても SLS コード遺伝子の発現が確認された。以上の結果より、HSA は分泌された SLS と相互作用し、活性安定化に機能することが示唆された。また、SAA のみならず、他の SLS 産生レンサ球菌でも同様の効果が確認された。HSA はヒト血漿中で最も豊富なタンパク質であることから、本研究は SLS 産生レンサ球菌が血流移行時に、病原性リスクを高める可能性を示す知見となる。

## P2-112

### 破傷風毒素の in vitro 検出法の開発

○金 玄, 油谷 雅広, 見理 剛, 妹尾 充敏 (感染研・細菌第2部)

### The development of in vitro Tetanus Toxin detection methods

○Hyun Kim, Masahiro Yutani, Tsuyoshi Kenri, Mitsutoshi Senoh (Dept. Bacteriology II, NIID)

ワクチン等の生物学的製剤の品質管理試験において、動物愛護の観点などから 3Rs : Reduction (動物数の削減), Refinement (苦痛の軽減), Replacement (代替法への移行) が強く求められている。破傷風トキソイドは安全性を確認するため、モルモットを用いて毒素活性を失っていることを評価している。本研究では、Replacement を果たすことを目的とし、蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) を利用した破傷風毒素 (TeNT) 活性の in vitro 測定系の開発を進めている。TeNT は亜鉛依存性エンドペプチダーゼであり、抑制性ニューロンにおいて、基質である VAMP2 (Vesicle associated membrane protein2) を特異的に切断する。本研究において、ドナー蛍光としてシアン蛍光蛋白質 (CFP), アクセプター蛍光として黄色蛍光蛋白質 (Venus) を用いて、その間に hVAMP2 を挿入した基質蛋白質を構築した。得られた基質蛋白質では、FRET が起こること、さらに、TeNT を作用させることで 2 つの断片を生じ、FRET が消失することを確認した。現在、品質管理試験での適用を目指し、さらなる検討を進めている。

## P2-113

### 細菌性コラゲナーゼの構造活性相関の解析

○Md Asaduzzaman<sup>1</sup>, 美間 健彦<sup>2</sup>, 後藤 和義<sup>1</sup>, 山本 由弥子<sup>1</sup>, 内山 淳平<sup>1</sup>, Joshua Sakon<sup>3</sup>, 松下 治<sup>1</sup> (<sup>1</sup>岡山大学・院医歯薬・病原細菌学, <sup>2</sup>愛媛県立医療技術大学, <sup>3</sup>米アーカーソール大・化学生化学)

### Structure-function analysis of Clostridial collagenases

○Md Asaduzzaman<sup>1</sup>, Takehiko Mima<sup>2</sup>, Kazuyoshi Gotoh<sup>1</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>1</sup>, Jumpei Uchiyama<sup>1</sup>, Joshua Sakon<sup>3</sup>, Osamu Matsushita<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., <sup>2</sup>Ehime Pref. Univ. Health Sci., <sup>3</sup>Dept. Chem. Biochem., Univ. Arkansas, USA)

**Background:** *Hathewayaya histolytica* (*Clostridium histolyticum*), a causative agent of gas gangrene, produces two classes of collagenases to destroy collagen fibers. We have identified two structural genes, colG and colH, encoding respective class of enzymes. They have a multi-domain structure composed of a Catalytic Module (CM), a Polycystic Kidney Disease-like domain(s) (PKDs), and a Collagen-Binding Domain(s) (CBDs). CM belongs the Zn-metalloprotease family, and has a consensus motif, HExxH, in the catalytic center. Two H bind to a zinc, and E binds to a substrate water molecule. We have shown the structure of PKD and CBD, and how CBD binds to triple-helical substrate. However, it has not been revealed how collagen anchors (PKD and CBD) provide CM with tropocollagen, and how CM loosens triple helical molecules to hydrolyze them.

**Objectives and methods:** The objective of this work is to show how collagen anchor provides CM with tropocollagen, and how CM loosens the triple helix to hydrolyze them. We replaced the E with a Q, resulting that the mutant can bind to collagen but not hydrolyze them. We fused His-tag at their C-termini to purify in a sufficient yield. We expect the inactive enzymes form stable complexes with triple-helical and non-helical substrate mimics. We are analyzing their structure by cryo-electron microscopy, small angle X-ray diffraction, and X-ray crystallography.

## P2-114

### Aeromonas の biofilm 由来 bOMVs による細胞毒性メカニズムの解析

○清家 総史<sup>1</sup>, 小林 秀丈<sup>1</sup>, 高橋 栄造<sup>2</sup>, 岡本 敬介<sup>3</sup>, 山中 浩泰<sup>1</sup> (広島国際大・薬・分子微生物学, <sup>2</sup>横浜薬科大・薬・感染予防学, <sup>3</sup>岡山大院・医歯薬・インド感染症共同研究センター)

### Analysis of cytotoxicity by bOMVs released from Aeromonas biofilm

○Soshi Seike<sup>1</sup>, Hidetomo Kobayashi<sup>1</sup>, Eizo Takahashi<sup>2</sup>, Keinosuke Okamoto<sup>3</sup>, Hiroyasu Yamanaka<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Mol. Microbiol. Sci., Fac. Pharm. Sci., Hiroshima International Univ., <sup>2</sup>Lab. Med. Microbiol., Dept. Health Pharm., Yokohama Univ. of Pharm., <sup>3</sup>Collab. Res. Ctr. Okayama Univ.)

【目的】*Aeromonas* は河川や汽水域等に棲息するグラム陰性の食中毒起因菌である。本菌は生体、非生体表面において強い接着性を有することから、医療機器に biofilm を形成後、人へ感染する事例も報告されている。そこで、biofilm を介した感染を想定し、biofilm 中に豊富に存在している外膜小胞 (bOMVs) が宿主の初期免疫に関わる影響を調べるため、マウスマクロファージ様細胞 (Raw 264.7 細胞) を用いた解析を行った。

【結果と考察】まず、Raw 264.7 細胞に種々の用量の bOMVs を添加し、WST assay により Raw 264.7 細胞の細胞生存率を調べた。その結果、bOMVs の用量依存的に Raw 264.7 細胞の生存率が低下した。次に、bOMVs の毒性成分を解析するため、種々の解析を行った結果、bOMVs に含まれる LPS が細胞毒性に強く関与し、細胞表面に発現する TLR4 を介して細胞毒性を示していることが示唆された。次に、bOMVs が誘導する細胞死を解析すると、pyroptosis マーカーである GSDMD の切断、IL-1β の遊離が認められたことから、bOMVs は pyroptosis を誘導することが明らかとなった。さらに、bOMVs の細胞毒性メカニズムを明らかにするため、bOMVs の局在を解析した結果、bOMVs は主に細胞膜の脂質ラフト外の領域に結合し、クラスリン依存性エンドサートーシスにより取り込まれ、細胞毒性を発揮することが明らかとなった。

以上の結果より、*Aeromonas* が遊離する bOMVs は、Raw 264.7 細胞に対して、TLR4 を介する細胞毒性、及び、クラスリン依存性エンドサイトーシスによる細胞毒性の 2 経路により pyroptosis を誘導することが示唆された。bOMVs により宿主の初期免疫が抑制されると、本菌が宿主に感染しやすい環境が整うことが推察される。



## P2-115

**Streptococcus mitis** 由来ヒト血小板凝集因子の N 末追加ドメインに依存的な宿主細胞の遺伝子発現亢進

○大岡 桂一郎<sup>1</sup>, 田端 厚之<sup>1,2</sup>, 大國 寿士<sup>3</sup>, 友安 俊文<sup>1,2</sup>, 長宗 秀明<sup>1,2</sup> (徳島大院・創成科学研究科・生物資源学, <sup>2</sup>徳島大院・社会産業理工学・生物資源産業学, <sup>3</sup>株式会社保健科学東日本・総合ラボ)

**Induction of cytokine gene expression in human cell line depending on N-terminal domain of Sm-hPAF**

○Keiichiro Ohoka<sup>1</sup>, Atsushi Tabata<sup>1,2</sup>, Hisashi Ohkuni<sup>3</sup>, Toshifumi Tomoyasu<sup>1,2</sup>, Hideaki Nagamune<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., <sup>2</sup>Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., <sup>3</sup>Health Sci. Res. Inst. East Japan Co. Ltd.)

【目的】*S. mitis* Nm-65 株は川崎病患児の口腔由来株であり、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) である *S. mitis* 由来ヒト血小板凝集因子 (Sm-hPAF) を産生する。Sm-hPAF は 4 ドメイン構造の典型的な CDC とは異なり、N 末追加ドメイン (OD) を有する。この OD の機能として、Sm-hPAF モホログのレクチノリンンでの報告よりレクチン活性が示唆されているが、OD の宿主細胞に対する作用の詳細は不明である。そこで本研究では、Sm-hPAF の OD に注目し、サイトカイン遺伝子の発現変動を指標として宿主細胞の応答反応を検討した。

【方法】検討に用いた Sm-hPAF 組換え体は大腸菌発現系で調製し、LPS 除去処理後に検討に用いた。被検細胞としてヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を用い、細胞生存率に影響を与えない濃度の組換え体を作用させ、サイトカイン遺伝子の発現変動を逆転写定量 PCR で検討した。

【結果と考察】Sm-hPAF 組換え体を作用させた HSC-2 では、川崎病の病態との関連で注目されている TNF- $\alpha$  や IL-6 の発現量が有意に増加した。一方、これらの遺伝子発現は、Sm-hPAF の OD 欠失体を作用させた細胞では有意に低下した。以上より、Sm-hPAF による TNF- $\alpha$  と IL-6 の発現亢進に関して、Sm-hPAF に特徴的な OD の寄与が示唆された。Sm-hPAF の OD はレクチンとしての機能のみならず、Sm-hPAF の膜孔形成能にも影響を及ぼしている可能性が考えられることから、Sm-hPAF に特徴的な OD と川崎病の病態との関連について、現在さらに詳細な検討を行っている。

## P2-116

**ヒト抗ジフテリア抗体の性状解析**

○幸田 知子<sup>1</sup>, 深江 志保<sup>1</sup>, 三牧 茜<sup>1</sup>, 里深 博幸<sup>2</sup>, 香月 康宏<sup>2,3</sup>, 平松 敬<sup>4</sup>, 向本 雅郁<sup>1</sup> (大公大院・獣医, <sup>2</sup>鳥取大学染色体工学研究センター, <sup>3</sup>鳥取大学・医学部・生命科学・染色体医工学講座, <sup>4</sup>株式会社 Trans Chromosomics)

**Characterization of human antibody against diphtheria toxin**

○Tomoko Kohda<sup>1</sup>, Shiho Fukae<sup>1</sup>, Akane Mimaki<sup>1</sup>, Hiroyuki Satofuka<sup>2</sup>, Yasuhiro Kazuki<sup>2,3</sup>, Kei Hiramatsu<sup>4</sup>, Masafumi Mukamoto<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metropolitan Univ., <sup>2</sup>Chromosome Engineering Res. Center., Tottori Univ., <sup>3</sup>Dept. Chromosome Biomedical Engineering, Sch. Life Sci., Fac. Med., Tottori Univ., <sup>4</sup>Trans Chromosomics, Inc.)

Diphtheria is a potentially fatal disease caused by infection with *Corynebacterium diphtheriae*. Diphtheria toxin (DT) causes tissue death at the site of production. In all clinical cases, a currently available primary therapeutic option is treatment with diphtheria antitoxin produced by hyper-immunization of horses. However, usage of horse therapeutic antibodies is problematic, since it not only raises ethical issues but also it could introduce serious side effects such as serum sickness. Therefore, there is a strong motivation to develop neutralizing human monoclonal antibodies (mAbs) against DT. In this study, we used trans-chromonic (TC)-mAb<sup>TM</sup> mice carrying the human genetic elements for production of completely humanized mAbs. TC-mAb mice were immunized with commercially available DT toxoid, and the reactivity of each mAb to DT was screened by ELISA. Then, their DT-neutralizing activities were examined by using the Vero cell viability assay. Of seven mAbs with specific binding to DT in ELISA, none exhibited DT-neutralizing activity. It turned out that the mAbs were IgM subclass and reacted with the receptor binding domain of DT. These results suggest that both class switch and affinity maturation insufficiently occurred. Modification of the immunization protocol and preparation of additional mAbs with DT neutralizing activity are now in progress in our laboratory.

## P2-117

**サルモネラエフェクター分泌を阻害する天然化合物の探索**

○高屋 明子<sup>1</sup>, 廣世 光呼<sup>1</sup>, 石橋 正己<sup>1</sup> (千葉大・院薬・活性構造化学, <sup>2</sup>千葉大・真菌セ)

**Identification of natural compounds to inhibit effector translocations of *Salmonella***

○Akiko Takaya<sup>1</sup>, Mikko Hirose<sup>1</sup>, Masami Ishibashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dep. Nat. Prod. Chem., Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ., <sup>2</sup>MMRC, Chiba Univ.)

サルモネラの病原性発現に関わるエフェクターは *Salmonella* pathogenicity island (SPI) 1 および SPI2 にコードされた 3 型分泌装置によって宿主細胞に移行される。これまでに SPI1-T3SS を阻害する化合物として、植物に含まれる Quercetin が報告されている。本研究では、Quercetin との構造類似度を基に独自の天然物ライブラリーから SPI1-T3SS 阻害化合物を新たに同定し、その阻害機構を検討した。まず、天然物ライブラリーに含まれる化合物 501 種について Quercetin との分子類似度を算出した。分子類似度には、MACCS key フィンガープリントを用いたタニモト係数 (T) を用いた。T>0.70 の 55 種をサルモネラ培養液に添加し、37°C 一晚静置培養後、培養液上清から分泌タンパク質を調製した。分泌タンパク質中の SPI1 エフェクター SipC 量を比較した結果、13 種の化合物で SipC 量が顕著に低下した。SipC 分泌量は培養条件によって異なることから、振とう培養での分泌量を調べた。その結果、両条件で SipC の分泌が阻害された化合物は、kaempferol 7-O-rhamnoside (T = 0.879), isocorilagin (T = 0.757), pentagalloyl glucose (T = 0.722) であった。阻害機構を調べるため、細胞内 SipC 量を化合物非添加時と比較したところ、isocorilagin と pentagalloyl glucose 添加では細胞内 SipC 量が顕著に減少していた。更に、sipC 転写に関わる上流の転写制御因子 Hila, InvF 量も減少していた。また、これらは SPI2 トランスロコンである SseB の分泌も抑制した。以上より、isocorilagin と pentagalloyl glucose は SPI1 と SPI2 の 2 つの T3SS を抑制することが示唆された。

## P2-118

**紅蔘サポニンによる黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制**

○岡 真優子<sup>1</sup>, 蔦本 さくら<sup>1</sup>, Nugraha Krisn Dendi<sup>2</sup>, 堀口 安彦<sup>2</sup> (京都府立大院・生命環境・食環境安全性, <sup>2</sup>大阪大・微研・分子細菌)

**Metabolite of Red ginseng extracts by  $\beta$ -glucosidase reduces hemolysin production from *S. aureus***

○Mayuko Oka<sup>1</sup>, Sakura Tsutamoto<sup>1</sup>, Dendi Nugraha Krisna<sup>2</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Food Hyg. Env. Health, Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Mol. Bacteriol., RIMD, Osaka Univ.)

Red ginseng, which was made by steaming and drying up Panax ginseng. In the previous study, we determined that Red ginseng extracts (RGE) with methanol enhanced the sensitivity against some antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. By using the RNA-seq technique, we next analyzed the expression levels of 2,726 genes in *S. aureus* BAA-1717 strain that had been incubated for 6 hours in the presence or absence of RGEs. RGEs decreased the expressions of 169 genes and increased the expressions of 129 genes. A typical two component system (TCS) consists of a sensor histidine kinase (HK) and a response regulator (RR) is a primary signal transduction mechanism in bacteria. Among of 16 TCSs in *S. aureus*, RGE decreased drastically the expressions of *saeS/R* genes for 0.5-3 hours and *agrC/A* genes for 3-6 hours. Moreover, the mRNA levels of virulence factors including  $\alpha$ - $\gamma$ - $\delta$ -hemolysin, which regulated by *SaeS/R* and *AgrC/A*, were decreased for 1-3 hours in a RGEs-dose dependent manner. It was annotated ginsenoside Rg3, as suppressor of *saeS/R* genes from RGEs. Ginsenoside Rb1 showed a little effect of suppressor for *saeS/R* genes, while a metabolite of ginsenoside Rb1 by  $\beta$ -glucosidase of *Lactobacillus* suppressed *saeS/R* gene expressions stronger than ginsenoside Rg3. Thus, we suggest that the  $\beta$ -glucoside of ginsenoside may be important in suppressed the expressions of *SaeS/R*.

## P2-119

### 志賀毒素産生性大腸菌毒素 SubAB の毒性に関わる宿主レドックス調節機構の解明

○津々木 博康<sup>1</sup>, 張 田力<sup>1</sup>, 八尋 錦之助<sup>2</sup>, 赤池 孝章<sup>3</sup>, 澤 智裕<sup>1</sup> (熊本大・院生命科学・微生物学,<sup>2</sup>京都薬科大・微生物・感染制御学,<sup>3</sup>東北大・院医・環境医学)

### Redox regulation involved in the toxicity of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* toxin SubAB

○Hiroyasu Tsutsuki<sup>1</sup>, Tianli Zhang<sup>1</sup>, Kinnosuke Yahiro<sup>2</sup>, Takaaki Akaike<sup>3</sup>, Tomohiro Sawa<sup>1</sup> (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ.,<sup>2</sup>Dept. Microbiol. Infect. Cont. Sci., Kyoto Pharm. Univ.,<sup>3</sup>Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】志賀毒素産生性大腸菌の一種から同定された毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB) は、宿主の小胞体 (ER) タンパク質 BiP を切断し ER ストレスを誘導する。我々は、SubAB の ER ストレスを介した細胞毒性や自然免疫抑制機構について詳細に解析し、その知見を報告してきた。一方、細菌毒素のレドックス調節に関する報告が散見されるが、SubAB については不明である。本研究では、一酸化窒素 (NO) を介したレドックス調節が SubAB の毒性にどのような影響を及ぼすか調べることを目的とした。

【方法】HeLa 細胞に NO ドナー存在下で SubAB を処理し、BiP の切断を評価した。SubAB の毒性に関わる宿主因子のうち NO の標的となるものとして Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) を見出した。そこで GSTP1 のノックアウト (KO) 細胞や組換え酵素を用いてさらに詳細な解析を行った。

【結果】NO は HeLa 細胞に対する SubAB の毒性を抑制した。野生型細胞では NO が SubAB の毒性を阻害したが、GSTP1 の KO 細胞では NO による阻害が消失した。NO は野生型 GSTP1 の精製酵素の活性を阻害したが、48 番目のシステインをセリンに置換した酵素では NO による阻害が减弱した。

【結論】SubAB は宿主因子としてレドックス調節タンパク質 GSTP1 を介して毒性を発揮することが分かった。一方、NO は SubAB の細胞毒性を阻害すること、またその分子メカニズムとして NO が GSTP1 の活性を阻害することが分かった。さらに、GSTP1 のもつ 4 つのシステインのうち 48 番目のシステインが NO の主な標的であることが示唆された。このような SubAB の毒性発揮に関わる宿主レドックス調節機構について、現在詳細な解析を進めている。

## P2-120

### C 型ボツリヌス菌 Yoichi 株の血球凝集素 33 の大腸菌組換え発現の構築と精製

○畑 剛士<sup>1</sup>, 宮下 慎一郎<sup>2</sup>, 唐津 修羅<sup>3</sup>, 黄 インシュン<sup>3</sup>, 長島 有希<sup>1</sup>, 諸菱 環<sup>1</sup>, 細谷 圭汰<sup>3</sup>, 本多 亮鷹<sup>2</sup>, 相根 義昌<sup>2</sup> (東京農大・生物産業・食香粧,<sup>2</sup>東京農大・生物産業・食香粧,<sup>3</sup>東京農大・生物産業・生物産業)

### Purification of recombinant hemagglutinin-33 from botulinum toxin complex serotype C strain Yoichi

○Tsuyoshi Hata<sup>1</sup>, Shin-Ichiro Miyashita<sup>2</sup>, Shura Karatsu<sup>3</sup>, I Hsun Huang<sup>3</sup>, Yuki Nagashima<sup>1</sup>, Tamaki Morobishi<sup>1</sup>, Keita Hosoya<sup>3</sup>, Akitaka Honda<sup>2</sup>, Yoshimasa Sagane<sup>2</sup> (Dept. Food. Cosme. Sci., Grad. Sch. Bio. Indust., Tokyo NODAI,<sup>2</sup>Dept. Food. Aroma Cosme. Chem., Fac. Bio. Indust., Tokyo NODAI,<sup>3</sup>Dept. Bio. Indust., Grad. Sch. Bio. Indust., Tokyo NODAI)

自然界でボツリヌス神経毒素 (BoNT) は無毒タンパク質と会合した毒素複合体としてボツリヌス菌により産生される。無毒タンパク質の一つである血球凝集素-33 (HA-33) は小腸上皮細胞へ結合し、BoNT の体内侵入を促進する。BoNT は血清型によって A-G 型に分類され、A および B 型 HA-33 はガラクトース、C 型 HA-33 はシアル酸を認識する。我々は、C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した HA-33 (変異型 HA-33/C) がガラクトースを認識することを見出した。しかし、その糖認識機構の詳細については不明である。本研究では、変異型 HA-33/C の大腸菌組換え体発現系の構築および精製を行った。変異型 HA-33/C の N 末端にヒスチジンタグを付加した大腸菌組換え体発現系を構築し、IPTG にて発現誘導したところ、His-変異型 HA-33/C は封入体を形成した。変異型 HA-33/C を可溶化するために、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) あるいはマルトース結合タンパク質 (MBP) を付加した大腸菌組換え体発現系を構築した。MBP-変異型 HA-33/C は可溶性タンパク質として発現したが、GST-変異型 HA-33/C は封入体を形成した。MBP-変異型 HA-33/C は、Amylose resin, Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーで精製を行い、純度 95% の精製標品を得た。現在、MBP-変異型 HA-33/C と各種糖との相互作用解析および結晶構造解析を進めている。

## P2-121

### ESAT-6 like protein secreted via T7SS contributes to cytotoxicity of *Streptococcus intermedius*

○橋野 正紀, 塚塚 剛史, 黒田 誠 (感染研・ゲノム)

○Masanori Hashino, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda (Pathogen Genomics Center Nat. Inst. Infect. Dis.)

小児脳膿瘍患者病変部より起因菌として *Streptococcus intermedius* TYG1620 株が同定された。全ゲノム解読およびマウス感染実験の結果、TYG1620 株はゲノム上に Type 7 Secretion System (T7SS) 関連遺伝子群を保有し、マウス皮下膿瘍形成に T7SS 関連遺伝子群が寄与することを報告した (Infect Immun. 2017 Jan 26;85(2))。TYG1620 株と T7SS machinery protein (EssA, EssC) のトランスポゾン挿入変異株 2 株を用いて、培養上清の分泌タンパク質を網羅的に Secretome 解析 (Data Independent Acquisition (DIA) 法) した結果、ESAT-6 like protein, LXG family protein, hypothetical protein を含む T7SS 依存的分泌タンパク質 10 種 (変異株で検出量が 5% 以下に減少) を同定した。その中で細菌毒素として報告例がある ESAT-6 like protein の欠損変異株を作製し、HeLa 細胞にその培養上清を添加し細胞傷害性を検討した結果、親株 TYG1620 株と比較して細胞傷害性が有意に减弱した。Secretome 解析 (DIA 法) により ESAT-6 like protein 欠損変異株の培養上清中では、LXG family protein, hypothetical protein を含む 8 種の T7SS 依存的分泌タンパク質の顕著な分泌減少 (検出量 5% 以下に減少) が確認された。ESAT-6 like protein は、T7SS を介した細胞傷害性に寄与するとともに、LXG family protein 等の T7SS 依存的分泌にも関与していることが示唆された。

## P2-122

### Effects of *Monascus* fermented rice extract on cholera toxin sensitivity of CHO cells

金城 麗菜<sup>1</sup>, Jun Xu<sup>2</sup>, 橘 信二郎<sup>1</sup>, 山城 哲<sup>2</sup> (琉球大・農,<sup>2</sup>琉球大・医・細菌)

Rena Kinjyo<sup>1</sup>, Jun Xu<sup>2</sup>, Shinjiro Tachibana<sup>1</sup>, Tetsu Yamashiro<sup>2</sup> (Facul. Agricul., Univ. Ryukyus,<sup>2</sup>Dept. Bacteriol. Sch. Med. Univ. Ryukyus)

*Genus Monascus* have been traditionally used to produce fermented foods and natural colorants in Asia. As an index of the biological effects of the cholera toxin (CTx), CHO cell elongation index (CCEI) is used. In this study, a research question on whether the pre-treatment of CHO cells with *Monascus* fermented rice extracts (MFRE) affects the sensitivity of CHO cells against the bio-effects of CTx was determined. Two different extracts, MFRE-A and MFRE-B, were prepared from the MFRE. CTx was induced from *Vibrio cholerae* O1 El Tor N16961. A 2x10<sup>4</sup> cell/ml portion of fresh CHO cells were reacted with CTx at 200 ng/ml, under 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C overnight. After fixation and Giemsa staining, nine fields with 30-50 cells/field were chosen and analyzed with Image-J to calculate the CCEI using a formula [(the elongated cells counts / the normal cell count) %]. CHO cells were pre-incubated with MFRE-A or MFRE-B in different concentrations for 30 min before adding CTx in the CCEI assay. The CCEI value was similar to that of the control when CHO cells were pre-incubated with MFRE-A; however, the CCEI was significantly altered when the cells were incubated with MFRE-B in a dose-dependent manner. The identification of the responsible compound(s) contained in MFRE-B and its possible mechanism(s) will be presented.

**P2-123/W8-7****Identification of a novel gene locus related to the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei***

○西田 隆司<sup>1</sup>, 平松 征洋<sup>1</sup>, Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>, 堀口 安彦<sup>1,2</sup> (阪大・微研・分子細菌学, <sup>2</sup>阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Takashi Nishida<sup>1</sup>, Yukihiro Hiramatsu<sup>1</sup>, Dendi Krisna Nugraha<sup>1</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., <sup>2</sup>CiDER, Osaka Univ.)

*Burkholderia pseudomallei* (Bps) is a facultative intracellular bacterium and the causative agent of melioidosis, a severe disease with a high mortality rate (~40%) in acute phase. A Type III Secretion System (Bsa T3SS) has been considered a major virulence factor of Bps, contributing to its intracellular growth ability and virulence in mice. *Burkholderia thailandensis* (Bt), a closely related bacterium with Bps, also depends on the orthologue of Bsa T3SS to replicate in cells in vitro but rarely causes diseases in humans and mice. Therefore, we hypothesize that Bps-specific virulence genes in addition to Bsa T3SS are involved in the pathogenicity of Bps. Indeed, Bps mutant of Bsa T3SS ( $\Delta bsaZ$ ) was found to less replicate in Raw264.7 cells than wild-type Bps but better survive in the cells than Bt $\Delta bsaZ$ . In order to search the Bps-specific virulence genes, we performed a screening of a transposon library prepared from Bps $\Delta bsaZ$  and identified a Bps-specific gene locus (Bps-specific virulence gene locus; Bsv locus) that supported intracellular growth of Bps $\Delta bsaZ$ . Bsv locus is not present in Bt genome and Bps $\Delta bsaZ$  with deletion of a gene in Bsv locus showed reduced ability to proliferate in Raw264.7 cells, similar to Bt $\Delta bsaZ$ . These results suggest that Bsv locus contributes to the Bps-specific pathogenicity. We are currently analyzing the function of the genes in Bsv locus.

**P2-124/W8-3****Vi capsular polysaccharide of *Salmonella* Typhi promotes macrophage phagocytosis by binding DC-SIGN**

Lillian F. Zhang<sup>1</sup>, Andreas J. Baumber<sup>1</sup>, ○日吉 大貴<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Med. Microbiol. Immunol., UC Davis, <sup>2</sup>長崎大・熱研・細菌学)

Lillian F. Zhang<sup>1</sup>, Andreas J. Baumber<sup>1</sup>, ○Hirota Hiyoshi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Med. Microbiol. Immunol., UC Davis, <sup>2</sup>Dept. Bacteriol., NEKKEN, Nagasaki Univ.)

Capsular polysaccharides are common virulence factors of extracellular, but not intracellular bacterial pathogens, due to their antiphagocytic properties. It is therefore paradoxical that *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar (S.) Typhi, an intracellular pathogen, synthesizes a virulence associated (Vi) capsule, which exhibits antiphagocytic properties. Here we show that the Vi capsular polysaccharide has different functions when *S. Typhi* interacts with distinct subsets of host phagocytes. The Vi capsular polysaccharide allowed *S. Typhi* to selectively evade phagocytosis by human neutrophils, while promoting human macrophage phagocytosis. A screen of C-type lectin receptors identified human DC-SIGN as the receptor involved in macrophage binding and phagocytosis of capsulated *S. Typhi*. Consistent with the anti-inflammatory activity of DC-SIGN, purified Vi capsular polysaccharide reduced inflammatory responses in macrophages. These data suggest that binding the human C-type lectin receptor DC-SIGN by the Vi capsular polysaccharide contributes to the pathogenesis of typhoid fever.

**P2-125****肺炎球菌感染における糖鎖結合タンパクの機能解析**

○古屋 瑠菜<sup>1,2</sup>, 小川 道永<sup>2</sup>, 齋藤 良一<sup>1</sup>, 明田 幸宏<sup>2</sup> (1東京医歯大・医学総合・分子病原体, <sup>2</sup>国立感染研・細1)

**Functional analysis of carbohydrate-binding proteins in a pneumococcal infection**

○Runa Furuya<sup>1,2</sup>, Michinaga Ogawa<sup>2</sup>, Ryoichi Saito<sup>1</sup>, Yukihiro Akeda<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Mol. Microbiol., Grad. Sch. Med., Tokyo Medical and Dental Univ., <sup>2</sup>Dept. Bac. 1, Natl. Inst. Infect. Dis.)

肺炎球菌は健康者では鼻腔咽頭に常在し小児や高齢者では敗血症、髄膜炎など侵襲性肺炎球菌感染症を引き起こす。莢膜多糖に対するワクチンが定期接種化されているが、莢膜型が非ワクチンタイプにシフトする「血清型交代現象」や薬剤耐性菌の増加が顕著であることから、血清型や抗菌薬に依存しない肺炎球菌と宿主因子との相互作用に着目した、「肺炎球菌の急所」を標的とした次世代型の予防・治療法の開発が急務である。

細胞内に侵入した肺炎球菌は膜孔形成毒素 Pneumolysin により endosome に穴をあけることで殺菌を回避する。それに対して宿主細胞は、肺炎球菌を内包する endosome を特異的に認識する autophagy を誘導し菌を排除する。一方で、肺炎球菌が autophagy 誘導を抑制する病原因子である CbpC を細胞内で放出し autophagy に対抗していることが明らかになったが、未だ不明な点が多い。

そこで本研究では細胞内に侵入した肺炎球菌と宿主との新たな相互作用機構を見出すことを目的とし、N末、C末に特異性の異なる糖鎖結合 domain を有する Tandem-repeat 型 Galectin に着目した。Galectin-family は  $\beta$ -galactoside 結合性 lectin であり、腫瘍転移、自然免疫などに関与することが知られている。そこで、組換え Galectin を用いて肺炎球菌との相互作用解析を行った結果、特定の Tandem-repeat 型 Galectin が菌体と直接相互作用することを発見し、さらにその結合性は糖鎖結合性欠変異の導入で消失した。さらに、感染細胞においても既報の膜上の糖鎖を認識する Galectin の局在様式とは異なる菌特異的に局在する新規の局在様式が存在することが明らかになった。今後はこの結合の感染における意義の解明を行う。

**P2-126****TBC1D18 regulates exocytic and endocytic trafficking of the invading Group A Streptococcus**

○野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大・院医・微生物)

○Atsuko Nozawa, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ)

Group A Streptococcus (GAS) typically invades epithelial cells and is transported by various host intracellular processes involving membrane trafficking. The Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) domain-containing Rab-specific GAPs (TBC/RabGAPs) regulate membrane trafficking, such as endocytosis, exocytosis, and autophagy. However, the role of TBC/RabGAPs in response to bacterial infection remains poorly understood. Here, we describe the functions of TBC1D18 (RAB GTPase activating protein 1-like; RabGAP1L) as both a negative and a positive regulator of endocytosis and exocytosis via endocytic recycling, respectively. TBC1D18 inhibited endolysosomal trafficking and subsequent autophagy induction during GAS infection. Additionally, GAS that invaded into cells was trafficked to Rab11A-positive recycling endosomes and exosomes, and released from infected cells. TBC1D18 facilitated this exocytic process via endocytic recycling, and GAS was expelled into the extracellular space. TBC1D18 is therefore a vital host factor that determines the fate of GAS in invaded cells.

## P2-127

### 脾臓内の *Salmonella* 宿主細胞の表現型解析

○松山 悦大<sup>1</sup>, 木村 宇輝<sup>1</sup>, 佐伯 華蓮<sup>1</sup>, 高屋 明子<sup>2</sup>, 常世田 好司<sup>1</sup> (1鳥取大・医・免疫, 2千葉大・薬・活性構造化)

### Phenotypic analysis of *Salmonella*-infected cells in the spleen

○Nobuhiro Matsuyama<sup>1</sup>, Uki Kimura<sup>1</sup>, Karen Saiki<sup>1</sup>, Akiko Takaya<sup>2</sup>, Koji Tokoyoda<sup>1</sup> (1Div. Immunol., Life Sci., Med., Tottori Univ., 2Dept. Nat. Prod. Chem., Pharm. Sci., Chiba Univ.)

*Salmonella* Typhimurium 弱毒株はマウスに感染すると、脾臓などで生存し続けることがわかっているが、脾臓内での宿主細胞は、マクロファージや樹状細胞など、複数の候補があり、さらにその細胞群の中のどの集団が詳細な研究は進んでいない。本研究の目的は、*Salmonella* の脾臓内局在を細胞レベルで明らかにすることである。そこで、*Salmonella* を感染させたマウス脾臓内に生着する、細菌の局在を組織切片免疫蛍光染色法によって宿主細胞を詳細に同定した。*Salmonella* は脾臓の赤脾髄に宿主細胞のクラスターを形成することが観察された。また、マクロファージマーカー F4/80 の陽性細胞内であることや、樹状細胞マーカー CD11c の陽性細胞外であることから、樹状細胞ではなくマクロファージが主な宿主細胞であることがわかった。さらに CD163 や CD9, MOMA-1, MHC class II 等の分子に対する抗体を用いて、宿主マクロファージの表現型を明らかにした。さらに、持続的に感染した際や抗菌薬を投与した際において、宿主細胞の表現型が変化するかについても検討した。また、*Salmonella* に対する様々な抗体を用いることで宿主細胞内において、どのような分子が強く発現しているか解析し、細菌側の表現型も明らかにすることができた。*Salmonella* とその宿主細胞の表現型を解明することは、*Salmonella* の生体内生存機構を解明するために重要である。

## P2-128

### 野兎病菌感染におけるピオチンリガーゼの解析

○仲村 岳真<sup>1</sup>, 西中間 菜穂<sup>1</sup>, 清水 隆<sup>1</sup>, 渡邊 健太<sup>1</sup>, 宇田 晶彦<sup>2</sup>, 度会 雅久<sup>1</sup> (1山口大・獣・公衆衛生, 2感染研・獣医学)

### The analysis of biotin ligases in *Francisella* infection

○Takemasa Nakamura<sup>1</sup>, Naho Nishinakama<sup>1</sup>, Takashi Shimizu<sup>1</sup>, Kenta Watanabe<sup>1</sup>, Akihiko Uda<sup>2</sup>, Masahisa Watarai<sup>1</sup> (1Lab. Vet. Pub. Hlth., Jnt. Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ., 2Dept. Vet. Sci., NIID)

*Francisella tularensis*, a causative agent of tularemia, is a highly pathogenic gram-negative bacteria to humans and animals. Among four *F. tularensis* subspecies, *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*F. tularensis*) exert high pathogenicity on humans, while subsp. *novicida* (*F. novicida*) seldom causes disease in healthy people. A biotin protein ligase is an enzyme that is involved in the biotinylation of protein and the control of biotin biosynthesis in bacteria. It is known that *F. novicida* has two functional biotin ligases (BplA, BirA), whereas *F. tularensis* *birA* gene is a pseudogene. From these insights, we had an interest in these differences in biotin regulation between the two subspecies and investigated their role in infection. The deletion mutants of two biotin ligases ( $\Delta bplA$ ,  $\Delta birA$ ) of *F. novicida* were constructed. The  $\Delta bplA$  strain, but not the  $\Delta birA$  strain showed decreased intracellular growth compared to the wild-type strain in HeLa cells. The immunocytochemistry using fluorescent labeled streptavidin was performed to visualize the intracellular biotin dynamics in the *F. novicida*-infected HeLa cells. As a result, dot-like biotin aggregations partially co-localized with the GFP expressing *F. novicida* or phagolysosomes were observed. These results suggest that biotin plays an important role in the escape of *F. novicida* from the phagolysosome, allowing intracellular growth.

## P2-129

### 選択的かつ網羅的遺伝子同定による *Vibrio vulnificus* の好中球逃避機構の解明

○柏本 孝茂, 門 武宏, 山崎 浩平, 上野 俊治 (北里大・獣医・獣医公衆衛生学)

### Neutrophil evasion strategies by *V. vulnificus*

○Takahige Kashimoto, Takehiro Kado, Kohei Yamazaki, Shunji Ueno (Lab. Veterinary Public Health., Sch. Veterinary Medicine, Kitasato Univ.)

*Vibrio vulnificus* (*V.v.*) は、ヒトに経口あるいは創傷感染し、体内で急速に拡散・増殖して患者を敗血症に陥れ、短時間内に死に至らしめる。この事実は、*V.v.* が宿主の自然免疫機構を回避して、増殖可能であることを示している。我々は、*V.v.* が好中球から逃避する事実を見出し、選択的かつ網羅的病原遺伝子同定法を開発して、*V.v.* が好中球から逃避して増殖するために必要とする遺伝子のみを網羅的に選抜し、40 の遺伝子を同定した。それらを機能分類すると共に、好中球との関連性を *In vivo* および *In vitro* で解析した。機能分類では、べん毛の構築や回転制御に関与する遺伝子が全体の 35% と最多を占めていた。その他、既知の好中球逃避因子である莢膜の合成や増殖因子である鉄の取り込み、二成分制御系、菌の分裂、染色体分配および機能未知の遺伝子が同定された。マウス創傷感染モデルを利用した解析の結果、べん毛の回転制御は、感染局所である皮下へ浸潤した好中球から逃れて拡散・増殖し、素早く筋肉内へと侵入するために必要であった。染色体分配に関与するとされる *mukB* は、感染局所での増殖に必要なと、全身循環中に侵入してから、好中球から逃れて増殖するのに必要と考えられた。機能未知の遺伝子のうち、ゲノム上に同方向に連続して配置されている 2 遺伝子の解析を行った結果、菌体外膜へのアシル物質の輸送を担う新規輸送システムであり、感染局所における好中球からの逃避に関与していた。*V.v.* は、環境変化を感知し、それぞれに合致した方法で好中球から逃れ、感染者体内における短時間内での増殖を可能にしていると考えられた。

## P2-130

### 抗菌薬寛容に伴う細菌表面分子の発現変化は宿主免疫を回避する

○佐伯 華蓮<sup>1</sup>, 木村 宇輝<sup>1</sup>, 松山 悦大<sup>1</sup>, 高屋 明子<sup>2</sup>, 常世田 好司<sup>1</sup> (1鳥取大・医・免疫, 2千葉大・薬・活性構造化)

### Antibiotics change bacterial phenotypes and induce the evasion of host immunity

○Karen Saiki<sup>1</sup>, Uki Kimura<sup>1</sup>, Nobuhiro Matsuyama<sup>1</sup>, Akiko Takaya<sup>2</sup>, Koji Tokoyoda<sup>1</sup> (1Div. Immunol., Life Sci., Med., Tottori Univ., 2Dept. Nat. Prod. Chem., Pharm. Sci., Chiba Univ.)

薬剤寛容細菌は、抗菌薬に対する耐性遺伝子を持たないにも関わらず、薬剤存在下でも生存可能な細菌集団である。これらの細菌は薬剤耐性菌になる前段階であるため、耐性菌を生み出さないためにも、その生体内での維持機構を解明することは非常に重要である。本研究では *Salmonella* Typhimurium を用いて、薬剤寛容細菌表面の表現型に注目し、薬剤寛容性を獲得する際に起こる表面分子の変化を調べるとともに、その変化に伴う宿主免疫への影響を調べた。*Salmonella* 菌の野生株や弱毒株を用いて、フルオロキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン処理による薬剤寛容細菌形成を行い、細菌の表面に発現している分子をフローサイトメトリーで解析した。さらに、抗菌薬を感染マウスに投与した際に起こる宿主免疫応答を観察することで、抗菌薬により細菌が免疫系から回避可能になったのかを評価した。抗菌薬を添加すると、多くの分子において発現量に差が見られなかった。しかし、一部だが複数で通常発現していない分子が表面上に発現し、一方でフラジェリンなどの表面分子は発現が大幅に減少した。抗菌薬で細菌表面分子が変わることにより、免疫系から回避している可能性があるため、抗菌薬が宿主免疫へ及ぼす影響を調べた。組織に残存する菌数に関わらず、抗 *Salmonella* 抗体量は抗菌薬によって大きく減少した。以上の結果は、細菌が薬剤寛容細菌を形成する際、表面分子の発現を変えることで宿主免疫から回避している可能性を示唆した。

## P2-131

Pathogenic effects on liver of mice by the infection of *Helicobacter mastomyrinus* isolates

○山中 仁木<sup>1</sup>, 宮内 綾乃<sup>2</sup>, 吉沢 隆浩<sup>1</sup>, 嶋田 新<sup>1</sup>, 大沢 一貴<sup>3</sup>, 増山 律子<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>信州大・基盤研セ, <sup>2</sup>立命館大院・食マネ, <sup>3</sup>長崎大院・医歯薬)

○Hitoki Yamanaka<sup>1</sup>, Ayano Miyauchi<sup>2</sup>, Takahiro Yoshizawa<sup>1</sup>, Shin Shimada<sup>1</sup>, Kazutaka Ohsawa<sup>3</sup>, Ritsuko Masuyama<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Res. Ctr. Adv. Sci. Technol., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Gastron. Manag., Ritsumeikan Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

*Helicobacter mastomyrinus* is frequently detected among the species in laboratory mice kept in Japan, though, only a few reports described the pathogenicities were found. In this study, we investigated the pathogenicities focusing on the liver of BALB/c mice infected with our isolates. The bacteria were isolated from mice, and subjected to BALB/c mice (male, 5-6 weeks old) for oral infection that were confirmed by PCR detections of *Helicobacter* genes. The pathological changes of liver were examined by histologically, and liver functions were evaluated with serum analysis. The 16S rRNA gene sequences of isolates were determined as 1740 bp which contain intervening sequences and had 99.7% similarity with the type strain of *H. mastomyrinus*. After infection with the isolates at 24 weeks, no apparent features including body weight loss and shortened colon were observed. The *Helicobacter* genes were detected in 60% of liver of the infected mice and the infiltrating granulocytes and monocytes around interlobular blood vessels appeared. Compared to uninfected mice, albumin and the A/G ratios was lower in the infected mice sera, while higher levels of AST and ALT were detected. These results potentially indicate that *H. mastomyrinus* isolates translocate into liver through intestinal mucosa and portal vein even in immunocompetent mice, resulting in the inflammatory response in liver.

## P2-132

感染モデルマウスを用いた *Campylobacter jejuni* の腸管定着に対するスタチン投与の影響

○下畑 隆明<sup>1,2</sup>, 辻口 舞<sup>2</sup>, 福島 志帆<sup>2</sup>, 牧本 真奈<sup>2</sup>, 木戸 純子<sup>2</sup>, 吉本 亜由美<sup>2</sup>, 石田 快<sup>2</sup>, 上番増 喬<sup>2</sup>, 馬渡 一諭<sup>2</sup>, 高橋 章<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福井県立・海洋生物資源, <sup>2</sup>徳島大・院医歯薬学研究所・予防環境栄養)

Effect of statin treatment on *Campylobacter jejuni* colonization in mouse infection model

○Takaaki Shimohata<sup>1,2</sup>, Mai Tsujiguchi<sup>2</sup>, Shihō Fukushima<sup>2</sup>, Mana Makimoto<sup>2</sup>, Junko Kido<sup>2</sup>, Ayumi Yoshimoto<sup>2</sup>, Kai Ishida<sup>2</sup>, Takashi Uebanso<sup>2</sup>, Kazuaki Mawatari<sup>2</sup>, Akira Takahashi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Marine-Bio, Fukui Prefectural Univ., <sup>2</sup>Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch.)

**Background:** *Campylobacter jejuni* causes human food-borne disease in the world. In *C. jejuni*-infection, host cellular cholesterol-rich domain, lipid raft, is associated with bacterial internalization. Thus, cholesterol is considered a key factor in the *C. jejuni*-infection. Nevertheless, there is no experimental report that examines cholesterol participation in *C. jejuni*-infection in an experimental mouse model. Herein, we examined the effect statin administration, an inhibitor of HMGCR, to estimate participation of cholesterol in colonization of *C. jejuni* in the gastrointestinal tract.

**Method:** In this experiment, we use gnotobiotic mice with antibacterial agents, and we revealed that cholesterol and bile acid contents and distribution by LC-MS in *C. jejuni* infection model.

**Results & Discussion:** It was revealed that cholesterol level in plasma and stool was lower in *C. jejuni*-infectible mice, but the cholesterol level was recovered in *C. jejuni*-infection. In this infection, the expression level of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) was significantly upregulated in the liver. Interestingly, the administration of statin increased the colonization of *C. jejuni* in the gastrointestinal tract. Those data suggest that cholesterol supply decreased the colonization of *C. jejuni*, as opposed to the in vitro study.

## P2-133

## 歯周炎マウスモデルによる歯周炎関連大腸炎の発症メカニズムの解明

○小林 良喜<sup>1</sup>, 戸田 みゆき<sup>2</sup>, 岡田 裕之<sup>2</sup>, 泉福 英信<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日本大・松戸歯学部・感染免疫学, <sup>2</sup>日本大・松戸歯学部・組織学)

## Investigation of the mechanism of periodontitis-related colitis in a mouse model

○Ryoki Kobayashi<sup>1</sup>, Miyuki Toda<sup>2</sup>, Hiroyuki Okada<sup>2</sup>, Hidenobu Senpuku<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infec. Immuno. Sch. Dent. at Matsudo, Nihon Univ., <sup>2</sup>Dept. Hist., Sch. Dent. at Matsudo, Nihon Univ.)

We have previously reported in animal models that *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) induces periodontitis and disrupts intestinal immune responses. However, the influence of *F. nucleatum* on the intestinal environment is unknown. Here, we elucidated the effects of *F. nucleatum* on the intestinal microflora and NLR family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) and gasdermin D (GSDMD), proinflammatory cytokines involved in the induction of intestinal inflammation. Mice were inoculated orally with *F. nucleatum* once daily for 15 inoculations. Analyses were performed 1 and 30 days after the last oral inoculation. Feces and colon tissue were collected and used for enterobacterial, immunological, and histological analyses. Interestingly, a reduction in *Clostridium* spp. and IgA was noted after 30 days. The number of M1-macrophages was significantly higher in the *F. nucleatum*-challenged group. The gene expression and proteins of IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly higher in the colon on Day 30 after the last oral inoculation. In addition, NLRP3 and GSDMD were significantly elevated 30 days after the last oral inoculation. Notably, caspase-11 was significantly elevated and persisted through Day 30, as confirmed by genes and proteins. These results suggest that *F. nucleatum* induces intestinal dysbiosis and colonic inflammation by activating inflammasomes.

## P2-134

## クローン病の腸管線維化に影響を与える病原性共生菌の同定とそのメカニズム

○今井 仁<sup>1,3</sup>, 鈴木 秀和<sup>2</sup>, 西崎 泰弘<sup>1</sup>, 鎌田 信彦<sup>3</sup> (<sup>1</sup>東海・医・健康管理学, <sup>2</sup>東海大・医・消化器内科学, <sup>3</sup>米国ミシガン大学医学部消化器内科)

## Identification and mechanism of pathobiont that contribute to intestinal fibrosis in Crohn's disease

○Jin Imai<sup>1,3</sup>, Hidekazu Suzuki<sup>2</sup>, Yasuhiro Nishizaki<sup>1</sup>, Nobuhiko Kamada<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Clinical Health Science, Sch. Med., Tokai Univ., <sup>2</sup>Dept. Gastro, Sch. Med., Tokai Univ., <sup>3</sup>Dept. Gastro, Sch. Med., The Univ. of Michigan)

**【目的】** クローン病は腸管線維性狭窄が起こることが知られており、度々治療に難渋する症例が多い。ところが、線維化を誘導する原因は証明されていない。接着性侵入性大腸菌 (AIEC) は宿主腸管上皮細胞へ侵入能を有する大腸菌で、クローン病患者の回腸末端に多く定着していることが報告されている。同部位は腸管線維性狭窄の好発部位であり、AIECが腸管線維化の病態に関与していると考えた。そこで本研究は、AIECが腸管に定着することによって線維化が誘導されるのかを検討した。

**【方法】** 抗生剤処理を行った C57BL/6 マウスにヒトクローン病より分離された AIEC (LF82 株) または非病原性の大腸菌 (HS 株) を定着させる。大腸菌定着マウスにサルモネラ菌弱毒株感染投与により大腸炎を誘発し、大腸菌定着と腸管炎症・線維化の関連を検討する。大腸粘膜中の炎症性サイトカインの発現は qRT-PCR 法で、コラーゲン沈着については Sirius red 染色、コラーゲンアッセイ法を用いて検討する。マウス腸炎モデルによる IL-33/ST2 シグナルの関与は抗 ST2 抗体によるシグナル抑制により検討する。ヒト腸管上皮細胞 T84 に対して AIEC の vitro での評価を行う。

**【成績】** AIEC LF82 株を定着させたマウスではサルモネラ感染および DSS 投与により腸管線維化の増悪が認められた。AIEC の定着は、腸管上皮における IL-33 受容体 ST2 の発現を有意に誘導し、抗 ST2 抗体投与により、誘導される腸管線維化は著明に改善された。

**【結語】** AIEC は腸管粘膜への定着は IL-33/ST2 シグナルの活性化し、腸管線維化が誘導されることが示唆された。

## P2-135

### 病原真菌 *Trichosporon asahii* の病原性におけるカルシニューリン経路の役割

○松本 靖彦<sup>1</sup>, 吉川 麻美<sup>1</sup>, 長町 多恵<sup>1</sup>, 杉山 悠<sup>1</sup>, 山田 剛<sup>2,3</sup>, 杉田 隆<sup>1</sup> (1)明治薬大・微生物学, (2)帝京大・医真菌研究所, (3)帝京大・アジア国際感染症研究科)

### A critical role of calcineurin pathway in virulence of the fungal pathogen *Trichosporon asahii*

○Yasuhiko Matsumoto<sup>1</sup>, Asami Yoshikawa<sup>1</sup>, Tae Nagamachi<sup>1</sup>, Yu Sugiyama<sup>1</sup>, Tsuyoshi Yamada<sup>2,3</sup>, Takashi Sugita<sup>1</sup> (1)Dept. Microbiol., Meiji Pham. Univ., (2)Teikyo Univ. Ins. Med. Mycol., (3)ADC, Teikyo Univ.)

*Trichosporon asahii* は、環境中に広く存在する酵母、及び菌糸・分節型分生子を形成する真菌であり、好中球が減少した患者に対して重篤な感染症を引き起こす。これまでに、*T. asahii* の病原性を評価するためのカイコ感染モデルが確立されている。また、*T. asahii* の感染における分子機構を解明するための遺伝子組換え技術が開発されている。しかし、*T. asahii* の病原性に寄与する遺伝子は同定されていない。カルシニューリンは真核生物で広く保存されている脱リン酸化酵素活性を有する細胞内シグナル伝達因子である。*T. asahii* と同じ担子菌門に属する病原真菌である *Cryptococcus neoformans* において、カルシニューリンを介するシグナル伝達経路がその病原性に必要である。本研究で我々は、*T. asahii* におけるカルシニューリンの欠損株を作製し、その病原性への寄与についてカイコ感染モデルを用いて検証した。カルシニューリンは  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットで構成されるヘテロダイマーであり、それらのタンパク質をコードする *cna1* と *cnb1* 遺伝子をそれぞれ欠損させた *T. asahii* のカルシニューリン欠損株を樹立した。*cna1*、及び *cnb1* 遺伝子欠損株はどちらも細胞膜ストレスや細胞壁ストレス感受性を示し、また菌糸の形成能が低下していた。さらに、いずれの遺伝子欠損株でもカイコに対する病原性が低下していた。以上の結果は、*T. asahii* の病原性においてカルシニューリン経路が重要な役割を担うことを示唆している。

## P2-136/W8-4

### *Streptococcus* 属細菌と *H. pylori* の共感染による胃がん幹細胞の発生誘導機序

○津川 仁<sup>1</sup>, 平井 美和<sup>2</sup>, 上田 孝<sup>2</sup>, 松崎 潤太郎<sup>3</sup>, 鈴木 秀和<sup>2</sup> (1)東海大・医・生体防御, (2)東海大・医・消化器内科, (3)慶應大・薬・薬物治療学)

### Co-infection with *Streptococcus* sp. and *H. pylori* enhances the risk of gastric carcinogenesis

○Hitoshi Tsugawa<sup>1</sup>, Miwa Hirai<sup>2</sup>, Takashi Ueda<sup>2</sup>, Juntaro Matsuzaki<sup>3</sup>, Hidekazu Suzuki<sup>2</sup> (1)Div. Host Defense Mechanism., Sch. Med., Tokai Univ., (2)Div. Gastroenterol. and Hepatol., Sch. Med., Tokai Univ., (3)Div. Pharmacotherapeutics, Keio Univ. Fac. Pharmacy)

【目的】胃がんモデルマウスへ *H. pylori* を単独感染させても胃がんは発症せず、胃発がんには *H. pylori* に加えて特定の胃内細菌が要求される。そこで、胃がん患者より採取された胃液検体を用いて胃発がんに関わる胃内細菌を探索しその役割を解析した。

【方法】*Helicobacter pylori* G27 及び *cagPAI* 欠損株を使用した。マウス胃粘膜より構築した胃オルガノイドから胃上皮細胞層 Mucosoid を構築した。胃がん患者の胃液から DNA を抽出し 16SrDNA ライブラリーを構築した。

【結果】16SrDNA ライブラリー解析から、胃がん患者の胃内では非胃がん患者に比べ *Streptococcus* sp. の存在量が相対的に有意に亢進していることが明らかとなった。*Streptococcus* sp. の酪酸産生に関わる *butCoAT* 遺伝子発現は starch 存在下で大腸菌のそれに比べ有意に高く酪酸産生能の亢進が認められた。Mucosoid 及び AGS 細胞へ酪酸を添加すると CD44v9 陽性胃がん幹細胞の前駆細胞となる CAPZA1 の過剰発現が HDCA 阻害依存的に誘導された。そこで、酪酸刺激下の Mucosoid へ *H. pylori* を感染させると、CD44v9 陽性細胞が発生した。次に、AGS 細胞へ *Streptococcus* sp. の培養上清を添加すると CAPZA1 の過剰発現が誘導され、*H. pylori* の共感染により CD44v9 発現が亢進した。これらの結果から、*Streptococcus* sp. 存在下での *H. pylori* 感染が CD44v9 陽性細胞を発生させ胃発がんリスクを亢進させると考えられた。

## P2-137

### 解糖経路関連遺伝子に着目した緑膿菌の腸管上皮細胞層透過機構の解析

○佐々木のはら<sup>1</sup>, 尾島 優志<sup>1</sup>, 七條 唯人<sup>1</sup>, 中川 準也<sup>1</sup>, 末澤 千草<sup>1,2</sup>, 奥田 潤<sup>1,2</sup> (1)香川県立保健医療大院・臨床検査・微生物, (2)香川県立保健医療大院・臨床検査・微生物)

### *P. aeruginosa* glycolytic pathway-associated genes related to bacterial translocation

○Nohara Sasaki<sup>1</sup>, Hiroshi Ojima<sup>1</sup>, Yuito Shichijo<sup>1</sup>, Junya Nakagawa<sup>1</sup>, Chigusa Suezawa<sup>1,2</sup>, Jun Okuda<sup>1,2</sup> (1)Div. Microbiol., Dept. Clin. Exam., Grad. Sch. Kagawa Pref. Univ. of Health Sci., (2)Div. Microbiol., Dept. Med. Tech., Kagawa Pref. Univ. of Health Sci.)

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、栄養要求性が低く、様々な自然環境中に生息することができるグラム陰性好気性桿菌である。また本菌は、感染防御能が低下した患者や乳幼児、高齢者(易感染性宿主)において菌血症や敗血症などの病原性を示す日和見感染起因菌である。これらの病原性は、緑膿菌の感染経路の1つである腸管経由内因性血液感染(バクテリアルトランスロケーション)によって引き起こされると報告されている。

同研究室の先行研究において、緑膿菌 PAO1 株の Caco-2 細胞層透過活性に関与していると考えられる 21 種類の遺伝子を同定した。本研究では、同定された遺伝子のうち、解糖経路関連遺伝子に着目し、緑膿菌の既知の病原性への関与について解析を行った。解糖経路関連遺伝子の変異株を作製し、Caco-2 細胞層透過活性試験を行った結果、緑膿菌野生株である PAO1 と比較すると透過活性の有意な減少がみられた。一方、運動性および ExoS の分泌能への影響はみられなかった。現在、透過活性が抑制された菌株について RNA-Sequencing (RNA-Seq) による遺伝子発現量の比較、また既知の病原因子との関連性を解析中である。

## P2-138

### Fate of Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles intravenously administered to mice

○内山 大樹<sup>1,2</sup>, 山口 雄大<sup>1</sup>, 宮崎 英隆<sup>1,3</sup>, 明田 幸宏<sup>1</sup>, 中尾 龍馬<sup>1</sup> (1)国立感染症研究所・細菌第1部, (2)医科歯科大・院医歯・外科, (3)愛医大・眼形外)

○Hiroki Uchiyama<sup>1,2</sup>, Takehiro Yamaguchi<sup>1</sup>, Hidetaka Miyazaki<sup>1,3</sup>, Yukihiko Akeda<sup>1</sup>, Ryoma Nakao<sup>1</sup> (1)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect., (2)Dept. Surg., Tokyo Med. Dent. Univ. Grad Sch. Med. Dent. Sci., (3)Dept. Oculoplastic and Orbital Surg., Aichi Med. Univ.)

*Porphyromonas gingivalis* (Pg) releases several virulence factors-laden outer membrane vesicles (OMVs) into the extracellular milieu. Recent studies have shown epidemiological relationship between Pg oral infection and systemic disorders. In the present study, we aim to investigate the spatiotemporal distribution of Pg OMVs in mice. OMVs were isolated from Pg culture supernatant by filtration and ultra-centrifugation. Pg whole cells or OMVs were intravenously injected via tail vein of mice at different concentrations, and euthanized at different time points after injection. The amounts of Pg cells and OMVs in blood, brain, heart, limb, liver, lung, kidney, spleen, and pancreas were estimated by real-time PCR, based on the correlation equation between the copy numbers of 16S rRNA gene per single bacterial cell or single MV. At 48 h, Pg DNA was detected in brain of all mice injected with OMVs, but neither with the whole cells, nor in other organs. A total of  $4.1 \times 10^8$  OMVs were detected in brain 48 h after injection, when  $5.6 \times 10^{11}$  OMVs were administered. The findings suggest that brain is the only organ that accommodates Pg OMVs without being eliminated at 48 h. We propose that Pg OMVs passed the blood-brain barrier may trigger chronic inflammation-driven neurodegenerative disorders in brain and spinal cord.

**P2-139****F. nucleatum が誘導する上皮間葉転換に対するレスベラトロールの影響**

○Jie Min, 沖永 敏則, 真下 千穂, 南部 隆之, 円山 由郷 (大歯大・歯・細菌)

**Resveratrol regulates F. nucleatum-induced the epithelial-mesenchymal transition in cancer cells**

○Jie Min, Toshinori Okinaga, Chiho Mashimo, Takayuki Nambu, Hugo Maruyama (Dept. Bacteriol, Osaka Dental Univ.)

During cancer development, epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in promoting tumor cell invasion and migration. *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), an anaerobic opportunistic pathogen associated with periodontitis, has been reported to be associated with the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. Resveratrol is an essential polyphenol for plants and exhibits anti-inflammatory and anticancer properties. The objective of this study was to examine the effect of resveratrol on the tumor promoting activity of *F. nucleatum*. We evaluated the proliferation and migration ability of HSC-3 cells using the Cell Counting Kit-8 and wound healing assay. And under the microscope, HSC-3 cells co-cultured with *F. nucleatum* have changed from a paving stone, sheet-like structure to a fibroblast-like spindle shape. The expression of mesenchymal markers, including N-cadherin and snail were enhanced, while E-cadherin was decreased in Real-time RT-PCR and Western blotting, indicating that *F. nucleatum* induces migratory ability in HSC-3 cells. On the other hand, resveratrol suppressed these expressions by *F. nucleatum* in HSC-3 cells. These results suggest that resveratrol regulates *F. nucleatum*-induced cancer cell migration in vitro and that the regulatory mechanism may be mediated by the snail1 signaling pathway.

**P2-140****腸管出血性大腸菌における Toxin-antitoxin systems は遺伝子発現パターンを変化させ病原性を抑制する**

○海老原 慎也, 顔 宏哲, 戸邊 亨 (阪大院・医・生体病態情報科学)

**Toxin-Antitoxin system alters gene expression patterns and reduces virulence gene expression in EHEC**

○Shinya Ebihara, Hilo Yen, Toru Tobe (Dept. Biomedical Science., Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

Toxin-antitoxin (TA) systems are found among many bacteria, but their functions are poorly understood. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) possesses many TA systems, here we describe a novel TA system, ECs5400-5399, belonging to *relBE* family. We have previously reported that the RNase toxin gene ECs5400 suppresses growth and virulence gene expression. To understand the preference of the ECs5400 toxin, we performed transcriptome analysis. Only 298 ORFs (5.9%) had less than half the RNA amount compared to the control. Next, 298 reduced genes were classified by COG functional categories. Genes classified in C, E, F, G, and O appeared ratios higher than 1.5 compared to the whole genome, suggesting that ECs5400 selectively suppresses gene expression. Focusing on virulence genes, read counts in LEE4 and 5 were reduced. To find the target genes in these operons, the RNA fragment counts per nucleotide were examined, and a remarkable decrease in read counts was found in the coding regions of *espA* and *tir*. To examine whether *espA* and *tir* are direct targets, Toxin and *espA* or *tir* were co-expressed using a plasmid. As a result, the toxin expression markedly reduced each production, suggesting that *espA* and *tir* are direct targets of ECs5400. These results indicate that toxins selectively regulate gene expression and directly suppress some pathogenic gene expression.

**P2-141/W7-6****Co-evolution of bacteria and paired immune receptors in humans**

○平安 恒幸<sup>1</sup>, 長谷川 玄<sup>1</sup>, Yifan Li<sup>1</sup>, 荒瀬 尚<sup>2,3</sup>, 山口 雅也<sup>4</sup>, 川端 重忠<sup>5</sup>, 華山 力成<sup>1</sup> (1金沢大・先進, 2阪大・微研・免疫, 3阪大・免フロ・免疫, 4阪大・院菌・バイオインフォ, 5阪大・院菌・口腔細菌)

○Kouyuki Hirayasu<sup>1</sup>, Gen Hasegawa<sup>1</sup>, Yifan Li<sup>1</sup>, Hisashi Arase<sup>2,3</sup>, Masaya Yamaguchi<sup>4</sup>, Shigetada Kawabata<sup>5</sup>, Rikinari Hanayama<sup>1</sup> (1Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., 2Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., 3Lab. Immunochem., IFReC, Osaka Univ., 4Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 5Dept. Oral Mol. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) is an innate immune receptor family unique to primates and absent in rodents. The LILR family is composed of five activating receptors, five inhibitory receptors, and one soluble form. We and others reported that human *LILRA6* and *LILRB3*, which are paired activating and inhibitory receptors, respectively, show high levels of allelic diversity, suggesting that selective pressure such as infectious diseases has acted on the *LILRB3* and *LILRA6* genes. However, *LILRB3* and *LILRA6* ligands that could explain the biological significance of their allelic diversity have not been identified yet. To identify the *LILRB3* and *LILRA6* ligands that could serve as a selective pressure, we investigated the interaction between *LILRB3/LILRA6* and various bacteria by flow cytometry with receptor Fc-fusion proteins. Here we found that *LILRB3*\*JP5 and *LILRA6*\*JP1 alleles strongly recognized certain bacteria, whereas *LILRB3*\*JP1 and *LILRA6*\*JP4 alleles did not, suggesting that *LILRB3* and *LILRA6* recognize the bacteria in an allele-specific manner. In addition, we identified the cell wall protein as an allele-specific ligand, which was also polymorphic among the bacterial strains. Taken together, our findings suggest that mutual selective pressure has diversified not only the host *LILRB3* and *LILRA6* but also the bacterial ligand.

**P2-142/W7-8****Innate immunity to microbial pathogens**

○宮下 惇嗣<sup>1</sup>, 斎藤 優<sup>2</sup>, 藤本 ゆかり<sup>2</sup>, 新家 一男<sup>3</sup>, 関水 和久<sup>4</sup> (1帝京大・医真菌研究セ, 2慶應義塾大・理工・生体分子化学, 3産総研・細胞分子工学・最先端バイオ技術探求グループ, 4帝京大・薬・カイク創薬学)

○Atsushi Miyashita<sup>1</sup>, Yu Saito<sup>2</sup>, Yukari Fujimoto<sup>2</sup>, Kazuo Shinya<sup>3</sup>, Kazuhisa Sekimizu<sup>4</sup> (1Teikyo Univ. Inst. Med. Mycol., 2Keio Univ., 3National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 4Teikyo Univ.)

自然免疫システムは感染防御の最前線で重要な役割を果たす。最近私たちは、自然免疫システムしか持たない昆虫が、病原体接種によって後天的に個体レベルの感染抵抗性を獲得することを報告している。本発表では、食品の発酵に用いられる細菌が産生する化合物の中に、カイクに経口投与することによってカイクの緑膿菌感染死を予防する活性物質が存在することを、当該化合物の精製と構造解析の結果と共に報告する。また、当該化合物の化学合成品と同様の活性が見られ、そのときカイクの脂肪体（免疫担当組織）における自然免疫関連遺伝子の発現上昇が起きていることを、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析によって明らかにした。RNA-seq法において同定された自然免疫関連遺伝子の中に幾つかの抗菌ペプチドが含まれていた。それらの合成品の中に、感染との同時投与では治療効果が見られないが、感染の数時間前に前投与すると感染予防効果を示すものが見出された。当該抗菌ペプチドには哺乳動物における相同分子が存在し、その合成品もカイクに対して同様の感染予防効果を示した。カイクと哺乳動物で機能が保存されていた抗菌ペプチドの立体構造には共通の構造モチーフが見出された。センチニクバエやサソリに存在する抗菌ペプチドも、構造と機能（カイクに対する感染予防効果）が共通していた。また、感染予防効果を示した抗菌ペプチドを血中に投与されたカイクの血球細胞では自然免疫関連遺伝子群の発現上昇が見られた。以上の結果は、自然免疫系を刺激することによって個体レベルでの感染抵抗性もたらされ、抗菌ペプチドがサイトカインとして重要な役割を果たしていることを示唆している。

## P2-143/W7-5

### 自然免疫シグナル伝達因子 STING が制御するリソソーム分解経路の解析

○飯伏 純平, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大院・医・微生物)

#### STING (Stimulator of interferon gene) regulates lysosomal degradation pathway

○Junpei Iibushi, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

宿主の自然免疫シグナル伝達因子 STING (stimulator of interferon gene) は、細胞内に侵入した細菌やウイルスに対する自然免疫・炎症応答のシグナル伝達を担う。病原微生物の感染により細胞質に出現する環状ジヌクレオチドと結合した STING は、小胞体からゴルジ体へ細胞内局在が変化して、活性化することで IFN を誘導する。活性化 STING は、後期・リサイクリングエンドソームを経てリソソームで分解される。また STING は v-ATPase 依存的なオートファジーを誘導することで細菌やウイルスを分解することが報告されている。IFN 誘導の詳細なメカニズムについての解析は進んでいるが、STING がゴルジ体からリソソームに至る細胞内輸送経路の制御分子、およびオートファジー誘導メカニズムについての知見は少ない。そこで活性化 STING の取束および病原微生物の分解にリソソームが関与することから、STING がリソソームへの輸送経路を制御すると予測し、STING が制御する分解経路のメカニズムを明らかにすることを目的とした。STING KO 細胞に A 群レンサ球菌 (Group A streptococcus; GAS) を感染させ、細胞内侵入率・生存率を検討したところ野生型細胞と変化はなかった。しかし、オートファジーのマーカーである LC3 だけでなく、GAS 感染初期から見られる損傷膜マーカーである galectin 3 の GAS へのリクルートが STING KO 細胞で低下していた。オートファジー機能不全細胞に STING をノックダウンするとコントロールと比較して GAS の細胞内生存率が増加した。また、EGF 刺激による EGFR の分解が野生型よりも STING KO 細胞で促進していた。以上より STING はオートファジー経路とは異なるリソソーム分解経路に関与していることが示唆された。

## P2-144

### マイコバクテリア感染によって誘導されるサイトカイン産生における GRIM-19 の新規役割

○高江洲 義<sup>1,2,3</sup>, 梅村 正幸<sup>1,2,3</sup>, 松崎 吾朗<sup>1,2,3</sup> (1)琉球大・熱生研・分子感染防御, (2)琉球大・院医・生体防御, (3)琉球大・医・先端医学研究センター)

#### A novel role of GRIM-19 in cytokine production during mycobacterial infection

○Gichi Takaezu<sup>1,2,3</sup>, Masayuki Umemura<sup>1,2,3</sup>, Goro Matsuzaki<sup>1,2,3</sup> (1)Mol. Microbiol. Group, TBRC, Univ. Ryukyus, (2)Dept. Biodefense, Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, (3)Adv. Med. Res. Ctr., Faculty Med., Univ. Ryukyus)

Tuberculosis is a communicable disease caused by Mycobacterium tuberculosis (Mtb) which primarily infects macrophages and establishes intracellular parasitism. Mtb evades killing in macrophages by multiple mechanisms. An inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 $\beta$  plays an important role in the clearance of Mtb in macrophages by promoting phagosome maturation. It has been shown that a mycobacterial virulence factor, Zn<sup>2+</sup> metalloprotease 1 (Zmp1), suppresses IL-1 $\beta$  production from infected macrophages by inhibiting caspase-1. We have recently reported that GRIM-19, an essential subunit of mitochondrial respiratory chain complex I, interacts with Zmp1 and is required for IL-1 $\beta$  production in macrophages infected with mycobacteria (Kurane et al., 2022). Mechanistically, GRIM-19 is essential for the generation of mitochondrial reactive oxygen species and NLRP3-dependent activation of caspase-1. Besides its role in NLRP3 inflammasome regulation, we found that GRIM-19 is also required for optimal gene expression of inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$  and IL-6, upon mycobacterial infection of macrophages. In this meeting, we will discuss the molecular mechanisms of how GRIM-19 regulates cytokine gene expression in macrophages in response to mycobacterial infection.

## P2-145

### Cytokine-induced FBXO2 directs xenophagy against Group A Streptococcus in endothelial cells

○Min Wu, 野澤 孝志, 中川 一路 (京都大・医・微生物感染症)

○Min Wu, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dep. Microbiol., Grad Sch Med., Kyoto Univ.)

Group A Streptococcus (GAS) is a common human pathogen that causes various illnesses, and xenophagy selectively eliminates intracellular GAS. We recently reported that FBXO2, a glycoprotein-specific receptor for substrate in the SKP1/CUL1/F-box protein (SCF) ubiquitin ligase complex, mediates recognition of GAS and promotes ubiquitin-mediated xenophagy against GAS in epithelial cells. While some researchers reported that the ubiquitin-coating rate is low in endothelial cells. So we investigated the potential role of FBXO2-SCF ubiquitin ligase complex in xenophagy in endothelial cells. The expression of SKP1 and CUL1 in endothelial cells were comparable with that in epithelial cells, but FBXO2 was not detected in endothelial cells. We found that interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) increased the expression of FBXO2 and promoted xenophagic degradation of GAS in endothelial cells. Knockdown of FBXO2 diminished bacterial killing in endothelial cells only when cells were treated with IL-1 $\beta$ , indicating that IL-1 $\beta$ -induced FBXO2 is involved in the intracellular GAS degradation. Moreover, co-immunoprecipitation between FBXO2 and ATG proteins showed that FBXO2 interacts with LC3 (ATG8). Mutant of critical Lysin (K)-51 of LC3-II experimentally suggested that FBXO2 is also an autophagy receptor. Taken together, IL-1 $\beta$  activates FBXO2-mediated xenophagy in endothelial cells.

## P2-146

### Oral infection of *P. gingivalis* induces exacerbation of neurological manifestation in mice

○岡野 徳壽, 鈴木 敏彦 (東京医科歯科・医歯・細菌感染)

○Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki (Dept. Bact. Path., Infect. Host Resp., Sch Med. Dent., Tokyo Med. Dent. Univ.)

*Porphyromonas gingivalis* is a Gram-negative anaerobic bacterium that has been considered to be one of the bacteria associated with the progression of human periodontitis. Subgingival biofilms formed by bacteria, including *P. gingivalis*, induce chronic inflammation, and production of inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  or interleukin (IL)-1 $\beta$  in the gingival tissue. Previous reports have shown that the spread of inflammation arising from periodontitis or periodontitis-associated bacterial infection can induce autoimmune diseases, including RA, multiple sclerosis (MS), and ulcerative colitis; however, the critical molecular mechanisms are poorly understood. Here, we discovered *P. gingivalis* infection to oral orchestrates IL-1 $\beta$ , IL-17 production, and caspase-1 activation in the spleen contributing to exacerbation of MS in mice model in a HIF-1 $\alpha$  dependent manner.



**P2-147/W7-7**

空間的マルチオミックスで探索する結核肉芽腫における泡沫化マクロファージのバイオマーカー

○瀬戸 真太郎, 土方 美奈子, 慶長 直人 (結核研究所・生体防御部)

**Spatial mutiomics profiling characterize foamy macrophages within tuberculous granulomas**

○Shintaro Seto, Minako Hijikata, Naoto Keicho (Dept. Pathophysiol. Host Defense, RIT)

泡沫化マクロファージは結核の病原性において重要な機能を果たす。特に、結核肉芽腫において、泡沫化マクロファージは菌増殖の場であり、壊死して蓄積することによって乾酪壊死が形成される。本研究では、結核菌感染によって乾酪壊死を伴う壊死性肉芽腫を形成するC3HeB/FeJ マウスを用いて、泡沫化マクロファージで特異的に発現するタンパク質・遺伝子を空間的マルチオミックスで明らかにした。FFPE 化した壊死性肉芽腫をレーザーマイクロダイセクションによって乾酪壊死、泡沫化マクロファージ、細胞層の3画分に分画して、それぞれの画分のプロテオミクス解析、およびトランスクリプトミクス解析を行った。泡沫化マクロファージ画分において、両解析で共通して発現量が多い遺伝子は4遺伝子存在した。免疫染色によって、これらのマーカータンパク質が泡沫化マクロファージに特異的に局在することを明らかにした。また、結核肉芽腫に移動したM2マクロファージが泡沫化マクロファージに分化することも明らかにした。オミックス解析の結果から、泡沫化マクロファージ画分では、M2マクロファージに関する遺伝子群、mTORC1信号に関する遺伝子群の発現が増加することが明らかになった。以上の結果は、泡沫化マクロファージを標的とした新規診断薬、宿主治療薬開発の分子基盤形成に寄与する。

**P2-148**

腔常在乳酸桿菌から分泌される過酸化水素が腔上皮細胞に与える影響の解明

○友野 柚希奈, 田端 里帆, 嶋田 真帆, 佐藤 史歩, 加藤 真友子, 伊藤 雅洋, 岡田 信彦 (北里大・薬・微生物学)

**Impact of hydrogen peroxide secreted from lactobacilli on human vaginal epithelia**

○Yukina Tomono, Riho Tabata, Maho Shimada, Shiho Sato, Mayuko Kato, Masahiro Ito, Nobuhiko Okada (Dept. Microbiol., Sch. Pha., Kitasato Univ.)

ヒト成年期の腔内には乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) が最優勢菌として常在しており、乳酸桿菌は乳酸を産生することで病原微生物の排除に関与するなど、その存在は有益と考えられている。また、腔常在乳酸桿菌の有する代表的な特徴のひとつに過酸化水素産生能が知られているが、腔粘膜における過酸化水素濃度は低く、病原微生物に対する直接的な殺菌作用はないと考えられている。本研究では、腔常在乳酸桿菌から分泌される過酸化水素が宿主に与える影響を明らかにするため、腔上皮細胞に及ぼす影響を解析した。二次元細胞培養したヒト腔上皮不死化細胞VK2/E6E7 (VK2)、または回転壁容器を用いた細胞培養システム Rotating Wall Vessel Bioreactor (RWV Bioreactor) を用いて培養したVK2三次元培養細胞塊を過酸化水素と24時間共培養した。培養後の細胞について、RIPA buffer を用いて抽出したタンパク質についてウェスタンブロッティング、またはLysis buffer を用いて抽出したmRNAについて定量的PCRを行った。その結果、過酸化水素は腔上皮細胞に対し粘着結合関連タンパク質および抗菌ペプチド産生亢進能を有することが示唆された。以上のことから、腔常在乳酸桿菌より分泌される過酸化水素は、腔粘膜において病原性微生物の定着を防ぐさらなる環境の構築および女性生殖器官恒常性の維持に寄与すると推察された。

**P2-149**

結核感受性に関する転写因子 MafB による結核肉芽腫形成の制御

○引地 遥香<sup>1,2</sup>, 中村 創<sup>1</sup>, 瀬戸 真太郎<sup>1</sup>, 土方 美奈子<sup>1</sup>, 慶長 直人<sup>2,3</sup> (1公益財団法人 結核予防会 結核研究所・生体防御部, 2長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・基礎抗酸菌疫学, 3公益財団法人 結核予防会 結核研究所)

**MafB, a transcription factor involved in tuberculosis susceptibility, regulates granuloma formation**

○Haruka Hikichi<sup>1,2</sup>, Hajime Nakamura<sup>1</sup>, Shintaro Seto<sup>1</sup>, Minako Hijikata<sup>1</sup>, Naoto Keicho<sup>2,3</sup> (1Dept. Pathophysiology and Host Defense, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 2Dept. Basic Mycobacteriosis, Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sciences, 3The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

MAFB, v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, is a transcription factor that regulates macrophage differentiation. Since a single-nucleotide polymorphism associated with early tuberculosis (TB) onset in Thai and Japanese has been identified near the *MAFB* locus, *MAFB* is considered a candidate gene for TB susceptibility. We have demonstrated that MAFB regulates interferon pathways and metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-infected human macrophage cell line, THP-1 cells (Hikichi et al., Front Microbiol, 2022). In this study, we explored the role of MafB in TB immunity using macrophage-specific MafB knockout (MafB-cKO) mice. We infected mice with aerosolized *Mtb*. At 8 weeks post infection, the bacterial burden in the lungs of MafB-cKO mice was significantly higher than that of wild-type mice. Micro-computed tomography scans showed opacities around the bronchi, suggesting peribronchial inflammation. Histopathologically, granuloma with the unclear boundary were formed around the bronchi and alveolar walls were extensively infiltrated by cells in the lungs of MafB-cKO mice. We discuss the mRNA sequencing results of MafB-cKO mice in the context of disease progression. This study provides insights into the role of MafB in granuloma formation, leading to the development of a predictive tool for TB-onset or novel anti-TB drugs targeting host factors.

**P2-150**

腸管粘膜最近傍に局在する腸内細菌が宿主免疫機能に与える影響

○楊 佳約<sup>1,2</sup>, 尾花 望<sup>3,4,5</sup>, 中藤 学<sup>6</sup>, 野村 暢彦<sup>3,4,7</sup>, 富田 勝<sup>1,2</sup>, 福田 真嗣<sup>1,6,8</sup> (1慶大・先端生命研, 2慶大・院・政策・メディア, 3筑波大・トランスポーター医学研究センター, 4筑波大・微生物サステナビリティ研究センター, 5筑波大・医学医療系, 6神奈川産技総研, 7筑波大・生命環境系, 8メタジェン)

**Mucosal bacteria closest to gut epithelium affects host immune system**

○Jiayue Yang<sup>1,2</sup>, Nozomu Obana<sup>3,4,5</sup>, Gaku Nakato<sup>6</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>3,4,7</sup>, Masaru Tomita<sup>1,2</sup>, Shinji Fukuda<sup>1,6,8</sup> (1IAB, Keio Univ., 2Grad. Sch. Med. Gov. Keio Univ., 3TMRC, Univ. of Tsukuba, 4MICS, Univ. of Tsukuba, 5Sch. Med. & Med. Sci., Univ. of Tsukuba, 6KISTEC, 7Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, 8Metagen, Inc.)

ヒト腸管内には多種多様な腸内細菌が生息しており、それらが産生する様々な代謝物質が人体の健康に影響を与えることが報告されている。中でも腸管粘膜近傍に局在する腸内細菌の中には、宿主免疫系に影響を与える腸内細菌の存在が報告されており、粘膜近傍に局在する腸内細菌の機能理解は重要である。これまで腸管粘膜近傍細菌叢の解析は、腸管組織の回収といった侵襲的な手法が必要であったが、本研究では非侵襲的に採取可能な便に着目した。16s rRNA 遺伝子解析より、便表面細菌叢は大腸粘膜近傍細菌叢に類似しており、大腸粘膜近傍細菌叢の解析に応用できることを見出した。本手法を活用し、マウス腸管の粘膜近傍に局在する細菌を新たに発見した。当該細菌はヒト腸内にも生息するため、本研究はヒトにも応用可能である可能性が考えられる。当該細菌を大腸炎モデルマウスに経口投与すると腸炎が増悪した。大腸炎は宿主免疫の破綻で悪化することから、当該細菌は宿主の腸管免疫を介して病態に関与することが考えられる。さらに、粘膜免疫への影響を検討するため当該細菌を無菌マウスに定着させたノトパイオートマウスの腸管において、特定のT細胞の分化誘導が促進されることを明らかにした。したがって、本研究は大腸粘膜近傍細菌叢に着目し、宿主免疫機能に影響を与える腸内細菌を新たに見つけることができた。今後は分化誘導されたT細胞の性質を調べるとともに、分化誘導機構の詳細を明らかにする予定である。

## P2-151

インターロイキン-1 $\alpha$ を菌体表層に提示する乳酸菌粘膜ワクチンの構築

○加藤 徹大, 横田 健治, 五十君 静信, 梶川 揚申 (東農大・応生科・農化)

### Construction of a mucosal vaccine using lactic acid bacteria displaying interleukin-1 $\alpha$

○Tetsuhiro Katoh, Kenji Yokota, Shizunobu Igimi, Akinobu Kajikawa (Dept. Agr. Chem., Appl. Bio. Sci., Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】粘膜ワクチンは全身性免疫と粘膜免疫を誘導することができることから優れた初発感染防御効果を発揮すると考えられている。乳酸菌は安全性が高く、遺伝子組換えによって異種抗原が発現できるため、特に経口粘膜ワクチンの抗原運搬体として期待されている。しかし、一般的に経口粘膜ワクチンの免疫誘導効率は低く、免疫応答を増強するアジュバントが必要となる。我々は HIV-1 抗原エピトープ (MPER) を S-layer 内に保持する組換え *Lactobacillus acidophilus* にインターロイキン-1 (IL-1) ファミリーサイトカインを分泌させることで免疫誘導効率を改善することに成功しているが、生菌を用いる必要があることから実用化への障壁が高い。そこで本研究では、IL-1 $\alpha$  を菌体表層に提示させることで死菌体での利用が可能となる経口粘膜ワクチンの構築を目的とした。

【方法・結果・考察】成熟型マウス IL-1 $\alpha$  にアンカーを融合させたタンパク質の遺伝子をプラスミドベクターにクローニングした。このプラスミドを MPER 発現組換え *L. acidophilus* NCK2208 に導入した。Western blot で IL-1 $\alpha$  の発現を確認し、ELISA により発現量を測定した。IL-1 $\alpha$  が菌体表層に固定されていることを蛍光免疫染色による顕微鏡観察および FACS 解析により確認した。Caco-2 細胞を用いた試験により、組換え *L. acidophilus* が産生するアンカー融合 IL-1 $\alpha$  が生理活性を示すことが明らかとなったことから、経口粘膜ワクチンの候補株が構築できた。現在、マウスへの経口投与による獲得免疫誘導効率を調べている。

## P2-152

A 型ボツリヌス神経毒素に対するヒト型モノクローナル抗体の開発・解析

○山口 アキ, 松村 拓大, 小林 伸英, 阿松 翔, 藤永 由佳子 (金沢大・医・細菌学)

### Development and analysis of human monoclonal antibodies against type A botulinum neurotoxin

○Aki Yamaguchi, Takuhiro Matsumura, Nobuhide Kobayashi, Sho Amatsu, Yukako Fujinaga (Dept. Bacteriol. Grad. Sch. Med., Kanazawa Univ.)

*Clostridium botulinum* やその類縁菌によって産生されるボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、神経中毒疾患であるボツリヌス症を引き起こす。このボツリヌス症の致死率は極めて高い。BoNT は抗原性の違いから血清型 A-G の 7 種類に大別される。そのうち主に A・B・E・F 型がヒトにボツリヌス症を引き起こす。現在、本邦では本疾患に対し、ウマ抗血清が治療薬として用いられている。しかしウマ抗血清はヒトにとって異種タンパク質であるため、アナフィラキシーを引き起こす可能性もある。そこで、我々は A・B・E・F 型 BoNT に対する治療用のヒト型モノクローナル抗体セットの開発を目指している。本研究室では、B 型 BoNT (BoNT/B) に対するヒト型抗体の創出に成功しており、現在は A 型 BoNT (BoNT/A) に対するヒト型抗体の開発に着手している。候補抗体シーズとして、BoNT/A に対するヒト型抗体 4 種 (NT-523, NT-320, BT-015, BT-175) (東, 高橋, 小崎ら 特許第 5432727 号) を用いた。これらの抗体の結合特異性を ELISA で解析した結果、NT-320, BT-015, BT-175 は BoNT/A 特異的、NT-523 は非特異的な結合を示すことが明らかになった。さらにエピトープ解析に向けた BoNT/A 各ドメインの組み換えタンパク質を用いた結合活性の解析、マウスを用いた *in vivo* における中和活性の解析を行ったのでその結果を紹介する。

## P2-153/W7-1

緑膿菌感染を伴うイヌ慢性外耳炎に対するファージ療法の実施

○中村 暢宏<sup>1,2,3</sup>, 藤木 純平<sup>1</sup>, 中村 圭佑<sup>1</sup>, 酒井 俊和<sup>4</sup>, 岩崎 智仁<sup>5</sup>, 岩野 英知<sup>1</sup> (<sup>1</sup>酪農大・獣医・獣医生化学, <sup>2</sup>国立感染症研・治療薬ワクチン開発研究センター, <sup>3</sup>早大・ファージセラピー研, <sup>4</sup>酪農大・獣医・伴侶動物外科, <sup>5</sup>酪農大・食と健康・応用生化学)

### Bacteriophage Therapy against Canine Clonic External Otitis with *Pseudomonas aeruginosa* Infection

○Tomohiro Nakamura<sup>1,2,3</sup>, Jumpei Fujiki<sup>1</sup>, Keisuke Nakamura<sup>1</sup>, Toshikazu Sakai<sup>4</sup>, Tomohito Iwasaki<sup>5</sup>, Hidetomo Iwano<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Lab. Vet. Biochem., Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., <sup>2</sup>Ctr. Drug and Vaccine Dev., NIID, <sup>3</sup>Phage Therapy Inst., Waseda Univ., <sup>4</sup>Lab. Vet. Surgery, Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., <sup>5</sup>Lab. Appl. Biochem., Col. Food and Health, Rakuno Gakuen Univ.)

【背景】イヌの外耳炎は最も発生が多い疾患の 1 つであり、特に慢性外耳炎からよく分離される緑膿菌は、多剤耐性化やバイオフィーム形成によって抗菌薬治療を困難にさせている。近年、バクテリオファージを用いたファージ療法が、抗菌薬に代わる治療法として注目を集めている。そこで、従来の抗菌薬治療を行うも再発を繰り返していた緑膿菌感染を伴うイヌ慢性外耳炎に対して、日本初となるファージ療法臨床試験を実施した。

【材料・方法】被検動物の外耳道スワブより分離した緑膿菌を宿主菌とし、溶菌活性を示すファージを分離・選抜した。治療として、1 日 2 回計 21 日間、複数種のファージをカクテル化した液体を耳道内に投与した。また、治療経過ごとの病変部細菌数の推移は細菌叢解析によって評価した。さらに、治療期間中のスワブから分離された緑膿菌のゲノム解析を実施し、変異解析を行った。

【結果】治療による副作用は認められなかった。また治療過程において、ファージの溶菌作用を回避する“ファージ耐性菌”の出現が認められたものの、ファージ耐性菌を溶菌することのできるファージを新たにカクテル化して投与することで顕著に細菌数は減少し、再診時に菌は全く検出されなかった。また、治療過程において分離された緑膿菌は線毛や鞭毛の遺伝子に変異が生じており、これらが関与する緑膿菌の運動性が低下していたことが明らかとなった。

【考察】ファージ療法の実施で慢性外耳炎が完治するに至った。治療途中で検出されたファージ耐性菌は細胞接着、バイオフィーム形成に重要な線毛や鞭毛などの遺伝子に変異が認められたことから、ファージ耐性化が症状改善に寄与した可能性も示唆される。

## P2-154

*Serratia marcescens* 産生物質による抗菌作用

○三好 智博<sup>1</sup>, 大塚 千郷<sup>2</sup>, 武藤 悠<sup>3</sup>, 石原 亨<sup>3</sup>, 大崎 久美子<sup>3</sup>, 三室 仁美<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大分大・グローバル感研, <sup>2</sup>松本歯大・歯, <sup>3</sup>鳥取大・農・生命環境農)

### Antimicrobial activity of substances produced by *Serratia marcescens*

○Tomohiro Miyoshi<sup>1</sup>, Chisato Ohori<sup>2</sup>, Yu Muto<sup>3</sup>, Atsushi Ishihara<sup>3</sup>, Kumiko Osaki-Oka<sup>3</sup>, Hitomi Mimuro<sup>1</sup> (<sup>1</sup>RCGLID, Oita Univ., <sup>2</sup>Fac. Dent., Matsumoto Dent. Univ., <sup>3</sup>Fac. Agric., Tottori Univ.)

抗生物質の服用は細菌叢破綻 (菌交代症) を引き起こすことがあるため、在細菌叢に影響を与えない常病原性細菌に対して特異的に作用する薬剤の開発が必要不可欠である。本研究では、この問題を解決するために、全身疾患と密接に関連する慢性的な細菌感染症である歯周病に着目し、特定の病原性微生物にのみ作用する物質 (微生物) を探すことを目的とした。歯周病の重症度は、通常歯周ポケットの深さの測定によって決定される。この歯周ポケットの深さと口腔内プラーク中に含まれるセラチア菌の量が逆相関していることが明らかとなり (\*), 歯周病とセラチア菌の関連性が示唆されている。我々は、セラチア菌が歯周の健康に関連する細菌であると予想し、セラチア菌 (分離株) を用いて歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対する競合阻害実験を行なった。その結果、一部の *Serratia marcescens* によって、*P. gingivalis* の生育が強く阻害された。セラチア菌は、培養中に独特の香りがするため、その揮発性物質に着目して各種微生物の生育阻害実験を行なったところ、歯周病細菌である *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や、う蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* などの生育が特異的に抑制された。現在、この成分を明らかにするために GC-MS 分析によって物質を同定し、解析を進めている。(\*) Meng Shi et al., Front. Cell Infect. Microbiol., 8:124 (2018)

## P2-155

野菜から分離された *Aeribacillus pallidus* が産生する抗菌物質の性状解析

○小川 春菜<sup>1</sup>, 藤本 奈那<sup>1</sup>, 石井 菜々<sup>1</sup>, 井上 笑花<sup>1</sup>, 杉山 優希<sup>1</sup>, 有満 秀幸<sup>1,2</sup> (1兵庫県大・環境人間・微生物, 2兵庫県大・先端食科学研)

**Property of antibacterial substance produced by *Aeribacillus pallidus* isolated from vegetables**

○Haruna Ogawa<sup>1</sup>, Nana Fujimoto<sup>1</sup>, Nana Ishii<sup>1</sup>, Emika Inoue<sup>1</sup>, Yuki Sugiyama<sup>1</sup>, Hideyuki Arimitsu<sup>1,2</sup> (1Dept. Microbiol. Sch. Human Sci. Environmen., Univ. of Hyogo, 2Res. Inst. Food and Nutr. Sci., Univ. of Hyogo)

【目的】好熱菌は55℃以上の温度で増殖し、河川や土壌など環境中に存在する。病原性はほとんどないものの、高い耐熱性をもつことから、食分野においては高温で保持された食品の腐敗や変敗の原因菌となっている。我々は好熱菌の混入が土壌と接触している野菜に多く由来すると考え、野菜から好熱菌を分離している過程で抗菌性を示す細菌が分離されたため、その同定と性状の解析を試みた。

【方法】数種の野菜を普通ブイオンにて55℃で培養し、増殖した菌を普通寒天培地に塗布して分離した。菌種は16SrRNA領域の配列を解析後、Blast検索により同定した。抗菌効果の評価試料は分離菌株を2×YT培地で55℃、24時間培養後、遠心上清をろ過滅菌したものを種々の条件に曝露後に使用した。各種菌体に対する抗菌効果については、寒天拡散法による阻止円形成の有無により検証した。

【結果と考察】野菜から14種類の好熱菌が分離され、計4株分離された抗菌性を示す細菌は*Aeribacillus pallidus*と同定された。この4株の上清試料は好熱菌の*Geobacillus stearothermophilus*と*Anoxybacillus sediminis*に対して抗菌効果を認められたが、中温菌に対しては認められなかった。また抗菌効果は4株とも室温・冷蔵・冷凍で1週間は安定であったが、90℃で3時間の加熱では2株は依然安定であるのに対し、残る2株の上清の活性は失われたことから、耐熱性の異なる少なくとも2種類のバクテリオシンが存在していることが示唆された。現在この抗菌物質の精製も含め、さらなる解析を進めている。

## P2-156

パン酵母βグルカンによる *Streptococcus mutans* バイオフィルムの形成抑制効果

○山崎 亮太, 吉岡 香絵, 有吉 渉 (九州歯科大学・歯学部・感染分子生物学分野)

**β-glucan from baker's yeast inhibits *Streptococcus mutans* biofilm**

○Ryota Yamasaki, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi (Dept. Health Promotion, Kyushu Dental Univ.)

*Streptococcus mutans* is well known as a cariogenic bacterium. This strain forms strong biofilm and produce lactic acid from sucrose, thus causing dental caries. Therefore, to inhibit their biofilm formation will reduce the risk of dental caries. *S. mutans* produce insoluble α-glucan to form biofilm. Hence the key point is to inhibit this α-glucan biofilm. In this study, inhibitory effect of β-glucan from baker's yeast to *Streptococcus mutans* UA159 growth and biofilm formation was examined. To identify the effect of β-glucan, growth inhibitory effect, biofilm inhibitory effect, and lactate assay were performed. In addition, other β-glucan such as laminarin, paramylon, and curdlan were also performed their inhibitory effect. As the results, although there was no growth inhibitory effect of β-glucan from baker's yeast, biofilm inhibitory effect was shown at more than 250 μg/mL. Other β-glucan were not shown biofilm inhibitory effect at 1,000 μg/mL. As the result of lactate assay, more than 500 μg/mL of β-glucan was significantly reduced the lactate production from *S. mutans*. From these results, β-glucan from baker's yeast was not act intracellularly of *S. mutans*, but inhibited *S. mutans* biofilm by interrupting the α-glucan biofilm.

## P2-157

Isolation and characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage with a broad host range

○Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Xin-Ee Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医科大学・医学部・細菌学部門)

○Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyanaaga, Xin-Ee Tan, Tepei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) is a subgroup of *B. fragilis* that can produce a *bft* toxin. Many studies reported that ETBF is associated with inflammatory bowel diseases and colorectal cancer development. There is no technology to kill specific bacteria in the gut microbiota. Therefore, the relationship between bacteria and disease is unclear. Our lab developed a system to target bacteria using Cas13a loaded into phage capsid. This study aims to isolate and identify a phage with broad host range to develop an antimicrobial capsid that can target ETBF.

151 strains of *B. fragilis* were collected. 15 strains were *bft* gene positive using PCR. These 151 strains were used for the induction of prophage. We have optimized the induction method by observing the effect of many conditions like culture medium, OD, antibiotic concentration, time, and temperature on the induction efficiency. We have also isolated phage from our university sewage water. A total of 28 phage solutions were obtained, 22 from prophage induction and 6 are sewage isolated phages. For host infection range, 51 strains of *B. fragilis* were used, and 7 phages with 32% to 45% infection were selected. The 7 phages will be characterized by transmission electron microscopy and whole genome sequencing. These results make useful phage candidates for the construction of antimicrobial capsids to selectively kill ETBF.

## P2-158

ジャワショウガ由来成分バングレンの抗菌活性について

○瀬部 真由<sup>1</sup>, 村上 圭史<sup>1</sup>, 小林 和瑚<sup>1</sup>, 久保 美和<sup>2</sup> (1川崎医療福祉大学・臨床栄養学科, 2徳島文理大学・薬品物理化学講座)

**Antibacterial effects of the Banglene from Indonesian ginger extracts**

○Mayu Sebe<sup>1</sup>, Keiji Murakami<sup>1</sup>, Wako Kobayashi<sup>1</sup>, Miwa Kubo<sup>2</sup> (1Dept. Clinical Nutrition., Kawasaki Univ. of Med. Welfare., 2Fac. Pharmaceutical Sciences., Tokushima Bunri Univ.)

【目的】ジャワショウガはインドネシア原産植物であり、東南アジアを中心に古くから伝統薬として食されてきた。バングレンはジャワショウガの抽出成分の一つであり、これまでにヒトの脳神経細胞の産生を促す効果が報告され、機能的食品として国内ですでに市販されている。本研究では成人の罹患率が高い歯周病に着目し、バングレンの抗菌活性を検討した。

【方法】微量液体希釈法により *Streptococcus mutans*, *S. oralis* などの口腔レンサ球菌や歯周病関連菌 *Porphyromonas. gingivalis* ATCC33277 (*P.g*) などの最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。使用培地は Brain heart infusion (BHI) 培地, *P.g* には Hemin と Menadion 添加 BHI 培地を使用した。37℃で24時間, *P.g* は48時間嫌気培養後に判定した。バングレンは cis 型と trans 型を使用した。バイオフィルムは、セルデスク上に培地, *P.g*, バングレン (MIC の 1/2 濃度) を添加し, 37℃で48時間嫌気培養し, 形成させた。バイオフィルムの形成量はクリスタルバイオレット法により定量した。

【結果】バングレンの各細菌に対する MIC は, 口腔レンサ球菌などに対してはいずれも抗菌活性はほとんど認められなかった。一方, *P.g* に対しては cis 型, trans 型ともに 4 μg/ml と抗菌活性が認められた。バングレンを添加することで, コントロールと比較して, バイオフィルムの形成量は cis 型で47%, trans 型で40%低下した。

【結論】ジャワショウガ由来成分バングレンは, 常在菌であるレンサ球菌には影響を与えず, 歯周病関連菌 *P.g* に対して抗菌作用やバイオフィルム形成阻害効果を示したことから, 歯周病予防への応用の可能性が示唆された。

## P2-159

### 新規チアゾリジンジオン誘導体のカンジダに対する効果について

○村上 圭史<sup>1</sup>, 瀬部 真由<sup>1</sup>, 小林 和瑚<sup>1</sup>, 藤猪 英樹<sup>2</sup>, 中尾 允泰<sup>3</sup>, 佐野 茂樹<sup>3</sup>, 安倍 正博<sup>4</sup> (川崎医福大・医療技術・臨床栄養, <sup>2</sup>慶応大・医・生物学, <sup>3</sup>徳島大・医歯薬学・分子創薬化学, <sup>4</sup>徳島大・医歯薬学・血液・内分泌代謝内科学)

#### Effects of novel thiazolidinedione derivatives on *Candida*

○Keiji Murakami<sup>1</sup>, Mayu Sebe<sup>1</sup>, Wako Kobayashi<sup>1</sup>, Hideki Fujii<sup>2</sup>, Michiyasu Nakao<sup>3</sup>, Shigeki Sano<sup>3</sup>, Masahiro Abe<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Dept. Clinic. Nutrition, Kawasaki Univ. Med. Welfare, <sup>2</sup>Dept. Biol., Sch. Med., Keio Univ., <sup>3</sup>Dept. Mol. Med. Chem., Grad. Sch. Pharma. Sci., Tokushima Univ., <sup>4</sup>Dept. Hematol., Endocrinol. Metabol. Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】現在日本で用いられている抗真菌薬の種類は限られており、その多くは静菌的な作用しか有していないため、新規抗真菌薬の開発が期待されている。我々は、チアゾリジンジオンを基本骨格に持つ抗がん剤 SMI-4a が、*Candida albicans* に対し抗真菌活性を示すことを見出したが、活性は弱かった。そこで、新たにその誘導体を合成し、カンジダに対する効果について検討を行った。

【方法】37 種類の新規チアゾリジンジオン誘導体の *C.albicans* CAD1 株, *C. glabrata* JCM3761 株, *C.tropicalis* JCM1541 株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を、RPMI 培地を使用し測定した。殺菌試験では、サブローデキストロース培地にて  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml になるように調整した菌液に、化合物を 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加し、37°C で振盪培養した。経時的に寒天培地に生菌数を測定し、生存率を算出した。*C.albicans* バイオフィーム形成菌に対する効果については、セルデスク (住友ベークライト) を使用し、37°C で 24 時間培養することにより、バイオフィームを形成させた。その後、100  $\mu\text{g/ml}$  の化合物を添加した培地に 24 時間浸漬後、生菌数を測定した。

【結果】37 種類のチアゾリジンジオン誘導体のうち、*C.albicans* または、*C. glabrata* に対し MIC が 16  $\mu\text{g/ml}$  以下となるものが 5 種類見出された。また、殺菌試験の結果、3 種類の化合物では、50  $\mu\text{g/ml}$  で、いずれのカンジダに対しても強い殺菌効果を有していた。これらの化合物は、バイオフィーム形成菌に対しても殺菌効果を示した。

【考察】本実験結果から、新規チアゾリジンジオン誘導体は、カンジダに対する新たな抗真菌薬となる可能性が期待される。

## P2-160

### ヒト糞便検体からの放線菌の分離とその生物活性評価

○武見<sup>1</sup>, 阪口 義彦<sup>1</sup>, 菊池 雄太<sup>2</sup>, 稲橋 佑起<sup>2</sup>, 後藤 和義<sup>3</sup>, 林 俊治<sup>1</sup>, 坂本 光央<sup>4</sup>, 大宮 直木<sup>5</sup> (<sup>1</sup>北里大・医・微生物, <sup>2</sup>北里大・大村智記念研, <sup>3</sup>岡山山大・学術研究院医歯薬学・病原細菌, <sup>4</sup>理研・バイオリソース, <sup>5</sup>藤田医科大・先端光学診療)

#### Isolation of actinomycetes from human feces and evaluation of their biological activities

○Akira Take<sup>1</sup>, Yoshihiko Sakaguchi<sup>1</sup>, Yuta Kikuchi<sup>2</sup>, Yuki Inahashi<sup>2</sup>, Kazuyoshi Gotoh<sup>3</sup>, Shunji Hayashi<sup>1</sup>, Mitsuo Sakamoto<sup>4</sup>, Naoki Ohmiya<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol., Sch. Med., Kitasato Univ., <sup>2</sup>Omura Satoshi Mem. Inst., Kitasato Univ., <sup>3</sup>Dept. Bacteriol., Med. Dent. Pharm. Sci., Inst. Acad. Res., Okayama Univ., <sup>4</sup>Microbe Div., RIKEN BRC., <sup>5</sup>Dept. Adv. Endoscopy, Fujita Health Univ.)

【背景・目的】*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) は、*C. difficile* が原因で起こる下痢症・腸炎である。糞便微生物移植 (FMT) により再発予防効果のあった CDI 患者とドナーの糞便のメタゲノム解析を行ったところ、FMT 後の患者およびドナーに特定の放線菌が検出された。放線菌は、土壌や植物に広く生息しており、様々な生理活性物質を生産していることが知られている。本研究では、腸内由来の放線菌が CDI の改善に何らかの役割を担っていると考え、ヒト糞便から放線菌を分離し、種々の細菌に対して生物活性評価を行った。

【方法】糞便検体の取り扱いには、北里大学医学部倫理委員会承認を得て行った (承認番号 B19-329)。ヒト糞便検体のろ液を各種寒天培地に混釈し、27°C で 1 ヶ月間培養することで放線菌を分離した。得られた分離株は、16S rRNA 遺伝子を BLAST 解析することで菌種を推定した。糞便由来放線菌を生産培養したところ、*C. difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* およびメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 株に対してペーパーディスク法による抗菌活性試験を行った。

【結果・考察】ヒト糞便検体からは 19 株の放線菌を分離し、16S rRNA 遺伝子解析により 6 属 13 種に分類された。それぞれ分離株を 3 種類の培地に生産培養をしたところ、2 株が *C. difficile* に、2 株が MRSA に、1 株が *P. aeruginosa* に対して抗菌活性を示した。現在、活性を示した各培養液から代謝産物解析を行っている。以上から、腸内に存在する放線菌は多様な二次代謝産物の生産能を持つと考えられ、腸内において何らかの役割を担っていると推察される。

## P2-161

### 酒粕由来細菌による *Staphylococcus aureus* のバイオフィーム形成阻害

○浪平 豪, 安田 好美, 川井 真好 (姫路獨協大・薬・衛生・微生物)

#### The inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by bacteria isolated from Japanese Sake Lees

○Go Namihira, Yoshimi Yasuda, Mako Kawai (Dept. Environ. Sci. and Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Himeji Dokkyo Univ.)

【目的】*Staphylococcus aureus* はヒトの皮膚や鼻腔の常在菌であるが、敗血症や創傷部位感染などの重篤な感染症の原因菌でもある。本菌はバイオフィームを形成することが知られており、カテーテル等の医療用デバイス表面におけるバイオフィーム形成が臨床上重大な問題となっている。そこで、酒粕から分離した細菌が *S. aureus* のバイオフィーム形成に与える影響を検討したので報告する。

【方法】酒粕由来細菌は酒粕から Soybean-Casein-Digest (SCD) 寒天平板培地を用いて分離した。得られた酒粕分離菌を SCD 液体培地で培養し、その培養上清を実験に用いた。バイオフィーム形成菌として *S. aureus* ATCC12600, *S. aureus* N315, および *S. aureus* MW2 を用いた。*S. aureus* は 0.25% グルコース添加 SCD 液体培地で培養してバイオフィームを形成させた。バイオフィーム形成量は 0.1% クリスタルバイオレットで染色し、560nm における吸光度を測定した。

【結果および考察】酒粕から分離した細菌約 70 株のうち 35 株の培養上清を添加することにより、*S. aureus* ATCC12600 のバイオフィーム形成量が 30~50% 低下することがわかった。酒粕由来細菌の培養上清は *S. aureus* に抗菌活性を示さないが、バイオフィーム形成を顕著に阻害することが明らかになった。これらの酒粕由来細菌は *Lactacisbacillus* 属や *Microbacterium* 属の細菌であった。また、Methicillin-Resistant *S. aureus* である *S. aureus* N315 および *S. aureus* MW2 のバイオフィーム形成にも阻害効果が認められた。今後、本酒粕由来細菌による *S. aureus* バイオフィーム形成阻害メカニズムを明らかにしたい。

## P2-162

### ファージ由来溶菌酵素の殺菌力と作用域の調査

○山下 和可奈<sup>1,2</sup>, 小島 新二郎<sup>1</sup>, アアハエルマン アザム<sup>1</sup>, 近藤 恒平<sup>1,3</sup>, 中村 暢宏<sup>1,4</sup>, 田村 あずみ<sup>1</sup>, 渡士 幸一<sup>1</sup>, 崔 龍洙<sup>5</sup>, 常田 聡<sup>2,4</sup>, 氣 恒太郎<sup>1,4,5</sup> (国立感染症研・治ワク, <sup>2</sup>早大・先進理工・生命医科, <sup>3</sup>国立感染症研・薬剤耐性研究センター, <sup>4</sup>早大・ファージセラピー研, <sup>5</sup>自治医科大学・医学部・細菌学部門)

#### Bactericidal activity and host range of bacteriophage-derived lysins

○Wakana Yamashita<sup>1,2</sup>, Shinjiro Ojima<sup>1</sup>, Azam Aa Haeruman<sup>1</sup>, Kohei Kondo<sup>1,3</sup>, Tomohiro Nakamura<sup>1,4</sup>, Azumi Tamura<sup>1</sup>, Koichi Watashi<sup>1</sup>, Longzhu Cui<sup>5</sup>, Satoshi Tsuneda<sup>2,4</sup>, Kotaro Kiga<sup>1,4,5</sup> (<sup>1</sup>Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>3</sup>AMR Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., <sup>4</sup>Phage Therapy Inst., Waseda Univ., <sup>5</sup>Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

抗菌薬の効かない薬剤耐性菌が世界規模で蔓延している。化合物による従来の抗菌薬開発は頭打ちのため、新しい抗菌治療法が求められている。細菌を内側から強力に溶菌する「バクテリオファージ由来溶菌酵素」は、新たな抗菌剤として注目されているが、グラム陰性菌においては通常菌体外から作用させられないことから、開発はあまり進んでいない。そこで本研究では、ファージ由来溶菌酵素の殺菌力を比較し、殺菌剤として適している溶菌酵素を調査した。大腸菌ファージ由来溶菌酵素であるホリン、エンドライシン、スパニンを T1 ファージ及び T7 ファージからクローニングし、大腸菌内で発現させたところ、T1 ファージ由来のスパニンが最も大腸菌の増殖を抑制した。さらに T1 スパニンの殺菌域を接合伝達の系を利用して調べたところ、検査可能であった全ての大腸菌、肺炎桿菌を強力に殺菌することを見出した。また、一部の緑膿菌、アシネトバクターに対しても効力があることを確認した。T1 スパニンは細菌の外側から添加しても溶菌しないため、抗菌剤としてそのまま利用することはできないが、菌体内へのデリバリーシステムを利用することで強力な殺菌剤になる可能性がある。

**P2-163**

【演題取り下げ】

【Withdrawn】

**P2-165**

多剤耐性菌感染症の治療を志向した新規抗菌性ヘリカルペプチドの開発

○三澤 隆史<sup>1</sup>, 平野 元春<sup>1,2</sup>, 倉島 恵愛<sup>1</sup>, 山崎 聖司<sup>3</sup>, 西野 邦彦<sup>3</sup>, 出水 庸介<sup>1,2</sup> (1国立医薬品食品衛生研究所, 2横浜市大院生命医科学, 3大阪大学産研)**Development of antimicrobial peptides for the treatment of multi-drug resistant bacteria infection**○Takashi Misawa<sup>1</sup>, Motoharu Hirano<sup>1,2</sup>, Megumi Kurashima<sup>1</sup>, Seiji Yamasaki<sup>3</sup>, Kunihiko Nishino<sup>3</sup>, Yosuke Demizu<sup>1,2</sup> (1National Institute of Health Sciences, 2Yokohama City Univ., 3Osaka Univ.)

近年、抗菌薬の長期使用や不適切な使用により、従来の抗菌薬に対する耐性を獲得した薬剤耐性菌の出現が臨床現場において大きな問題となっている。そのため、多剤耐性菌感染症に対する治療法の確立を目指した、新規メカニズムに基づく抗菌薬の開発が求められている。その中で、新たな抗菌薬として抗菌ペプチド (Antimicrobial Peptides; AMPs) が注目を集めている。AMPsの抗菌活性発現には、1) 安定な二次構造の形成と2) カチオン性及び疎水性残基が空間的に分離して配置された両親媒性が重要である。当研究室ではこれまでに、既知のAMPsである Magainin 2 の発生中心配列の探索およびその構造展開を行い、顕著な溶血性を示すことなく多剤耐性菌緑膿菌を含む種々の細菌に対し強い抗菌活性を示す **17KKV** を見出している (M. Hirano, T. Misawa et al., *ChemMedChem*. 2019, 14, 1911-1916)。本研究では、**17KKV** をリードとして、ペプチドのヘリカル構造制御およびカチオン性アミノ酸の検討を行うことにより、AMPsのさらなる高活性化を目指した。合成したペプチドについて、CD スペクトルを用いた二次構造やグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対する抗菌活性評価、ヒト赤血球細胞に対する溶血活性評価を行った。さらには、臨床分離株である多剤耐性緑膿菌数種に対する有効性を同様に検討した。本発表では、それらの詳細について報告する。

**P2-164**

Lysocin E targeting menaquinone is a promising lead compound for anti-tuberculosis drugs

Gebremichal Gebretsadik<sup>1</sup>, 稲泉 茜<sup>1</sup>, 西山 晃史<sup>1</sup>, 山口 雄大<sup>1</sup>, 浜本 洋<sup>2</sup>, 田丸 亜貴<sup>3</sup>, 早津 学<sup>4</sup>, Amina Shaban<sup>1</sup>, ○尾関 百合子<sup>1</sup>, 松本 壮吉<sup>1</sup> (1新潟大・院医・細菌学, 2帝京大・医学真菌センター, 3大阪健康安全基盤研究所・微生物部, 4新潟大・院医・解剖学)Gebretsadik Gebremichal<sup>1</sup>, Akane Inaizumi<sup>1</sup>, Akihito Nishiyama<sup>1</sup>, Takehiro Yamaguchi<sup>1</sup>, Hiroshi Hamamoto<sup>2</sup>, Aki Tamaru<sup>3</sup>, Manabu Hayatsu<sup>4</sup>, Amina Shaban<sup>1</sup>, ○Yuriko Ozeki<sup>1</sup>, Sohkiichi Matsumoto<sup>1</sup> (1Dept. Bacteriology, Niigata Univ. Sch. Med., 2Institute of Medical Mycology, Teikyo Univ., 3Dept. Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 4Div. Microscopic Anatomy, Niigata Univ. Sch. Med.)

There is an urgent need to develop new anti-tuberculosis drugs with novel modes of action to cure drug-resistant tuberculosis and shorten the chemotherapy period by sterilizing tissues infected with dormant bacteria. Lysocin E is an antibiotic that showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* by binding to its menaquinone (commonly known as Vitamin K2). This study aims to evaluate the anti-tuberculosis activities of lysocin E and decipher its mode of action. We show that lysocin E has high in vitro activity against both drug-susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* var. *tuberculosis* (Mtb), and dormant mycobacteria. Lysocin E is likely bound to menaquinone causing Mtb membrane disruption, inhibition of oxygen consumption and ATP synthesis. Thus, we have concluded that the high anti-tuberculosis activity of lysocin E is attributed to its synergistic effect of membrane disruption and respiratory inhibition. The efficacy of lysocin E against intracellular Mtb in macrophages was lower compared to its potent activity against Mtb in culture medium, probably due to its low ability to penetrate cells, but its efficacy in mice was still superior to that of streptomycin. Our findings indicate that lysocin E is a promising lead compound for the development of a new tuberculosis drug.

**P2-166/W7-2**大腸菌 ST131 における *mcr-1* 保有プラスミドの獲得による病原性減弱機構○佐藤 豊孝<sup>1,2</sup>, 山本 聡<sup>2</sup>, 小笠原 徳子<sup>2</sup>, 白井 優<sup>3</sup>, 長野 則之<sup>4</sup>, 土井 洋平<sup>5</sup>, 堀内 基広<sup>1</sup>, 高橋 聡<sup>2</sup>, 横田 伸一<sup>2</sup>, 田村 豊<sup>3</sup> (1北大・獣医・獣医衛生/国際感染症/ワンヘルスリサーチセンター, 2札幌大・医・微生物/感染制御部, 3酪農大・獣医・食品衛生, 4信州大・大学院・総合理工学, 5藤田医・微生物学・感染症科)**Virulent attenuation mechanism by acquisition of *mcr-1*-harboring plasmid into *Escherichia coli* ST131**○Toyotaka Sato<sup>1,2</sup>, Soh Yamamoto<sup>2</sup>, Noriko Ogasawara<sup>2</sup>, Masaru Usui<sup>3</sup>, Noriyuki Nagano<sup>4</sup>, Yohei Doi<sup>5</sup>, Motohiro Horiuchi<sup>1</sup>, Satoshi Takahashi<sup>2</sup>, Shin-ichi Yokota<sup>2</sup>, Yutaka Tamura<sup>3</sup> (1Lab. Vet. Hygiene/Infect. Dis./One Health Res. Cent., Hokkaido Univ., 2Dept. Microb./Sch. Med., Sapporo Univ., 3Lab. Food Microb./Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., 4Dept. Med. Sci., Grad. Sch. Med., Shinshu Univ., 5Depart. Microb. and Infect. Dis., Sch. Med., Fujita Health Univ.)

Colistin is a last-line drug against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. The spread of plasmid-mediated colistin resistance genes (*mcr*) among Enterobacteriales is a worldwide concern. In this study, the virulent of an international high-risk fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clone, ST131, by acquisition of colistin resistance determinants, chromosomal (*pmrAB*) mutations or *mcr* (*mcr-1*, *mcr-3*, and *mcr-5*)-harboring plasmids, and their therapeutic effects of colistin were evaluated in murine infection model. We found that acquisition of some *mcr*-harboring plasmids (IncI2\_ *mcr-1* and IncP1\_ *mcr-3*) attenuated the virulence (prolonged the survival and reduced the viable bacterial number in abdominal cavity and liver) in mice, whereas *pmrB* mutations exhibited similar virulence with the parent strain, and lower efficacy of the colistin treatment. RNA-Seq analysis revealed that IncI2\_ *mcr-1* plasmid significantly altered the gene expressions of ST131, and this alteration was largely accompanied by the presence of two hypothetical proteins-encoding genes located on the plasmid. Therefore, this study demonstrated that potential risk of the virulence and efficacy of colistin treatment was depend on the resistance determinant but associated with non-*mcr* contributonal factors located on the plasmids.

## P2-167/W7-3

多剤耐性菌による難治性尿路感染症治療に向けた新規アプローチの初期検討

○星子 裕貴<sup>1</sup>, 山本 武司<sup>1</sup>, 奥野 未来<sup>1</sup>, 前田 憲成<sup>2</sup>, 小椋 義俊<sup>1</sup> (1久留米大・医・感染医学, 2九工大・院生命体・環境共生工学)

### A novel approach to the treatment of urinary tract infections caused by multidrug-resistant bacteria

○Yuki Hoshiko<sup>1</sup>, Takeshi Yamamoto<sup>1</sup>, Miki Okuno<sup>1</sup>, Toshinari Maeda<sup>2</sup>, Yoshitoshi Ogura<sup>1</sup> (1Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med., 2Dept. Biol. Func. Eng., Grad. Sch. Life Sci. Sys. Eng., Kyutech)

様々な感染症で薬剤耐性菌が深刻な問題となっている。特に尿路感染症 (UTI) においては起病菌の約 8 割が複数の抗菌薬耐性を有するとされている。多剤耐性菌の治療法として、ファージセラピーが検討されているが、狭い宿主域、低拡散性、高率な耐性菌出現などの問題点も多く、適応は限定的である。そこで、我々は薬剤耐性菌による難治性 UTI の新規治療法として、「細菌を食べる細菌」である細菌捕食性細菌に注目した。細菌捕食性細菌の一種である *Bdellovibrio bacteriovorus* は、広範な種のグラム陰性桿菌を捕食する。また、運動能力が高く拡散性に優れており、物理的に宿主細胞内に侵入することから耐性菌が出現しにくいと予想される。細菌宿主不在では速やかに死滅し、真核生物は宿主としないことから安全性も高い。本研究では、細菌捕食性細菌の臨床応用を目指して、UTI の代表的な起病菌である尿路感染性大腸菌 (UPEC) に対する捕食能の検討と高捕食能を有する新たな細菌捕食性細菌の探索を行った。まず初めに、UPEC 臨床分離株 15 株に対する捕食能の評価を行った。その結果、標準株 *B. bacteriovorus* 109J 株は UPEC 臨床分離株の系統を問わず、捕食可能であることがわかった。次に、高捕食能を有する細菌捕食性細菌の探索を行うために、河川などの水系環境中より単離を試みた。その結果、109J 株とは明らかに異なるプラークを形成する細菌捕食性細菌を分離することができた。一部の分離株を 16S rRNA 遺伝子配列を決定して菌種同定を行ったところ、*B. bacteriovorus* であることがわかった。今後は、UPEC 臨床分離株に対する分離株の捕食能を比較することで、難治性 UTI に対する有用株を選定する予定である。

## P2-168/W7-4

緑膿菌バイオフィームにおける SOS 応答を介した抗生物質耐性メカニズム

○鶴木 海緒<sup>1</sup>, 矢野 真弓<sup>2</sup>, 伊澤 徹<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>3,4</sup>, 豊福 雅典<sup>3,4</sup> (1筑波大・生命環境・生物資源, 2筑波大院・生命地球科学, 3筑波大・生命環境系, 4筑波大学・微生物サスティナビリティ研究センター)

### SOS response leads to antibiotic persistence in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

○Mio Unoki<sup>1</sup>, Mayumi Yano<sup>2</sup>, Toru Isawa<sup>2</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>3,4</sup>, Masanori Toyofuku<sup>3,4</sup> (1Coll. Agro-Biol. Resour. Sci., Sch. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 4MICS, Univ., Tsukuba)

多くの細菌は実環境中で、細胞と細胞外マトリクスからなるバイオフィーム (BF) を形成する。これまで、BF 内部では多様な表現型の細胞や突然変異株が存在することが報告されている。これらは、近年問題視される抗生物質耐性細菌の出現との関連性が予想される。抗生物質耐性は、DNA 修復を司る SOS 応答との関連が報告されている一方で、BF 中における SOS 応答の誘導が示唆されている。しかし、BF 内における実際の SOS 応答の空間的解析や、細胞の不均一性との関連について、一細胞レベルでの検証はほとんど行われていない。そこで、本研究では BF 内部における SOS 応答の分布及びそれに起因する表現型の変化を解析することを目的とした。SOS 応答は RecA タンパク質により制御されているため、BF 研究のモデル細菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 株に SOS 応答のマーカーとして *recA* プロモーターレポーターを導入した株を用い、BF 内部の *recA* 高発現細胞を検出した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、*recA* 高発現細胞は BF 全体の細胞が一様に誘導されるのではなく、一部の細胞のみ誘導されるのが観察された。BF 由来の細胞に抗生物質を曝露したところ、パーシスターと推定される細胞が検出された。そこで、フローサイトメーターを用いて BF から *recA* 高発現細胞を分取し、抗生物質感受性を検証したところ、*recA* 高発現細胞特異的な抗生物質耐性が確認された。本研究は、バイオフィーム内部の SOS 応答を解析することにより、抗生物質耐性の出現経路について新たな知見が得られることが期待される。

## P2-169

福岡県で分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌のゲノム解析

○カール 由起, 重村 洋明, 上田 紗織, 片宗 千春, 江藤 良樹, 芦塚 由紀 (福岡県保健環境研究所)

### Whole-genomic analysis of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Fukuoka

○Yuki Carle, Hiroaki Shigemura, Saori Ueda, Chiharu Katamune, Yoshiki Etoh, Yuki Ashizuka (Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences)

【目的】感染症発生病動向調査に基づき、福岡県では、県内で発生したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の患者に由来するカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (CPE) 株を収集している。その中で、同一菌種でカルバペネマーゼ遺伝子 (*bla<sub>carba</sub>*) 亜型が一致する CPE が長期に渡って散発的に分離される医療機関があり、同一 (類似) クローンによる CPE 感染症の可能性が考えられた。本研究は、福岡県内で収集された CPE の遺伝学的特徴を明らかにするとともに、同一 (類似) クローンによる感染症が起きているかを確認することを目的とした。

【方法】2017~2021 年に福岡県内の医療機関 9 施設から収集した CPE 株 (30 株) を対象に次世代シーケンサー (illumina Miseq) を用いてゲノム解析を行い、菌種、菌の遺伝子型 (ST)、薬剤耐性遺伝子及び病原性遺伝子を決定した。

【結果・考察】CPE 保有 *bla<sub>carba</sub>* 亜型は、*bla<sub>IMP-1</sub>* 27 株、*bla<sub>IMP-6</sub>* 2 株、*bla<sub>GES-24</sub>* 1 株であり、同一亜型の CPE が 2 株以上検出された医療機関は 4 施設あった。そのうち菌種、菌の遺伝子型 (ST)、薬剤耐性遺伝子及び病原性遺伝子が完全一致する *bla<sub>IMP-1</sub>* 保有 CPE を 2 施設 (医療機関 A : *Klebsiella oxytoca* ST40 2 株, 医療機関 B : *K. pneumoniae* ST11 4 株) で認め、これら CPE の分離期間は、*bla<sub>IMP-1</sub>* 保有 *K. oxytoca* ST40 が 2020 年 8 月~2021 年 8 月、*bla<sub>IMP-1</sub>* 保有 *K. pneumoniae* ST11 が 2019 年 4 月~2020 年 10 月と長期に渡っていた。これらのことから、同一 (類似) クローンの CPE による感染症が一部の医療機関で起きている可能性が示唆された。引き続き同一 (類似) クローンと疑われる CPE による感染症の発生病動向を注視していく必要がある。

## P2-170

*Mycoplasma bovis* におけるフルオロキノロンの薬剤感受性と耐性遺伝子の推移について

○高橋 直之, 高橋 紗野香 (全国農業協同組合連合会・家畜衛生研究所)

### Changes in antimicrobial susceptibility and resistance gene of *Mycoplasma bovis* to fluoroquinolones

○Naoyuki Takahashi, Sayaka Takahashi (National Federation of Agricultural Co-operative Associations)

**Introduction:** *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) is a causative agent of bronchopneumonia, mastitis, and it has led much economic loss. Control of *M. bovis* relies on early diagnosis and antimicrobial treatment. Fluoroquinolones (FQ) are one of the most effective antimicrobial agents against *M. bovis*, but their increasing use has raised concerns about resistance. Therefore, we examined changes over time in antimicrobial susceptibility and resistance genes to FQ.

**Methods:** A total of 127 *M. bovis* strains isolated in Japan between 2008 and 2016 were tested for susceptibility to FQ. Susceptibility to FQ was tested using a microbroth dilution method to determine the minimal inhibitory concentrations (MICs). The quinolone resistance region (QRDR) of *gyrA* and *parC* were also subjected to full genome sequencing using Miseq for amino acid mutations.

**Result:** There was no change in the MIC50 of FQ, but the MIC90 increased from 2 µg/mL to 32 µg/mL after 2015. This suggests that strains with high MICs are emerging and becoming resistant to FQ. The percentage of strains with mutations in *gyrA* or *parC* amino acids increased from 56.2% to 72.4% after 2015. In addition, strains with amino acid mutations were identified that differed from the previously reported mutations. These results confirm that *M. bovis* is becoming more resistant to FQ and that QRDR mutations are also diversifying.

## P2-171

The effect of *mfpA* encoding PRP on the MICs of Levofloxacin in *M. avium* clinical isolates from Japan

○Mwangala Akapelwa<sup>1</sup>, 会津・大内 勇樹<sup>1</sup>, Joseph Yamweka Chizimu<sup>1</sup>, Thoko Flav Kapalamula<sup>1</sup>, Conscilliah Rhombohl Menda<sup>3</sup>, Yukiko Nishiuchi<sup>4</sup>, 鈴木 定彦<sup>1,2</sup>, 中島 千絵<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所, <sup>2</sup>北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所, <sup>3</sup>Ministry of Health, Papua New Guinea, <sup>4</sup>大阪大学刀根山結核研究所)

○Mwangala Akapelwa<sup>1</sup>, Yuki Aizu-Ouchi<sup>1</sup>, Joseph Yamweka Chizimu<sup>1</sup>, Thoko Flav Kapalamula<sup>1</sup>, Conscilliah Rhombohl Menda<sup>3</sup>, Yukiko Nishiuchi<sup>4</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1,2</sup>, Chie Nakajima<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Div. Biores., Intl. Inst. for Zoonosis Ctrl., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>International Collaboration Unit, Hokkaido Univ., International Institute for Zoonosis Control, <sup>3</sup>Ministry of Health, Papua New Guinea, <sup>4</sup>Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City Univ. Sch. Medicine)

Fluoroquinolones are often considered an alternative therapy for *Mycobacterium avium* infections. Recently, *MfpA* has been implicated in FQ resistance in *M. tuberculosis*, however, its role in *M. avium* has not been elucidated. To investigate the role of *MfpA* in levofloxacin resistance, MIC determination and screening of *mfpA*, *gyrA*, *gyrB*, and *mfpB* was conducted in 84 *M. avium* clinical isolates from Japan. Levofloxacin resistance was observed in sixty-four isolates (76.2%) while twenty isolates 23.8% were susceptible. No resistance-conferring mutations were observed in *gyrA*, *gyrB*, and *mfpB*, however, a frameshift mutation in *mfpA* was found in a third of our isolates [30/88, 34%] while the rest of the isolates retained an intact gene [66%, 58/88]. The MIC results showed a strong association between the intact *mfpA* and levofloxacin resistance (*p*-value <0.001). To facilitate rapid differentiation of these *mfpA* genotypes, a multiplex PCR was developed and successfully employed in this study. These findings revealed the potential of *mfpA* to impact the bactericidal activity of FQs in *M. avium*, therefore, the detection of *mfpA* could be helpful in the selection of optimal treatment regimens for the management of macrolide-resistant infections.

## P2-172

## 口腔から分離されたセファロsporin/カルバペネム耐性グラム陰性耐性菌に対する消毒剤感受性

○春田 梓<sup>1,2</sup>, 松尾 美樹<sup>2,3</sup>, 吉川 峰加<sup>1</sup>, 竹内 真帆<sup>1</sup>, Mi Le Nguyen Tra<sup>2,3</sup>, 菅原 庸<sup>3,4</sup>, 梶原 俊毅<sup>3,4</sup>, 大毛 宏喜<sup>3,5</sup>, 津賀 一弘<sup>1</sup>, 小松澤 均<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>広島大・医系科学研究科・先端歯科補綴学, <sup>2</sup>広島大・医系科学研究科・細菌学, <sup>3</sup>広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, <sup>4</sup>国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター, <sup>5</sup>広島病院・感染症科)

## Disinfectant Susceptibility of Oral Cephalosporin/Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria

○Azusa Haruta<sup>1,2</sup>, Miki Kawada-Matsuo<sup>2,3</sup>, Mineka Yoshikawa<sup>1</sup>, Maho Takeuchi<sup>1</sup>, Mi Le Nguyen Tra<sup>2,3</sup>, You Sugawara<sup>3,4</sup>, Toshiki Kajihara<sup>3,4</sup>, Hiroki Ohge<sup>3,5</sup>, Kazuhiro Tsuga<sup>1</sup>, Hitoshi Komatsuzawa<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Advanced Prosthodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>Project Research Ctr., Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., <sup>4</sup>Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Institute of Infectious Diseases, <sup>5</sup>Dept. Infect. Dis., Hiroshima Univ. Hosp.)

我々は以前、長期療養施設 (LTCF) の入居者の口腔内から第三世代セファロsporin耐性グラム陰性菌を分離したことを報告している。口腔内では消毒剤がよく使用されるため、口腔内細菌の消毒剤感受性を調べることは重要である。本研究の目的は、口腔グラム陰性耐性菌 (GN-ARB) の出現傾向および抗菌薬と消毒剤耐性の関連性を明らかにすることである。

LTCF 入居者の口腔内から分離した *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* などの GN-ARB の Povidone-iodine (PVPI), Cetylpyridinium chloride (CPC), Benzalkonium chloride (BZK) および Chlorhexidine chloride (CHX) に対する感受性を評価した。口腔と便分離株の感受性を比較するために、同じ消毒剤に対する便分離株の感受性を評価した。全ゲノム解析を用いて消毒剤感受性と消毒剤耐性遺伝子の関連性を検討した。消毒剤耐性 GN-ARB と臨床情報の相関を検討した。

178 名の入居者のうち 38 名から口腔 GN-ARB が分離された。口腔 GN-ARB では、PVPI の最小発育阻止濃度 (MIC) は分離株間ではほぼ同じ値を示したが、CPC, BZK, CHX の MIC は菌種・株間で大きなばらつきがあった。特に、*Pseudomonas aeruginosa* は CPC, BZK に対して高い耐性を示した。便 GN-ARB の消毒剤感受性は、口腔 GN-ARB と同様の傾向を示した。*P. aeruginosa* では *qacEΔ1* の存在と CPC/BZK 耐性の相関を認めたが、他菌種では相関を認めなかった。多変量解析により、口腔の CPC 耐性菌の存在と経管栄養の相関が示された。本研究より、一部の口腔 GN-ARB は抗菌薬だけでなく消毒剤にも耐性を示すことが明らかとなった。(研究共同者 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター 菅井基之, 矢原耕史, 野野祥子)

## P2-173

## 多剤耐性のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する紅蔘エキスの抗菌作用

○髙本 さくら<sup>1</sup>, 寒川 慶<sup>2</sup>, 岩尾 洋<sup>1</sup>, 堀口 安彦<sup>3</sup>, 岡 真優子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都府立大院・生命環境・食環境安全性, <sup>2</sup>大阪公立大院・医・分子病態薬理, <sup>3</sup>大阪大学・微研・分子細菌)

## Antimicrobial activity of Red ginseng extracts against multidrug-resistant MRSA

○Sakura Tsutomoto<sup>1</sup>, Keiichi Samukawa<sup>2</sup>, Hiroshi Iwao<sup>1</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>3</sup>, Mayuko Osada-Oka<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Food. Hyg. Env. Health, Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Pharm., Osaka Metropolitan Univ., Grad. Sch. Med., <sup>3</sup>Dept. Mo. Bacteriol., RIMD, Osaka Univ.)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、薬剤耐性菌感染症における新規患者の約 95% を占めており、新たな MRSA 治療薬が必要とされている。近年、新規抗菌薬には、耐性菌出現率の高い抗生物質とは異なる作用点をもつ化合物が探索されてきた。我々は、高麗人蔘を蒸して乾燥させた紅蔘の抽出エキス (Red ginseng extracts; RGE) による抗菌薬感受性の増強作用を見いだした。MRSA4 株に対して、RGE は濃度依存的に β-lactam 系と aminoglycoside 系抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を 1/2-1/32 に低下させた。RGE は、配糖体の異なる 30 種類以上のサポニン (ジンセノシド) を含んでいることから、HPLC で分離した 4 種類のジンセノシド類について検討した結果、ジンセノシド Rg3 に抗菌薬感受性増強作用を確認した。一方、他の 3 つのジンセノシド類には全く抗 MRSA 作用はなかった。そこで、ジンセノシド Rg3 の作用点を明らかにするため、MRSA の oxacillin 感受性増強作用が報告されている非イオン性界面活性剤 Triton X-100 と比較検討した。Triton X-100 は、濃度依存的に 9 種類の抗菌薬の MIC を低下させ、臨界ミセル濃度 (0.013-0.015%) 以下の 0.01% Triton X-100 により、各抗菌薬の MIC は 1/2-1/256 に低下した。しかし、Triton X-100 の抗 MRSA 作用には、特異性がなく、RGE が作用しない fosfomycin, tetracycline, および erythromycin の MIC は Triton X-100 により低下した。また、RGE は Triton X-100 のもつ膜溶解作用を示さなかった。以上の結果から、ジンセノシド Rg3 は、Triton X-100 と異なる作用機序で MRSA の抗菌薬感受性を増強させる可能性を考える。

## P2-174

Gain of resistance to bedaquiline by overexpression of trypanosomal ASCT in *Mycobacterium smegmatis*

○グロリア ブンデュティディ<sup>1</sup>, Yuri Ando<sup>2</sup>, Yuichi Matsuo<sup>3</sup>, Mizuki Hayashishita<sup>1</sup>, Gregory M. Cook<sup>4</sup>, Takaya Sakura<sup>1</sup>, Shinjiro Hamano<sup>1</sup>, Kenji Hirayama<sup>1</sup>, Kiyoshi Kita<sup>1,5</sup>, Daniel K. Inaoka<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Oita Univ., <sup>3</sup>Kumamoto Univ., <sup>4</sup>Univ. of Otago, <sup>5</sup>The Univ. of Tokyo)

○Bundutidi M. Gloria<sup>1</sup>, Yuri Ando<sup>2</sup>, Yuichi Matsuo<sup>3</sup>, Mizuki Hayashishita<sup>1</sup>, Gregory M. Cook<sup>4</sup>, Takaya Sakura<sup>1</sup>, Shinjiro Hamano<sup>1</sup>, Kenji Hirayama<sup>1</sup>, Kiyoshi Kita<sup>1,5</sup>, Daniel K. Inaoka<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Oita Univ., <sup>3</sup>Kumamoto Univ., <sup>4</sup>Univ. of Otago, <sup>5</sup>The Univ. of Tokyo)

Although Bedaquiline (BDQ), a potent inhibitor of mycobacterial ATP synthase, displays an excellent bactericidal effect, it is still unclear whether its mechanism of action (MoA) is caused by (i) ATP depletion, (ii) disruption of electrochemical gradient homeostasis, or (iii) its uncoupling effect. The acetate:succinate CoA transferase/succinyl-CoA synthetase (ASCT/SCS) cycle is an important source of ATP in trypanosomes which function independently to the electrochemical gradient, and produces ATP at higher rates than bacterial ATP synthase. In *T. brucei*, an active ASCT/SCS cycle results in resistance to oligomycin A, an inhibitor of ATP synthase. To deepen our understanding of MoA of BDQ, we have engineered an alternative ATP synthesis pathway in *M. smegmatis* which was achieved by overexpression of trypanosomal ASCT. We found that overexpression of ASCT resulted in *M. smegmatis* resistant to BDQ, shifting the IC50 in exposure time-dependent manner. *M. smegmatis* grown in different carbon sources showed a higher rescue rate in glycerol media compared to other carbon sources. We provide evidence that the reduction of intracellular ATP is the primary MoA of BDQ and not the disruption of electrochemical gradient homeostasis or its uncoupling effect. Moreover, this system can be exploited for identification of next-generation *Mycobacterium* ATP synthase-specific inhibitors.

## P2-175

ベトナムにおける淡水魚類の腸管内容物から分離したエロモナス属菌の解析

○山口 貴弘<sup>1</sup>, 陳内 理生<sup>2</sup>, 長谷 篤<sup>3</sup>, 久米田 裕子<sup>4</sup>, 中山 達哉<sup>5</sup> (<sup>1</sup>大安研・微生物部, <sup>2</sup>神奈川衛研・微生物部, <sup>3</sup>徳塚山大・現代生活, <sup>4</sup>府大・微生物制御セ, <sup>5</sup>広大・総合生命)

### Analysis of *Aeromonas* ssp. isolated from gut contents of freshwater fish in Vietnam

○Takahiro Yamaguchi<sup>1</sup>, Michio Jinnai<sup>2</sup>, Atsushi Hase<sup>3</sup>, Yuko Kumeda<sup>4</sup>, Tatsuya Nakayama<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, <sup>2</sup>Div. Microbiol., Kanagawa pref. Inst. Public Health, <sup>3</sup>Fac. Contemporary Human Life Sci., Tezukayama Univ., <sup>4</sup>Res. Center for Micro. Control, Osaka Pref. Univ., <sup>5</sup>Grad. Sch. Int. Sci. for Life, Hiroshima Univ.)

2020年にベトナム・ホーチミン市で市販されていた淡水魚80検体の腸管内容物から、エロモナスアガーに抗菌薬(セフトキシム(CTX), メロペネム(MEM))を添加した培地を用いて、基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)もしくはカルバペネマーゼ産生エロモナス属菌の分離を試みた。その結果、CTX, MEMを含有したエロモナスアガーからそれぞれ44株および24株の計68株のエロモナス属菌を分離した。68株のうちESBL遺伝子(*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>)を保有する株は24株、カルバペネマーゼ遺伝子である*bla*<sub>NDM-1</sub>を保有する株は7株であった。CTX含有培地から検出されたのはESBL遺伝子保有株24株、*bla*<sub>NDM-1</sub>保有株6株、MEM含有培地から検出されたのは*bla*<sub>NDM-1</sub>保有株1株であった。また*bla*<sub>NDM-1</sub>を保有するエロモナス属菌は7株中2株が同一検体由来であり、80検体中6検体(7.5%)から検出された。これら7株について次世代シーケンスによりゲノム配列を決定したところ、すべて染色体上に*bla*<sub>NDM-1</sub>に保有することが明らかとなった。本発表では染色体上の*bla*<sub>NDM-1</sub>の周辺領域のゲノム解析結果についても報告する。本研究結果から、ベトナムで市販されている魚類からヒトで問題となっているESBL遺伝子およびカルバペネマーゼ遺伝子を保有するエロモナス属菌が検出された。これらが薬剤耐性遺伝子のリザーバーとなり、水産業とヒト社会の間で、薬剤耐性遺伝子の循環に他の腸内細菌目細菌などに加えてエロモナス属菌も関与している可能性が示唆された。

## P2-176

メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤のハイスループットスクリーニングによる探索

○温 麗萍, 小野 勝彦, 張 田力, 豊元 柊弥, 津々木 博康, 澤 智裕 (熊本大・生命科学・微生物)

### High throughput screening of metallo-β-lactamase inhibitors

○Liping Wen, Katsuhiko Ono, Tianli Zhang, Touya Toyomoto, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci. Kumamoto Univ.)

【背景と目的】カルバペネム系抗菌剤は、非常に広い抗菌スペクトラムを持ち、多くの薬剤耐性菌に対しても抗菌活性を示すことから世界中で使用されている。一方、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)はカルバペネム系抗菌剤を加水分解し、これを獲得した細菌はカルバペネム系抗菌剤に耐性を示すことから臨床的に大きな問題となる。MBL発現株に対する治療としては、MBL阻害剤と抗菌剤との併用が有力視されているが、現在のところ実用化されたMBL阻害剤は存在しない。そこで本研究では、MBL産生菌の生育を指標とした化合物スクリーニングを行い、新しいMBL阻害剤の探索を行った。

【方法】阻害剤スクリーニングは、Enamine社の480種の化合物を対象に行った。MBLの一種であるIMP-1を発現する大腸菌の生育を指標として、メロペネムの共存下で対象菌の生育を抑制する化合物をヒット化合物とした。

【結果と考察】480種の化合物を対象にスクリーニングを実施した結果、11種化合物がメロペネムの共存下でIMP-1発現株の増殖を顕著に抑制した。この中で最も強い効果を示す3種化合物(NAMIKI E7, G7, F9)をMBL阻害剤の候補化合物として同定した。さらにこれらヒット化合物の責任構造を同定するために類似化合物のMBL阻害活性を検討した。その結果、類似化合物ではMBL阻害活性は観察されなかった。このことから、ヒット化合物の化学構造全てがMBL阻害の活性に必要であることが考えられる。今後はヒット化合物の細胞毒性、細胞移行性などを検討していく。

## P2-177

ベトナムにおける淡水魚類腸管から検出されたESBL産生大腸菌

○陳内 理生<sup>1</sup>, 山口 貴弘<sup>2</sup>, 長谷 篤<sup>3</sup>, 久米田 裕子<sup>4</sup>, 中山 達哉<sup>5</sup> (<sup>1</sup>神奈川衛研・微生物部, <sup>2</sup>大安研・微生物部, <sup>3</sup>塚塚山大・現代生活, <sup>4</sup>府大・微生物制御セ, <sup>5</sup>広大・総合生命)

### Spread of ESBL-producing Enterobacteriaceae isolated from gut contents of freshwater fish in Vietnam

○Michio Jinnai<sup>1</sup>, Takahiro Yamaguchi<sup>2</sup>, Atsushi Hase<sup>3</sup>, Yuko Kumeda<sup>4</sup>, Tatsuya Nakayama<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Div. Microbiol., Kanagawa pref. Inst. Public Health, <sup>2</sup>Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, <sup>3</sup>Fac. Contemporary Human Life Sci., Tezukayama Univ., <sup>4</sup>Res. Center for Micro. Control, Osaka metropolitan Univ., <sup>5</sup>Grad. Sch. Int. Sci. for Life, Hiroshima Univ.)

Extended Spectrum beta (β)-Lactamase (ESBL: 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ)産生菌について、ベトナムにおける汚染状況の一端を明らかにするべく、市場で販売されていた淡水魚80検体の腸管内容物からその分離を試みた。その結果、74検体(84.1%)から*Escherichia coli* 86株、*Klebsiella pneumoniae* 47株、*Enterobacter asburiae* 14株、*Citrobacter braakii* 11株およびその他15株のESBL産生菌が検出された。得られた*E. coli*のうちESBL遺伝子保有株は72株で、CTX-M型遺伝子の内訳は*bla*<sub>CTX-M-55</sub>が31株、*bla*<sub>CTX-M-79</sub>が7株、*bla*<sub>CTX-M-65</sub>が6株、*bla*<sub>CTX-M-15</sub>が5株、*bla*<sub>CTX-M-27</sub>が3株、*bla*<sub>CTX-M-3</sub>、*bla*<sub>CTX-M-164</sub>および*bla*<sub>CTX-M-14a</sub>がそれぞれ1株であった(ただし、12株は未決定)。また、*bla*<sub>TEM</sub>を45株が保有していた。CTX-M型ESBL遺伝子において*bla*<sub>CTX-M-55</sub>が最も多いという結果は、ベトナムの養豚の調査報告と一致していた。今回、淡水魚からも検出されたことから、河川も含めたベトナムの環境が広く*bla*<sub>CTX-M-55</sub>保有*E. coli*に汚染されている可能性が考えられた。*bla*<sub>CTX-M-55</sub>保有*E. coli*はベトナムにおいて尿路感染症患者からも検出されていることから、今回得られた株についても今後更なる解析が必要と考えられた。

## P2-178

消毒薬耐性 *Acinetobacter baumannii* の抗菌薬交差耐性機構

○川井 真好<sup>1</sup>, 安田 好美<sup>1</sup>, 山岸 純<sup>2</sup> (<sup>1</sup>姫路獨協大・薬, <sup>2</sup>阪大産研)

### Antimicrobial Cross-Resistance Mechanisms of Antiseptic-Resistant *Acinetobacter baumannii*

○Mako Kawai<sup>1</sup>, Yoshimi Yasuda<sup>1</sup>, Jun-ichi Yamagishi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Fac. Pharm. Sci., Himeji Dokkyo Univ., <sup>2</sup>ISIR, Osaka Univ.)

【目的】薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii* は臨床現場で重大な問題となっている。消毒薬は作用点がマルチターゲットであるため耐性菌が出現し難いと考えられてきた。しかしながら、消毒薬グルコン酸クロルヘキシジン(CH)あるいは塩化ベンザルコニウム(BK)に曝露したアシネトバクター属菌が抗菌薬に耐性化する現象を見出した。今回、研究室内で消毒薬自然突然変異耐性株を分離し、その性状を解析したことで報告する。

【方法】薬剤感受性 *A. baumannii* BAA747を用いて研究室内で自然突然変異により消毒薬耐性株を分離した。薬剤感受性測定は寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。エチジウムブロミド(EtBr)の蓄積量は蛍光プレートリーダーで測定した。

【結果および考察】*A. baumannii* BAA747をCHあるいはBKの2MIC濃度で選択すると、いずれも10<sup>-8</sup>から10<sup>-7</sup>の頻度で自然突然変異株(CHRおよびBKR)が得られた。変異株はいずれの消毒薬にも親株の2MIC値を示した。しかしながら、CHR103変異株はシプロフロキサシン(CPFX)感受性が親株の8MIC値を、CHR143変異株ではCPFXの耐性化に加えてメロペネム(MEPM)が4MIC値を示した。また、CHR123変異株はCPFXおよびアミカシン(AMK)で親株の8MIC値を示した。一方、BKR731変異株は、AMKなどのアミノ配糖体薬に耐性化していたが、CPFXには耐性化しなかった。CHR103およびCHR143変異株は菌体内EtBr蓄積量が低下したことから、排出ポンプの機能亢進による薬剤排出量の増加が耐性要因の一つであると考えられた。また、BKR731変異株はEtBr蓄積量が増加し、耐性要因は不明となった。現在、リアルタイムPCRによる排出ポンプ等の発現解析を行っている。



**P2-179****肺炎桿菌多剤排出ポンプ *KexD* 発現上昇変異株におけるトランスクリプトーム解析**

○小川 和加野<sup>1</sup>, 森田 大地<sup>2</sup>, 松原 大<sup>1</sup>, 黒田 照夫<sup>2</sup> (第1薬科大, <sup>2</sup>広島大・院・医系科学)

**Transcriptome analysis on *kexD*-expressing mutant in *Klebsiella pneumoniae***

○Wakano Ogawa<sup>1</sup>, Daichi Morita<sup>2</sup>, Futoshi Mastubara<sup>1</sup>, Teruo Kuroda<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Microbiol. & Biochem., Daiichi Univ. of Pharmacy, <sup>2</sup>Grad. Sch. Bio. Heal. Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】肺炎桿菌の RND 型多剤排出ポンプ *KexD* は強力な多剤排出ポンプの1つであるが、通常条件下では発現が認められない。我々は以前、このポンプの発現亢進変異株を分離した。そして、この変異株において、二成分転写制御系 *CrrB* の変異を同定した。一般的に二成分転写制御系は細胞膜に存在する Histidine Kinase が環境変化を感知し、その情報を受け取った Response Regulator が直接的な転写制御因子として働き、様々な遺伝子の発現を変化させると考えられている。そこで、我々は二成分転写制御系 *CrrB* の変異により発現が変化した遺伝子群の同定を目指した。

【方法】多剤耐性肺炎桿菌 Em16-1 とその親株である ATCC10031 から RNA を調製し、Illumina Miseq により、RNA 発現量解析を行った。

【結果】親株である肺炎桿菌 ATCC10031 と比較し、変異株 Em16-1 で発現量が4倍以上変化した遺伝子を選択した。その結果、41 遺伝子の発現上昇、18 遺伝子の発現低下が検出された。発現上昇した遺伝子群の中には *kexD* が含まれており、解析系が機能していることが示唆された。発現上昇した主な遺伝子には *kexD* とその周辺に位置する遺伝子、ABC 型 Transporter であるリン酸輸送系 *phnDCEE*、ホスホン酸代謝経路遺伝子群である *phnFHJJKLM* が含まれていた。*CrrB* はコリスチン耐性に関わる転写制御系として報告されており、コリスチン耐性化した変異株ではリポ多糖の合成に関わる遺伝子群 *arn* オペロンの発現上昇が報告されている。変異株 Em16-1 においてもこのオペロン (*arnBCADT*) の発現上昇が検出された。一方で、我々の変異株 Em16-1 ではコリスチン耐性の上昇は観察されなかった。

**P2-180****ディフィシル菌の溶菌酵素 CD18980 の生化学的解析**

○関谷 洋志, 小林 早紀, 高橋 郁美, 玉井 栄治 (松山大・薬・感染症学)

**Analysis of lytic enzyme CD018980 of *Clostridioides difficile***

○Hiroshi Sekiya, Saki Kobayashi, Ikumi Takahashi, Eiji Tamai (Dept. Infect. Disease., Col. Pharma. Sci., Matsuyama Univ.)

【目的】ディフィシル菌はグラム陽性嫌気性桿菌であり、偽膜性大腸炎や抗菌薬関連下痢症の原因菌として医療現場で問題となっている。溶菌酵素は細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンを加分解する酵素であり、菌に作用させると菌を死滅させる。今回、ディフィシル菌由来の溶菌酵素 CD18980 について、その生化学的性質を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】ディフィシル菌 630 株の DNA を鋳型に PCR 法で溶菌酵素と推定された CD18980 をクローニングし、pColdII に組み込んだ。また、触媒ドメインのみの領域 (CD18980\_CD) もサブクローニングした。構築したプラスミドを導入した大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL を M9 培地で培養後、1 mM IPTG を添加し 15°C で約 24 時間培養しタンパク質の発現を誘導し、アフィニティーカラムで精製した。タンパク質の溶菌活性は濁度低下法、ザイモグラフィーで測定し、pH, NaCl, 金属イオンの影響や熱安定性についても調べた。また、プルダウン法で各種菌との結合を調べた。

【結果・考察】CD18980 と CD18980\_CD はディフィシル菌に対してどちらも溶菌活性を示したが、CD18980\_CD の方が強い溶菌活性を示した。そこで、CD18980\_CD の生化学的性質を調べた。CD18980\_CD は pH7.0 で溶菌活性が最も大きく、その活性は 0 mM NaCl で最も大きく、NaCl 濃度の上昇により低下した。また、Zn<sup>2+</sup> や Cu<sup>2+</sup> の添加により活性は大きく低下した。さらに、37-55°C で熱処理を行ったタンパク質も活性を保持できることが明らかになった。この CD18980\_CD はノービイ菌や古草菌など、ディフィシル菌以外の菌にも溶菌活性を示した。今後、CD18980\_CD の生体内での有効性を検討し、治療薬開発に繋げたいと考えている。

**P2-181****Development of Cas13a-phagecapsid to eliminate enterotoxigenic *Bacteroides fragilis***

○Thuy Nguyen<sup>1</sup>, Arbaah Mahmoud<sup>1</sup>, 相羽 由詞<sup>1</sup>, 渡邊 真弥<sup>1</sup>, 宮永 一彦<sup>1</sup>, Xin-Ee Tan<sup>1</sup>, 笹原 鉄平<sup>1</sup>, 崔 龍洙<sup>1</sup> (自治医科大学・医学部・細菌学部門, <sup>2</sup>自治医科大学・医学部・細菌学部門)

○Thuy Nguyen<sup>1</sup>, Arbaah Mahmoud<sup>1</sup>, Yoshifumi Aiba<sup>1</sup>, Shinya Watanabe<sup>1</sup>, Kazuhiko Miyanaga<sup>1</sup>, Xin-Ee Tan<sup>1</sup>, Sasahara Teppei<sup>1</sup>, Longzhu Cui<sup>1</sup> (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., <sup>2</sup>Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) is a human colonic commensal anaerobe that is asymptotically carried by 5 to 20% of the world population. It has also been suggested to be associated with colorectal cancer. However, it is unknown because there is no technique to eliminate specific bacteria from the gut microbiota. Recently, our laboratory has established a new platform for development of sequence-specific antimicrobials by using bacteriophage and the CRISPR-Cas13a system. The aim of this study is to develop an ETBF-specific bacterial eliminating agents to remove the ETBF from gut microbiome without affecting untargeted bacteria. To the date, we collected total of 125 *B. fragilis* strains, and 15 strains found to carry *bft* genes when detected by PCR. Next, we tested all strains for their susceptibility to antibiotics of AMPC, TET, CFX and CAM for selecting host strains to perform further experiments. Among those, 6 strains from which prophage could not be induced by mitomycin C were whole-genome sequenced. These strains will be good candidates to generate the bacterial eliminating agents. Currently, *B. fragilis* phage collection and CRISPR-Cas13a optimization are undergoing.

**P2-182****Isolation and characterization of broad-host-range bacteriophage targeting *Escherichia coli* strains**

○Thi My Duyen Ho, ティティアナンパコーン カネート, アルイーサオラー, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, タン シンイー, スリワニフィーラナラヤナン, 崔 龍洙 (自治医科大学・医学部・細菌学部門)

○Thi My Duyen Ho, Kanate Thitiananpakorn, Ola Alessa, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Xin-Ee Tan, Veerananarayanan Srivani, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Our laboratory has previously established a novel antimicrobial by loading CRISPR-Cas13a into phage capsid. This antimicrobial capsid (AB-capsid) cleaves targeted RNA encoded by specific drug-resistant bacterial genes and other non-specific RNAs, thereby executing collateral yet targeted bacterial killing. Despite targeted bactericidal activity, this AB-capsid was constructed by a narrow-host-range phage to limit its clinical application. We aim to isolate broad-host-range phages from *E. coli* lysogens. The hunt for new phages began with inducing 136 *E. coli* lysogens with mitomycin C and the 136 crude-induced solutions were then tested for their respective host ranges against 398 *E. coli* strains. 63 of 136 lysates showed distinctive bactericidal activity ranging from 0.25 - 64.57%. Among them, 22 lysates were bacteriocins (a trypsin-sensitive antimicrobial peptide co-induced during phage isolation) as implied by the loss of killing activity after trypsin exposure, including JMUB6796 lysate, which displayed the best host range (64.57%). Nevertheless, we collected 41 phage solutions, out of which phage JMUB6709 recorded the broad host-range activity (35.68%) and seems to be an ideal candidate due to its potential to infect both the antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *E. coli* strains and thereby would be exploited for phage-based technology in the near future.

## P2-183

### 臨床分離された IMP-6 産生肺炎桿菌に感染するバクテリオファージの単離と感染解析

○川野 光興<sup>1</sup>, 近藤 恒平<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中村学園大・栄養科・食品微生物, <sup>2</sup>感染研・薬剤耐性センター)

### Isolation and analysis of phages infecting clinical isolates of IMP-6-producing *K. pneumoniae*

○Mitsuoki Kawano<sup>1</sup>, Kohei Kondo<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Nutritional Sci., Nakamura Gakuen Univ., <sup>2</sup>Antimicro. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis.)

*Klebsiella pneumoniae* harboring the plasmid carrying *bla*<sub>IMP-6</sub> is becoming an increasingly hazardous species in Japan. We collected and characterized 29 novel bacteriophages that infect *K. pneumoniae* carrying the pKPI-6 plasmid, isolated at clinical settings in western Japan. Our phages showed broad host ranges. We applied a phage cocktail treatment constructed from 10 phages against two host strains, Kp21 and Kp22, which show different phage susceptibility patterns each other. Although the phage cocktail delayed phage-resistant Kp21 emergence, the emergence of phage-resistant Kp22 could not be delayed. Moreover, phage-resistant Kp21 became sensitive to other phages, which did not originally infect wild-type Kp21. Our study demonstrates how a suitable phage cocktail can diminish the occurrence of phage-resistant bacteria.

## P2-184/W11-7

### Comparison of analgesic effect between botulinum toxin A1 and A2 on cancer pain

○明吉 愛実<sup>1</sup>, 幸田 知子<sup>2</sup>, 鳥居 恭司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京農大院・農・動物, <sup>2</sup>大阪公立大)

○Manami Akeyoshi<sup>1</sup>, Tomoko Kohda<sup>2</sup>, Yasushi Torii<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Tokyo Univ. of Agriculture, <sup>2</sup>Osaka Metropolitan Univ.)

**Objective:** In recent years, the number of cancer patients has been increasing with the aging population in Japan, so pain management is very important. However, currently used analgesics have problems such as insufficient pain control for osteosarcoma pain. Botulinum toxin is known to relieve pain by inhibiting the release of neurotransmitters. In this study, we injected botulinum toxin to mice with bone cancer and evaluated its analgesic effect to verify whether it could be used for pain treatment.

**Method:** NCTC 2472 tumour cells were injected C3H/HeN mice into femur. The mice were administered botulinum toxin A1 or A2 20 days after the tumour cells injection. To compared, the tumour treated mice were administrated with Acetaminophen which is currently used as a non-opioid analgesic. The von frey test to measure tactile response, the hot plate test to acute pain, and the rotarod test to motor function, were performed.

**Result:** At high concentrations of toxins, the effect was not clear because the motor function was decreased due to the muscle relaxation. However, the toxins at the most effective concentrations increased the values in the von frey test than untreated mice and with Acetaminophen. This result suggests botulinum toxin are effective to suppress the pain in bone cancer. Furthermore, analgesic effect by A2 toxin was observed at lower concentration than A1 toxin.

## P2-185

### 非平衡大気圧プラズマジェットを用いた植物栽培における養液の衛生管理技術の開発

○粟飯原 睦美<sup>1</sup>, 泉 匠人<sup>1</sup>, 白井 昭博<sup>1</sup>, 向井 孝志<sup>2</sup>, 川上 烈生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>徳島大院・社会産業理工学研究所, <sup>2</sup>日亜化学工業株式会社)

### Hygiene technology for plant nutrient solution using nonequilibrium atmospheric pressure plasma jets

○Mutsumi Aihara<sup>1</sup>, Takuto Izumi<sup>1</sup>, Akihiro Shirai<sup>1</sup>, Takashi Mukai<sup>2</sup>, Retsuo Kawakami<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Tech. Indust. and Social Sci, Tokushima Univ., <sup>2</sup>Nichia corp.)

Recently, as one of the solutions to food shortage problem, plant factories are attracting attention because they can produce crops stably regardless of weather conditions by artificially controlling the environment. From the perspective of environmental conservation and pollution, hydroponic cultivation is the main method used in plant factories, where the nutrient solution is circulated and reused. However, once pathogenic bacteria are contaminated in the nutrient solution, they can multiply and spread. To control hygienic management of the nutrient solution is essential. We have focused on the irradiation effect of nonequilibrium atmospheric-pressure plasmas as a new hygiene control technology for plant nutrient solutions. In this study, we used a nonequilibrium atmospheric-pressure air plasma jet to control pathogenic bacteria in nutrient solution and evaluated their bactericidal effects on *E. coli*, *B. subtilis*, and *S. aureus*. As a result, a remarkable inactivation effect was obtained via strong oxidative stress within a few seconds to a few minutes against all bacteria. The damaging effects of air plasma jet on the nutrient solution were also investigated and no significant change in the composition was observed. The results of this study clarify that the air plasma jet irradiation is an effective hygiene control for the management of plant nutrient solutions.

**LS1-1****ナノポアシーケンスによる細菌ゲノム解析**

○上村 泰央, 西澤 明人 (株式会社ジーンベイ)

**Bacterial genome analysis by nanopore sequencing**

○Yasuo Uemura, Akito Nishizawa (GeneBay, Inc.)

オックスフォード・ナノポア・テクノロジー社が開発したナノポアシーケンスは、DNA鎖またはRNA鎖が「ナノポア」と呼ばれる人工膜に埋め込まれた数ナノメートルのタンパク質ポアを通過する際に生じる電位の変化を測定することにより、塩基配列を解読できる最先端の次世代シーケンサーである。数十 kbp から数百 kbp、最長では数 Mbp にも達するような非常に長い配列断片を、1本のリードとして解読することができるため、これまでのシーケンサーでは困難であった長いリピート配列を持つバクテリアゲノム配列の構築に威力を発揮している。

一方で、配列決定精度が比較的低いことから、ナノポアシーケンサーで得られたリードのみを用いて構築したゲノム配列にはエラーが残る場合もあり、ショートリードで補正することが必要とされてきた。しかし、最近ではサンガーシーケンサー並みの配列決定精度を実現する試薬も利用できるようになり、ナノポアシーケンサーで得られたリードのみで精度の高いゲノム配列の構築ができるようになってきている。

本講演では、最新のナノポアロングリードシーケンサーを用いたバクテリアゲノムの *de novo* アセンブリ解析を中心に、実際の解析事例を交えて最新情報とともに紹介したい。

**LS1-2****ナノポアシーケンスによる細菌・ウィルスゲノム解析**上村 泰央<sup>1</sup>, 西澤 明人<sup>1</sup>, ○金 智慧<sup>2</sup> (1株式会社ジーンベイ, 2株式会社オックスフォード・ナノポアテクノロジー)**Bacterial genome analysis by nanopore sequencing**Yasuo Uemura<sup>1</sup>, Akito Nishizawa<sup>1</sup>, ○Jihye Kim<sup>2</sup> (1GeneBay, Inc., 2K.K. Oxford Nanopore Technologies)

オックスフォード・ナノポアテクノロジー社が開発したナノポアシーケンサーは、DNA鎖またはRNA鎖が「ナノポア」と呼ばれる人工膜に埋め込まれた数ナノメートルのタンパク質ポアを通過する際に生じる電位の変化を測定することにより、塩基配列を解読できる最先端の次世代シーケンサーである。数十 kbp から数百 kbp、最長では数 Mbp にも達するような非常に長い配列断片を、1本のリードとして解読することができるため、これまでのシーケンサーでは困難であった長いリピート配列を持つバクテリアゲノム配列の構築に威力を発揮している。

一方で、配列決定精度が比較的低いことから、ナノポアシーケンサーで得られたリードのみを用いて構築したゲノム配列にはエラーが残る場合もあり、ショートリードで補正することが必要とされてきた。しかし、最近ではサンガーシーケンサー並みの配列決定精度を実現する試薬も利用できるようになり、ナノポアシーケンサーで得られたリードのみで精度の高いゲノム配列の構築ができるようになってきている。

本講演では、最新のナノポアロングリードシーケンサーを用いたバクテリアゲノムの *de novo* アセンブリ解析を中心に、実際の解析事例を交えて最新情報とともに紹介したい。

オックスフォード・ナノポア社からは新たに開発したインフルエンザウィルス検出パイプライン、並びにサル痘について新しく開発した解析パイプラインを紹介する。新型コロナのゲノム疫学調査により、全ゲノムを解析することの重要性、ならびに簡便な操作と解析パイプラインが必須であることが浮き彫りとなった。オックスフォード・ナノポア社ではこれらの経験からさらに感染症分野への応用が可能なインフルエンザウィルスゲノムシーケンシング解析パイプラインとサル痘の解析パイプラインを紹介する。また最新の豚インフルエンザウィルスへの応用についても論文とともに紹介したい。

**LS2****微生物シングルセルゲノミクス：進歩と将来の展望**○細川 正人<sup>1,2</sup> (1早稲田大学, 2bitBiome株式会社)**Microbial single cell genomics: advances and future perspectives**○Masahito Hosokawa<sup>1,2</sup> (1Waseda Univ., 2bitBiome, Inc)

The natural world teems with a wide variety of microbes, including those found in the sea, soil, and animal intestines. However, the vast majority of these microbes remain uncultivated, making it challenging to fully comprehend their characteristics. To address this issue, we have developed single-cell sequencing as a powerful tool for investigating uncultivated microbes. This technology allows us to individually obtain genomic information from diverse microbial populations, which is difficult to achieve through conventional metagenomic analysis, particularly for rare microbes or those with closely related species. The acquired genomes can be subjected to detailed comparative analysis at the strain level, thereby revealing differences among bacterial strains within individual hosts or within the same environment. By leveraging these capabilities, it is possible to describe the functions of each microbe in intricate detail. Single-cell genome sequencing provides high-quality genomes that are difficult to obtain through metagenomics alone and will aid in a deeper understanding of microbial ecosystems by illuminating metabolic pathways and horizontal gene transfer networks. Single-cell RNA sequencing also reveals heterogenous gene expression in clonal bacterial populations, which these technologies can help to explore commensal or pathogenic bacteria at the strain level, linking taxonomic and functional information. In this talk, I will introduce single-cell genome sequencing technology, including genome sequencing and transcriptome sequencing, and its integration with conventional metagenomics.

**LS3-1****塩基配列の多様性が高いシーケンス技術を用いた肺腫瘍組織におけるメタゲノム解析**

○木口 悠也, 水谷 壮利, 鈴木 稔 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻)

**Metagenomics in lung tumor tissue using shotgun sequencing with high nucleotide diversity**

○Yuya Kiguchi, Taketoshi Mizutani, Yutaka Suzuki (Dept. Computational Biology and Medical Sciences, Grad. Sch. Frontier Sciences, the Univ. Tokyo)

腫瘍組織内マイクロバイーム解析はヒトマイクロバイーム研究の新たな潮流として膀胱がんや乳がん、大腸がんなど様々ながんを対象に研究が開始されており、がん種によってマイクロバイームの構成が異なることが示唆されている。しかし、これまでの腫瘍組織内マイクロバイーム解析ではがん組織のゲノム配列データを細菌ゲノムデータベースにマッピングすることでその構成を明らかにしているため、参照ゲノムに存在しない細菌は検出できていないという課題が存在する。ショットガンメタゲノム解析では *de novo* アセンブリ解析とベニング解析によって Metagenome Assembled Genome (MAG) と呼ばれる細菌ゲノムの構築が可能である。しかし、細菌ゲノムは種ごとに大きく異なる GC 含量を有することが知られており、GC 含量の偏りはシーケンスバイアスを発生させ、一部の細菌はシーケンスされにくいという技術的制約が存在する。そこでこの課題の克服のため、本研究では GC 含量に偏りがある配列もシーケンス可能な新技術 (Twist 96-Plex Library Prep Kit) を適用し、肺腫瘍組織の細菌ゲノム解析を試みた。本発表では当手法をメタゲノム解析に用いるインパクトを紹介するとともに肺腫瘍内マイクロバイーム解析に適用することによって明らかになった肺腫瘍内細菌叢の特徴と病態との関連を議論する。

## LS3-2

### #We Make DNA—未来を創る：細菌のゲノム研究を切り拓く Twist NGS ソリューション

○田谷 敏貴 (Twist Bioscience シニアアプリケーションサイエンティスト)

### #We Make DNA - Writing the Future: Twist NGS Solutions Pioneering Bacterial Genomics Research

○Toshiki Taya (Senior Manager, Field Application Scientist, APAC, Twist Bioscience)

Twist Bioscience はシリコンベースの高速かつ正確な DNA 合成プラットフォームを特徴とします。Twist の NGS パネルを用いたターゲット濃縮によって、2022 年には梅毒細菌の系統分類、節足動物中の病原体検出など、Twist のハイスループット DNA 合成技術を最先端の感染症研究に適用した例が国内外で見られるようになりました。一方で、細菌叢の研究の加速から新たな治療ターゲットを見つける研究も進んでいます。シーケンスコストが劇的に低下したことで期待されているのが、検体数の増加への対応と費用対効果です。本発表では Twist Bioscience の最新情報として、自動化に頼らない検体数増加への対応：自動化を最小化させ、スループットを高める新しい前処理試薬について紹介します。

## LS4

### 薬剤耐性腸内細菌目細菌の臨床アップデート：疫学・検査・治療

○松村 康史 (京都大学医学部附属病院検査部・感染制御部)

### Update on antimicrobial resistance in Enterobacterales in clinical settings: epidemiology, diagnosis, and treatment

○Yasufumi Matsumura (Department of Clinical Laboratory and Infection Control and Prevention, Kyoto University Hospital)

大腸菌、クレブシエラ、エンテロバクター等が属する腸内細菌目細菌は、ヒトにおける感染症の主たる原因菌である。これらの感染症に対して第一選択として用いられている第 3 世代セファロスポリン、キノロン、カルバペネムへの薬剤耐性が临床上の問題となっている。特に大腸菌において ESBL 産生菌、キノロン耐性菌、クレブシエラやエンテロバクターにおいてカルバペネマーゼ産生菌(CPE)の増加が顕著である。これらは、大腸菌 ST131 やクレブシエラ ST258 など特定の薬剤耐性クローンの伝播によって生じていることが全ゲノム解析により明らかになっている。

ESBL や CPE の治療においては、表現型としての耐性および耐性機序を正確に検出する検査が重要である。最新のブレイクポイントに対応した薬剤感受性検査法の確実な実施に加え、耐性因子に対する遺伝子検査の活用が望ましい。ESBL や CPE に対する最適は標準化されるには至っていないが、臨床的知見が集積しつつある。

本発表では、臨床現場における薬剤耐性腸内細菌目細菌の疫学、検査、治療について最近の動向を総括することで、臨床医が現在求めているエビデンスについて考えたい。

## LS5-1

### 新製品 Revio のご紹介と、生物技研で行う PacBio を使用した細菌ゲノム解析

○小林 孝史<sup>1</sup>、中野 江一郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>PacBio Japan, <sup>2</sup>(株) 生物技研)

### Introducing Revio, the new PacBio's long read sequencer and bacterial genome application service by Bioengineering lab

○Takafumi Kobayashi<sup>1</sup>, Koichiro Nakano<sup>2</sup> (<sup>1</sup>PacBio Japan, <sup>2</sup>Bioengineering lab)

PacBio has so far established long read sequencing technology for over a decade and recently launched HiFi sequencing using continuous consensus sequencing (CCS) approach. It enables over 99.9% accuracy (Phred Score Q30), which is competitive against most of short read sequencers' specification. Sequel IIe is now commonly used for complete bacterial genome sequencing and shotgun metagenome sequencing in addition to plant, animal, and human genome sequencing.

In October 2022, PacBio released new long read sequencer, Revio, which enables 15x higher throughput compared to existing Sequel IIe system. This system will launch at customer site on 1<sup>st</sup> half of 2023 and accelerate bacterial genome sequencing project with lower cost per sample. On this session, we introduce the key features of PacBio Revio system and its bacterial genome analysis application including shotgun metagenome sequencing.

Bioengineering lab has started long read sequencing service from September, 2021. We also introduce and highlight service packages of Bioengineering lab on bacterial genome application on this session.

## LS5-2

### 高精度長鎖シーケンスによる微生物群集中の個の理解

○鈴木 仁人 (国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター)

### Understanding individual bacteria in microbial community by highly accurate long-read sequencing

○Masato Suzuki (Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases)

薬剤耐性病原細菌による難治性感染症が国際的な公衆衛生上の問題となっている。本演題では、Pacific Biosciences 社の高精度 (HiFi) 長鎖シーケンスを含むシーケンス技術や解析装置のアップデート、株式会社生物技研の PacBio HiFi リードを用いた微生物ゲノム解析サービスの概要を紹介した上で、PacBio HiFi シークエンスを含む長鎖リードシーケンスによって行った国内外の薬剤耐性病原細菌分離株のプラスミドを含む完全ゲノム配列の解析事例とそれを行うための情報解析ツールを紹介する。そして、PacBio HiFi シークエンスを含む長鎖リードシーケンスによって行ったヒト細菌叢もしくは環境試料のメタゲノム解析、および PacBio HiFi シークエンスによって行った薬剤耐性遺伝子とプラスミドの最新の配列ライブラリーを活用した Hi-C 法 (染色体立体配座捕捉法) によるシングルセルメタゲノム解析の試みを紹介したい。今後、薬剤耐性病原細菌を含む細菌の分離株のゲノム解析および細菌叢のメタゲノム解析を行う際の一助となれば幸いである。

## LS6

### Urban Microbiomes: Shotgun Metagenomes of Built Environments

○鈴木 治夫 (慶應義塾大学 環境情報学部)

○Haruo Suzuki (Faculty of Environment and Information Studies, Keio Univ.)

Factors contributing to the increase in microbial infections include antimicrobial resistance, urbanization, and international movement of people by transportation. Designing cities and built environments for human health requires monitoring and data sharing of urban microbiomes through international collaboration. The Metagenomics and Metadesign of the Subways and Urban Biomes (MetaSUB) International Consortium (<http://metasub.org/>) was established in 2015 to investigate urban microbiomes on a global scale (doi: 10.1016/j.isci.2022.104993). Over a three-year period from 2015-2017, approximately 5,000 samples from surfaces in built environments (e.g., subway stations) in 60 cities in 32 countries were collected and subjected to shotgun metagenomic sequencing. The study found that the microbiomes in cities are unique and different from those found in human and soil environments and that the number of antimicrobial resistance genes detected across different cities varied by several orders of magnitude (doi: 10.1016/j.cell.2021.05.002). Members of the MetaSUB International Consortium are continuing to collect samples from various urban environments, such as sewage, air, and surfaces, in cities worldwide in order to study urban microbiomes before, during, and after the COVID-19 pandemic and mass gathering events.

## LS7

### 結核：継続する脅威

○鈴木 定彦 (北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 所長・バイオリソース部門 教授)

### Tuberculosis: The Continuing Threats

○Yasuhiko Suzuki (Director & Professor at Division of Bioresources, Hokkaido Univ. International Institute for Zoonosis Control)

The novel coronavirus infection, COVID-19, originated from China in December 2019 quickly swept the entire world by infecting approximately 668 million people and killing approximately 6.7 million as of January 20, 2023. Japan is no exception, with numerous infections and deaths by this infectious disease. Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* has been spreading around the world for centuries and continues to be a threat to humanity. World Health Organization (WHO) estimated 2 billion infections with 10.6 new cases and 1.6 million deaths worldwide in 2021 by their Global Tuberculosis Report 2022. The estimated numbers of new cases and new deaths is slightly increasing compared to those in 2020. When compared with the data in 1990, more than 30 years ago, the estimated numbers of new cases have increase 1.6 times with the stable number of deaths. The emergence and spread of multidrug- and extensively drug-resistant TB has accelerated the spread of this disease. Another issue is the zoonotic tuberculosis, a form of tuberculosis in people caused by *M. bovis* or other animal related *M. tuberculosis* complex species. The estimated number of new zoonotic tuberculosis cases in 2018 was around 140,000 with deaths around 12,300. As the comprehensive surveillance of zoonotic tuberculosis in human tuberculosis has not yet been performed, those numbers are the tip of iceberg. However, the rapid spread of COVID-19 around the world have turned a blind eye to the importance of TB control. This situation may not be the right way for achieving the Sustainable Development Goals, especially Goal 3, "Good Health and Well Being" and related one, Goal 1, "No Poverty". Hence, the control measures for tuberculosis including zoonotic tuberculosis need to be implemented comprehensively.

For the control of TB, patients should be diagnosed at early stage of the disease and the drug susceptibilities of causative be *M. tuberculosis* complex strains should be analyzed earliest possible for the proper treatment regimens. Specifying high risk *M. tuberculosis* complex strains can contribute to the blockade of spread. New drugs effective even against multidrug- and extensively drug-resistant TB and new treatment regimen can stop the problematic tuberculosis. In addition, novel vaccines effective for preventing adult TB development is also needed. In this seminar, I would like to discuss the past, present, and future of TB and TB control measures by focusing on diagnostic methods, molecular epidemiological analysis, drugs and vaccines.