

浅川賞受賞講演

モリクテス綱細菌の運動能のメカニズムと起源

宮田 真人 (大阪公立大学大学院理学研究科)

Mechanism and origin of class Mollicutes motility

Makoto Miyata (Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University)

浅川賞を授与いただき、ありがとうございます。歴史ある賞のすばらしい受賞者の面々に私の名を加えていただいたこと、感謝の念に堪えません。私は1999年から欠かさず総会に参加して来ましたが、いつも最大の楽しみは浅川賞受賞講演でした。聴講時には、こんなことやあんなことも聞いてみたいなど思っていました。いざ自身がお話しすると、何を話すか迷うところです。幸運(?)なことには今年には受賞決定から講演までの時間があるので、私はこの悩みを他の受賞者より長く楽しむことができます。

あいさつビデオ (<https://youtu.be/cq4GJTJ9JcA>)

以下にこれまでに行った研究への思いと内容を記します。Mollicutes 綱細菌は、Firmicutes 門細菌 (グラム陽性菌、高ATPブランチ) に由来し、ペプチドグリカン層がないこと、ゲノムが縮退していることなどが特徴です。Mycoplasma 属や Spiroplasma 属などから構成されています。

【ゲノム複製 (1988–97)】

大学院ではウサギ骨格筋ミオシンを、生化学あるいは生物物理学の技術を用いて研究しました。今考えると間違っていたのですが、当時、この分野には手詰まり感があって、私は“分子生物学”にあこがれていました。学位を取得した1988年に現所属の大阪市立大学理学部 (現在は大阪府大と統合されて大阪公立大学) に助手として採用された私は、ヒツジ病原菌である *Mycoplasma capricolum* のゲノムの複製の研究を始めました。Mollicutes 綱細菌が最小の細胞とゲノムを持つ生物であると考えられていたことや、DNA複製が生命の本質であるとの考えがあったことなどが主な理由です。

【*Mycoplasma mobile* の滑走運動 (1997–現在)】

1990年代半ばになると、細菌もチューブリン (FtsZ) やアクチン (MreB) などと近縁の細胞骨格を持ち、細胞構造を組織化していることが明らかになってきました。そして“細菌の細胞生物学”は、それまでDNA複製を研究していた分子生物学者らが主体となって進められたのです。ある時、以前に読んだ *Mycoplasma mobile* (マイコプラズマ・モービレ) の論文を思い出しました。すなわち *M. mobile* は菌体の片方の端に滑走接着器官を形成し、その器官で動物細胞やガラスにはりつき、すべる様に動く“滑走運動”を行います。そこで私たちは、滑走運動を担う表面タンパク質3種を特定し、それらを精製して分

子形状を明らかにしました。次に滑走のメカニズムを議論するために、発生する力、詳細な動き、直接の結合対象、直接のエネルギー源を明らかにして「滑走装置表面には数百本のあしとクランクのタンパク質が並んでおり、それらがATPのエネルギーにより協働的に動いて宿主表面のシアル酸オリゴ糖をつかんだり引っ張ったり離したりして、菌体をスムーズに前方に移動させる」と提案しました。さらに、その素過程をとらえることにも成功しました。菌体内部でATPを加水分解して力を発生している“モーター”を発見し、そのモーターが生物に普遍的に存在しているATP合成酵素とよく似た六量体構造が二量体化したものであることも明らかにしました。

【*Mycoplasma pneumoniae* の滑走運動 (1997–現在)】

ヒト肺炎菌の *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ・ニューモニエ) も滑走運動を行います。滑走に関するタンパク質に *M. mobile* との共通点はありません。私たちは *M. mobile* で培った経験を活かし、*M. pneumoniae* 滑走のメカニズムを提案しました。

【*Spiroplasma* の遊泳運動と合成生物学 (2015–現在)】

節足動物や植物の病原菌などとして知られる *Spiroplasma* (スピロプラズマ) 属細菌は、らせん型の菌体のらせん方向を反転させることで水中を遊泳します。菌体内にはリボンと呼ばれる構造が形成され、リボンは細菌アクチンである MreB の5つのアイソフォームなどから構成されます。私たちは、滑走運動で培った技術を適用し遊泳のメカニズムに迫りました。さらに、2016年にクレイグベンター研究所から発表されたミニマル合成細菌、JCVI-syn3B (Hutchinson C III et al 2016 Science) にリボンの構成タンパク質を発現させることで、遊泳運動を再構築することに成功しました。興味深いことに、この遊泳は2種類の MreB のみでも再現され、現在はその仕組みに焦点を当てて研究しています。これらの結果は、私たちが以前から提案している細胞運動の起源、すなわち「動く性質を意図せずに獲得した生命維持のためのタンパク質の動きが細胞表面に伝わり、原始的な運動能を獲得した細胞が選択されて運動能として確立された」と言うものです。ミニマル合成細菌は基礎研究に用いるためによく工夫されているため“野生”に近い他のモリクテス綱細菌に対して生物学を行う上での利点が沢山あります。現在私たちは、ミニマル合成細菌を用いて、生きていることを明らかにする研究に挑戦しています。

【急速凍結レプリカ電子顕微鏡法の細菌学への展開
(2012– 現在)】

急速凍結レプリカ電子顕微鏡法は、1976年に動物生理学の分野で開発された方法です (Heuser J et al 1979 Journal of Cell Biology). 細菌や宿主細胞の表面構造を高分解能で迅速に観察することができます。私たちは、この技術のペプチドグリカン、細菌膜小胞、細胞骨格などの研究への活用方法を開発しています。

【謝辞】

浅川賞は私の名前でもいただきましたが、共同研究者全員で貰ったものと理解しています。また共同研究者以外の、議論、支持いただいた諸兄にも深く感謝いたします。 <(_ _)>

【参考情報】

1. 宮田真人 (2020) 「運動能獲得のとき：仰天！モリクテス綱の運動メカニズム」, 生化学, 92 巻 6 号. 791-800, doi:10.14952/SEIKAGAKU.2020.920791



2. 宮田真人 (2020) 「運動能の系統樹 — 生命の系統樹における運動システム進化についての提案 —」, 生物物理, 60 (4) 231-235, doi:10.2142/biophys.60.231



3. 宮田真人 (2021) キャリアデザイン談話室, 「滑走博士の遺言状」, 生物物理, 61 (6) 421-423, doi:10.2142/biophys.61.421



4. 宮田真人 Researchmap
https://researchmap.jp/mycoplasma/published_papers



5. Web site: Miyata lab
<https://www.sci.osaka-cu.ac.jp/~miyata/index.html#>



6. YouTube: Mycochannel
<https://www.youtube.com/user/MycoplasmaGliding>



7. 生体運動, ビデオアーカイブ
<https://www.motility.sci.osaka-cu.ac.jp/video/>



SL

化学の視点で感染症に挑む

座長：横田 伸一（札幌医科大学）

Challenge to infectious diseases from the point of view of chemistry

Chair: Shinichi Yokota (Sapporo Medical University)

SL-2

細菌学的解析手法を用いた薬剤耐性菌対策への新規アプローチ

○佐藤 豊孝^{1,2,3} (1)北大・院・獣医・獣医衛生学, (2)北大・院・国際感染症学院, (3)北海道One Healthリサーチセンター)

A novel approach to combating antimicrobial drug-resistant bacteria using bacteriological analysis methods

○Toyotaka Sato^{1,2,3} (1)Lab. Veterinary Hygiene, Sch./Fac. Veterinary Medicine, Hokkaido Univ., (2)Grad. Sch. Infectious Diseases, Hokkaido Univ., (3)One Health Research Center, Hokkaido Univ.)

薬剤耐性菌は国際社会全体の課題である。WHOのグローバル・アクションプランのもと各国主導でAMR対策が行われてきた。一方で、我が国での第1期AMR対策アクションプラン(2016-2020)においても十分な対策効果が得られていないことが伺える。中でも新規抗菌薬開発は減少の一途を辿り、特に多剤耐性菌への対策は早急の課題である。

我々は上記課題の克服に寄与すべく、細菌学的観点および解析手法を用いて、従来の抗菌薬開発に捉われない新たな視点での細菌感染症治療薬の開発に資する様々な基礎研究を行なっている。一例として「感染部位特異的治療薬(vivoEF阻害剤)」の開発について紹介したい。『vivoEFs』とは、*in vivo* bacterial essential factorsとして命名した略語であり、各感染部位特異的な細菌の生存必須因子の総称である。我々は細菌ゲノムからvivoEFsを網羅的に推定・抽出法および本因子を阻害する化合物の探索手法を開発した。本アプローチを適用することにより、従来の抗菌薬開発での対象化合物(いわゆる抗菌性物質)を我々の細菌感染症治療薬開発の対象からは除外することが可能であり、細菌感染症治療薬開発の対象シーズの飛躍的な拡大に成功した。vivoEF阻害剤は従来の抗菌薬と異なる特性を有するため、必然的に抗菌作用メカニズムも異なる。実際に多剤耐性菌にも良好な抗菌活性を示すvivoEF阻害剤を複数同定することに成功し、一部は創薬開発へと繋がっている。本演題では、vivoEF阻害剤を含めた細菌感染症への新たな細菌学的アプローチの取り組みについて紹介させて頂きたい。

SL-1

新規抗菌薬リードの創製を目指した天然物創薬

○市川 聡(北大・院・薬)

Medicinal chemistry based on natural product for the discovery of novel antimicrobial leads

○Satoshi Ichikawa (Fac. Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ.)

既存の抗菌薬に対する薬剤耐性菌の出現は、公衆衛生上の深刻かつ継続的な問題であり、新たな抗菌薬の開発は急務である。細菌の細胞壁を形成する高分子であるペプチドグリカンには、N-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し高分子がポリペプチドで架橋したものであり、その生合成は抗菌薬創製の標的である。その生合成を担う酵素の中で、phospho-MurNAc-pentapeptide translocase (MraY)は、新規標的として期待されている。自然界にはMraYを強力に阻害するマクロライド天然物が数多く見出されている。我々はこれらの天然物の化学構造と生物活性に興味を持ち、その有機合成¹、創薬化学展開²、MraYとの複合体構造解析³、構造に基づいた薬物設計⁴、効率的な天然物ライブラリー構築法の開発⁵を行ってきた。本シンポジウムでは、これらの我々の取り組みを紹介する。

1. Total synthesis of (-)-muraymycin D2 and its epimer. Tanino, T.; Ichikawa, S.; Shiro, M.; Matsuda, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1366-1377.

2. Tanino, T.; Al-Dabbagh, B.; Mengin-Lecreulx, D.; Bouhss, A.; Oyama, H.; Ichikawa, S.; and Matsuda, A. Mechanistic analysis of muraymycin analogues: a guide to the design of MraY inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8421-8439.

3. Chung, C. B.; Mashalidis, H. E.; Tanino, T.; Kim, M.; Matsuda, A.; Hong, J.; Ichikawa, S.; Lee, S.-Y. Structural insights into inhibition of lipid I production in bacterial cell wall synthesis. *Nature* **2016**, *533*, 557-561.

4. Yoo, J.; Mashalidis, E. H.; Kuk, A. C. Y.; Yamamoto, K.; Kaeser, B.; Ichikawa, S.; Lee, S.-Y. GlcNAc-1-P-transferase-tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 217-224.

5. Yamamoto, K.; Sato, T.; Hao, A.; Asao, K.; Kaguchi, R.; Kusaka, S.; Ruddaraju R. R.; Kazumori, D.; Seo, K.; Takahashi, S.; Horiuchi, M.; Yokota, S.-I.; Lee, S.-Y.; Ichikawa, S. *ChemRxiv* **2023**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2023-2w411

SL-3

糖鎖を提示した粒子のサイズと形状が単核貪食細胞からのIL-12の産生と獲得免疫の方向性を決定する

○小島 直也(東海大・工・生命化学科)

The size and shape of glycan-presenting particles determine IL-12 production from mononuclear phagocytes and direction of acquired immunity

○Naoya Kojima (Dept. Applied Biochemistry, Tokai Univ.)

マクロファージなどの単核貪食細胞による微生物の表層糖鎖を介した食作用は、炎症反応とその後の獲得免疫応答を引き起こす重要なプロセスだが、糖鎖を介した食作用がIL-12の産生と細胞性免疫誘導にどのように関連しているかは完全には理解されていない。微生物を適切な粒子サイズを持つ糖鎖提示粒子と捉えれば、単純な糖鎖のみを提示している粒子に対する単核貪食細胞の応答を評価することで、免疫応答に関する新しい視点を提供できると思われる。本講演では、糖鎖を提示した人工粒子に対する単核貪食細胞の応答の例として、オリゴマンノース提示リボソーム(OML)と乳酸菌の形状を保持しているintact cell wall(ICW)に対する応答について、粒子のサイズと形状といった視点から考えてみたい。

抗原を封入したOMLをマウスに投与すると、オリゴマンノースに依存した単核貪食細胞からのIL-12の産生を伴って病態制御可能な抗原特異的細胞性免疫が誘導される。OMLにはこの応答を誘導するのに必要な閾値となる粒子サイズが存在しており、500nm未満のOMLではこれらの応答は観察されなくなる。一方、壁テイコ酸(WTA)を発現している*L. plantarum*のICWによる刺激に反応して、骨髄由来マクロファージは食作用依存的にIL-12を産生する。しかし、この能力は、ICWからWTAだけを除去すること、またはICWを繊維状に破壊することで完全に失われる。これらの知見は、粒子のサイズと形状が特定の糖鎖の認識を起点とした食作用とIL-12の産生誘導及びその後の獲得免疫応答の方向性を決定していることを示唆している。粒子のサイズと形状は粒子上の糖鎖の空間構成に影響を与えるため、単核貪食細胞は糖鎖の空間構成を認識し粒子を貪食することでIL-12の産生を誘導していると考えられる。

PS

北海道から細菌学を発信する

コンピーナー：横田 伸一（札幌医科大学）
東 秀明（北海道大学）

Disseminating Bacteriology from Hokkaido

Conveners: Shinichi Yokota (Sapporo Medical University)
Hideaki Higashi (Hokkaido University)

PS-1

北海道で One Health 的に展開してきた真菌研究

○豊留 孝仁^{1,2,3}（¹帯畜大・獣医，²帯畜大・動食検診セ，³千葉大・真菌セ）

Our fungal research developed in Hokkaido with the One Health concept

○Takahito Toyotome^{1,2,3}（¹Dept. Vet. Med., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.,
²Diagn. Cent. Anim. Health Food Saf., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.,
³Med. Mycol. Res. Cent., Chiba Univ.）

真菌は、ヒトや動物を取り巻く環境の一部として我々と密接に関わっている。このような環境中の真菌種にはヒトや動物に感染症を起こす種も存在している。*Aspergillus fumigatus* は、ヒトや動物にアスペルギルス症という感染症を起こす真菌である。本菌種も環境中に普遍的に存在しており、特に土壌を主な生息場所としている。鳥類はアスペルギルス症の感受性が高いとされており、鳥類の中でもペンギン種は暑熱ストレスなどを受けることで、さらに罹患のリスクが高まる。これまでに北海道の一水族館と共同で屋外飼育を伴うペンギン種のアスペルギルス症について、感染予防対策を立案・実施し、その成果を報告してきた。この対策の中では、ペンギンが接触する環境を考慮にいれる事が非常に重要であった。一方、環境中で抗真菌薬耐性 *A. fumigatus* が拡散していることが近年明らかとなってきており、北海道も例外ではないことがわかってきている。このような耐性菌の出現や拡散、そして耐性菌の拡散を防ぐ対策を考える上でも *A. fumigatus* の環境における生息場所やその特性ともいえる普遍性を考慮に入れることが重要と考えられている。本発表では、ヒトと動物、そして環境を含めたワンヘルスの観点から、私達の研究成果について紹介をした。

PS-2

分子細菌学的 One Health アプローチ

○北尾 公英，東 秀明（北大・人獣共通感染症国際共同研究所 感染・免疫部門）

Molecular Bacteriological One Health Approach

○Tomoe Kitao, Hideaki Higashi (Div. Infect. and Immun., International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ.)

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所、感染・免疫部門では、ミクロからマクロまで詳細な細菌感染機構を理解するための基礎研究に取り組んでいます。部門発足以来、炭疽菌感染の実態を捉えるべく流行地域へ赴き、比較ゲノム解析を中心に同菌の病原性発現に関わる遺伝子について研究してきました。現在は、これまでに得られた知見に基づく新たな予防・治療法開発に向けて、生化学的、分子生物学的手法による病原性メカニズムの解明に取り組んでいます。今年度から、レジオネラや緑膿菌の病原性に関する研究なども行っています。ワンヘルスの観点から求められる課題を含め、当部門の研究についてお話しさせていただきます。

In the Division of Infection and Immunity at Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control, we are engaged in basic research to understand the detailed bacterial infection mechanisms from the micro to macro levels. To date, we have conducted fieldwork in epidemic regions to grasp the reality of anthrax infections and performed comparative genomic analyses of genes related to bacterial virulence. Based on the insights gained so far, we are currently working on elucidating the virulence mechanisms of *Bacillus* by biochemical and molecular biological approaches towards the development of new therapy and preventive methods. This year we also started basic research about *Legionella* and *Pseudomonas*. In this talk, we will introduce our research projects including future perspectives of One Health.

PS-3

Accelerating infectious disease research from Asahikawa

○原 英樹（旭川医大・医・感染症学）

○Hideki Hara (Dept. Infect. Dis., Asahikawa Med. Univ.)

Infectious diseases are defined as adverse symptoms resulting from the interaction between microorganisms and hosts. To understand the pathogenesis of infections, our laboratory has been investigating both bacterial virulence factors and host immune responses. To date, we have elucidated novel functions of toxins and mechanisms that regulate the activity of virulence factors. In addition, it has been revealed that the inflammatory responses, which was previously thought to play a protective role in infection, can exacerbate infections. In this talk, I will introduce our laboratory along with these latest insights.

PS-4

Intersection Pathways: Chronic Periodontitis, Cognitive Decline, and Emerging Therapeutic Frontiers

○李 智媛, 長谷部 晃 (北大・院・歯・微生物学)

○Ji-Won Lee, Akira Hasebe (Microbiology, Dept. Oral Pathobiological Science, Fac. and Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ.)

Chronic periodontitis, a prevalent inflammatory condition affecting the supporting structures of the teeth, has long been recognized for its impact on oral health. Emerging evidence suggests a significant association between chronic periodontitis and cognitive decline, illuminating a complex intersection between oral health and neurological function. While gingipains produced by *Porphyromonas gingivalis* have been identified in the brains of AD patients, a direct causal relationship has not been conclusively proven. We recently have started study about inflammation response associated with *P. gingivalis* recognized as a potential risk factor for transitioning to Alzheimer's disease. In this symposium, we review and discuss the multifaced pathways linking chronic periodontitis and cognitive decline, shedding light on the underlying mechanisms and therapeutic opportunities at this intriguing intersection.

PS-5

ボツリヌス毒素の機能解析：毒素作用から生まれる新たな応用

○宮下 慎一郎, 相根 義昌 (東京農大・生物産業・食香粧化学)

Functional Analysis of Botulinum Toxin: New Applications Emerging from Toxin Action

○Shin-Ichiro Miyashita, Yoshimasa Sagane (Dept. Food Aroma Cosme. Chem., Fac. Bio-ind., Tokyo NODAI)

北海道で1951年に起きた日本初のボツリヌス中毒から、およそ70年が経過する。その間、ボツリヌス中毒の発生メカニズムが解明されたこと、加えて食品加工における衛生観念が浸透したことで、この病気は現在では非常に稀なものとなった。ボツリヌス中毒は弛緩性の神経麻痺を特徴としており、この原因物質は *Clostridium botulinum* 由来のボツリヌス神経毒素 (BoNT) である。BoNT は自然界では無毒タンパク質 (NAPs) と結合して毒素複合体 (TC) を形成し、経口摂取されると消化されずに小腸まで到達する。体内に侵入した BoNT は神経細胞膜の受容体に結合し、神経伝達物質の放出に与する SNARE タンパク質を切断して神経伝達を遮断する。BoNT は自然界で最も毒性が高い毒物の一つであり、中毒の予防法の開発あるいは神経細胞内の毒素を標的とした抗体治療法による病床期間の短縮が望まれる。本毒素の強力な毒性と生物学特性は潜在的に脅威とみなされる一方、致死量に満たない BoNT を利用したボツリヌス毒素製剤はジストニアや過活動膀胱の治療において非常に効果的である。

本セッションでは我々の最近の研究成果から、1) BoNT に結合した NAPs の経口毒性における機能解析、2) 新しいボツリヌス毒素製剤としてのモザイク毒素の機能評価、3) 無毒化 BoNT を利用した新しい抗体送達プラットフォームの開発について紹介し、ボツリヌス毒素の今後の可能性について議論したい。

PS-6

Characterization of three flagellins using the gene deletion mutants in *Treponema denticola*

○邱 辰軒, 永野 恵司 (北海道医療大・歯・微生物)

○Chen-Hsuan Chiu, Keiji Nagano (Div. Microbiol, Sch. Dent., Health Sci. Univ. Hokkaido)

The oral spirochete *Treponema denticola* is implicated in the progression of human periodontal disease. The flagellar filament of *T. denticola* consists of three flagellins, FlaB1, FlaB2, and FlaB3, with high amino acid sequence homology. In this study, we constructed and characterized *T. denticola* mutants with all combinations of FlaB protein deletions. We used a derivative strain of ATCC 35405, which lacks a phage-derived region, as the parent strain, for it exhibited higher efficiency in constructing mutants. Deletion of *flaB* genes abolished the expression of the corresponding proteins while the remaining gene products were expressed. FlaA, a flagellar sheath protein, was detected in all mutants except Δ *flaB123*. The bacterial density at the plateau phase was lower or tended to be lower in Δ *flaB1*, Δ *flaB12*, Δ *flaB23* and Δ *flaB123*, compared to the parent strain. The cell length was significantly longer in Δ *flaB12*, Δ *flaB23*, and Δ *flaB123*. Rotation rates were increased in Δ *flaB2* and Δ *flaB23*. However, this is not always consistent with a spreading assay on a soft agar medium. On the other hand, Δ *flaB123* lost its rotation completely and showed no spreading on a soft agar plate. Collectively, mutations of *flaB* genes cause differences in morphology, growth, and motility in *T. denticola*. These results suggest that these FlaB proteins have functional differences.

PS-7

獣医学から薬剤耐性菌問題への One Health Approach

○前田 愛子¹, 佐藤 豊孝^{2,3}, 岡田 佳帆², 鈴木 章夫^{2,3}, 小松 勇介², 堀内 基広^{2,3} (¹北大・国際感染・獣医衛生, ²北大・獣医・獣医衛生, ³北大・OHRC)

One Health Approach from Veterinary Medicine to Antimicrobial Resistance

○Aiko Maeda¹, Toyotaka Sato^{2,3}, Kaho Okada², Akio Suzuki^{2,3}, Yusuke Komatsu², Motohiro Horiuchi^{2,3} (¹Lab. Vet. Hyg., Sch. Inf., Hokkaido Univ., ²Lab. Vet. Hyg., Sch. Vet., Hokkaido Univ., ³OHRC, Hokkaido Univ.)

演者が所属する北海道大学大学院獣医学研究院・国際感染症学院・獣医衛生学教室では、教員3名、博士研究員1名、技術職員1名、事務職員1名、博士課程大学院生5名が所属し、獣医学分野や One Health Approach に基づいた幅広い研究活動を行っている。具体的には、ブリストン病・難治性神経変性疾患に関する研究、薬剤耐性菌に関する研究、食品媒介感染症に関する研究などである。加えて、JICA 技術協力プロジェクト「モンゴル国獣医・畜産分野人材育成能力強化プロジェクト」などを通じた国際協力活動や共同研究も展開している。博士課程3年である演者は、薬剤耐性菌のさらなる拡散の抑制と One Health Approach に基づく薬剤耐性菌対策に資する科学的知見の創出を目指した研究を行っている。中でも、フルオロキノロン耐性大腸菌クローン ST131 に着目した分子疫学的解析および生体内定着機構の解析に関する研究を全ゲノム解析や Transposon-directed sequencing 解析などの様々な細菌学的手法を用いて行っている。ST131 は国際的にヒトの臨床現場に拡散しているハイリスククローンであり、尿路感染症や血流感染症などの原因となる。近年、ST131 はヒトの臨床現場だけでなく、健康なヒトや伴侶動物 (イヌやネコ) からの分離報告もなされており、地域社会における ST131 の定着とヒトと伴侶動物間での伝播が危惧されるが、その拡散・定着・循環様式には不明な点が多い。演者の札幌市内のヒト、伴侶動物、家畜および下水由来フルオロキノロン耐性大腸菌株の遺伝的類似性を比較した分子疫学的解析では、同市中内における ST131 のヒトと伴侶動物間での循環・定着様式が明らかになってきた。本演題ではこれらについて紹介したい。

PS-8

北海道における小児由来肺炎球菌の血清型分布の経年的変化（2011～2023）

○川口谷 充代¹, 漆原 範子¹, Meiji Soe Aung¹, 伊藤 政彦², 小林 宣道¹
(¹札幌医科大学・衛生学, ²札幌臨床検査センター)

Secular changes in the serotype distribution of pediatric pneumococci in Hokkaido, 2011-2023

○Mitsuyo Kawaguchiya¹, Noriko Urushibara¹, Meiji Soe Aung¹, Masahiko Ito², Nobumichi Kobayashi¹ (¹Dept. Hygiene, Sapporo Med. Univ., Sch. Med., ²Sapporo Clinical Laboratory Inc.)

【背景】小児に対する肺炎球菌結合型ワクチン（PCV）の導入後、ワクチンの予防効果に伴うワクチン非含有血清型による肺炎球菌感染症の増加およびその薬剤耐性が临床上問題となっている。本研究では、2011年から2023年に分離された小児由来肺炎球菌の血清型分布の経年変化と薬剤耐性傾向について報告する。【対象・方法】2011年～2023年に北海道内の医療機関から集められた小児由来非侵襲性肺炎球菌4752株を対象とし、I-VIIの期間 [I. 998株: 2011年, II. 975株: 2013年4-10月, III. 873株: 2013年11月-2014年11月, IV. 678株: 2016年, V. 460株: 2018年7月-2019年1月, VI. 415株: 2020年, VII. 2023年: 353株] における血清型分布を調査した。血清型の判別は米国CDCのウェブサイト (<https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html>) に記載されている多重PCR法を、血清型群6, 15, 24亜型の判別には我々が考案した鑑別法を用いた。薬剤感受性は、微量液体希釈法を用いて判定した。【結果と考察】最新の2023年の調査では、全体の96.9%がPCV13に含まれない血清型に属し、最も優勢な3つの血清型23A (16.1%), 35B (15.3%), 15A (10.5%)の多く(≥81.5%)が多剤耐性であった。本研究から現在の定期接種ワクチンであるPCV13のカバー率が、60.3% (期間I), 24.9% (期間III), 3.1% (期間VII)へと有意に減少していることが明らかとなった。約13年間にわたる一連の研究により、小児に対するPCV導入以降、ワクチンカバー率の低下に伴う非PCV13血清型の増加が確認されたことから、PCV導入期における血清型分布を調査することは、今後の新規PCV開発の上でも重要であると考えられた。

PS-9

低酸素環境における *Chlamydia trachomatis* のヒト細胞内適応機構の探索

○大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

Exploring mechanisms of intracellular adaptation of *Chlamydia trachomatis* by hypoxic culture

○Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci, Hokkaido Univ.)

Chlamydia trachomatis (以下クラミジア) は偏性細胞内寄生菌で、国内で年間約3万件の発生報告がある性器クラミジア症の原因菌である。感染時には子宮頸管炎や不妊等が生じるのに加え、子宮頸がんのリスク因子となることから、その病態形成の制御に向けてクラミジアの細胞内増殖機構の解明が重要となる。また、クラミジアの主な感染部位である子宮頸管部は酸素濃度5%以下の低酸素環境であり、炎症時にはさらに低下するため、クラミジアは低酸素環境に適応していると予想される。一方、本菌は二相性増殖サイクルなどの特殊性状を有するために遺伝子導入が依然として困難であり、感染時の分子機構には未だ不明な点が多く残されている。本研究では低酸素下で生じるクラミジア感染細胞の分子機構の変化を調べるため、低酸素下でのクラミジア感染実験を実施した。クラミジア (L2 434/Bu 株) をHEp-2細胞に感染させ低酸素下(2%)で培養すると通常酸素下(21%)と比べて10~100倍増加した。またクラミジアは通常酸素下では感染細胞のミトコンドリアとp38 MAPKを要求するが、低酸素下では感染細胞のPI3K/AKT経路の活性化が生じており、クラミジアが利用する感染細胞の代謝経路を酸素分圧に応じて変えたことによるものと考えられた。PCRアレイにより、クラミジア感染細胞では解糖系代謝酵素の発現亢進がみられた。これらの結果は、クラミジアは低酸素条件下での細胞環境によく適応していることを示すとともに、クラミジアは自身の生存が有利になるよう感染細胞の代謝系を巧みに改変することを示唆している。

JKISM-S1

シンポジウム 1

コンピーナー：住友 倫子（徳島大学）
Eun-Kyeong Jo (Chungnam National University)

Symposium 1

Conveners: Tomoko Sumimoto (Tokushima University)
Eun-Kyeong Jo (Chungnam National University)

JKISM-S1-1

腸内細菌由来代謝産物は *Candida albicans* の腸管定着を阻害する

○後藤 義幸, Bonita McCuaig (千葉大・真菌・感染免疫)

Metabolites from microbiota provide colonization resistance against *Candida albicans* in the gut

○Yoshiyuki Goto, Bonita McCuaig (Div. Mol. Immunol., MMRC., Chiba Univ.)

Candida albicans is an opportunistic fungus in the human gut. Recent reports have shown that *C. albicans* is associated with the development of invasive candidiasis. Although several groups have reported that commensal bacteria prevent the colonization of *C. albicans* in the gut, the molecular and cellular mechanisms are still largely unknown. Using a series of antibiotic-treated mice and NGS analysis, we found that Enterobacteriaceae have the potential to prevent *C. albicans* colonization. We further isolated Enterobacteriaceae and confirmed that these bacteria prevent *C. albicans* colonization using gnotobiotic mice. To identify bacteria-derived metabolites responsible for colonization resistance against *C. albicans*, we performed a metabolome analysis of feces from mice that allow or are resistant to *C. albicans* colonization. In addition, we found that the supernatant of the culture medium of isolated Enterobacteriaceae has the potential to kill *C. albicans*. After purification and GC-MS, LC-MS, and NMR analysis, we identified that indole derivatives had fungicide effects. Using CRISPR/Cas9-based genome editing, we created a bacterial strain that defects indole derivatives. In contrast to the wild-type strain, the strain failed to kill *C. albicans*. These results indicate that commensal bacteria produce indole derivatives for preventing *C. albicans* colonization in the gut.

JKISM-S1-2

Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to cathepsin B-mediated pyroptosis in murine macrophages

○Jin Kyung Kim¹, Hui-Jung Jung², Miri Hyun³, Ji Yeon Lee³, Jong-Hwan Park⁴, Seong-II Suh², Won-Ki Baek², Hyun ah Kim³ (¹Keimyung Univ. Sch. Med., ²Dept. Microbiology, Keimyung Univ. Sch. Med., ³Dept. Infectious Diseases, Keimyung Univ. Sch. Med., ⁴College of Veterinary Med., Chonnam National Univ.)

Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) has emerged as a clinically significant global pathogen in the last decade. However, the host immune responses of the macrophages during hvKp infection are largely unknown. In the present study, we aimed to compare the cytotoxic effects of hvKp and classical *K. pneumoniae* (cKp) in murine macrophages. We found that the activation of caspase-1 (Casp-1)-dependent pyroptosis was higher in cKp-infected macrophages compared with that in hvKp-infected macrophages. In *Casp-1* deficiency macrophages, pyroptosis diminished during infection. Both hvKp and cKp strains led to nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome formation and lysosomal cathepsin B activation, thus resulting in pyroptosis. Compared with the cKp strain, the hvKp strain inhibited these phenomena in murine macrophages. HvKp infection resulted in different levels of pyroptosis via the activation of cathepsin B-NLRP3-Casp-1 in murine macrophages. Therefore, the manipulation of pyroptotic cell death is a potential target for host response during hvKp infection in macrophages.

JKISM-S1-3

Microcolony formation and pathogenicity in urinary tract cells of uropathogenic *Escherichia coli*

○平川 秀忠 (群馬大・医・細菌)

○Hidetada Hirakawa (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ.)

Urinary tract infections (UTIs) are estimated to affect more than 150 million people annually. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the most common pathogen responsible for UTI. Although pathogens that invade the urinary tract are normally excreted with urine, UPEC adheres to and invades the epithelial cells of the urinary tract system and forms biofilm-like microcolonies that are resistant to urinary excretion. In addition, UPEC is resistant to various antimicrobial agents and innate immunity, making UTI caused by UPEC a high risk for refractory disease. We are interested in elucidating the mechanisms of microcolony formation and virulence expression of UPEC. We have previously shown that flagella, in addition to fimbria, contribute to the microcolony formation and virulence of UPEC. We have also identified some regulatory elements of the flagellum. We have confirmed that these mutants have low infection efficiency and low micro-colony formation ability in transurethral infected mice. On the other hand, certain environmental signals, such as iron deficiency and extracellular cytidine, promote microcolony formation, indicating that microcolony formation and virulence of UPEC are mediated by a complex regulatory system. In this talk, we will introduce the virulence theory of UPEC and the mechanisms of pathogenicity control, including microcolony formation.

JKISM-S1-4**Comparative proteomics reveals antiviral restriction factors associated with replicated HSV-1 DNA**

○Eui Tae Kim¹, Joseph M. Dybas², Matthew D. Weitzman³ (1Jeju National Univ. College of Med., 2The Children's Hospital of Philadelphia, 3Univ. Pennsylvania Sch. Med.)

Viruses exploit host ubiquitin systems to reshape cellular proteomes and counter defenses. HSV-1's ICP0 protein, an E3 ubiquitin ligase, facilitates infection by degrading antiviral factors. To identify ICP0's substrates, we compared wild-type HSV-1 and ICP0-deficient mutant infections using proteomics. We immunoprecipitated ubiquitinated proteins, profiled protein abundance changes, and isolated proteins on replicated viral genomes using click-chemistry. Integration of these datasets revealed proteins ubiquitinated and degraded. Among them was SLFN5, which associates with the viral genome without ICP0. HSV-1 infection rapidly depleted SLFN5, and ICP0 was necessary and sufficient for its proteasomal degradation. SLFN5 depletion enhanced HSV-1 replication, while its overexpression repressed it. SLFN5 knockdown increased viral gene transcription and RNA polymerase II recruitment to viral promoters, suggesting SLFN5 restricts HSV-1 by limiting viral transcription. Our proteomics approach provides a comprehensive view of viral-host interactions, elucidating ICP0's role in viral takeover of cellular processes. These insights inform novel antiviral strategies targeting key host-virus interfaces.

JKISM-S1-5**新規感染症治療薬の開発におけるカイコモデルの有用性**

○浜本 洋 (山形大・医・感染症)

The utility of silkworm models in the development of novel infectious disease therapeutics

○Hiroshi Hamamoto (Dept. Infect. Dis., Yamagata Univ. Fac. of Med.)

The development of novel therapeutic agents based on innovative mechanisms of action is urgently needed to combat antimicrobial resistance (AMR). Traditionally, the exploration of compounds targeting factors essential for in vitro growth has been believed to be saturated. In fact, only a few new classes of antimicrobial agents have been developed that demonstrate therapeutic efficacy, and most new developments are based on improving existing products. As major pharmaceutical companies withdraw from antimicrobial development, drug discovery in academia requires simple, low-cost, ethical animal models. We focused on the silkworm model to establish a quantitative evaluation system for antimicrobial efficacy. We compared the pharmacokinetics and pathogenicity of bacteria in silkworms and mice, affirming silkworm reliability for drug discovery. Various researchers have established infection models using silkworms with multiple species of bacteria, including *Staphylococcus aureus*, fungi, and acid-fast bacilli. Several novel antibiotics have been identified using these models, including lysocin E. In this presentation, I will introduce the appeal of silkworm models, which have been studied for over 20 years, and discuss the results and applications of these models to date.

JKISM-S1-6**The gut microbiome pair of *Oribacterium* sp. GMB0313 and *Ruminococcus* sp. GMB0270 provide complete protection against COVID-19 and Influenza**

○Seong-Tshool Hong¹, Sura Kim¹, Hee-Suk Chae¹, Hea-Jong Chung² (1Jeonbuk National Univ. Medical Sch., 2Korea Basic Science Inst.)

Despite the potential protective role of the gut microbiome against viral infections such as COVID-19 and influenza, specific microbes that confer resistance have not yet been widely identified. We have recently identified and validated gut microbes that offer protection against both COVID-19 and influenza. These protective gut microbes were first discovered through a fecal microbiota transplantation (FMT) from an individual without a history of COVID-19 infection or immunization into a lethal COVID-19 hamster model. This FMT from the COVID-19-resistant donor led to significant phenotypic changes in the hamsters' sensitivity to COVID-19. Metagenomic analysis highlighted distinct differences in the gut microbiome composition among the hamster groups, leading to the identification of two previously unknown bacterial species, *Oribacterium* sp. GMB0313 and *Ruminococcus* sp. GMB0270, both associated with resistance to COVID-19. Following this, we conducted a proof-of-concept confirmation experiment adhering to Koch's postulates. Oral administration of this microbial pair to the hamsters provided complete protection against SARS-CoV-2 infection through the activation of CD8+ T cell-mediated immunity. Additionally, administering this same microbial pair orally to an influenza mouse model also conferred complete protection against influenza. The prophylactic efficacy of these microbes against both COVID-19 and influenza was found to be comparable to, or even superior to, current vaccines, including mRNA vaccines. This remarkable efficacy suggests that the microbial pair could be developed as a host-directed universal vaccine for a range of respiratory infections, potentially including future emerging viruses.

JKISM-S1-7**全ゲノム配列を用いた腸管出血性大腸菌のサーベイランス**

○李 謙一 (感染研・細1)

Whole genome sequence-based surveillance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

○Ken-ichi Lee (Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis.)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC is a foodborne pathogen, which causes more than 3,000 infection/year in Japan. For early detection and prevention of the spread of the outbreak, nationwide surveillance using molecular typing has been conducted. For a next-generation tool of molecular surveillance, we have developed automated WGS-based surveillance tools, which include assembly, quality check, and single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. These tools enable to compare between local isolate data and hundreds of thousands of genomic data in public databases. The criteria SNP values for outbreak were comparable to previous studies, but some precautions were identified. Currently, we are conducting WGS-based surveillance on a trial basis. As a result of WGS-based surveillance, several findings have been made: (i) Most of EHEC that causes hemolytic uremic syndrome possess locus of enterocyte effacement (LEE), but LEE-negative EHEC isolates from the patients share common virulence factors, (ii) WGS can accurately identify the transmission route of an antimicrobial resistance plasmid, (iii) the Stx phages contributing to a large-scale foodborne outbreak may be spreading internationally. To reduce the harm caused by EHEC infections, rapid and precise elucidation of transmission routes using WGS analysis will be required in the future.

ポスター発表

コンピーナー：藤猪 英樹 (慶應義塾大学)
Yong-Woo Jung (Korea University)

Poster presentation

Conveners: Hideki Fujii (Keio University)
Yong-Woo Jung (Korea University)

P3-001

腸内細菌由来代謝産物は *Candida albicans* の腸管定着を阻害する

○後藤 義幸, Bonita McCuaig (千葉大・真菌・感染免疫)

Metabolites from microbiota provide colonization resistance against *Candida albicans* in the gut

○Yoshiyuki Goto, Bonita McCuaig (Div. Mol. Immunol., MMRC., Chiba Univ.)

Candida albicans is an opportunistic fungus in the human gut. Recent reports have shown that *C. albicans* is associated with the development of invasive candidiasis. Although several groups have reported that commensal bacteria prevent the colonization of *C. albicans* in the gut, the molecular and cellular mechanisms are still largely unknown. Using a series of antibiotic-treated mice and NGS analysis, we found that Enterobacteriaceae have the potential to prevent *C. albicans* colonization. We further isolated Enterobacteriaceae and confirmed that these bacteria prevent *C. albicans* colonization using gnotobiotic mice. To identify bacteria-derived metabolites responsible for colonization resistance against *C. albicans*, we performed a metabolome analysis of feces from mice that allow or are resistant to *C. albicans* colonization. In addition, we found that the supernatant of the culture medium of isolated Enterobacteriaceae has the potential to kill *C. albicans*. After purification and GC-MS, LC-MS, and NMR analysis, we identified that indole derivatives had fungicide effects. Using CRISPR/Cas9-based genome editing, we created a bacterial strain that defects indole derivatives. In contrast to the wild-type strain, the strain failed to kill *C. albicans*. These results indicate that commensal bacteria produce indole derivatives for preventing *C. albicans* colonization in the gut.

P3-003

細菌由来膜小胞のがん治療効果増強に向けた磁性ナノ粒子封入

○長坂 有志¹, 鈴木 千博², 二又 裕之^{1,3}, 大多 哲史¹, 田代 陽介¹ (静大院・総合科技, ²静大工, ³静大・グリーン研)

Magnetic Nanoparticle Encapsulation of Membrane Vesicles to Enhance Cancer Therapy Effectiveness

○Yushi Nagasaka¹, Chihiro Suzuki², Hiroyuki Futamata^{1,3}, Satoshi Ota¹, Yosuke Tashiro¹ (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ²Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Shizuoka Univ., ³Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

グラム陰性菌が放出する膜小胞は、直径約 100 nm の脂質二重膜から構成される生体微粒子であり、長期的な抗腫瘍免疫反応を効果的に誘導する。しかし、効率の向上が必須であり、実用化には至っていない。本研究では、細菌由来膜小胞内に磁性ナノ粒子を封入することで、ハイブリッド微粒子「磁性膜小胞」を作製し、膜小胞の免疫誘導と磁性ナノ粒子の発熱という 2 つのプロセスの相乗効果によるがん治療効果増強を目的とした。膜小胞の免疫活性がより高いことで知られるプロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) ベン毛欠損株を培養した。培養上清から抽出した膜小胞と磁性ナノ粒子 synomag (Micromod) を混合し、エクストルーダー (Avanti) による押し出し後、磁気分離を行った。その後、各微粒子のタンパク質量を Bradford 法で行ったところ、磁性微粒子に十分量のタンパク質が検出され、膜小胞との複合微粒子形成が示唆された。また、ナノトラック解析 (NTA) と SEM 観察から、膜小胞コーティング後の粒子径増大が確認された。以上により、膜小胞内への磁性ナノ粒子封入が示された。次に、各微粒子の免疫細胞への影響を調べた。その結果、磁性ナノ粒子と比べ、磁性膜小胞添加時のマクロファージによる貪食能が向上した。また、磁性膜小胞のマクロファージへの細胞障害性は低いものの、がん治療に重要な炎症性サイトカインである IL-6 を産生することが示された。本研究ではがん治療に有効な磁性膜小胞の作製法を確立した。今後は、培養細胞、モデルマウスを用いてがん腫瘍に対する免疫誘導能および安全性について評価する。

P3-004

Antimicrobial resistance of *emm89 Streptococcus pyogenes* isolates from patients throughout Japan

○Weichen Gong¹, 大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也^{1,2}, 元岡 大祐³, 広瀬 雄二郎¹, 奥野 ルミ⁴, 池辺 忠義⁵, 川端 重忠¹ (1) 阪大・歯・微生物, (2) 阪大・歯・バイオインフォ, (3) 阪大・微研・ゲノム解析, (4) 東京健安研セ・微生物, (5) 感染研・細菌一部)

○Weichen Gong¹, Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi^{1,2}, Daisuke Motooka³, Yujiro Hirose¹, Rumi Okuno⁴, Tadayoshi Ikebe⁵, Shigetada Kawabata¹ (1) Dept. Microbiol. Sch. Dent., Osaka Univ., (2) Dept. Info., Sch. Dent., Osaka Univ., (3) NGS Core Facility, RIMD., Osaka Univ., (4) Dept. Microbiol., Tokyo Metropolitan Inst. of Public Health, (5) Dept. Bacteriol. I., NIID)

Streptococcus pyogenes is involved in a wide range of diseases including pharyngitis and life-threatening invasive infections. Increasing antimicrobial resistance (AMR) has been reported worldwide for various bacteria, which limits antibiotics use for infection cases. The present study investigated the AMR of *S. pyogenes emm89* strains, which have recently shown an increasing trend in Japan. Examined were 311 *emm89* strains previously isolated from patients with invasive and non-invasive infections throughout Japan. Following the Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, the minimum concentrations of six antibiotics, including penicillin-G, azithromycin (AZM), and clindamycin (CLI), for inhibition of the isolates were determined. In addition, genomes for AMR-associated genes were screened using the ARIBA software tool. Thirty-two AMR strains were identified, of which 84.38% showed resistance to AZM and/or CLI. Furthermore, there was a significantly higher correlation of non-invasive as compared to invasive infections showing AMR. Genomic analysis revealed a wide distribution of three genes related to AMR, *ermT*, *folP*, and *lmrP*, in the *emm89* strains. The high prevalence of *S. pyogenes* bacteria resistant to AZM and/or CLI poses a threat to public health in Japan, thus development of next-generation antimicrobial therapy is urgently needed.

P3-005

乳酸菌から単離した胆汁酸耐性と抗生物質耐性を同時に付与する両機能性酵素の機能解析

○草田 裕之, 玉木 秀幸 (産総研・生命工学・生物プロセス)

Bile salt hydrolase degrades β -Lactam antibiotics and confers antibiotic resistance on *Lactobacillus*

○Hiroyuki Kusada, Hideyuki Tamaki (BPRI., Dept. Life Sci. Biotechnol., AIST.)

Bile salt hydrolase (BSH) is a well-known enzyme related to bile detoxification and colonization of lactic acid bacteria in the human gastrointestinal tract. In the present study, we isolated and purified two putative BSH proteins from the probiotic bacterium *Lactobacillus paragasseri* and demonstrated their bifunctional activity capable of degrading not only bile salts but also the penicillin (β -lactam antibiotic). Although antibiotic resistance and bile detoxification have been separately recognized as different microbial functions, our findings suggest that bifunctional BSHs simultaneously confer ecological advantages to host gut bacteria to improve their survival in the mammalian intestine by attaining a high resistance to bile salts and β -lactams. *L. paragasseri* actually showed resistance to both bile salts and β -lactam antibiotics, suggesting that bifunctional BSHs may be involved in this multi-resistance of the isolate. We further verified that such bifunctional enzymes were broadly distributed among the phylogeny, suggesting that the bifunctionality may be conserved in other BSHs of gut bacteria. Our findings further suggest that the hitherto-overlooked penicillin-degrading activity could be a potential new target for the probiotic function of lactic acid bacteria.

P3-006

抗ブドウ球菌エンドライシンのリンカー領域が機能に与える影響

宗友 荘介¹, ○内山 淳平², 内山 伊代², Wanganuttara Thamonwan², 津久井 利広³, 萩谷 英大⁴, 山本 由弥子², 神田 秀幸¹, 松下 治² (¹岡山大・院医歯薬・公衆衛生, ²岡山大・院医歯薬・病原細菌, ³日本全薬工業, ⁴岡山大学病院・感染症内科)

Functional impact by shorting a linker region of a staphylococcal endolysin

Sosuke Munetomo¹, ○Junpei Uchiyama², Iyo Uchiyama², Wanganuttara Thamonwan², Toshihiro Tsukui³, Hideharu Hagiya⁴, Yumiko Yamamoto², Hideyuki Kanda¹, Osamu Matsushita² (¹Dept. Pub. Heal., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ³Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., ⁴Dept. Infect. Dis., Okayama Univ. Hosp.)

Background: Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. present challenges in clinical and veterinary settings. Phage-encoded peptidoglycan-degrading enzyme, endolysin, is a promising antimicrobial agent. The linker of an enzyme has recently shown to be not only enzymatic activity but also stability. ORF93 is a novel endolysin derived from a giant phage S6 infecting *Staphylococcus* spp. We examined the influence by linker shortening on the endolysin characteristics using the staphylococcal endolysin ORF93.

Methods: Linker deletion mutants were designed, and their protein structures were predicted. Proteins were expressed using *Escherichia coli*. We compared the yield, antimicrobial spectrum, bacteriolytic activity, and cold storability.

Results and Discussion: We produced ORF93 and four linker deletion mutants: ORF93- Δ 05, ORF93- Δ 10, ORF93- Δ 15, and ORF93- Δ 20, with 5, 10, 15, and 20 amino acids removed from the linker, respectively. All endolysins, except ORF93- Δ 20, were produced and purified as a soluble form. ORF93 and the linker deletion mutants showed the same antimicrobial spectra against *Staphylococcus* spp. ORF93- Δ 15 showed the highest yield and bacteriolytic activity. In the cold storability experiment, only ORF93- Δ 10 showed a slight worse. These findings, along with other studies, indicate that linker is crucial in endolysin development.

P3-007

黄色ブドウ球菌の膜タンパク質から成るトキシン・アンチトキシンシステムの機能解析

○加藤 文紀 (広島大院・医)

Characterization of *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system composed of membrane proteins

○Fuminori Kato (Grad. Sch. Biomed. Heal. Sci., Hiroshima Univ.)

Whole genome sequences of various species are publicly available. However, there are a large number of hypothetical genes and it is particularly difficult to estimate the function of small proteins due to their smaller size. We are focusing on small proteins of less than 1000 amino acid residues in *Staphylococcus aureus*. Toxin-antitoxin (TA) systems consist of small proteins; a toxin inhibits essential cellular functions (such as DNA, RNA, and protein synthesis) and its cognate antitoxin neutralizes the toxicity. We have previously identified a new *S. aureus* TA system, TsaA/TsaT, consisting two predicted membrane proteins. In this study, we aimed to characterize the function of the *S. aureus* TsaA/TsaT TA system. TsaA/TsaT TA system is conserved among *Staphylococcus* species and, in addition, the broader region surrounding the *tsaAT* gene is well conserved across *Staphylococcus* species. Macromolecules assay and LIVE/DEAD staining showed that TsaT toxin causes cell membrane damage in *E. coli* and *S. aureus*. Furthermore, Subcellular localization analysis demonstrated that TsaT toxin and TsaA antitoxin are membrane proteins. Further, amino acids substitutions experiments showed that E63 in the TsaA antitoxin and five K in the TsaT toxin are involved in their neutralization reaction.

[Non-member collaborators: Masayori Inouye, Keiko Inouye (Rutgers University, USA)]

P3-008

Microbiological profiling of the surfaces of used-masks: Effects of non-woven fabric mask sprays

○Takashi Abe¹, Anna Wakui^{1,2}, Mirai Sekiguchi¹, Misato Miyazawa¹, Aya Sato¹, Miho Kawachi¹, Manami Imai¹, Shingo Maruyama¹, Hiroto Sano^{1,3}, Takuichi Sato¹ (¹Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ²Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare, ³Dept. Pathol., Nippon Dent. Univ. at Niigata)

Objectives: This study aimed to profile the microbiota on the surfaces of non-woven fabric masks after wearing, and to examine the effects of mask sprays on the microbiota.

Methods: After obtaining informed consent from six healthy subjects, the surface (lip area) of masks after wearing was wiped with a sterile cotton swab. On another day, masks after wearing were sprayed with mask spray of 5 companys' products (BiSCao Water; Etak Spray; Matsukiyo Aroma Mask Spray; Fumakilla Mask DE Block; and Gatsby Mask Refresh Aroma Mist), left to dry in the shade overnight, and then samples were taken. The samples were cultured anaerobically at 37°C on blood agar plates. The bacterial species were identified by 16S rRNA gene sequencing.

Results: The bacterial concentration of the surface of masks after wearing was $(1.5 \pm 0.9) \times 10^3$ CFU/mL; and among 334 isolates, *Cutibacterium* (79.3%), *Staphylococcus* (16.5%) and *Streptococcus* (2.4%) were predominantly recovered. In contrast, after sprayed (BiSCao Water, Etak, and Matsukiyo), the bacterial concentrations were 10^1 to 10^3 CFU/mL levels. On the other hand, few bacteria were detected after sprayed with Fumakilla and Gatsby.

Conclusions: These findings indicate that the bacterial concentrations from the surface of masks after wearing were 10^3 CFU/mL levels, and that spraying mask sprays substantially decreases the amount of bacteria.

P3-009

Molecular microbiological profiling of green tea bottled beverages

○Yuki Kato¹, Anna Wakui^{1,2}, Misato Miyazawa¹, Miho Kawachi¹, Takashi Abe¹, Aya Sato¹, Manami Imai¹, Haruna Sato¹, Rika Okabe¹, Takuichi Sato¹ (¹Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ²Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare)

Objectives: To explore the potential for storage and the safety of drinking leftover bottled tea beverages, we conducted a screening experiment on the growth of salivary bacteria in plastic bottles of tea.

Methods: Resting whole saliva was collected from 10 participants. The saliva samples were diluted to a bacterial concentration of 10³ CFU/mL, and inoculated into the test bottled beverages. The bottles were stored at 37°C for 24 h, then 1.0 mL of each sample was cultured anaerobically at 37°C on a blood agar plate. The bacterial species were identified by 16S rRNA gene sequencing.

Results: More than 60% of the samples of four types of green tea beverages showed higher bacterial levels after 1 day of storage, and former members of the genus *Lactobacillus* were specifically detected as the predominant bacteria (17.3%-100%). In contrast, more than 60% of the samples of two types of green tea beverages, *i.e.*, Soh-cha and Bold Oi Ocha, showed lower bacterial levels after 1 day of storage, and *Streptococcus* spp. were detected as the predominant bacteria (8.8%-66.7%).

Conclusions: These findings suggest that bacteria, particularly former members of the genus *Lactobacillus*, tend to grow in some green tea beverages with a neutral pH. In contrast, the tea beverages with less bacterial growth contained *Streptococcus* spp., and the leftovers may be safe to store and drink again.

P3-010

Clostridium perfringens α -toxin up-regulates plasma membrane CD11b expression on murine neutrophils

○竹原 正也¹, 阪口 義彦¹, 永浜 政博¹ (¹徳島文理大・薬・微生物, ²順天堂大・薬・微生物免疫学)

○Masaya Takehara¹, Yoshihiko Sakaguchi¹, Masahiro Nagahama¹ (¹Dept. Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ., ²Dept. Microbiol. Immunol, Fac. Pharm., Juntendo Univ.)

Gas gangrene caused by *Clostridium perfringens* type A infection is a highly lethal infection of soft tissue characterized by rapid spread of tissue necrosis. This tissue destruction is related to profound attenuation of blood flow accompanied by formation of platelet-leukocyte aggregates in the blood vessels. Several studies have identified α -toxin as a major virulence factor in the aggregate formation via activation of the platelet gpIIb/IIIa. Here, we show that α -toxin greatly and rapidly increases plasma membrane localization of CD11b, which binds to the platelet gpIIb/IIIa via fibrinogen, in mouse neutrophils. Interestingly, short-term treatment of α -toxin has little effect on gene expression profiles in neutrophils, and the toxin does not change the total protein expression levels of CD11b in whole cell lysates. The following analysis demonstrated that CD11b localizes to intracellular vesicles in intact cells, but the localization changed to the cytoplasmic membrane in α -toxin-treated cells. These results suggest that CD11b is recruited to the cytoplasmic membrane by α -toxin. Together, our results illustrate that the increase of cell membrane CD11b expression by α -toxin might be crucial for the pathogenesis of *C. perfringens* to promote formation of platelet-leukocyte aggregates, leading to rapid tissue necrosis due to ischemia.

P3-011

New regulatory network via ArcAB and quorum sensing system of *Vibrio cholerae* biofilm formation

○Jant Cres Caigoy¹, 成谷 宏文², 島本 敏¹, やん 智群^{3,4}, 島本 整¹ (¹広島大院・統合生命科学, ²十文字学園女子大・人間生活・食品開発, ³広島大院・生物圏科学, ⁴丸善製薬株式会社)

○Jant Cres Caigoy¹, Hirofumi Nariya², Toshi Shimamoto¹, Zhiqun Yan^{3,4}, Tadashi Shimamoto¹ (¹Grad. Sch. Int. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Grad. Sch. Human Life Sci. Jumonji Univ., ³Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ., ⁴Res. Cent. Maruzen Pharm. Co. Ltd.)

Vibrio cholerae utilizes the ArcAB system in response to shifts in respiratory conditions. Previously, we found that HapR mutations have significant effect on its biofilm formation under different oxygen conditions. This led us to speculate that ArcAB and quorum sensing system are playing a role in anoxic biofilm formation. We selected strains that produce robust biofilms under anoxia, constructed their respective isogenic *arcA* and *arcB* deletion mutants, and then performed the biofilm assay. Regulon analysis of putative ArcA-binding sites in the *hapR* promoter, followed by gel shift assay between phosphorylated ArcA (P-ArcA) and *hapR* promoter was also done. Then, gene expression of *hapR* and *hapA*, along with other biofilm-associated genes were evaluated. Results revealed that deletion of either *arcA* or *arcB* led to a significant decrease in the biofilms of intact HapR strains. Whereas variable biofilm formation was observed in HapR-deficient strains. Gel shift assay then showed direct binding of P-ArcA to the *hapR* promoter. Significant increase in *hapR* and *hapA* expression and significant reduction in biofilm-associated genes expression were observed in the *arcA* mutants of intact HapR strains. In this study, we have shown that P-ArcA promotes anoxic biofilm formation by repressing *hapR* transcription, a new regulatory network in the biofilm formation of the pathogenic *V. cholerae*.

P3-012

Prevalence of *Escherichia albertii* in food and environment, and development of the detection method

○新井 沙倉, 廣瀬 昌平, 工藤 由起子 (国立衛研・衛微)

○Sakura Arai, Shouhei Hirose, Yukiko Kudo-Hara (Div. Microbiol., Natl. Inst. Health Sci.)

Escherichia albertii is an emerging enteropathogen and its foodborne outbreaks have been reported in Japan. The prevalence of *E. albertii* in food and environment in Japan was surveyed, and *E. albertii* was isolated from chicken, pork, oyster, and river water. However, *E. albertii* was not isolated from several PCR-positive samples; therefore, systematic methods for detecting *E. albertii* in food was examined. Each 25 g of chicken and bean sprout samples inoculated at a low level (17.7 CFU) or high level (88.5 CFU), or uninoculated with *E. albertii* were prepared. The samples were enriched in modified EC broth supplemented with cefixime and tellurite followed by *E. albertii* specific real-time PCR assay (EA-rtPCR) and plating on DHL, MacConkey agar (MAC), and these agars supplemented with rhamnose and xylose (RX-DHL and RX-MAC). Noncolored colonies suspected as *E. albertii* were confirmed with EA-rtPCR. The sensitivity (the number of positive samples / the number of inoculated samples) of EA-rtPCR was 1.000 for chicken and bean sprout samples inoculated with *E. albertii* at low and high levels. Plating on RX-DHL and RX-MAC was significantly superior to plating on DHL and MAC. In conclusion, screening for *E. albertii* with EA-rtPCR followed by isolation with RX-DHL or RX-MAC is an efficient method for *E. albertii* detection in food.

P3-013**Unique properties of Atg8 paralogs in CASM-Xenophagy deployment during pneumococcal infection**

○小川 道永, 栗石 早矢佳, 明田 幸宏 (感染研・細)

○Michinaga Ogawa, Sayaka Shizukuishi, Yukihiko Akeda (Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis)

Individual Atg8 paralogs, comprising LC3A, LC3B, LC3C, GBRP, GBRPL1 and GATE16, play a crucial role in canonical autophagy. However, their functions remain unclear owing to functional redundancy. In a previous study, we reported that intracellular *Streptococcus pneumoniae* triggers hierarchical autophagy in response to bacterial infection. This process commences with the induction of conjugation of Atg8 paralogs (Atg8s) to single membranes (CASM), followed by CASM shedding and subsequent induction of xenophagy. In our recent study, we performed functional analysis of Atg8s during pneumococci-induced hierarchical autophagy. Our findings suggest that LC3A and GBRPL1 are crucial for CASM induction, whereas GATE16 and GBRP play sequential roles in CASM shedding and subsequent induction of xenophagy, respectively. Moreover, we reveal novel bacterial tactics to gain intracellular survival niches by manipulating CASM-xenophagy progression by generating intracellular pneumococci-derived H₂O₂.

P3-014**アスペルギルスファミガタスの集団ゲノミクスによる遺伝系統の分布と高リスク系統の探索**○高橋 弘喜¹, Xiaohui He¹, 楠屋 陽子², 萩原 大祐^{1,3}, 豊留 孝仁^{1,4}, 新居 鉄平¹, Cai Bian⁵, 永山 聖樹¹, 柴田 紗帆¹, 渡邊 哲¹ (1千葉大・真菌, 2NITE, NBRC, 3筑波大・生命環境, 4帯畜大・獣医, 5BGI)**Population genomics of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus***○Hiroki Takahashi¹, Xiaohui He¹, Yoko Kusuya², Daisuke Hagiwara^{1,3}, Takahito Toyotome^{1,4}, Teppei Arai¹, Cai Bian⁵, Masaki Nagayama¹, Saho Shibata¹, Akira Watanabe¹ (1Med. Mycol. Res. Cent., Chiba Univ., 2NBRC, NITE, 3Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, 4Dept. Vet. Med., Obihiro Univ. A.V.M., 5BGI)

Aspergillus fumigatus is a pathogenic fungus with a global distribution. Although azole-resistant TR-mutants are widely distributed, only a few TR-mutants have been isolated in Japan. The emergence of azole-resistant *A. fumigatus* (ARAF) other than the TR-mutants is a problem in Japan. Additionally, the genetic diversity of *A. fumigatus* strains in Japan remains relatively unknown. In this study, we analyzed the genome sequences of 171 strains from Japan as well as the antifungal susceptibility of these strains. We found that 22 strains were highly tolerant to itraconazole. Next, we conducted a population analysis of 876 strains by combining the available genomic data for strains isolated worldwide, which were grouped in six clusters. We observed the geographic distributions of clusters such as Cluster 2 where the strains from Japan were over-represented. Finally, using 628 strains from Clusters 1, 2, and 4, the genomic loci associated with azole resistance were detected on the basis of a genome-wide association study. Thus, we revealed the complexity of the genomic mechanism underlying the emergence of ARAF strains other than the TR-mutants as well as the genomic diversity of *A. fumigatus* in Japan.

P3-015**結核感受性に関する転写因子 MafB はマウスの結核菌感染を制御する**○引地 遥香^{1,2}, 中村 創¹, 大森 志保¹, 瀬戸 真太郎¹, 土方 美奈子¹, 慶長 直人³ (1結核予防会結核研究所・生体防御部, 2長崎大・院医歯薬・新興感染症病態制御学, 3結核予防会結核研究所)**Transcription factor MafB regulates Mycobacterial infection in mice**○Haruka Hikichi^{1,2}, Hajime Nakamura¹, Shiho Omori¹, Shintaro Seto¹, Minako Hijikata¹, Naoto Keicho³ (1Dept. Pathophysiology and Host Defense, RIT, JATA, 2Dept. Infection Research, Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sci., 3The Research Inst. of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

MAFB, is a transcription factor that regulates macrophage differentiation. A genome-wide association study revealed that a single-nucleotide polymorphism in the neighborhood of *MAFB* is associated with early tuberculosis (TB) onset in Thai and Japanese populations. We have demonstrated that MAFB regulates interferon-related pathways in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-infected human macrophages (Hikichi H et al., Front Microbiol, 2022). These studies led to a hypothesis that *MAFB* is associated with TB susceptibility. To test this, we subjected macrophage-specific *Mafb* conditional knockout (*Mafb*-cKO) mice to aerosol infection with *Mtb*. *Mafb*-cKO mice exhibited a higher bacterial burden and reduced survival. In the lungs of *Mafb*-cKO mice, pathological examination demonstrated the presence of granulomas characterized by an indistinct boundary. Flow cytometry analysis revealed impaired recruitment of T cell and enhanced infiltration of Ly6G-positive neutrophil in *Mafb*-cKO mouse lungs. Finally, we discuss the mRNA sequencing results of *Mtb*-infected mice lungs in the context of impaired immunity and higher susceptibility to *Mtb* infection. This study offers insights into the role of *MAFB* in TB progression, paving the way for the development of predictive biomarkers for TB onset, as well as novel anti-TB drugs targeting host factors.

P3-016***Streptococcus sobrinus* が放出する膜小胞 (MV) がバイオフィルム形成に及ぼす影響についての研究**○吉田 浩子¹, 袴田 杜², 根岸 慎一¹, 泉福 英信² (1日本大・歯・矯正, 2日本大・歯・微生物免疫)**Biofilm formation by membrane vesicles released from *Streptococcus sobrinus***○Hiroko Yoshida¹, Morito Hakamada², Shinichi Negishi¹, Hidenobu Senpuku² (1Dept. Orthodontics., Sch. Dent., Nihon Univ., 2Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Nihon Univ.)

Streptococcus sobrinus, which is associated with the oral biofilm formation (BF), synthesizes glucan, a polysaccharide using sucrose as a substrate together with *Streptococcus mutans*. Recently, *S. mutans* released membrane vesicles (MVs), which induce BF of initial colonizers. *S. sobrinus* may release MVs and its pathogenicity is unknown. To clear abilities of MVs from *S. sobrinus* for the BF, MVs are purified from *S. sobrinus* and used for BF assay using *S. mutans* and other bacteria. BF formation experiment: After coating a 96-well microtiter plate with filter-sterilized human saliva, *S. sobrinus* MV diluted to various concentrations in Tryptic Soy Broth (TSBs) with 0.25% sucrose was added. *S. mutans* UA159.gtfBC- (a strain that has lost the ability to form BF), *S. aureus* cowan I, *Actinomyces naeslundii* x600, and *Actinomyces oris* MG1 were added with MVs and cultured at 37°C for 16 hours. After culturing, the BFs were stained with safranin and measured absorbance at 492 nm as a volume of biofilm. *S. sobrinus* MVs induced BFs of *S. mutans* UA159.gtfBC-, *A. oris* MG1 which play a role for induce oral biofilm formation, and *S. aureus* cowan I as an opportunistic pathogen in the oral cavity in a concentration-dependent manner. Therefore, *S. sobrinus* MV could be considered as a new virulence factor.

P3-017

細胞外小胞分泌阻害が Cholix の細胞致死機構に及ぼす影響

○八尋 錦之助¹, 尾崎 和矢¹, 永原 妃葉¹, 川村 朝香¹, 小倉 康平², 津々木 博康³, 伊豫田 淳⁴ (1京都薬科大・微生物, 2京都大・農・生物機能, 3熊本大・先端・微生物, 4国立感染症研・細菌第1)

EVs inhibition promotes Cholix-induced apoptosis via JNK-regulating caspase-dependent pathway

○Kinosuke Yahiro¹, Kazuya Ozaki¹, Hiyo Nagahara¹, Asaka Kawamura¹, Kohei Ogura², Hiroyasu Tsutsuki³, Sunao Iyoda⁴ (1Lab. Microbiol. Infect. Con, Kyoto Pharma. Univ., 2Div. Food Sci. Biotech, Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., 3Dep. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., 4Dep. Bacterio. I, NIID)

Cholix cytotoxin (Cholix) produced by *V. cholerae* is a novel eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) adenosine diphosphate-ribosyltransferase that causes host cell death by inhibiting protein synthesis. However, the role of Cholix in infectious diseases caused by *V. cholerae* remains unclear. Some bacterial cytotoxins are reportedly carried by host extracellular vesicles (EVs) and then transferred to other cells. Here, we investigated the effects of the EVs pathway on Cholix-induced hepatocyte death. We observed that Cholix-induced cell death was significantly enhanced in the presence of EVs inhibitors and in Rab27a-knockdown cells but it did not involve a sphingomyelin-dependent EVs pathway. We observed that the size of the hepatocyte EVs did not change after treatment with Cholix. RNA sequencing analysis revealed that desipramine, an EVs inhibitor, promoted the Cholix-activated c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway. Further, JNK inhibition decreased desipramine-enhanced, Cholix-induced poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. In addition, suppression of Apaf-1 by small interfering RNA further enhanced Cholix-induced PARP cleavage by desipramine, suggesting that the desipramine-stimulated JNK pathway promotes a mitochondria-independent cell death pathway via Cholix when apoptosome formation is inhibited.

P3-018

Structural analysis of inactive hyaluronidase of *Streptococcus pyogenes*

○山口 雅也^{1,2}, 東 孝太郎², 武部 克希³, 中田 匡宣⁴, 住友 倫子⁵, 川端 重忠² (1阪大・院歯・バイオインフォ, 2阪大・院歯・微生物, 3岡大・院医歯薬・歯科薬理, 4鹿大・院医歯・口腔微生物, 5徳大・院医歯薬・口腔微生物)

○Masaya Yamaguchi^{1,2}, Kotaro Higashi², Katsuki Takebe³, Masanobu Nakata⁴, Tomoko Sumitomo⁵, Shigetada Kawabata² (1Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 2Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 3Fac. Med., Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., 4Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., 5Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ.)

Streptococcus pyogenes is a Gram-positive human-specific pathogen. While most *emm*-type *S. pyogenes* strains have inactive hyaluronidase HylA, some, such as *emm4*, have a V199D point mutation that activates HylA. This study investigates the phylogenetic relationship and crystal structure of HylA.

A Bayesian phylogenetic tree based on *hylA* sequences suggested that active HylA evolved from inactive HylA through natural mutations. The 2.40 Å crystal structure of the recombinant inactive HylA from *emm1 S. pyogenes* (M1HylA) was determined, revealing the causes of inactivity. The region between the $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helix containing V199 was a disordered long loop, with V199 indirectly causing inactivation. Molecular dynamics simulation indicated that the region of high flexibility corresponded to the disordered region in the M1HylA crystal structure. RMSD analysis showed that the domain containing V199 had a higher RMSD than other domains, suggesting a role for V199 in structural instability. In addition, molecular interactions between HylA and hyaluronan were predicted using AutoDock Vina. The results showed that inactive HylA could still bind hyaluronan. These results indicate that a single point mutation outside the active site of HylA alters its secondary structure and activity. On the other hand, the binding region remains structurally conserved and retains the ability to bind hyaluronan.

P3-019

抗菌薬排出に関与する新規肺炎球菌 ABC トランスポーターの機能構造解析

○田口 厚志^{1,4}, 藤田 純三², 田辺 幹雄³, 高谷 大輔⁴, 福澤 薫⁴, 難波 啓一², 西野 邦彦^{1,4} (1大阪大・産研, 2大阪大・生命機能研究, 3高エネ研・構造生物, 4大阪大・薬)

Characterization of a novel pneumococcal ABC transporter involved in antibiotic efflux

○Atsushi Taguchi^{1,4}, Junso Fujita², Mikio Tanabe³, Daisuke Takaya⁴, Kaori Fukuzawa⁴, Keiichi Namba², Kunihiro Nishino^{1,4} (1SANKEN, Osaka Univ., 2Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ., 3SBRC, KEK, 4Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Multidrug efflux pumps play a major role in antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, but how Gram-positive bacteria utilize these membrane transporters remains poorly characterized. To identify membrane transporters involved in antibiotic resistance in the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, we constructed pneumococcal strains that overexpress putative efflux pumps and screened these strains against a panel of representative antibiotics. In this screen, we identified a previously uncharacterized ABC transporter that contributed to elevated resistance against a cell wall active antibiotic. Heterologous expression of this transporter in *Escherichia coli* resulted in a similar increase in resistance, suggesting that it does not require other pneumococcal proteins for its function. To understand the molecular basis for substrate transport, we reconstituted this transporter in proteoliposomes and found that the ATPase activity is not affected by the presence of the putative substrate. We succeeded in obtaining cryo-EM structures of the inward- and outward-facing conformations, which provide insight into the structural basis of substrate recognition. Together, this work advances our understanding of membrane transporters in Gram-positive bacteria.

P3-020

WQ-3810: A Novel Fluoroquinolone Exhibiting Potency Against Fluoroquinolone-Resistant *M. avium*

○Sasini Jayaweera¹, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima^{1,2}, Yasuhiko Suzuki^{1,2} (1Div. Bioresources, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., 2Inst. for Vaccine Research and Development, Hokkaido Univ.)

M. avium, part of the *M. avium* complex (MAC), is an opportunistic pathogen causing MAC lung diseases. Fluoroquinolones (FQs) are recommended for macrolide-resistant MAC infection, but overuse may lead to resistance. WQ-3810, a new FQ with significant efficacy against FQ-resistant pathogens, lacks sufficient studies on its activity against *M. avium*. This study assesses WQ-3810's inhibitory effect on recombinant wild-type (WT) gyrase A, B, and four mutant gyrase A proteins (Ala91Val, Asp95Ala, Asp95Gly, and Asp95Tyr) using a DNA supercoiling inhibitory assay, determining the drug concentration inhibiting half of the enzyme activity (IC₅₀). WQ-3810's Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was tested against 11 clinical *M. avium* isolates (7WT, 2Asp95Gly and, 2Asp95Tyr), and results were compared with Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Levofloxacin from a previous study. WQ-3810 exhibited dose-dependent inhibition against WT and mutant gyrase A. All four mutant DNA gyrase A showed higher IC₅₀s (2.60 - 4.47 fold) than the WT. In comparison, Ciprofloxacin had the highest IC₅₀s for all mutants, while WQ-3810 had the lowest IC₅₀s for three mutants. Additionally, WQ-3810 MICs were comparable to Moxifloxacin for the WT and half of the MICs for mutants, suggesting a favorable inhibitory profile against both WT and mutant *M. avium* DNA gyrase A, highlighting its therapeutic potential.

P3-021**REA tuberculosis vaccine candidate induces clearance of infection in a mouse model challenged with *Mycobacterium tuberculosis***

Ki-Won Shin¹, Sintayehu Kebede Gurmessa¹, Han-Gyu Choi¹, Yong Woo Back², Zongyou Jiang¹, Thuy An Pham¹, Seunga Choi², Ohwa-Jung Kim¹ (¹Dept. Microbiol. and Med. Sci., Coll. Med., Chungnam National Univ., ²Resarch Inst., Myco-Rapha Inc.)

A number of tuberculosis (TB) vaccine candidates have been developed, with some advancing to clinical trials. However, none of these candidates have demonstrated the clearance of infection in a mouse model. Herein, we engineered potent chimeric protein vaccine candidate REA that induced Th1 and Th17 responses via maturation of dendritic cells. REA-activated macrophages operated the killing mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) such as phagosomal maturation and phagolysosome fusion through (PI3K)-p38 MAPK-Ca²⁺-NADPH oxidase pathway. Dendritic cells and macrophages activated with REA elicited the synergic anti-mycobacterial responses. A more significant finding is that REA-immunized mice suppressed MTB growth to undetectable levels at 16 weeks post-infection, which was supported by gross and pathologic findings and acid-fast staining of the lung tissues, and maintained antigen-specific multifunctional IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α CD4⁺ T cells and long-lasting T cells producing cytokines in the tissues. Our findings suggest that REA could be an excellent prime prophylactic vaccine candidate against TB.

Ki-Won Shin, Sintayehu Kebede Gurmessa, Han-Gyu Choi: These authors contributed equally to this work.

P3-022**An Alternative Splicing Variant of the Mixed-Lineage Leukemia 5 Protein Is a Cellular Adhesion Receptor for ScaA of *Orientia tsutsugamushi***

○Nam-Hyuk Cho, Yen Thi Hai Nguyen, Chaewon Kim, Hong-Il Kim, Yuri Kim, Sang-Eun Lee, Sunghoe Chang, Na-Young Ha (Seoul National Univ. Coll. Med.)

Scrub typhus is a mite-borne disease caused by the obligately intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi*. We previously demonstrated that ScaA, an autotransporter membrane protein of *O. tsutsugamushi*, is commonly shared in various genotypes and involved in adherence to host cells. Here, we identified a mixed-lineage leukemia 5 (MLL5) mammalian trithorax group protein as a host receptor that interacts with ScaA. MLL5, identified by yeast two-hybrid screening, is an alternative splicing variant of MLL5 (vMLL5) which contains 13 exons with additional intron sequences encoding a tentative transmembrane domain. Indeed, vMLL5 is expressed on the plasma membrane as well as in intracellular compartments in eukaryotic cells and colocalized with adherent *O. tsutsugamushi*. In addition, ScaA-expressing *Escherichia coli* showed significantly increased adherence to vMLL5-overexpressing cells compared with vector control cells. We mapped the C-terminal region of the passenger domain of ScaA as a ligand for vMLL5 and determined that the Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax (SET) domain of MLL5 is an essential and sufficient motif for ScaA binding. We observed significant and specific inhibition of bacterial adhesion to host cells in competitive inhibition assays using the C-terminal fragment of ScaA or the SET domain of vMLL5. Moreover, immunization with the C-terminal fragment of ScaA provided neutralizing activity and protective immunity against lethal challenge with *O. tsutsugamushi* as efficiently as vaccination with the whole passenger domain of ScaA. These results indicate that vMLL5 is a novel cellular receptor for ScaA-mediated adhesion of *O. tsutsugamushi* and facilitates bacterial adhesion to host cells, thereby enhancing bacterial infection.

P3-023**Olfactory receptor signalings alter the homeostasis of memory CD8 T cells**

○Yong Woo Jung, Hyun jin Moon (Korea Univ.)

Memory CD8⁺ T cells are characterized by a long lifespan, and rapid and strong response to the re-encountered antigen. Although the survival and proliferation of these cells are mediated by homeostatic cytokines such as IL-7 and IL-15 without their cognate antigens, we previously found a non-dividing subset of memory T cells. This population expressed higher mRNA levels of olfactory transduction-associated genes compared to dividing subset. Based on these findings, we hypothesized that olfactory receptor (OR) signalings alter the homeostatic proliferation of memory CD8⁺ T cells. To test this hypothesis, we cultured CFSE-labeled memory CD8⁺ T cells with IL-7 and IL-15 in the presence of an agonist or antagonist of OR1480, which is a major OR differentially expressed in these subsets. While the proliferation of memory CD8⁺ T cells was suppressed with the treatment of antagonist, these cells divided with the treatment of agonist comparable to controls. In order to verify this finding *in vivo*, we initially examined the inflammatory effects by treating naïve mice with these chemicals intranasally. We found that these mice did not develop inflammation in the lungs and airways after treatment once a day for 7 days. Then, mice containing memory CD8 T cells were treated with these compounds and showed that the inhibition of OR1480 reduced the recruitment of these T cells into the lungs. These results suggest that OR signalings modulate homeostasis of memory CD8 T cells by mediating the proliferation and migration.

P3-024**Identification and characterization of a DNA-binding protein from starved cells (Dps) homologue in *Acanthamoeba*: Implications for encystment-induced DNA protection**

○Minsang Shin, Seunghyeok Bang, Soyoung Joo, Ja Moon Aung, Je Chul Lee, Yeonchul Hong (Sch. Med., Kyungpook National Univ.)

Acanthamoeba spp. are free-living amoebae recognized as opportunistic human pathogens. They exist in diverse environments and exhibit a biphasic life cycle characterized by motile trophozoite and resistant cyst stages. Under harsh conditions, trophozoites transform into cysts, undergoing degradation of internal structures and macromolecules, including DNA, which enhances their survival by increasing resistance. Similarly, under unfavorable conditions, bacteria produce stress-responsive proteins like DNA-binding protein from starved cells (Dps) to protect DNA integrity. However, the mechanism underlying DNA protection in protozoa, such as *Acanthamoeba*, during the encystment under adverse conditions remains unclear. We cloned a bacterial Dps homologue (AcDps) from *Acanthamoeba*, then expressed and purified the recombinant AcDps protein (rAcDps) in *E. coli* to investigate its functional characteristics. Polyclonal antibodies against rAcDps were used to monitor expression changes during *Acanthamoeba* encystment. Additionally, we examined the factors influencing the formation of rAcDps oligomeric complexes and DNA-rAcDps complexes under various divalent cation and pH conditions by utilizing techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis, electrophoretic mobility shift assay, and atomic force microscopy imaging. AcDps, cloned from *Acanthamoeba*, is comprised of 171 amino acids, and has a molecular weight of approximately 21 kDa, showing a high structural resemblance to bacterial Dps proteins. Expression of AcDps is minimal in trophozoites but initiates 48 hours following encystment induction and persists for up to 96 h. When tagged with EGFP, AcDps appears as multiple small vesicle-like structures scattered throughout the cysts' cytoplasm. In addition, the rAcDps protein primarily forms oligomeric complexes. These complexes effectively bind both linear and supercoiled plasmid DNA in the presence of Zn²⁺ divalent cations, creating quasi-DNA complexes that protect the DNA from DNase I degradation. We have identified a bacterial Dps homologue, AcDps, in *Acanthamoeba*. AcDps is significantly upregulated during the encystment process and shares structural and functional similarities with bacterial Dps proteins that are known to accumulate under stress conditions and aid in condensing DNA into protective biocrystalline structures. The capacity of rAcDps to oligomerize and bind to DNA, presumed to serve as a protective barrier against damage, highlights its functional and evolutionary importance and suggests its potential as a therapeutic target.

P3-025

Nutrient Deprivation and Its Impact on Early Pulmonary Infection by *Mycobacterium avium*

Jeong-Ih Shin, Kyu-Min Kim, Min Phuong Trinh, Woo-Kon Lee, OMin-Kyoung Shin (Coll. Med., Gyeongsang National Univ.)

The virulent and phenotypic changes of mycobacteria, a nutritionally deficient bacterium, have been studied, but its understanding is not well established in the mouse infection model of *Mycobacterium avium*. The epidemiology of *M. avium* infection begins with inhalation of aerosols containing the bacteria from soil or water containing extremely low-carbon sources, leading to lung colonization. In this study, we compared the bacterial burden between *M. avium* strains adapted to non-carbon sources, with log-phase bacteria. In mouse infection models at 1 and 2 weeks, the bacterial burden of the starved strains was significantly higher in the lungs, spleen, and liver. The starved strain showed a slight decrease in the growth rate, colony-forming units (CFU), and metabolism level. The morphological changes of the bacteria appeared to adjust the fatty acid component and elongation. The initial attachment against to host cell and antibiotic resistance of starved bacteria were enhanced and glycopeptidolipid (GPL), the adhesion molecule, was increased. Furthermore, structures like biofilm were observed in the infected lung with starved bacteria. In the lungs, IL-2, IL-3, IL-16, IL-23, and CXCL10/CRG-2 were significantly reduced by starvation bacterial infection, followed by highly inhibited recruitment of dendritic cells and macrophages to the lungs. This may contribute to immune evasion and the persistence of infection due to impaired bacterial-cell interactions caused by structures like biofilms. This study focused on the early stages of the infection process and highlights the structures and molecules involved in the high bacterial burden in the early establishment of *M. avium* pulmonary infection. This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2021R111A2045131).

P3-027

Beneficial effects of cellular coinfection resolve inefficiency in influenza A virus transcription

○Chung-Young Lee (Kyungpook National Univ.)

For diverse viruses, cellular infection with single vs. multiple virions can yield distinct biological outcomes. We previously found that influenza A/guinea fowl/Hong Kong/WF10/99 (H9N2) virus (GFHK99) displays a particularly high reliance on multiple infection in mammalian cells. Here, we sought to uncover the viral processes underlying this phenotype. We found that the need for multiple infection maps to amino acid 26K of the viral PA protein. PA 26K suppresses endonuclease activity and viral transcription, specifically within cells infected at low multiplicity. In the context of the higher functioning PA 26E, inhibition of PA using baloxavir acid augments reliance on multiple infection. Together, these data suggest a model in which sub-optimal activity of the GFHK99 endonuclease results in inefficient priming of viral transcription, an insufficiency which can be overcome with the introduction of additional viral ribonucleoprotein templates to the cell. More broadly, the finding that deficiency in a core viral function is ameliorated through multiple infection suggests that the fitness effects of many viral mutations are likely to be modulated by multiplicity of infection, such that the shape of fitness landscapes varies with viral densities.

P3-028

Effects of hzVSF-v13 Treatment of Roborovski Hamster Infected with SARS-CoV-2

○Hee-Suk Chae¹, Hae-mi Kim², Seong-Tshool Hong² (¹Dept. Obstetrics and Gynecology, Research Inst. of Clinical Med., Jeonbuk National Univ., ²Jeonbuk National Univ. Med. Sch.)

Finding an effective treatment against coronavirus disease-2019 (COVID-19) is urgently needed. COVID-19 can disrupt the regulation of the innate host immune system, leading to hypercoagulation, hyperinflammatory. The lungs are the main affected organ in severe COVID-19. Humanized virus suppressing factor-variant 13 (hzVSF-v13) is a monoclonal IgG4 against vimentin, which is expressed on the surface of virus-infected cells. Therapeutic efficacy of a hzVSF-v13 was evaluated with the SARS-CoV-2 infected Roborovski hamster. The SARS-CoV-2-infected hamster rapidly fell into hypothermia after a high fever and showed a typical COVID-19 infection pattern entering the terminal stage equivalent to death at 4 dpi (days post infection). But the hamster injected with hzVSF-v13 had a slight increase in body temperature and gradually began to recover to normal from 2 dpi. The hzVSF-v13 was effective in treating severe COVID-19 by inhibiting the growth of viruses and inflammation. The hzVSF-v13 is significant currently when there is no suitable COVID-19 treatment.

P3-029

The Mycobacterial Protein AcpM Inhibits TFEB to Enhance Mycobacterial Survival by Modulating miRNA in murine macrophages

○Kyungtae Kim^{1,2,3}, In Soo Kim^{1,2,3}, Young Jae Kim^{1,2,3}, Seul Gi Shin^{1,2,3}, Eun-Kyeong Jo^{1,2,3}, Seungwha Paik^{1,2} (¹Dept. Microbiol., Chungnam National Univ. Sch. Med., ²Dept. Med. Sci., Chungnam National Univ. Sch. Med., ³Infection Control Convergence Research Center, Chungnam National Univ. Sch. Med.)

AcpM, an acyl carrier protein, is a crucial component for the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. AcpM plays a key role in the synthesis of fatty acids by elongating mycolic acids in the bacterial cell wall, which serve as a defense mechanism against the host. Transcription factor EB (TFEB) is known to regulate lysosomal biogenesis and autophagy through its involvement in several signaling pathways, including mTORC1, calcium, and AKT pathways. However, the immunological function of AcpM in host-pathogen interactions has not yet been identified. Treatment with recombinant AcpM (rAcpM) significantly reduced both TFEB gene and protein levels in mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs). Confocal analysis showed that rAcpM treatment inhibited the nuclear translocation of TFEB and decreased phagosome-lysosome fusion in BMDMs. Additionally, rAcpM downregulated various autophagy and lysosomal genes without affecting autophagic flux. MicroRNA analysis revealed that rAcpM treatment increased miR-155-5p levels, leading to reduced expression of SHIP1 and enhanced phosphorylation of the Akt-mTOR pathways, blocking TFEB activation. In summary, our results demonstrate that AcpM suppresses host defense by inhibiting the nuclear translocation of TFEB in BMDMs. These findings enhance the understanding of AcpM's role in *M. tuberculosis* infection.

P3-030**The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor- α is essential for antimicrobial activity against nontuberculous mycobacterial infections by activating mitochondrial functions**

○Sang Min Jeon^{1,2,3,4}, Soo In Kim^{1,2,3,4}, Bomi Lee^{1,2,3,4}, Yuri Seo^{1,2,3,4}, Geumseo Kim^{1,2,3,4}, Eun-Kyeong Jo^{1,2,3} (1Dept. Microbiol., Chungnam National Univ. Sch. Med., 2Infection Control Convergence Research Center, Chungnam National Univ. Coll. Med., 3Dept. Med. Sci., Chungnam National Univ. Coll. Med., 4Brain Korea 21 FOUR Project for Med. Sci., Chungnam National Univ. Coll. Med.)

Nontuberculous mycobacteria (NTM) infections are increasingly prevalent among both immunocompromised and immunocompetent individuals worldwide. Despite extensive unmet medical needs for controlling NTM infections, there is a paucity of studies investigating the role of key integrative factors in activating protective immune responses. Our previous studies showed that estrogen-related receptor (ERR) α , an orphan nuclear receptor (NR3B1), plays a critical role in controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation. Here, we explore the role and mechanisms underlying myeloid-specific ERR α in activating host immune defenses during NTM infections. Deficiency of myeloid-specific ERR α in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) impairs both antimicrobial and inflammatory responses to infections with several NTM species, including *M. abscessus* subsp. *abscessus* (Mabc) and *M. avium* (Mav). We assessed mitochondrial respiration by measuring the oxygen consumption rate in BMDMs from ERR α wild-type (WT) and ERR α conditional knockout (CKO) mice. Following Mabc infection, mitochondrial maximal respiration was significantly higher in ERR α WT BMDMs compared to ERR α CKO BMDMs. Furthermore, the mRNA and protein levels of mitochondrial respiratory chain complex I were notably reduced in ERR α CKO macrophages compared to ERR α WT macrophages post-Mabc infection. Mitochondrial respiratory complex I, which is involved in generating mitochondrial reactive oxygen species, was essential for effective antimicrobial responses against Mabc infection. Collectively, these data suggest that ERR α is crucial for keeping the functionality of mitochondrial respiratory complex I and the production of mitochondrial reactive oxygen species, which are critical for enhancing host defense against NTM infections.

P3-031**Inflammasome-activating poxvirus peptide suppresses intracellular survival of *Mycobacterium abscessus* in macrophages**

○Taylor Roh, Sang Min Jeon, Kyung Tae Kim, Bomi Lee, Gyoungah Ryu, Eun-Kyeong Jo (Dept. Med. Sci., Chungnam National Univ. Sch. Med.)

The NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome is essential for the host's antimicrobial defenses against *Mycobacterium abscessus* (Mabc), a rapidly-growing nontuberculous mycobacteria (NTM) with high antibiotic resistance. In this study, we designed a 29-amino acid inflammasome-activating peptide (IAMP29) and examined whether IAMP29 induced antimicrobial response to smooth Mabc or smooth *Mycobacterium boletii* (Mboll) infection in human and murine macrophages. IAMP29 treatment significantly upregulated the production of interleukin (IL)-1 β by Mabc- or Mboll-infected macrophages. Additionally, IAMP29 exhibited an activation of caspase-1 and an increase in the processed active form of IL-1 β in culture supernatants after Mabc or Mboll infection. Moreover, IAMP29 treatment significantly suppressed the intracellular survival of Mabc or Mboll in human and murine macrophages. We further found that IAMP29 robustly induces metabolic reprogramming towards glycolysis and interacts with two pyruvate kinase M isoforms (PKM1 and PKM2), ultimately leading to the activation of the NLRP3 inflammasome in human immune cells. Finally, silencing PKM2 led to a significant increase of intracellular bacterial viability in human macrophages, suggesting that the interaction between IAMP29 and PKM2 plays a role in the antimicrobial responses against Mabc infection. These findings collectively indicate that IAMP29 robustly activates the inflammasome and induces IL-1 β secretion, thereby contributing to antimicrobial responses through PKM2 in human macrophages during Mabc or Mboll infections.

P3-032***Bacteroides vulgatus* plays a beneficial role in ERR α -deficient mice undergoing radiation-induced gastrointestinal toxicity**

○Shin Seul Gi¹, Gyoungah Ryu², Eun-kyeong Jo³, Sup Kim⁴ (1Chungnam National Univ. Sch. Med., 2Dept. Microbiol., Chungnam National Univ. Sch. Med., 3Dept. Med. Sci., Chungnam National Univ. Sch. Med., 4Dept. Radiation Oncology, Chungnam National Univ. Hospital)

Radiation therapy (RT) is a widely employed treatment for cancer patients, but it can negatively impact normal tissues, leading to gastrointestinal toxicity with side effects such as vomiting and diarrhea. These side effects often limit the permissible radiation dose and overall effectiveness of treatment. Estrogen-related receptor alpha (ERR α), an orphan nuclear receptor, is abundantly expressed in intestinal epithelial cells and plays a crucial role in mitochondrial biogenesis and metabolism. While recent studies have demonstrated a protective role for ERR α in dextran sulfate sodium-induced colitis, its involvement in radiation-induced intestinal toxicity has yet to be fully understood. In this study, we investigated the function of ERR α in radiation-induced intestinal injury. ERR α -deficient mice were observed to be more susceptible to radiation, exhibiting heightened intestinal inflammation. Additionally, recent studies have indicated that *Bacteroides vulgatus* exerts a protective effect in various colitis models. Our previous research revealed a reduction in *B. vulgatus* levels in ERR α -deficient mice. To assess the therapeutic potential, *B. vulgatus* was administered orally to these mice twice a week for one month. Following this period, the mice were subjected to abdominal irradiation. ERR α -deficient mice that received *B. vulgatus* treatment showed improved survival rates and increased body weight, along with a significant reduction in intestinal inflammation. Collectively, these findings suggest that *B. vulgatus* provides protective benefits against radiation-induced intestinal injury in ERR α -deficient mice.

P3-033**Myeloid mitofusin 2 promotes inflammatory responses and xenophagy against *Mycobacterium tuberculosis* through hypoxia inducible factor 1- α**

○Young Jae Kim^{1,2,3,4}, Jinyoung Lee^{1,2,3,4}, Bomi Lee^{1,2,3,4}, Yuri Seo^{1,2,3,4}, Geumseo Kim^{1,2,3,4}, Jin Kyung Kim⁵, Eun-Kyeong Jo^{1,2,3} (1Dept. Microbiol., Chungnam National Univ. Coll. Med., 2Infection Control Convergence Research Center, Chungnam National Univ. Coll. Med., 3Dept. Med. Sci., Chungnam National Univ. Coll. Med., 4Brain Korea 21 FOUR Project for Med. Sci., Chungnam National Univ. Coll. Med., 5Dept. Microbiol., Keimyung Univ. Sch. Med.)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is the causative pathogen of human tuberculosis, a serious infectious disease worldwide. Intracellular infection with Mtb can disrupt mitochondrial function and dynamics. Mitofusin 2 (MFN2) is a major mitochondrial fusion protein that regulates mitochondrial dynamics. However, its role and the mechanisms underlying innate host defense against intracellular bacterial infection remain to be fully characterized. Using myeloid-specific *Mfn2* deletional (MFN2-CKO) mice, we investigated the role of MFN2 in myeloid cells during mycobacterial infections. Macrophages from MFN2-CKO mice exhibited higher intracellular bacterial replication compared to wild-type controls. Consistent with this, MFN2-CKO mice showed an increased bacterial burden upon *in vivo* infection with Mtb and *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin. Mechanistically, myeloid MFN2 deficiency impaired xenophagy, the autophagic degradation of intracellular pathogens. Specifically, MFN2 was required for efficient co-localization of mycobacteria with autophagosomes and lysosomes, as well as for proper autophagic flux. This MFN2-dependent xenophagy activation was mediated through hypoxia inducible factor (HIF)-1 α . We further demonstrated that MFN2-mediated generation of mitochondrial reactive oxygen species led to the induction of HIF-1 α , thereby promoting inflammatory signaling in macrophages during Mtb infection. Finally, MFN2 interacted with the small GTPase Rab7, facilitating the activation of xenophagy in macrophages during Mtb infection. These findings highlight that MFN2 plays a critical role in the activation of inflammatory responses and xenophagy through HIF-1 α signaling.

P3-034

GNU-MMA, New Potent Inhibitor Against *Mycobacterium tuberculosis*

○Bo Eun Heo¹, Thanh Quang Nguyen¹, Tae Ho Kim¹, Bui Thi Bich Hanh¹, Seunghyeon Jeon¹, Jinsun Jeong¹, Yujin Park¹, Guehye Kim¹, Da-Gyum Lee², Sungweon Ryoo², Kiseok Jang², Chul-Su Yang³, Benoit Laleu⁴, Jichan Jang¹ (¹Dept. Bio & Med. Big Data, Gyeongsang National Univ., ²Clinical Research Center, Masan National Tuberculosis Hospital, ³Dept. Molecular and Life Sci., Hanyang Univ., ⁴Medicines for Malaria Venture (MMV))

Tuberculosis is one of the deadliest diseases, which is predominantly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). New therapeutic options are needed to cope with MDR and XDR forms of tubercle bacilli, which has emerged as a global threat. Here, we report GNU-MMA that is potent antitubercular activity against both actively growing and dormant *Mtb*, including anti-tuberculosis drug-resistant strains. The compound is an ATP synthesis inhibitor and mutant selected in vitro suggest that the drug targets QcrB, a subunit of the cytochrome bc₁ oxidase. In mice, GNU-MMA showed excellent bactericidal activity in a both acute and chronic mouse model of TB infection. Together, our data indicate that GNU-MMA is encouraging druggable compound that treats drug susceptible and resistant TB.

P3-035

Comparison of heterologous prime-boost immunization strategies with DNA and recombinant vaccinia virus co-expressing GP3 and GP5 of European type porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs

○Hwei Zhang, Chongkai Zhai, Fuchao Mao (Animal Diseases and Public Health Engineering Research Center of Henan Province, Luoyang Polytechnic)

Vaccination is principally used to control and treat porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. This study investigated immunogenicity and protective efficacy of heterologous prime-boost regimens in pigs, including recombinant DNA and vaccinia virus vectors coexpressing PRRSV European genotype (EU) isolate GP3 and GP5: group A, pVAX1-EU-GP3-GP5 prime and rddVTT-EU-GP3-GP5 boost; group B, rddVTT-EU-GP3-GP5 prime and pVAX1-EU-GP3-GP5 boost; group C, empty vector pVAX1; group D, E3L gene-deleted vaccinia virus E3L- VTT. Vaccine efficacy was tested in an EU-type PRRSV (Lelystad virus strain) challenge pig model based on evaluating PRRSV-specific antibody responses, neutralizing antibodies, cytokines, T lymphocyte proliferation, CD4+ and CD8+ T lymphocytes, clinical symptoms, viremia and tissue virus loads. Plasmid DNA was delivered as chitosan-DNA nanoparticles, and Quil A (Quillaja) was used to increase vaccine efficiency. All piglets were boosted 21 days post the initial inoculation (dpi) and then challenged 14 days later. At 14, 21, 28 and 35 dpi, groups A and B developed significantly higher PRRSV-specific antibody responses compared with control groups C and D. Two weeks after the boost, significant differences in neutralizing antibody and IFN- γ levels were observed between groups A, C, D and B. At 49 dpi, groups A and B had markedly increased peripheral blood CD3+CD4+ T cell levels. Following virus challenge, group A showed viremia, but organ virus loads were lower than those in other groups. Thus, a heterologous prime-boost vaccine regimen (rddVTT-EU-GP3-GP5 prime, pVAX1-EU-GP3-GP5 boost) can improve humoral- and cell-mediated immune responses to provide resistance to EU-type PRRSV infection *in vivo*.

JKISM-2

シンポジウム 2

コンビナー：港 雄介 (藤田医科大学)
Joon Haeng Rhee (Chonnam National University)

Symposium 2

Conveners: Yusuke Minato (Fujita Health University)
Joon Haeng Rhee (Chonnam National University)

JKISM-S2-1

Endoribonuclease: Regulator of pathogenicity in Gram-negative foodborne pathogen

○Minho Lee (Dept. Microbiology, College of Med., Hallym Univ.)

Bacteria utilize endoribonucleases to process and degrade RNA, allowing them to rapidly adapt to environmental changes. Recent studies have discovered that pathogenic bacteria with endoribonuclease mutations exhibit decreased virulence, impaired motility, and reduced growth within host cells. Despite these findings, the precise molecular mechanisms associated with endoribonuclease-mediated pathogenesis have yet to be fully understood.

In this study, we describe the conserved and unique functions of RNase G and RNase III, focusing on growth, stress resistance, biofilm formation, motility, and virulence in the gram-negative foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*). It then presents the functions of RNase G and RNase III in the pathogenicity of *S. Typhimurium*.

Altogether, this study highlights the underestimated impact of endoribonucleases on bacterial adaptation. Furthermore, this study improves our understanding of the mechanisms by which bacterial pathogens sense the host environment and respond precisely by expressing the gene products required for adaptation to that particular niche.

JKISM-S2-2

抗ファージ防御システムからみた細菌の生存戦略

○氣駕 恒太郎¹, アザム アアハエルマン¹, 小島 新二郎¹, 千原 康太郎¹, 近藤 恒平², Wenhan Nie¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈¹, 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹ (1国立感染症研・治ワク, 2国立感染症研・AMRセンター)

Deciphering Bacterial Survival Strategies through Phage Defense System Analysis

○Kotaro Kiga¹, Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Kotaro Chihara¹, Kohei Kondo², Wenhan Nie¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita¹, Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹ (1Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis.)

It is estimated that approximately 20% of bacteria on Earth are lysed daily by viruses called phages. The interaction between bacteria and their infecting viruses (phages) plays a crucial role in the evolution of both. Bacteria have evolved defense systems such as restriction-modification systems and CRISPR-Cas to combat phage infection. Phages, in turn, have developed strategies to counter bacterial defense systems. Retron is a unique defense system that detects phage infection by producing a single-stranded DNA. Upon detecting phage infection, Retron Ec78 triggers abortive infection by degrading tRNAs expressed in bacteria (Azam AH et al.). In essence, Retron Ec78 prevents phage replication and infection expansion by depleting the tRNAs of host bacteria. However, some phages have been found to circumvent this defense mechanism by encoding tRNA in their own genomes. Ongoing research has revealed that phages employ numerous strategies to overcome bacterial defense systems beyond tRNA targeting. This presentation will discuss the survival strategies of bacteria and phages from the perspective of defense systems.

JKISM-S2-3

Targeting Mycobacterial AcpM: A New Approach to Modulate Host-Pathogen Interaction in Tuberculosis

○Seungwha Paik (Chungnam National Univ. College of Med.)

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* infection, is one of the deadliest infectious diseases threatening humanity. *M. tuberculosis* has been shown to evade host innate immune systems by secreting a variety of virulent factors during infection. AcpM is a mycobacterial acyl carrier protein that is required for *M. tuberculosis* survival. It promotes fatty acid synthesis by extending mycolic acids in *M. tuberculosis*' lipid-rich cell walls. Mycolic acids act as a virulence factor against the host, protecting the bacteria from the cellular environment. However, the immunologic characteristics of AcpM in terms of host-pathogen interaction have yet to be discovered. We previously reported that AcpM inhibits apoptosis in murine macrophages. Furthermore, we discovered that AcpM impairs host defense by preventing transcription factor EB (TFEB) nuclear translocation in macrophages. TFEB is recognized as the master regulator of lysosomal biogenesis and autophagy. A recent study found that TFEB activation is critical for upregulating antimicrobial defense and controlling intracellular bacterial growth. AcpM-mediated inhibition of TFEB activation did not directly affect autophagy flux, but it reduced phagosome-lysosome fusion and increased *M. tuberculosis* intracellular survival in BMDMs. These findings contribute to a better understanding of host-pathogen interactions in terms of AcpM during *M. tuberculosis* infection and may accelerate the development of new anti-tubercular agents that target AcpM.

JKISM-S2-4

腸炎ビブリオの宿主適応と病原性機構

○児玉 年央 (長崎大・熱研・細菌)

Host adaptation and virulence mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus*

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

Some Gram-negative bacterial pathogens have sophisticated secretion systems to transport virulence proteins such as exotoxins and effectors. Exotoxins are exported via the type II secretion system (T2SS). In contrast, the type III secretion system (T3SS) directly translocates effectors into host cells. As these secretion systems and virulence proteins are essential virulence determinants for pathogens, secretion and transcriptional regulation, particularly in response to host cell contact, are considered critical steps in the establishment of infection. Therefore, these secretion systems are strictly regulated by several mechanisms in a series of pathogenic processes. This presentation focuses on the host adaptation and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*, which is known as a causative agent of food poisoning. This pathogen possesses virulence factors, including an exotoxin, a thermostable direct hemolysin (TDH), and/or a TDH-related hemolysin (TRH), and two sets of gene clusters for T3SSs (T3SS1 and T3SS2). Our functional analyses revealed that this pathogen has an outstanding mechanism for sensing the intestinal environment and host cell contact to regulate the precise expression and secretion of T3SS effectors and exotoxins. Herein, we discuss how this organism recognizes contact with host cells and regulates the gene expression of virulence factors.

JKISM-S2-5

Toxoplasma gondii macrophage migration inhibitory factor shows anti-*Mycobacterium tuberculosis* potential via AZIN1/STAT1 interaction

○Chul-Su Yang (Dept. Medicinal and Life Science, Hanyang Univ.)

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is a pathogenic bacterium, belonging to the family *Mycobacteriaceae*, that causes tuberculosis (TB). *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor (TgMIF), a protein homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF), has been explored for its potential to modulate immune responses during MTB infections. We observed that TgMIF interacts with CD74, antizyme inhibitor 1 (AZIN1), and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and contributes to the restoration of mitochondrial function and macrophage polarization. Furthermore, TgMIF, in combination with first-line TB drugs, significantly inhibited drug-resistant TB strains, including multidrug-resistant TB. In summary, this study suggests that TgMIF has promising therapeutic potential against MTB infection by influencing immune responses, restoring mitochondrial function, and enhancing the effects of conventional TB drugs. These findings provide directions for further research and the potential development of TgMIF-based therapeutic strategies for TB, especially in the context of drug-resistant strains.

JKISM-S2-6

多様性がもたらす細菌の病原性ダイナミクス

○明田 幸宏^{1,2} (1感染研・細菌第一部, 2阪大・微研)

Heterogeneity in Bacterial pathogenesis

○Yukihiro Akeda^{1,2} (1Dept. Bacteriol I, NIID, 2RIMD, Osaka Univ.)

Not only research on pathogenic bacteria, but life science research has been generally conducted by experiments using model organisms. This approach has led to numerous discoveries in the life sciences, since the accumulation of research results on the same organisms is essential for clarifying and generalizing life phenomena whose details are unknown. On the other hand, phenomena in the laboratory are not always reproducible in the real world, including humans, the environment, and many wild organisms. In medical research as well, studies on laboratory animals and human subjects might yield completely different results, and it must be taken carefully in their interpretation. Especially in recent years, through the technique such as genomic/transcriptomic/single cell analysis of organisms, it has become clear that individual and cell populations, which were thought to be homogeneous, are dynamically heterogeneous, and adapting to their environment with diversity. Based on this background, I would like to present how heterogeneous populations of pathogenic bacteria make their distinct mechanisms of virulence. This will be examples to discuss how diversity in a single colony on agar plates, or in actual infectious diseases can make difference to establish their niche of pathogens in infectious diseases.

JKISM-S2-7

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga toxins are not just cytotoxins

○Moo-Seung Lee, Kyung-Soo Lee (Korea Research Inst. Bioscience and Biotechnology/Univ. Science and Technology)

Shiga toxins (Stxs) are primary virulence factors produced by Stx-producing *Escherichia coli* (STEC). Stxs binding to glycolipid on the host cell surface are multi-functional ribosome-inactivating proteins primarily responsible for developing the hemolytic uremic syndrome (HUS) and central nervous system (CNS) impairment. Current therapeutic options for diseases caused by Stxs are few, including peritoneal dialysis. However, the precise reasons for dialysis of the peritoneum to treat HUS are unknown. These potent cytotoxins are composed of one enzymatically active A subunit (StxA) and five receptor-binding B subunits (StxB). Although the toxins are primarily associated with cytotoxic effects, they also elicit other pathogenic consequences due to their induction of a number of biological processes, including apoptosis through ER-stress, pro-inflammatory responses, autophagy, and post-translational modification (PTM). Moreover, several studies have reported the association between Stxs and extracellular vesicles (EVs), including microvesicles and exosomes, demonstrating that Stx-containing EVs secreted by intoxicated macrophages are taken up by recipient cells, such as toxin-sensitive renal proximal tubular epithelial cells. This mechanism likely contributes to the spreading of Stxs within the host and may exacerbate gastrointestinal illnesses and kidney dysfunction. In this talk, we also summarize recent findings relating to the host responses, in different types of cells in vitro and in animal models, mediated by Stxs-containing exosomes or the toxins themselves. Due to their unique properties, EVs have been explored as therapeutic agents, drug delivery systems, and diagnostic tools. Thus, potential therapeutic applications of EVs in EHEC Stxs-mediated pathogenesis are also briefly discussed. It has become increasingly apparent that Stx-activated immune cells release increased amounts of biologically active molecules that function as paracrine factors and may exacerbate adverse effects on primary target organs. Additionally, this discussion aims to highlight the identification of Stx-activated peritoneal immune cells that produce critical host factors disrupting renal tight junctions, thereby amplifying lethality. The capacity of Stxs to undermine the structural integrity of tight junctions in target organs suggests that inhibiting the production of host factors, including EVs, may offer a viable strategy to mitigate HUS pathogenesis.

JRS

中・高校生研究発表セッション

コンピーナー：豊留 孝仁（帯広畜産大学）
山口 雅也（大阪大学）

Research presentations by junior high school and high school students

Conveners: Takahito Toyotome (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)
Masaya Yamaguchi (Osaka University)

JRS-1

使用済みマスクに付着・生息する細菌の分析:細菌の量および構成から不織布マスクの再利用を考える

○小田 直太郎¹, 阿部 峰士², 丸山 伸吾², 涌井 杏奈^{2,3}, 佐藤 拓一² (1新潟市立五十嵐中学校, 2新潟大・院保・臨床化学, 3新潟医福大・医療技術)

Analysis of bacteria of used masks: Toward the reuse of non-woven fabric masks

○Naotaro Oda¹, Takashi Abe², Shingo Maruyama², Anna Wakui^{2,3}, Takuichi Sato² (1Karashi Junior High School, Niigata City, 2Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., 3Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare)

【目的】普段通りに着用した場合の、不織布マスクから検出される細菌の数・構成を解析しました。そして、各社から販売されているマスク用スプレー（5製品）の効果についても検討しました。【方法】発表者自身（実験当時、中1）およびその家族1名を被験者として、不織布マスクを通常通り（半日）着用後、口唇部分に触れていた部分（滅菌ろ紙で窓枠を作成し、その内側2.5 cm²）を滅菌綿棒（+定圧採取器具）で擦過し、緩衝液に懸濁し試料としました。別日に、同様に着用していた不織布マスクに各社（5製品）のマスク用スプレーを噴霧（+1晩陰干し）し、試料採取しました。分散均一化後、CDC血液寒天平板に接種し、37°Cで嫌気培養を行い、各コロニーからDNA抽出し、16S rRNA PCR-RFLP（アガロースゲル電気泳動）法により細菌種の同定を行いました。【結果】着用した不織布マスクからは、中1（992±1511）、大人（6600±5481）CFU/mLの細菌が検出されました。中1から分離した208菌株の細菌構成の内訳は、*Streptococcus*（31.3%）、*Actinomyces*（25.0%）、*Rothia*（12.0%）、*Staphylococcus*（12.0%）、*Schaalia*（5.3%）、*Corynebacterium*（2.4%）、*Gemella*（1.4%）、*Neisseria*（1.0%）、*Veillonella*（0.5%）、*Cutibacterium*（0.5%）でした。一方、大人からの分離菌を解析したところ、58菌株すべてが*Cutibacterium*でした。各社のマスク用スプレーを（用法通りに2~6回）噴霧（+陰干し）すると、中1のマスクでM社（6.7±4.7）、B社（30±8.1）CFU/mLと激減し、E社、F社、G社では細菌が全く検出されませんでした。一方、大人のマスクでM社（153±210）、B社（4207±5369）、E社（883±415）、F社（20±14）、G社（137±193）CFU/mLと、4社で10分の1程度以下にまで減少しました。【考察】普段通りに不織布マスクを着用すると、中1（子供）で約1千個、大人で約7千個の細菌が付着・生息することが分かりました。そしてマスク用スプレーを噴霧すると、特に子供で効果があることも分かりました。今後、被験者を増やし、子供と大人の違いが本当かどうか、そして、マスク用スプレー噴霧の回数を増やすなどして、大人にも効果的な使用法を発見したいです。

JRS-2

土壌細菌の個体数調査とグラム染色による細菌の判別

○新城 惟愛, ○照屋 美悠, ○佐藤 桜生, ○八木 美紅, ○仲間 美月（沖縄県立球陽高等学校）

Soil bacteria population surveys and gram staining for bacterial identification

○Itika Sinjyo, ○Miyu Teruya, ○Sano Sato, ○Miku Yagi, ○Mizuki Nakama (Okinawa Prefectural Kyuyo Senior High School)

土壌中には1gあたり数十億個の細菌がいるとされている。しかし、その種類など不明な点が多い。私達は、土壌に生息する細菌を研究してみたいと考え、本研究のテーマとした。球陽高校の裏にある野鳥の森の4つの地点の土壌を利用して土壌の状態や場所ごとの土壌細菌の個体数や大まかなコロニーの差を調べ、培養した細菌をグラム染色を用いて判別した。LB培地上でコロニーを形成した細菌の個体数から土壌1gあたりに換算すると、32,100個であった。先行研究では53,750個であることから、先行研究がおこなわれた2015年と比べて細菌の個体数が減少したことがわかった。土壌細菌の個体数調査では、円状の白色のスムーズコロニー、円状の濃い黄色のスムーズコロニー、円状の薄い黄色のスムーズコロニー、中心に穴があるラフコロニー、カビなど合計10種類のコロニーが見られた。これらの結果から土壌細菌の最適増殖温度は37°Cに近い温度だと考えられる。また、20°Cでも増殖可能であるが、37°Cのときよりも増殖に時間がかかってしまうと考えられる。泥の地点の培地のコロニーの種類が他の地点よりも多い傾向にあることから、泥に近い状態の土には様々な種類の土壌細菌が生息している可能性がある。また、37°Cは多くの腸内細菌が成長できる温度であることから、土壌細菌の中にも腸内細菌科の菌が生息していると考えられる。コロニーの見た目で見極められたところ、参考文献から大腸菌が1番多いと推測できる。また枯草菌と推測できるコロニーも見られた。

JRS-3

身近なものの殺菌効果

○山崎 敏恵, ○岩本 佳純, ○鏡 咲希（熊本県立熊本北高等学校）

Sterilization effect of familiar things

○Yukie Yamasaki, ○Kasumi Iwamoto, ○Saki Kagami (Kumamoto Prefectural Kumamoto Kita High School)

消毒に使われるエタノールは、人の皮膚に赤みやかゆみ、腫れなどを生じさせることがある。肌が弱い人でも身近なものでエタノールの代用することで簡単に殺菌をすることが可能なのではないかと考えた。そこで、乳酸菌と納豆菌を用いて、身近にある7種類の試料で殺菌効果を比較した。その結果、7種類すべての試料で殺菌効果を観察することができた。また、滴下する試料の量が多いほど、殺菌効果を観察することができた。本研究によって、身近にあるものでエタノールの代用をすることが可能であるものの、時間の経過とともに殺菌効果が薄れる可能性が示された。

JRS-4

植物由来抗菌物質の探索

○山口 諒真, 東 文香, 檜垣 拓真, 南 仁太 (大阪府立岸和田高等学校)

Exploration of the antimicrobial substances derived from plants

○Ryouma Yamaguchi, Fumika Azuma, Takuma Higaki, Jinta Minami (Osaka Prefectural Kishiwada High School)

校内に生えている植物を用いて抗菌物質の探索を行った。抗菌効果及び殺菌効果の指標として阻止円を用い、細菌は納豆菌を利用した。その結果、ユーカリの葉を用いた場合に直径 1 cm 程度の阻止円を確認することができた。先行研究により、ユーカリには殺菌効果がある 1.8 シネオールユーカリプツールが含まれていることが報告されている。本研究でもこの殺菌物質が働いたと考えられる。一方、クマリンという殺菌物質が含まれている桜の葉では抗菌及び殺菌効果を確認することができなかった。これは納豆菌に対しては効果を示さない、もしくは納豆菌の増殖を抑制するのに十分な量のクマリンを用いていなかったためだと考えられる。今後は、より多くの植物を用いて抗菌及び殺菌効果を調べるとともに、乳酸菌や酵母菌も用いて、各菌種に応じた効果的な抗菌物質を探索していきたい。

JRS-5

大腸菌において、照射する紫外線の波長と Hsp 生産量にはどのような相関があるのか

○前場 雄晴, ○赤木 孝輔, ○岡野 和子, ○竹本 逞, ○松尾 瑠桜 (兵庫県立神戸高等学校)

Relationship between UV wavelength and Hsp production in *E. coli*

○Yusei Maeba, ○Kosuke Akagi, ○Wako Okano, ○Takuma Takemoto, ○Runa Matsuo (Hyogo Prefectural Kobe High School)

細胞の恒常性を保つタンパク質はヒートショックプロテインまたは分子シャペロン (以降 Hsp と記載する) と呼ばれるタンパク質であり、熱・紫外線・低酸素状態など様々なストレスに反応して増加する。私たちは紫外線の波長の違いによって Hsp の生産量に違いが生じると仮説を立て大腸菌を用いて実験を行った。まず電気泳動を用いて Hsp の観測を試みたが十分な結果が得られなかった。次の実験では、Hsp によるストレス耐性に着目し、大腸菌の生存率を計測することで Hsp のはたらきを間接的に観測する実験を行なった。その結果、Hsp の熱と紫外線への応答、さらに紫外線の波長による応答程度の違いが確認された。

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）
永沢 亮（愛知医科大学）
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)
Ryo Nagasawa (Aichi Medical University)
Yuki Wakabayashi (Osaka Institute of Public Health)

WCB-1

The strategies of *Salmonella* for evading from host immune system and antibiotics

○木村 宇輝¹, 佐伯 華蓮¹, 松山 悦大¹, 高屋 明子², 常世田 好司¹ (1鳥取大・医・免疫学, 2千葉大・薬・感染制御学)

○Uki Kimura¹, Karen Saiki¹, Nobuhiro Matsuyama¹, Akiko Takaya², Koji Tokoyoda¹ (1Div. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Tottori Univ., 2Dept. Infect. Ctrl. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

Antimicrobial bacteria arise from the "persisters" which survive from antibiotics without the resistant genes and reexpand after the treatment. We have previously shown that *Salmonella* decrease IgG-secreting plasma cells in the host bone marrow. Other groups have indicated a delayed formation of germinal centers during infection. However, it remains unclear how bacteria evade from host immunity and antibiotics in the body. To clarify it, we utilized a mouse infection model with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antibiotics failed to kill most *Salmonella* in the spleen, though it could highly increase the titer of lipopolysaccharides (LPS)-specific IgM in serum and the numbers of follicular CD4 T cells and germinal center B cells. Intriguingly, antibiotics quickly induced LPS on the outer membrane of *Salmonella*. The upregulation of LPS could lead to an increased secretion of LPS-specific IgM and induce the effective phagocytosis to host macrophages. Our results suggest that a combination of antibiotics and antibodies contributes to the persistence of *Salmonella* by enhancing the invasion into macrophages.

WCB-2

The Mode of action of tick defensin (persulcatusin) against *Staphylococcus aureus*

○下田 蒼, 渡辺 朋弥, 戸部 隆太, 米山 裕 (東北大・農・動物微生物)

○So Shimoda, Tomoya Watanabe, Ryuta Tobe, Hiroshi Yoneyama (Dept. Animal Microbiol., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

Antimicrobial peptides (AMPs) are present in a wide range of plants, animals, and microorganisms. Since AMPs are characterized by their effectiveness against emergent antibiotics-resistant bacteria, they are attracting attention as next-generation antimicrobial compounds that could solve the problem of drug-resistant bacteria. Persulcatusin (IP), an antibacterial peptide derived from the hard tick *Ixodes persulcatus*, shows high antibacterial activity against various Gram-positive bacteria as well as multidrug-resistant bacteria. Previously, we generated spontaneously mutants of *Staphylococcus aureus* with resistance to IP and analyzed their cross-resistance to other AMPs and antibiotics. Furthermore, we screened for mutants with high susceptibility to IP using a *S. aureus* transposon mutant library and identified 16 genes involved in IP resistance. These results indicated that IP may inhibit cell-wall synthesis. In this study, we analyzed effects of IP to bacterial cytoplasmic membrane using fluorescent probes. Furthermore, we attempted to estimate the novel targets of IP by competition assays between IP and other antimicrobial agents. Our results suggested that IP may induce inhibition of cell-wall synthesis via interaction with cell-wall precursors on the bacterial cytoplasmic membrane.

WCB-3

Regulon and response factors of the two-component system PmrAB of *Acinetobacter baumannii*

○山田 倫暉¹, 鴨志田 剛^{1,2}, 白石 宗³, 山口 大貴¹, 藤室 雅弘¹, 横田 伸一³, 八尋 錦之助¹ (1京都薬大, 2明治薬大, 3札幌医大)

○Noriteru Yamada¹, Go Kamoshida^{1,2}, Tsukasa Shiraishi³, Daiki Yamaguchi¹, Masahiro Fujimuro¹, Shin-ichi Yokota³, Kinnosuke Yahiro¹ (1Kyoto Pharm. Univ., 2Meiji Pharm. Univ., 3Sapporo Med. Univ.)

Acinetobacter baumannii has acquired resistance to antimicrobial agents, and extensively drug-resistant (XDR) strains have become a significant concern. Resistance to colistin, used as a last resort against XDR strains, is due to mutations affecting lipooligosaccharide (LOS) modifications involving the *pmrAB* two-component system. The role of PmrAB in antimicrobial resistance or environmental adaptation of *A. baumannii* is not fully understood. The aim of this study is to elucidate PmrAB functions and regulatory genes (regulon) through transcriptome analysis of activated mutant strains. We found that PmrAB responds to environmental factors (e.g., low pH, Fe²⁺, Zn²⁺, Al³⁺) and interacts specifically with Fe²⁺ rather than Fe³⁺ as reported in other bacterial species. Additionally, a novel functional ExxxE motif was found in PmrB, which is essential for metal recognition. Crucially, PmrAB modifies LOS in response to metal ions, especially Al³⁺, reducing its toxicity and increasing resistance to colistin or polymyxin B. This study highlights the importance of PmrAB in the environmental adaptation or resistance development of *A. baumannii*, contributing to a better understanding of the bacterium's high environmental adaptability and drug resistance.

WCB-4

Non-deacetylated poly-*N*-acetylglucosamine-hyperproducing *S. aureus* autoaggregates upon vortexing

○沓野 祥子¹, 林 幾江², 于 連升^{1,3}, 山田 作夫⁴, 久恒 順三^{1,3}, 菅井 基行^{1,3} (1)感染研・薬剤耐性, (2)広島大院・医系・細菌, (3)広島大院・医系・薬剤耐性, (4)崎福大・医療技術・臨床検査・栄養)

○Shoko Kutsuno¹, Ikue Hayashi², Liansheng Yu^{1,3}, Sakuo Yamada⁴, Junzo Hisatsune^{1,3}, Motoyuki Sugai^{1,3} (1)Antimicrob. Resist. Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Dept. Bacteriol., Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ., (3)Dept. Antimicrob. Resist., Biomed. Health. Sci., Hiroshima Univ., (4)Dept. Med. Technol., Fac. Health. Sci. Technol., Kawasaki Univ. Med. Welf.)

Staphylococcus aureus (SA) is one of the causative agents of biofilm infections. The *ica* operon (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* and *icaR*) is involved in the synthesis and extracellular export of poly-*N*-acetylglucosamine (PNAG), a major component of Staphylococcal biofilms. We have previously identified a novel repressor of SA PNAG biosynthesis, Rob, which binds to the 5bp motif in the *icaR-icaA* intergenic region. In the process of deleting the 5 bp motif (Δ 5bp), a strain was isolated that exhibited autoaggregation upon vortexing. In this study, we investigated the aggregation mechanism of this strain. Whole genome analysis revealed that the Δ 5bp strain had a mutation in *icaB* (Δ 5bpBm). PNAG is positively charged by partial deacetylation of IcaB and accumulates on the cell surface. During vortexing of Δ 5bp or PNAG biosynthesis inhibitors (*icaR*, *rob*) and *icaB* double defects, aggregates were found only in Δ 5bp Δ icaB, suggesting that the *ica* operon is more highly expressed in Δ 5bp Δ icaB. Furthermore, the supernatant of Δ 5bpBm was found to contain large amounts of PNAG that had not undergone deacetylation. These results indicate that strains producing large amounts of non-deacetylated PNAG autoaggregate and form non-adherent biofilms upon vortexing. This phenomenon indicates that SA may form non-adherent biofilms and is proposed as a new mechanism for non-adherent biofilm formation.

WCB-5

クレブシエラのカルバペネム低感受性化への3型線毛転写制御因子 MrkH 欠失による影響

○山中 夏樹¹, 高橋 弘樹², 高屋 明子¹ (1)千葉大院・薬・感染制御, (2)千葉大・真菌)

Effect of deletion of type 3 fimbriae transcriptional regulator MrkH in *Klebsiella* on low susceptibility to carbapenems

○Natsuki Yamanaka¹, Hiroki Takahashi², Akiko Takaya¹ (1)Dept. Infect. Cont. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ., (2)Med. Mycol. Res. Cent., Chiba Univ.)

カルバペネマーゼ遺伝子を獲得していないにも関わらずカルバペネム耐性となるクレブシエラでは、基質拡張型あるいはAmpC型 β -ラクタマーゼ遺伝子の獲得とその過剰発現及び外膜ポーリン OmpK35/36の欠失の両方がカルバペネム耐性の要因になると報告されている。我々はこれまでに、誘導型クラスC β -ラクタマーゼDHA-1遺伝子を獲得したクレブシエラでは、高濃度のカルバペネム系抗菌薬メロペネム (MEPM) で処理してもDHA-1依存的にMEPMを分解することでMEPM低感受性となることを報告している。今回、基質拡張型及びAmpC型 β -ラクタマーゼ遺伝子を獲得せずにMEPM低感受性となったクレブシエラ Kv004 について解析した。まず、Kv004の外膜ポーリン OmpK35/36の産生量を調べたところ、MEPM感受性であるKv002と同程度であった。このことからKv004のMEPM低感受性はOmpK35/36の減少によらないことが示唆された。Kv004を寒天培地に塗布すると特徴的なドライコロニーを形成し、液体培地で培養した菌液では短時間で凝集がみられた。このことからKv004では細菌間の接着に関わる遺伝子に変異があると考えられた。そこで、ドライコロニーを形成せず凝集がみられないKv002とKv004の全ゲノム配列を比較し、遺伝子変異を調べた。その結果、Kv004では3型線毛の発現に関わる *mrkH* に1ヌクレオチド挿入がありフレームシフトが生じていた。3型線毛は細菌間の接着に関わることから、Kv004のMEPM低感受性には細菌間接着の変化が寄与する可能性を考えている。この可能性を調べるため、現在Kv002の *mrkH* (*mrkH*_{Kv002}) をKv004に導入した *mrkH*_{Kv002} 相補株の作製を検討している。

WCB-6

加齢に伴う肺環境および多形核白血球の変化が肺炎球菌感染症の重症化に与える影響の解析

○小林 桃子 (阪大・院歯・微生物学)

Investigation of age-related changes in the lung on the severity of pneumococcal infection

○Momoko Kobayashi (Grad. Sch. Dent., Osaka Univ.)

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は市中肺炎の最大の起病菌である。肺炎球菌感染症は65歳以上の高齢者において罹患率や死亡率が高い。しかし、高齢者で肺炎球菌感染症が重症化する機構についてはまだ十分に明らかとなっていない。本研究では、病態の重症化に寄与する宿主の免疫反応について解析した。

若齢群 (7~8週齢) と高齢群 (73~78週齢) のマウスに *S. pneumoniae* TIGR4株を経鼻感染させ、生存率と体内の菌数分布を解析した。感染実験の結果、若齢群と比べ高齢群のマウスの生存率は有意に低く、肺内から検出される菌数も有意に高かった。次に、肺内の免疫応答を調べるため、肺炎球菌感染24時間後の肺洗浄液を回収し、マルチプレックス測定装置にてサイトカインの発現量を測定した。その結果、高齢群では感染に関わらずサイトカインの発現量が高い傾向にあった。さらに、肺組織の好中球エラスターゼを免疫染色した結果、若齢群と比べ高齢群で肺炎球菌に反応してエラスターゼの発現量が有意に増加することが示された。加えて、重症化に関与する細胞集団を特定するため、感染後の肺組織を単一細胞に分離し、シングルセルRNA-seq解析を行った。その結果、若齢群の感染肺では6種類の多形核白血球亜集団が遊走されているのに対して、高齢群では4つの亜集団のみが遊走されていることが示された。

以上の結果より、高齢マウスの肺組織の慢性的な炎症や好中球の過剰な活性化が病態の重症化を引き起こすことが示唆された。また、若齢マウス特異的に遊走される2つの多形核白血球亜集団は病態の重症化を防ぐ細胞集団である可能性が示された。

WCB-7

Water flow navigates the long journey of surface-associated bacteria living in hot springs

○上村 直輝¹, 千葉 直哉², 玉腰 雅忠², 中根 大介¹ (1)電通大・基盤理工, (2)東京薬大・生命科学部)

○Naoki Uemura¹, Naoya Chiba², Masatada Tamakoshi², Daisuke Nakane¹ (1)Dept. Eng. Sci., UEC., (2)Dept. Mol. Biol., TUPLS)

Bacterial motility can be broadly divided into swimming and surface motility, and surface motility is usually much slower than swimming. Why would bacteria choose to move on surfaces? We hypothesized that surface motility could help them cope with water flow, from rivers in nature to the bloodstream in the human body. We focused on *Thermus thermophilus*, a highly thermophilic bacterium that can crawl on surfaces using type IV pili (T4P). We reproduced the water flow conditions of the hot spring where *T. thermophilus* was isolated, using a flow chamber, a syringe pump, and a stage heater under an optical microscope. Our observations revealed that the cells exhibited positive rheotaxis, moving upstream against the direction of water flow at the speed of $16.9 \pm 10.9 \mu\text{m}/\text{min}$. In addition, we observed the response to water flow in six strains of *T. thermophilus* and ten species of bacteria belonging to the *Deinococcus-Thermus*. Only rod-shaped bacteria moved against water flow, by standing up at one pole and aligning their cell orientation parallel to the water flow like a weathervane. Notably, *Thermus* can move against rapid water flow with a shear stress 100 times higher than that swimming bacteria can move. These results suggest that surface motility bacteria have evolved a distinct rheotactic mechanism to cope with water flow conditions that would sweep away swimming bacteria.

ICD

医療関連感染にかかわる微生物の対策と検査

司会：横田 伸一（札幌医科大学）

ICD-2

医療関連感染で注意が必要なウイルスに対する感染対策

○黒沼 幸治（札幌医科大学・医・呼吸器・アレルギー内科学）

医療機関における感染対策は日常生活の場とは異なる面が多く、様々な病院職員に対する感染対策の啓発も ICD として重要となる。医療機関で重要な感染対策は患者を守るためのものと医療従事者を守るためのものを考えて指導する必要がある。医療従事者は自らの安全に配慮しながら患者に最適な環境を提供することを考えなければならない。

安全な医療を実施するためには感染対策として標準予防策（スタンダードプリコーション）に加え、病原ウイルスの感染経路により「空気」「飛沫（+エアロゾル）」「接触」に分けて予防策を追加して行う。COVID-19 の流行で当初は院内にウイルスを“持ち込まない”対策に力が入れていたが、現在はウイルス感染が“拡がらない”ようにすることが重要になっている。他にもインフルエンザ感染症や RS ウイルス感染症などの飛沫感染主体の感染症に対する対策を一緒に考えることが大切である。さらにノロウイルス感染症や流行性角結膜炎 (EKC) は感染性が高く、院内感染を拡げないために十分な接触感染対策が必要である。また、免疫の低下した患者に感染症を拡げないために医療従事者が麻疹、風疹、水痘帯状疱疹、ムンプスのワクチン接種を行うことも重要である。

医療従事者を守るためには患者が持つウイルス感染症として B 型肝炎、C 型肝炎、HIV などへの感染対策が重要である。針刺し、血液・体液曝露の対策などとして安全器材の導入やリキャップの禁止などを徹底するとともに、曝露後の対応方法についてもしっかりと準備しておく必要がある。

ICD-1

医療関連感染で注目すべき細菌に対する感染対策の実例

○藤谷 好弘（札幌医科大学・医・感染制御・臨床検査医学）

医療関連感染とは医療機関等で患者や医療従事者が新たに感染症に罹患することをいう。医療関連感染で重要な細菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、ESBL 産生菌、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)、薬剤耐性緑膿菌などの薬剤耐性菌や *Clostridioides difficile*、レジオネラなどが注目され、医療機関における集団感染事例も散見される。特に薬剤耐性菌は世界的な脅威であり、これらが検出された場合にどのような対応が必要になるだろうか。多くの医療機関で個室隔離や接触感染予防策などの感染対策のルールが定まっているものと思われる。しかし、感染管理部門としては施設内での更なる感染伝播の防止を目的として感染源や感染経路の特定のための疫学調査、積極的なスクリーニング検査、時に病原体の詳細な検査・解析が必要になる場合もある。特に無症候性病原体保有者（保菌者）について、感染症を発症していなくても感染源として感染伝播が持続する原因になる場合があり、時に保菌者に対するスクリーニング検査や感染対策を考慮する必要がある。施設内の感染伝播を防止するためには個々の感染者への感染対策に加え、俯瞰的視野で包括的な対応とマネジメントが必要となる。本講習会では具体的な事例および対応例を提示し、受講者の皆さまと議論ができればと考える。

ICD-3

医療関連感染で活用されてきている検査機器とその特性

○高橋 聡（札幌医科大学・医・感染制御・臨床検査医学）

医療関連感染の原因微生物を明らかにするための標準法は、培養検査と考える。しかし、迅速に同定ができない微生物、また、臨床現場での培養自体が困難な微生物がある。このような微生物の検出に、近年、核酸増幅法検査が用いられている。例えば、医療関連感染の原因微生物であるノロウイルスは、排泄物から容易に感染伝播することが知られており、迅速な検出が必要とされる。しかし、従来からの抗原定性検査（イムノクロマト法）では感度が高くないことから診断に至らない事例も多かった。そこで、保険適用は無いものの核酸増幅法検査による検出が可能な試薬と機器が医療関連感染対策として活用されている。

血液培養で黄色ブドウ球菌が検出された場合に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) か、メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (MSSA) かは、純培養後の薬剤感受性試験結果から判断していたが、こちらも核酸増幅法検査で *mecA* 遺伝子の有無を調べることでより迅速に判定が可能となり、より早期の適切な治療開始が可能となっている。

その他、クロストリディオイデス・ディフィシル、抗酸菌、カルバペネマーゼ産生遺伝子等の検出等においても核酸増幅法検査が活用されてきている。

本講演では、これらの検査機器とその特性を解説し、施設に合わせた活用のお役に立ちたいと考えている。

遺伝子水平伝播 (HGT) 現象の未踏領域

コンピーナー: 鈴木 仁人 (国立感染症研究所)
新谷 政己 (静岡大学)

Unveiling untapped areas of horizontal gene transfer

Conveners: Masato Suzuki (National Institute of Infectious Diseases)
Masaki Shintani (Shizuoka University)

生物において遺伝子水平伝播 (HGT: horizontal gene transfer) は進化の駆動力である。細菌は HGT によって薬剤耐性遺伝子などの生存・増殖に関わる遺伝子を獲得し、新たな宿主や環境に適応してきた。DNA はプラスミドが媒介する接合伝達などによって細菌間を伝播する。プラスミドは染色体外で環状もしくは線状の形態をとっており、主に IV 型分泌装置により接合伝達される。一方で、HGT は制限酵素や CRISPR-Cas システムなどの外来 DNA に対する防御システムに影響を受ける。これらの DNA 編集酵素は発見後、遺伝子工学手法として開発され、生命科学研究に貢献をもたらしてきた。近年、原核生物から哺乳類生物まで広く保存された防御システムも明らかとなってきている。本シンポジウムでは、細菌の DNA を移すシステムとそれを防ぐシステムの双方に関して最新の知見を紹介し、HGT 現象に関して新たな理解を得たい。

後援: 公益財団法人大隅基礎科学創成財団
Supported by: Ohsumi Frontier Science Foundation

S1-1

IV 型分泌装置の立体構造から解き明かされる新たな接合伝達メカニズム

○岸田 康平 (東北大・院生命)

Insights into Conjugative Transfer Mechanisms from the Structure of Type IV Secretion Systems

○Kouhei Kishida (Dept. Life Science, Tohoku Univ.)

接合伝達は、ある細菌細胞からプラスミド DNA が他細胞へ水平伝播する現象であり、薬剤耐性遺伝子の拡散に寄与することが知られている。接合伝達は主に IV 型分泌装置を介して行われるが、この分泌装置は受容菌細胞との接触に関与する性線毛の形成と DNA 分子の輸送の両側面を担っており、接合伝達のメカニズムを理解する上で重要な研究対象である。近年の立体構造解析により、IV 型分泌装置は数十種以上のコンポーネントから成る 2.8 メガダルトンの巨大な構造体であることに加えて、細胞内ではこの構造が遷移することが明らかとなった。本発表では、これら立体構造解析を背景に、接合伝達機構のメカニズムの解明を目指し、演者が近年明らかにした IV 型分泌装置の構造遷移に関わる接合伝達関連遺伝子や性線毛の形成におけるリン脂質の役割についての新たな知見を紹介し、接合伝達機構の新たなメカニズムについて議論したい。

S1-2

腸球菌の pELF1 型伝達性線状プラスミドと薬剤耐性遺伝子

○橋本 佑輔¹, 富田 治芳^{1,2} (¹群馬大・院医・細菌学, ²群馬大・院医・薬剤耐性菌実験施設)

Enterococcal Linear Plasmids and the Spread of Antimicrobial Resistance Genes

○Yusuke Hashimoto¹, Haruyoshi Tomita^{1,2} (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Gunma Univ., ²Lab. Bacteriol. Drug Resist., Grad. Sch. Med., Gunma Univ.)

抗菌薬耐性遺伝子 (ARG) の伝播は、公衆衛生上の大きな課題である。腸球菌においては、日常診療で頻用される多くの抗菌薬に耐性を示す多剤耐性株が問題となっており、これには接合伝達性プラスミドの水平伝播が大きな役割を果たしている。腸球菌には液体培地においても伝達可能な高頻度接合伝達性プラスミドが 3 種類知られている。そのうちのひとつである pELF1 は、国内医療機関にて分離されたバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) より 2019 年に発見された。pELF1 は両末端が異なる構造をした線状プラスミドであり、多数の ARG を保有する多剤耐性プラスミドであった。我々は pELF1 型プラスミドの網羅的疫学解析を実施し、pELF1 型プラスミドの特徴として、多剤耐性系統の腸球菌 (*E. faecium*) に分布していること、また Fitness cost, 並びに Transcriptome 解析から VRE で最多の *E. faecium* にフィットした特性が確認された。pELF1 型プラスミドの他の特徴として、腸球菌属内での広宿主域が知られている。pELF1 型プラスミドが国内において複数の腸球菌種を多剤耐性化した院内アウトブレイク事例や、スイスでは pELF1 型プラスミドが、*E. avium* 由来の carbohydrate utilization system を獲得し VRE の腸管定着性向上に寄与している事例の報告がある。我々は近年ベトナム環境由来の VRE が保有する pELF1 型プラスミド上に、水生環境細菌種が保持する薬剤排出ポンプ遺伝子のホモログを見出し、水生環境における ARG の水平伝播の可能性を確認した。このように、pELF1 型プラスミドは、腸球菌の ARG の重要な運び手として機能していることが示唆されており、その研究成果の一端を報告する。

S1-3

原核生物における新しい可動遺伝子グループ SE の発見

○矢野 大和 (感染研・薬剤耐性研究センター)

SE: a new class of mobile DNA element nesting in Gammaproteobacteria

○Hirokazu Yano (AMR-RC, NIID)

演者らは海洋細菌が保有する抗菌薬耐性遺伝子の水平伝播現象を観察する過程で、チロシン型部位特異的組換え酵素を利用するにもかかわらず、*attL x attR* 組換えの際に空サイトを作り出さない可動遺伝子単位を複数発見した (Nonaka *et al.* 2018 PLoS ONE; Nonaka *et al.* 2022 PLoS ONE)。本可動遺伝子単位の推定転移中間体上の *attL x attR* 組換え産物由来配列を PCR 増幅し、その配列を詳細に解析したところ、組換え産物は供与サイトの一方の鎖のみに由来していることが判明し、演者らはこれらの可動遺伝子単位を SE (Strand-biased circularizing integrative element) と命名した。SE は一部の IS グループのようにコピアウト経路を辿って転移すると推定された。続いて SE の宿主域を調べるため、RefSeq データベース内の完全ゲノム配列が得られている細菌株が保有する各 DNA 分子に SE のコア遺伝子のシンテニーブロックが存在しているかどうかを PSI-BLAST を使用して調べた。その結果、SE は Gammaproteobacteria 綱のみに分布し、Gammaproteobacteria 綱平均で 3.6% の DNA 分子上に存在していることが判明した。SE は *Vibrio*, *Shewanella*, *Pseudomonas* という海に関連する属が保有する DNA 分子上に高頻度 (19-21%) で発見され、*Escherichia* 属や *Klebsiella* 属の DNA 分子上には低頻度 (0.5%) で発見された。また SE はプラスミドより染色体上に多く発見された (Idola *et al.* 2023 Mobile DNA)。

S1-4

Structural mechanism of bridge RNA-guided recombination

○西増 弘志 (東大・先端研)

○Hiroshi Nishimasu (RCAST, The Univ. Tokyo)

Insertion sequence (IS) elements are the simplest autonomous transposable elements found in prokaryotic genomes. Recently, we discovered that IS110 family elements encode a recombinase and a non-coding bridge RNA (bRNA) that confers specificity for target DNA and donor DNA through two programmable loops. Here, we report the cryo-electron microscopy structures of the IS110 recombinase in complex with its bRNA, target DNA, and donor DNA, in three different stages of the recombination reaction cycle. The IS110 synaptic complex comprises two recombinase dimers, one of which contains the target-binding loop of the bRNA and binds target DNA, while the other coordinates the bRNA donor-binding loop and donor DNA. Collectively, our structural and functional data reveal a novel mechanism by which a bRNA confers target and donor DNA specificity to IS110 recombinases for programmable recombination.

S1-5

抗ファージ防御システムからみた細菌の生存戦略

○氣駕 恒太郎¹, アザム アアヘルマン¹, 小島 新二郎¹, 千原 康太郎¹, 近藤 恒平², Wenhan Nie¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈¹, 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹ (¹国立感染症研・治ワク, ²国立感染症研・AMRセンター)

Deciphering Bacterial Survival Strategies through Phage Defense System Analysis

○Kotaro Kiga¹, Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Kotaro Chihara¹, Kohei Kondo², Wenhan Nie¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita¹, Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹ (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis.)

地球上の細菌の約20%が毎日ファージによって殺菌されると言われている。細菌とそれに感染するウイルス(ファージ)の相互作用は、各々の進化において極めて重要な役割を果たしている。細菌はファージ感染に対抗するため、制限修飾系やCRISPR-Casなどの防御システムを進化させてきた。ファージもまた細菌の防御システムに対抗する手段を持っている。近年、新たな抗ファージ防御システムが多数発見されてきた。すでに明らかになっているだけでも、一つの細菌株は平均して5つ以上の防御システムを持つことが知られる。我々が注目していた防御システムの一つであるRetronは極めて特徴的で、逆転写酵素を発現することで一本鎖DNAを生成し、ファージ感染を検知する。ファージ感染を検知したRetron Ec78は、自身(細菌)のtRNAを分解することで自滅する(Azam AH et al.)。宿主細菌に自滅してしまったファージは増殖できず、感染の拡大に失敗する。しかし、ファージもまた非常に巧妙であり、一部のファージは自身のゲノムにtRNAをコードすることで、細菌によるtRNAの枯渇を防ぎ、細菌の生存を確保しつつ感染を成立させる。何十億年にわたる進化の過程で発展したこれらのメカニズムは、高度に洗練されたものである。さらに私たちは解析を進め、ファージがtRNA以外にも防御システムを攻略する戦略を多数有していることを明らかにした。本シンポジウムでは、防御システムからみた細菌とファージの生存戦略について議論したい。

S2

「動物細菌叢」の研究—ワンヘルスへの挑戦—

コンピーナー: 内山 淳平 (岡山大学)
楠本 正博 (農研機構)

Animal microflora research: a challenge to One Health

Conveners: Jumpei Uchiyama (Okayama University)
Masahiro Kusumoto (National Agriculture and Food Research Organization)

持続可能な社会の実現には「ワンヘルス」の概念が必要不可欠である。特に、「動物細菌叢」は動物の健康のみならず、ヒトの生活や環境保全に大きく関わっている。そのため、動物細菌叢を理解することで、ワンヘルスの柱の1つである「環境とヒトと動物のより良い関係づくり」が達成できると期待される。動物の細菌叢は、野生動物の食性・行動パターンの類似性、コンパニオンアニマルや家畜における飼育環境の均一性から、比較的高品質なデータが得られやすい特徴を有する。この特徴から、動物細菌叢のコンパニオンアニマル、畜産、環境での応用が期待されている。その例として、コンパニオンアニマルの腸内フローラ検査や家畜の腸内フローラのデータベース化がある。本セッションでは、先進的に動物細菌叢の研究を進めている研究者に登壇頂き、最新の研究成果を共有し、今後、どのように動物細菌叢が研究・利用されるか議論したい。

共催: 公益社団法人日本獣医学会微生物学分会
Co-sponsorship: Microbiology Subcommittee, Japanese Society of Veterinary Science

後援: 日本ワンヘルスサイエンス学会
Supported by: Nominal sponsorship: Japan Society of One Health Sciences

S2-1

ペットの健康管理に向けた新たな道: 腸内細菌叢による健康チェック

○島 綾香, 安宅 快, 石田 浩高, Murzabaev Marsel (アニコム(株)・検査事業部)

A new road to pet health care: Checking health by gut microbiota

○Ayaka Shima, Kai Ataka, Hirota Ishida, Murzabaev Marsel (Anicom Pafe Inc.)

ペットは自身の健康状態を言葉で伝えることができないため、ヒトに比べて疾患の発見が遅くなる傾向にある。現在、ペットの健康状態を非侵襲的かつ網羅的に調べられる検査法はほとんどない。一方で、腸内細菌叢はヒトや動物の健康維持に重要な役割を担っており、宿主の健康状態や環境の変化によりその構成比が変化することや、構成比の変化が疾患を引き起こす可能性があることが知られている。そこで、弊社では腸内細菌叢の測定がペットの疾患の予防や早期発見につながる可能性があると考え、月2万件の腸内細菌叢測定を実施可能なシステムを新たに構築し、ペット保険契約者を対象に腸内細菌叢の測定サービスを実施している。現在は毎月約1万7千件の腸内細菌叢測定を実施し、これまでに集まったデータは約70万件にのぼる。これらのデータをもとに、個々の測定結果に応じて飼い主様にフードや、健康診断の受診を提案し、疾患の予防や早期発見につながる啓蒙活動に取り組んでいる。本講演では、これらのデータの中から動物種や品種による腸内細菌叢の違いや、健康な動物と疾患を有する動物の腸内細菌叢の違いについて例を挙げて紹介する。

S2-2

伴侶動物における糞便移植療法の現状と展望

○大森 啓太郎 (東京農工大)

Current status and perspective of fecal microbiota transplantation in companion animals

○Keitaro Ohmori (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

糞便移植療法は、糞便微生物移植 (Fecal Microbiota Transplantation: FMT) と呼ばれ、健康なヒトや動物の糞便中に存在する微生物叢を、疾患に罹患した患者や動物の消化管内に移植する治療法である。近年の次世代シーケンサー技術の発展に伴い、腸内細菌叢の構成や機能の解析が進むにつれ、ヒトおよび動物の様々な疾患における腸内細菌叢の異常 (ディスバイオーシス) が明らかになってきた。そのため現在、ディスバイオーシスの改善を目的とした FMT が、医学および獣医学分野において古くは新しい治療法として注目を集めている。

人医療においては、*Clostridioides difficile* 感染症の患者に対する FMT の劇的な治療効果をきっかけに、炎症性腸疾患などの消化器疾患だけではなく、糖尿病やうつ病などの非消化器疾患に対しても FMT が実施され、その効果が明らかになっている。さらに FMT は、移植片対宿主病の抑制や、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法における治療抵抗性の改善に有効であることも報告されている。

犬や猫を対象とする伴侶動物医療においては、臨床試験レベルではあるが、主に消化器疾患の動物に対して FMT が実施されている。演者は、慢性消化器疾患の犬に加え、非消化器疾患としてアトピー性皮膚炎の犬に対する FMT を実施し良好な治療成績を報告している。そこで本演題においては、演者が実施している犬を対象とした FMT のデータを中心に、伴侶動物医療における FMT の現状と今後の展望について解説したい。

S2-3

ウサギの腸内環境と食性

○川崎 淨教 (香川大・農)

Intestinal environment and feeding habits of rabbits

○Kiyonori Kawasaki (Fac. Ag., Kagawa Univ.)

小型後腸発酵型動物であるウサギは、腸内細菌の主要な発酵の場として大きな盲腸を備えており、盲腸内内容を盲腸糞として再摂取する食糞を行う。食糞を行うことでウサギは微生物体タンパク質やビタミンなどを消化・吸収することが可能となる。

アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) では、盲腸糞を作るための高度な仕組みは盲腸および近位結腸部に備わっていることが明らかとなっており、この仕組みを維持するためには比較的粒子サイズの大きい不溶性繊維が食事中に豊富に含まれている必要があることも報告されている。さもなければ、この仕組みを維持できず、下痢を発症することや、繊維質の低下に伴い増加する未消化のデンプン質やタンパク質が盲腸内での異常発酵を引き起こす結果、盲腸詰まりを発症し、最悪の場合死に至ることなどが報告されている。

一方、日本固有のウサギであるアマミノクロウサギ (*Pentalagus fernessi*) はウサギでは珍しい堅果食であることが報告されており、冬季では食餌中のおよそ 4 割がドングリ (スダジイ) であることが示唆されている。ドングリはデンプン質を多く含むだけでなく、タンニンといった有毒物質を含んでいるため、そのような食餌では、腸内環境の悪化やタンパク質消化率の低下などが引き起こされると考えられるが、アマミノクロウサギではそのような報告はほとんど存在しない。このように同じウサギという名前がつく動物であってもその食性や行動、腸内環境は大きく異なることが分かってきた。今回は、ウサギに関するこれまでに得られた成果に加え、本領域の最新の知見を紹介し、今後の研究の方向性について議論する場としたい。

S2-4

ブタの腸内細菌叢と生産性の関係

○井上 亮 (摂南大・農・動物機能科学)

Impact of gut microbiota on productivity in pigs

○Ryo Inoue (Lab. Anim. Sci., Setsunan Univ.)

ブタでも腸内細菌叢が重要な役割を担っていることが徐々にわかってきている。ブタにおける腸内細菌叢の役割はヒトのそれと共通する部分も多いが、次の 2 点において特異性がみられる。まず、不溶性の食物繊維である、セルロースやヘミセルロースの分解能力を有している点である。もちろん、草食動物の消化管細菌叢に比べるとその能力は低いが、*Fibrobacter* や *Treponema* といった、ヒト腸内細菌叢にはみられないセルロースやヘミセルロース分解菌の存在が確認できる。すなわち、ブタの腸内細菌叢では不溶性食物繊維から短鎖脂肪酸が産生されることになる。次に、この腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸の代謝エネルギーへの貢献が高い点である。ブタでは短鎖脂肪酸が代謝エネルギー 2-3 割に貢献し得るといわれており、これは同じ雑食であるヒトの 1 割程度よりも顕著に高い。この 2 点の特異性はブタの生産性に直結する重要な役割であり、実際に不溶性食物繊維の分解菌が少なく、短鎖脂肪酸産生量が少ない腸内細菌叢を有するブタ、すなわち腸内細菌叢が攪乱状態にあるブタでは生育や繁殖成績が悪いことが示されている。本講演では、ブタの腸内細菌叢の特徴を解説し、現在明らかになっている生産性との関係を概説する。また、腸内細菌叢を改善することで、生産性も改善し得るといふ事例、そして養豚産業における腸内細菌叢活用の展望も併せて紹介する。

S2-5

乳牛における子宮内細菌叢解析の産業利用の可能性

○八木沢 拓也¹、内山 淳平²、片桐 成三³ (¹NOSAI北海道、²岡山大・医・細菌、³北大・獣医・臨繁)

Commercial potential for application of uterine microbiota analysis in dairy cows

○Takuya Yagisawa¹, Jumpei Uchiyama², Seiji Katagiri³ (¹Hokkaido Agric. Mut. Aid Assoc., ²Okayama Univ., ³Hokkaido Univ.)

乳牛は、分娩することではじめて乳を生産する。乳牛が一生で分娩する回数は平均で約 3 回であり、酪農家は各分娩間隔が一定になるよう繁殖管理に努めている。受胎性が低下すると、分娩してから次の受胎までの期間が長引くこととなり、乳生産に対する飼料代がかさむことで経営的損失を生む。低受胎に至る原因は、生殖器の異常、蹄病等の併発疾患、低栄養、ストレスなど多岐にわたる。原因に基づいた対策を講じることは安定した経営を行ううえで重要である。しかしながら、既存の検査法では原因が特定できない個体が一定の割合で存在し、酪農経営を逼迫している。

近年、ヒトにおいて、無菌と考えられてきた子宮内に細菌の存在が明らかにされ、妊孕性との関連性が示された。正常妊娠においては、不妊と比較して *Lactobacillus* 属菌が主要かつ優勢な細菌として存在し、一方で、不妊の子宮内には慢性子宮内膜炎の原因菌の構成割合が増加することが示された。このように、子宮内細菌叢解析により、子宮内環境が妊娠に適した状態にあるか評価が可能である。現在、この技術は、先進医療となり、原因不明な不妊症に対して活用されている。

ウシはヒトと同じ哺乳動物であり、子宮機能も類似する点があることから、ウシの子宮細菌叢と受胎性との関連性が想定される。子宮細菌叢解析をウシの低受胎の検査へ外挿できる可能性が考えられる。本講演では、ウシにおける受胎性に関する子宮内細菌叢の研究を紹介し、原因不明な低受胎の評価への応用の可能性について議論する。

S3

病原体-宿主間ノン・セルフ認識の新潮流

コンピーナー：小川 道永 (国立感染症研究所)
野澤 孝志 (京都大学)

New trends in "self- and non-self-recognition" recognition in host-pathogen interactions

Conveners: Michinaga Ogawa (National Institute of Infectious Diseases)
Takashi Nozawa (Kyoto University)

宿主は病原体特有の分子をパターン認識レセプターで感知することで病原体を非自己 (ノン・セルフ) として識別している。さらに、近年では、病原体特有の成分 (タンパク質・核酸・糖・脂質) だけでなく、病原体の宿主内ライフサイクルに関連した分子やイベントもノン・セルフとして認識され、生体防御の誘導に関わるという新たな概念が提唱されている。それに対して、病原体もまた、病原因子を駆使し、これまで知られていなかった多彩な宿主因子や生体防御システムなどを標的とし、細胞への侵入や細胞死、炎症応答などの宿主高次機能を巧みに操作・制御することが明らかとなってきている。本ワークショップでは、細菌と宿主間におけるノン・セルフ認識を介した相互作用について、様々な細菌種における細菌-宿主相互作用を解析している研究者とともに、最先端のトピックスを議論したい。

S3-1

肺炎球菌のシアリダーゼ NanA による膜孔形成毒素 Pneumolysin 依存的な膜損傷制御に関する解析

○栗石 早矢佳, 小川 道永, 明田 幸宏 (感染研・細1)

Analysis of Pneumolysin-dependent membrane disruption by pneumococcal sialidase NanA

○Sayaka Shizukuishi, Michinaga Ogawa, Yukihiko Akeda (Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis.)

肺炎球菌は主にヒトの鼻咽頭に常在し、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肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こすことがある。IPD 発症経路の一つとして、菌が宿主細胞へ侵入し、膜孔形成毒素 Pneumolysin (Ply) によってエンドソーム膜を損傷することでエンドサイトーシスによる殺菌を逃れ、血中や髄液へと移行する経路がある。このように Ply は肺炎球菌の宿主細胞内生存に必須の病原因子であるが、一方で、過度なエンドソーム膜の損傷は宿主殺菌機構であるオートファジー誘導の引き金ともなることが知られている。さらに、宿主細胞外においても Ply は細胞膜に膜孔を形成するため、過度な細胞膜の損傷は菌の定着の足場となる宿主細胞の細胞死を誘導してしまう。したがって、肺炎球菌は自身の宿主内生存のために Ply の活性を適度に調節する必要がある。我々は肺炎球菌が生存戦略として Ply の活性を制御している可能性について解析を行った結果、シアリダーゼ活性を有する NanA が Ply による過度のエンドソーム膜損傷を抑制することを見いだした。本シンポジウムでは、Ply による過度なエンドソーム損傷を NanA が制御する分子機構、さらには、シアリダーゼ阻害剤であるオセルタミビルの侵襲性肺炎球菌感染制御の可能性について最新の知見を紹介する。

S3-2

Outer membrane vesicles of *Escherichia coli* relay inflammatory responses to exosomes of macrophage

○岡 真優子¹, 今宮 里沙², 篠原 明莉², 山口 雄大³, 堀口 安彦⁴ (1京都府立大院・生命環境・食環境安全性学, 2京都府立大・生命環境・食環境安全性学, 3国立感染症研・細菌1, 4阪大・微研・分子細菌学)

○Mayuko Oka¹, Risa Imamiya², Akari Shinohara², Takehiro Yamaguchi³, Yasuhiko Horiguchi⁴ (1Food Hyg. Env. Health, Grad. Sch. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., 2Food Hyg. Env. Health, Facul. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., 3Dep. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., 4Dep. Mol. Bacteriol., Res. Inst. Microb. Dis. Osaka Univ.)

Extracellular membrane vesicles (EVs), which are derived from mammalian cells, have been shown to influence intracellular events of target cells, such as the gene expression and cell motility. Exosomes, a type of EVs, especially have been reported to cause inflammatory responses in recipient cells. Both Gram-negative and Gram-positive bacteria also release EVs, which play a critical role in the bacterium-bacterium and bacterium-host interactions. Here, we show that outer membrane vesicles (OMVs) of *Escherichia coli* and exosomes of macrophages (Mφs) infected with pathogens relay inflammatory signals to naive Mφs. Exosomes from Mφs infected with live *E. coli* stimulated naive Mφs to secrete pro-inflammatory factors. Inflammatory responses induced by exosomes derived from Mφs infected with heat-inactivated *E. coli* or lipopolysaccharide were significantly weaker than those elicited by OMVs released from live *E. coli*. OMVs from a *cirA*-deleted strain of *E. coli* were less able to induce exosome-mediated inflammatory responses through the naive Mφs. The C-terminus of the *CirA* protein, which was conveyed by OMVs and exosomes from *E. coli* to naive Mφs, was involved in relaying the inflammatory signals. These data suggest that *E. coli*-derived OMVs and subsequent Mφ-derived exosomes trigger inflammatory responses in Mφs that reside in tissues remote from the site of bacterial infection.

S3-3

The mechanism of macrophage cell death-inducing by *Salmonella* T3SS-2

○羽田 健 (北里大・薬・微生物)

○Takeshi Haneda (Lab. Microbiology., 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. However, the mechanism of T3SS-2 effectors induce macrophage cell death remains unclear. In this presentation, I would like to discuss the latest findings on the mechanism of macrophage cell death-inducing by T3SS-2 of *S. Typhimurium*.

S3-4

The Bsv locus contributes to the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*

○西田 隆司¹, 平松 征洋¹, Dendi Krisna Nugraha¹, 堀口 安彦^{1,2} (1阪大・微研・分子細菌学, 2阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Takashi Nishida¹, Yukihiko Hiramatsu¹, Dendi Krisna Nugraha¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (1Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., 2CiDER, Osaka Univ.)

A facultative intracellular bacterium *Burkholderia pseudomallei* (Bps) causes melioidosis. The pathogenicity of Bps is often evaluated by the intracellular growth in in vitro culture. However, closely related *B. thailandensis* (Bt), which does not cause diseases, also exhibits similar intracellular growth. Although the type III secretion system (T3SS) of Bps is known to play a primary role in its intracellular growth and pathogenicity in animals, Bt also expresses an almost identical T3SS. We previously demonstrated that T3SS-deficient Bt (BtΔT3SS) lost the intracellular growth ability, but T3SS-deficient Bps (BpsΔT3SS) did not, implying that unknown virulence factors besides T3SS of Bps may be involved in the intracellular growth and pathogenicity in animals. To seek such factors, we screened a transposon library prepared from BpsΔT3SS and identified a gene locus named Bps-specific virulence (Bsv), which is absent in the Bt genome. BpsΔT3SS with a gene deletion in the Bsv locus (BpsΔT3SSΔ*bsvB*) failed to proliferate in Raw264.7 cells. Microscopic analyses revealed that the Bsv locus facilitates the proliferation of Bps in lysosomal marker (Lamp1)-positive vacuoles by inhibiting the vacuolar acidification. In a mouse infection assay, BpsΔT3SSΔ*bsvB* was found to be less lethal than BpsΔT3SS. These results suggest that the Bsv locus contributes to the pathogenicity of Bps.

S3-5

A new single-cell RNA-seq approach to analyze interaction of *Salmonella* to host immune system

○日吉 大貴¹, アルカディム ハマド², 山下 舞花², 奥崎 大介², 児玉 年央¹ (1長大・熱研・細菌学, 2阪大・免フロ・ヒト免疫)

○Hirota Hiyoshi¹, Mohamad Al Kadi², Maika Yamashita², Daisuke Okuzaki², Toshio Kodama¹ (1Dept. Bacteriol., NEKKEN, Nagasaki Univ., 2Hum. Immunol., iFReC, Osaka Univ.)

Salmonella enterica causes a serious systemic infection in human. A rapid increase of multi-drug resistant *Salmonella* strains have been highly concerned and needed new therapies. To develop new therapies, it should be known more detail how the pathogen interacts with host immune system. Nonetheless, due to recent divergence of immune cell subsets, it becomes difficult to analyze the interaction by previous conventional techniques. In this study, we attempted using a single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) with fixed infected spleen tissues to see how *Salmonella* interacts and subverts the host immune cells during systemic infection. CL57BL/6 mice were infected with *S. Typhimurium* wild-type (wt) or remained uninfected, and the scRNA-seq analysis in the samples showed different immune cell heterogeneity and occurrence of a unique neutrophil subset in the spleen of mice infected with *S. Typhimurium* wt. Moreover, a crucial virulence factor for the systemic infection, type III secretion system coded on *Salmonella* pathogenicity island-2 (T3SS-2), and one of T3SS-2 effector were required for induction of the neutrophil subset. Collectively, this new scRNA-seq approach can be used to understand mechanism by which *Salmonella* overcomes host immune defense to cause systemic infection and consider a concept of new therapies.

S3-6

液-液相分離体ストレス顆粒は KEAP1-NRF2 経路を制御する

○野澤 孝志, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 中川 一路 (京大・院医・微生物)

Stress granules regulate the KEAP1-NRF2 activation during Group A Streptococcus infection

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

宿主細胞は、病原体の感染を直接的もしくは間接的に感知し、細胞の自律的な免疫応答を活性化させる。最近我々は、ヒトの病原性細菌の一つ A 群レンサ球菌 (Group A Streptococcus, GAS) の感染細胞において、分泌毒素に反応してストレス顆粒 (Stress granule, SG) が形成されることを明らかにした。ストレス顆粒は、低酸素やウイルス感染などの様々なストレス刺激に反応して形成される液液相分離体で、ストレス回避に寄与していると考えられている。GAS 感染により誘導された SG の機能を調べるために、SG 形成不全細胞 (G3BP1/2 dKO 細胞) を作成し、感染制御に関わる様々な遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、感染細胞では、SG 形成依存的に p62/SQSTM1 や NQO1 の遺伝子発現が活性化していることが示唆された。これらの遺伝子発現は酸化ストレス等で活性化する KEAP1/NRF2 経路により制御されていることから、KEAP1 の細胞内局在を解析した。共焦点顕微鏡観察や SG 局在タンパク質の近接バイオチン解析から、KEAP1 は SG に局在変化し、NRF2 が活性化していることが示唆された。KEAP1 の活性化経路は、i) KEAP1 の酸化的修飾を介したプロテアソーム分解と ii) KEAP1-p62 結合を介した 2 経路が存在するが、GAS 感染時の KEAP1 の SG 局在化は p62 非依存的であったことから、第 3 の KEAP1/NRF2 活性化経路であることが示唆された。以上の結果から、GAS 感染細胞は、分泌毒素を感知した統合的ストレス応答シグナルが、SG 形成を介して KEAP1/NRF2 経路を活性化させ、細胞の恒常性維持を担っていることが示唆された。

S4

ゲノム微生物学研究の最先端

コンピーナー：小椋 義俊 (久留米大学)
大島 拓 (富山県立大学)

The cutting edge of genome microbiology research

Conveners: Yoshitoshi Ogura (Kurume University School of Medicine)
Taku Oshima (Toyama Prefectural University)

ゲノム解析が手軽に行えるようになったことで、微生物学の様々な分野においてゲノム研究やゲノム配列情報を利用した基礎・応用研究が盛んに進められている。研究会「微生物ゲノム研究のフロンティア」を前身として2007年に発足した「日本ゲノム微生物学会」では、病原微生物から環境微生物に至る様々な微生物を研究材料とする300から500名の研究者が集まり、ゲノム研究に関する最新技術や新知見を発表し、活発な討論と研究交流が行われている。本シンポジウムでは、日本ゲノム微生物学会を代表する5名の研究者に最先端のゲノム研究について発表頂き、今後のゲノム微生物学研究の方向性について議論したい。

後援：日本ゲノム微生物学会

Supported by: Society of Genome Microbiology, Japan

S4-1

細菌の遺伝子サイレンシング

○大島 拓 (富山県大・生工)

Gene silencing in bacteria

○Taku Oshima (Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ.)

外来遺伝子の水平伝搬を介した獲得は、細菌のゲノム多様性を増し、多様な環境変化に対応する能力を強化すると考えられている。一方で、多くの細菌は、外来遺伝子の発現を特異的に抑えるため、サイレンサーと呼ばれるDNA結合タンパク質を持つ。サイレンサーは、外来遺伝子に結合し、直接、外来遺伝子の転写を阻害する。その結果、外来遺伝子の発現による宿主への悪影響を低減できるとされる。その結果、外来遺伝子をゲノム上に保持したまま、宿主が世代を重ねることで、徐々に外来遺伝子が宿主の遺伝子ネットワークに取り込まれると推定されている。しかし、本当にそれが起こるのか？実際に、外来遺伝子は悪さをするのか？さらには、悪さをするかもしれない外来遺伝子をどのように使っているのか？の検証は、まだまだ不十分である。本シンポジウムでは、我々が行ってきたゲノム解析による検討を紹介し、サイレンサーの機能について議論したい。

S4-2

Novel enzymes and pathways in archaea

○道盛 裕太, 跡見 晴幸 (京大院工・合成生化)

○Yuta Michimori, Haruyuki Atomi (Dept. Synth. Chem. Biol. Chem., Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Archaea represent the third domain of life on our planet. The Archaea exhibit a wealth of unique biological functions and mechanisms, offering new targets in many fields of biochemistry and biotechnology. In addition, understanding the evolutionary relationship among the archaea, bacteria and eukaryotes is a challenging topic of research that must be pursued in order to envision the origin of life and how it evolved. Finally, the variety of novel biological systems identified in the Archaea, such as metabolic and regulatory mechanisms, provide a vast resource of biomolecules that can be applied in various fields of biotechnology. Here we will present our recent research on the metabolism of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. The organism is an obligate heterotroph and anaerobe, and grows on a variety of organic compounds including peptides/amino acids, oligo- and poly-saccharides, and organic acids such as pyruvate. The genome consists of 2,088,737 bp with 2,306 predicted coding regions. Among the 2,306 genes, function based on primary structure can only be predicted on approximately half of the genes. Consequently, our understanding on many of the metabolic pathways in *Thermococcus kodakarensis* remain incomplete. The presentation here will focus on enzymes and pathways related to pentoses and amino acids.

S4-3

Large-scale MAG-based analysis of microbial diversity

○森 宙史 (遺伝研・情報研究系)

○Hiroshi Mori (Dept. Informatics, National Inst. Genetics)

Metagenomics is a powerful method that can reveal the diversity of microbes, including uncultured bacteria. In particular, Metagenome Assembled Genome (MAG), a draft genome sequence reconstructed from metagenome sequences, is powerful for estimating the evolutionary relationships and metabolic potential of microbes. We have developed Microbiome Datahub (<https://mdatahub.org>), a database of publicly available MAGs. In this presentation, I will present the results of our analysis aimed at elucidating bacterial diversity using large-scale comparative genomic analysis of MAGs.

S4-4

Evolutionary strategies for the recovery of growth loss due to genome reduction

○Bei-Wen Ying (筑波大・生命環境系)

○Bei-Wen Ying (Inst. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Our study investigated the impact of genome reduction and evolution on growth and transcriptome in *Escherichia coli*. Employing experimental evolution, we observed a notable recovery in growth rate, initially hampered by genome reduction. Diverse genomic mutations emerged during evolution, randomly distributed across the reduced genome. Genome mutation and transcriptome analyses suggest that evolutionary adaptations to genome reduction follow unique mechanisms in each lineage. Gene network analysis identified distinct gene modules linked to the evolutionary changes in growth, genome mutation, and gene expression. This diversity in evolutionary paths led to improved growth fitness and a balanced transcriptome architecture, demonstrating that multiple evolutionary routes can effectively compensate for genome reduction. Furthermore, the systematic survey of an assortment of reduced genomes with broader characteristics intriguingly found the correlations of reduced genome size to bacterial growth rate, mutation frequency, and transcriptome reorganization. It indicated the intricate coordination of global traits in bacteria undergoing genome reduction and evolution as a law of living systems.

S4-5

構造情報から読み解く *Pseudomonas* 属細菌の核様体タンパク質

○水口 千穂^{1,2} (1東大院・農生科・AgTECH, 2東大・微生物連携機構)

Nucleoid-associated proteins in *Pseudomonas*: from structure to function

○Chiho Suzuki-Minakuchi^{1,2} (1AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, 2CRIIM, UTokyo)

核様体タンパク質 (NAPs) は DNA に結合し、細菌の核様体形成や遺伝子の転写制御に関与する。NAPs には様々な種類が存在し、DNA への結合様式や DNA の折り畳み方は NAPs によって異なる。私はこれまでカルバザール分解プラスミド pCAR1 とその宿主である *Pseudomonas putida* KT2440 株の染色体にコードされる NAPs について研究を進めてきた。pCAR1 には 3 種類の NAPs (MvaT ホモログ, NdpA ホモログ, HU ホモログ) がコードされており、これらは KT2440 株の染色体にコードされるそれぞれのホモログと協調的に機能する。本発表では MvaT ホモログと NdpA ホモログについて、構造情報からこれらのタンパク質の機能について考えたい。

MvaT ホモログは、腸内細菌の H-NS と同様に外来遺伝子のサイレンシングを行うが、アミノ酸配列の保存性が低い「機能的ホモログ」である。特に N 末端側の二量体・多量体化ドメインは腸内細菌の H-NS ホモログと *Pseudomonas* 属細菌の MvaT ホモログで保存性が低く、両者の多量体形成機構は異なるのではないかと予想された。そこで KT2440 株染色体由来の MvaT ホモログ TurB について、多量体形成に必要な二箇所の二量体化部位の構造を結晶構造解析により明らかにした。本発表では MvaT ホモログと H-NS ホモログが持つ多量体形成機構の共通点と相違点について議論する。一方、NdpA ホモログについては世界的にも研究例が非常に少なく、どのように DNA に結合しているのかすらわかっていない。そこで本発表では、pCAR1 にコードされる NdpA ホモログ Pnd について、AlphaFold2 と MD シミュレーションから明らかとなりつつある DNA への結合様式についても議論する。

S5

感染重症化メカニズム研究の最前線

コンピーナー：原 英樹 (旭川医科大学)
松岡 悠美 (大阪大学)

New insights in exacerbation mechanisms of infection

Conveners: Hideki Hara (Asahikawa Medical University)
Yumi Matsuoka (Osaka University)

病原細菌がヒトなどに感染すると発症し、重症化した場合には死に至ることもある。感染症対策としては、まず感染を防ぐことが第一であるが、感染後にも重症化を防ぐことが重要になってくる。古典的な概念では、低病原性細菌に感染した場合には治癒し、高病原性細菌に感染した場合は重症化すると考えられてきた。しかしながら、昨今の新型コロナウイルス患者の知見から、同じ病原体に感染しても重症化する患者としない患者に分かれることが明らかとなってきた。つまり、感染病態が重症化するには細菌側の因子だけでなく、宿主側の因子や環境因子など様々な要因が関わってくる。本セッションでは、細菌因子や病原因子に加えて、最新の研究から明らかになってきた感染症の重症化に関わる様々なファクターを中心に紹介し、より実態に近い感染重症化機構について議論する。

S5-1

Exacerbation mechanism of *Acinetobacter* infection through Gsdmd-mediated membrane rupture

○松田 泰幸¹, 山内 肇¹, 鴨志田 剛², 白石 宗³, 横田 伸一³, 原 英樹¹ (1旭川医大・医・感染症, 2京葉大・微生物感染制御, 3札幌医大・医・微生物)

○Yasuyuki Matsuda¹, Hajime Yamauchi¹, Go Kamoshida², Tsukasa Shiraiishi³, Shin-ichi Yokota³, Hideki Hara¹ (1Dept. Infect. Dis., Div. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ., 2Dept. Microbiol. Infect. Control Sci., Kyoto Pharm. Univ., 3Dept. Microbiol., Sch. Med., Sapporo Med. Univ.)

Acinetobacter baumannii, a Gram-negative bacterium, is a major cause of hospital-acquired infections, primarily manifesting as pneumonia, septicemia, and meningitis. Although innate immune responses affect pathogenesis of *Acinetobacter* infection, mechanisms by which *Acinetobacter* triggers inflammatory responses remain poorly elucidated. Here we found that *Acinetobacter* LPS is essential for inflammasome activation in infected macrophages. LPS is recognized by caspase-11, a sensor of intracellular LPS, to induce the gsdmd-mediated cell death pyroptosis and the production of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-18. Notably, *Gsdmd*^{-/-} mice, but not IL-1 β - or IL-18-deficient mice, harbored less bacterial burden in organs infected with *Acinetobacter baumannii*. Enzymatic activation of pmrA/B system in *Acinetobacter baumannii*, which is known to induce phosphoethanolamine modification of LPS, impaired inflammasome activation in infected macrophages. Moreover, the enhancement of pmrB activity resulted in decreased mortality and bacterial burden in *Acinetobacter*-infected mice. Taken together, these findings demonstrate that *Acinetobacter baumannii* promotes inflammasome activation through LPS, promoting bacterial growth in infected individuals and worsening the disease pathogenesis.

S5-2**Genome-wide screening of *Pseudomonas aeruginosa* genes required to evade neutrophils in the lung**○中塚 賀也^{1,2}, Gabriel Nunez² (¹京大・医・呼吸器内科学, ²Dept. Path., Univ. Michigan)○Yoshinari Nakatsuka^{1,2}, Gabriel Nunez² (¹Dept. Respir. Med, Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., ²Dept. Path., Univ. Michigan)

Pseudomonas aeruginosa is a common pathogen for pneumonia in hospitals. Neutrophils play a critical role in early host defense against *P. aeruginosa* in the lung, and pathogen evasion from neutrophil killing is a critical step for the establishment of lung infection. However, knowledge is scarce about the genes utilized by *P. aeruginosa* to effectively limit neutrophil-mediated killing in the lung. By performing genome-wide transposon-mutant library screening in vivo, we find that *P. aeruginosa* infection in the lung is promoted by pathogen nitrite reductase *nirD*. *NirD* is required for ammonium production from nitrite, a metabolite derived from nitric oxide (NO) generated by inducible NO synthetase (iNOS) in phagocytes. *P. aeruginosa* deficient in *nirD* exhibits reduced survival after phagocytosis by wild-type neutrophils, but not iNOS-deficient neutrophils. Mechanistically, *nirD* enhances *P. aeruginosa* survival by preventing the pathogen from localization in the late phagosomes, which contain highly bactericidal environment. After intratracheal infection, *P. aeruginosa* deficient in *nirD* shows accelerated elimination from wild-type mice, but not from mice with selective iNOS deficiency in neutrophils. While in general iNOS helps the killing activity of neutrophils, our study revealed that *P. aeruginosa* uses the molecule for their survival.

S5-3**Gas6/Axl による呼吸器感染症の重症化**

○柴田 岳彦 (東医大・医・微生物)

Severe respiratory infections caused by Gas6/Axl axis

○Takehiko Shibata (Dept. Microbiol., Sch. Med., Tokyo Med. Univ.)

様々な原因により感染症は重症化する。病原体の病原性や量だけでなく、宿主の状態にも依存する。例えば高齢、喫煙、肥満、または糖尿病の罹患は重症化リスクとして挙げられる。このように個体レベルでのリスクファクターは判明しているが、分子・細胞レベルでの解明にはほとんど至っていない。これまでに我々は、致死量のインフルエンザウイルスをマウスに感染させると、感染初期に一過的に growth arrest-specific protein 6 (Gas6) が産生され、その受容体 Axl を介して I 型 IFN の産生を抑制し、ウイルスの増加に伴う感染症の重症化を招くことを示した。また致死量でなくてもウイルス感染に伴い感染後期には Gas6 が誘導され、このときに統一的に細菌が感染すると、細菌が容易に増殖し、重症化することを見出した。このようにウイルス感染により誘導される Gas6 はそのタイミングによって感染症の重症化をもたらすことを明らかにした。一方、Gas6 レベルの上昇は、ウイルス感染に限らない。最近我々は、老齢マウスや糖尿病モデルマウスでは特に気道上皮細胞に Gas6 が蓄積し、血中や気管支肺胞洗浄液中の Gas6 濃度が上昇することを見出した。これらマウスはウイルス感染症が重症化しやすかったが、Gas6/Axl がその原因の一つであることを明らかにした。このようにウイルス感染そのものに限らず、加齢や基礎疾患に伴い Gas6 レベルが高くなり、それが感染症の重症化の原因である可能性が示唆された。本講演では、Gas6/Axl による感染制御の破綻と重症化について、また加齢や基礎疾患に伴う Gas6 誘導機構について紹介したい。

S5-4**Enhanced bacterial pathogenicity through iron acquisition mechanisms and host defense mechanisms**

○坂本 啓 (山口大・院・医・微生物)

○Kei Sakamoto (Dept. Microbiol. Immunol., Grad. Sch. Med., Yamguchi Univ.)

Iron is essential for the survival of bacteria. In the case of enteric pathogens, there is no shortage of iron as long as they stay in the gut. This abundance is due to the presence of iron in the foods. However, upon dissemination outside the gut, bacteria encounter an environment largely devoid of iron. To survive in such environments, pathogenic bacteria employ various strategies, including the multifunctional utilization of virulence factors. Enteropathogenic *Escherichia coli* and its relatives typically colonize in the gut and attach to the epithelium. To achieve this, they use a virulence factor called the type III secretion system. However, upon extraintestinal dissemination, they utilize the same mechanism for hemolysis and acquire heme as a source of iron. Furthermore, iron utilization systems are thought to be involved in the pathogenicity of pathobionts such as *Klebsiella pneumoniae*. On the host side, there exists a nutrient immunity targeting iron. Transferrin strongly binds iron, maintaining extremely low concentrations of free iron. Additionally, during infection, the upregulation of iron scavenger proteins, mediated by cytokines, prevents the utilization of free heme iron by bacteria. Thus, iron-acquisition systems are deeply intertwined with the survival and enhancement of pathogenicity of pathogenic bacteria, suggesting their potential as therapeutic targets.

S5-5**Impact of Staphylococcal Agr quorum-sensing system on atopic dermatitis and systemic infection**

○松岡 悠美 (阪大・免フロ・皮膚アレルギー生体防御)

○Yumi Matsuoka-Nakamura (Cutaneous Allergy and Host Defense. IFRc., Osaka Univ.)

Atopic dermatitis (AD) is commonly associated with colonization by *Staphylococcus aureus*. Previously, we found that phenol-soluble modulin peptides are regulated by Agr quorum sensing (QS) promotes Th2 type inflammation and skin barrier disruption. Recently, we performed whole genome sequencing of *S. aureus* strains isolated from the infant skin and found that cutaneous acquisition of loss-of-function mutations in *S. aureus agr* loci reduces skin colonization and protects against the development of AD. These studies indicate that Agr-QS-dependent virulence is critical for induction of cutaneous inflammation with features of AD in which colonized *S. aureus* retains *agr* gene expression. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) causes outbreaks in hospitals, although how bacteria adapt to environments and acquire resistance remains unknown. We analyzed specific MRSA lineage evolves from the clone with positive Agr-QS to clones silencing Agr either completely or reversibly; the latter group, termed environmentally-adapted Agr (EA-Agr) MRSA, succeeded to cause an outbreak and acquired resistant genes in the hospital. Agr-silencing clones showed higher persistence to antibiotics and a higher ability to gain foreign genes than Agr-positive clones. EA-Agr MRSA formed biofilm and colonized hosts in the murine systemic infection model. This EA-Agr phenotype was controlled by epigenomic changes.

オミクスのデータ多量解析に基づくシステムバイオロジーは、細菌学の発展にいかに関与するか

コンビーナー：曳地 康史（高知大学）
森田 鉄兵（慶應義塾大学）

How does systems biology based on the multivariate analysis of omics contribute to bacteriology?

Conveners: Yasufumi Hikichi (Kochi University)
Tepei Morita (Keio University)

Barbara McClintock 博士の「動く遺伝子」説からのトランスポゾンの発見によって、我々は逆遺伝学という新たな研究戦略を得た。そして、Jennifer Anne Doudna 博士と Emmanuelle Marie Charpentier 博士が開発したゲノム編集技術により、機能未知の遺伝子の表現型への役割を明らかにすることが可能となった。さらに、オミクスの多量解析技術の発達により、生命現象の神秘を解明する技と道具を得た。しかし、生命現象は、環境要因により大きな影響を受けるとともに、一形質に複数のサブシステムが関与しているため、*in vitro* での特定の形質以外、その機構の本丸を明らかにした事例は数少ない。本シンポジウムでは、細菌-宿主相互作用に関わる事象について、オミクスのデータ多量解析に基づくシステムバイオロジーが細菌学の発展にいかに関与するかについて、我が国が世界に誇る 6 名の若手研究者に話題を提供していただき、議論をすすめる。

S6-1

Dissection of immune signaling statuses of *Arabidopsis thaliana* upon *Pseudomonas* infection

○佐藤 昌直¹, 登達也² (¹北大・農・応用分子昆虫学, ²Plant Biol. Lab, Salk Inst.)

○Masanao Sato¹, Tatsuya Nobori² (¹Applied Mol. Entomol., Research Fac. Agri., Hokkaido Univ., ²Plant Biol. Lab, Salk Inst.)

The plant immune signaling network, which controls inducible responses to pathogen attack, is a biological signaling processes mediated by complex networks in which network components. We studied the *Arabidopsis* immune signaling network upon challenge with a strain of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* expressing the effector protein. This bacterial strain feeds multiple inputs into the signaling network, allowing many parts of the network to be activated at once. In addition, such signal transduction is coordinated in a spatiotemporal manner. We developed a pattern recognition analysis and analyzed mRNA profiles for 571 immune response genes of 22 *Arabidopsis* immunity mutants after inoculation with *Pseudomonas syringae* pathovar tomato DC3000 AvrRpt2 as a reference (Sato et al. 2010, PLOS Pathogens). The mRNA profiles were analyzed as detailed descriptions of changes in the network state resulting from the genetic perturbations. Using this reference, we analyzed single nuclei transcriptome of *A. thaliana* challenged by *P. pseudomonas*. We will discuss an integration of cellular and signaling information during the induction of innate immunity of *A. thaliana*.

S6-2

Infection strategy switching in a plant pathogenic bacterium under high humidity

○峯 彰（京大・院・農）

○Akira Mine (Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

Bacteria can cause diseases in both animals and plants. However, unlike the stable environment within the animal host, plant host environments are highly sensitive to the surrounding atmosphere. High humidity has long been known to favor bacterial disease development in plants in agricultural fields and natural ecosystems. Similar to animal pathogenic bacteria, plant pathogenic bacteria secrete effector proteins via the type III secretion system to subvert host immunity. Recent discoveries have shown that under high humidity, plant pathogenic bacteria make use of effectors to create a water-rich environment in the host intercellular space they colonize. However, it is currently unknown how this niche creation is mechanistically linked to bacterial pathogenesis. In this talk, I will present a time-resolved transcriptome analysis of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* during plant infection under high humidity, enabled by our high-throughput and low-cost RNA sequencing methodology. Co-expression network analysis of the RNA-seq data, in combination with a high-throughput transposon screening using genetically engineered bioluminescent bacteria, revealed that once the water-rich environment is established under high humidity, *P. syringae* switches gene expression patterns from effector secretion to nutrient acquisition and utilization, thereby promoting bacterial growth.

S6-3

Virulence mechanisms executed majorly by quorum sensing in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1

○都筑 正行（高知大・農林海洋）

○Masayuki Tsuzuki (Fac. Agric. and Marine Sci., Kochi Univ.)

The phytopathogenic soil-borne Gram-negative bacteria family *Ralstonia solanacearum* species complex is a causal pathogen of wilt disease on wide range of crop species world-wide. The *R. pseudosolanacearum* strain OE1-1 infects solanaceous plants by invading from their roots and finally reaches xylem vessels. For full virulence of strain OE1-1, it has been revealed that a cell density-dependent gene regulatory mechanism, quorum-sensing (QS), has important roles. However, to understand the regulatory mechanism important for infectious process, understanding the whole picture of gene regulatory network in bacterial cells is needed. To obtain the overview of the gene regulation in strain OE1-1, we performed gene network analysis with the transcriptome data in multiple conditions and genotypes. As a result, we obtained 31 gene clusters having the similar expression patterns. Each cluster had the enriched GO terms with the specific functions including QS, type III secretion system, motility or iron uptake. The correlation pattern between the clusters indicated that induction of QS negatively affects the expression level of the other major clusters, suggesting that QS is a major regulatory mechanism of strain OE1-1 virulence. From these results, we would like to discuss the infectious mechanism of *R. pseudosolanacearum* OE1-1.

S6-4**Host manipulation by plant microbiota, a complex system composed of various microorganisms**

Jana Hucklenbroich¹, 島崎 智久², 中野 亮平² (1マックスプランク植物育種学研究所, 2北大・理)

Jana Hucklenbroich¹, Tomohisa Shimasaki², Ryohei Thomas Nakano² (1Max Planck Inst. for Plant Breeding Research, 2Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

A diverse array of microbes inhabits the internal and external surfaces of plant tissues, collectively forming the plant microbiota. Previous studies spanning decades described that individual root-associated microbes are capable of manipulating plant physiology from different aspects. For example, our prior research has demonstrated that a significant proportion of Rhizobiales bacteria isolated from healthy *Arabidopsis thaliana* roots promote host root growth by stimulating cell division at the root tip. Additionally, a subset of these bacteria possess the capacity to modulate host immune responses (Garrido-Oter*, Nakano*, Dombrowski* et al., 2018). We also found that the expression of these functional capacities is largely influenced by surrounding co-inhabiting microbes. Our overarching objective is to elucidate the impact of the root-associated microbiota as a whole on plant physiology and understand the mechanisms by which plants regulate these interactions, viewing individual microbes as integral components of a complex system. Here, we present our recent efforts to identify the pivotal genes and molecules that mediate root-microbiota interactions toward this ultimate end. Our work underscores the importance of contextualizing individual microbial functions within complex host-microbiota ecosystem (i.e. the holobiome), enlightening its broader ecological relevance.

S6-5**Stealth regulation by small RNAs and development of RNA-Seq based methods, vice versa**

○森田 鉄兵^{1,2} (1慶大・先端生命研, 2慶大・院・政メ)

○Tepei Morita^{1,2} (1Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., 2Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.)

To establish an infection, bacteria pathogens control their gene expression by various regulatory mechanisms at each stage of transcription and translation. These multiple layers of regulations form complex regulatory networks. The regulation at the initiation step of transcription is the primary layer and is mediated by transcription factors. Additionally, recent studies have reported the cases in which the establishment of infection involves regulations at post-transcriptional initiation steps. The post-transcriptional regulations are generally occurred in mRNAs, where transcription elongation/termination and translation are often regulated by small functional RNAs (sRNAs) and RNA-binding proteins (RBPs). Development of RNA-Seq-based methods, with deep validation from experiments of biochemistry and genetics, has played an important role in our current understanding of the complex regulatory networks and the functions of sRNAs and RBPs. In this talk, I will share about recent advances in bacterial RNA regulation, including our findings on Cold shock proteins that are well conserved RBPs among bacteria. The discussion will focus on how RNA-Seq based approaches are incorporated into research on bacterial pathogenicity.

S6-6**統合的ストレス応答を介した生体防御リプログラミングと細胞内細菌の生存戦略**

○野澤 孝志, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 中川 一路 (京大・院医・微生物)

Integrated stress responses to host defense and bacterial pathogenesis

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

病原細菌の感染に対して、宿主細胞は炎症性サイトカインシグナルやオートファジーなど様々な細胞自律性免疫を惹起する。一方で、病原細菌は毒素やエフェクターなどの多様な活性分子を分泌し、免疫シグナルや機能性分子を攪乱する。感染細胞内では、多種多様な分子間相互作用や遺伝子発現変化を介した複雑な生体分子ネットワークが形成され、ネットワーク全体のダイナミクスが細胞恒常性の維持や破綻につながる。我々は近年、ヒトの病原性細菌の一つA群レンサ球菌の感染細胞では、本菌の毒素が惹起する統合的ストレス応答がストレス顆粒 (Stress granule, SG) の形成を誘導することを明らかにしており、SG形成を介した新たな生体防御システム及び細菌による細胞内生存戦略の解明に挑んでいる。今回は、統合的ストレス応答に着目した感染細胞のマルチオミクス解析をもとに、新たな生体防御システムとA群レンサ球菌の細胞内動態について紹介する。

生体防御からみた感染症研究の最前線

コンピーナー：金城 雄樹（東京慈恵会医科大学）
中川 一路（京都大学）

Frontline researches of infectious diseases from the perspective of host defense

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

新型コロナウイルス感染症の流行により、生体防御研究の重要性が再認識されている。感染症の新たな診断法・治療法・予防法の開発において、病原体の感染機構、引き起こされる感染症の病態や感染防御機構の解明、新たな手法を用いた創薬など、様々な視点から新規の方法を模索する必要がある。本シンポジウムでは、生体防御からみた感染症研究をテーマとして、細菌・真菌だけでなく、ウイルス等各分野で進められている新たな観点から、病原体による感染機構、病原因子の作用機序や感染に対する生体防御メカニズム、ワクチンによる免疫応答などに関して、様々な分野の研究者が最新の知見を紹介する。

共催：日本微生物学連盟

Co-sponsorship: Federation of Microbiological Societies of Japan

後援：日本生体防御学会

Supported by: Japanese Society of Host Defense Research

S7-1

Regulation of immune response by mycobacteria through host lipid receptors

○原 博満, 飯笹 英一（鹿児島大・院医歯・免疫学）

○Hiromitsu Hara, Eiichi Iizasa (Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ.)

The lipids in the cell wall of mycobacteria, including the causative agents of tuberculosis and leprosy, play crucial roles in the bacteria's growth, survival, and interaction with the host's immune system. Macrophages, as the primary cells of the host's defense against pathogenic mycobacteria, also serve as a niche for bacterial proliferation. Mycobacteria are known to establish long-term persistent infections within non-bactericidal, or "permissive," macrophages, which exhibit low levels of nitric oxide and inflammatory cytokine expression. The DAP12-associated receptor TREM2, which is highly expressed in tumor-associated macrophages (TAMs) that work on immune evasion of cancers and is important for TAM differentiation and function, has been reported. We have recently reported that TREM2 recognizes non-glycosylated mycolic acids in the mycobacterial cell wall, induces permissive macrophages, and negatively regulates the anti-mycobacterial immune response via the C-type lectin receptor (CLR)-FcRγ-CARD9 pathway, thereby possibly working on immune evasion of the bacteria. Furthermore, we have identified a DAP12-associated host receptor that recognizes phenolic glycolipids (PGL), known as virulence factors of the hypervirulent W-Beijing strain of *M. tuberculosis* and *M. leprae*, which will be introduced in this session.

S7-2

志賀毒素産生性大腸菌毒素 subtilase cytotoxin の病原性解析

○津々木 博康（熊本大・院生命科学・微生物）

Pathogenicity analysis of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* toxin subtilase cytotoxin

○Hiroyasu Tsutsuki (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ.)

Subtilase cytotoxin (SubAB) は、オーストラリアで集団食中毒の原因となった志賀毒素 (Stx) 産生性大腸菌 (STEC) O113 株から同定された AB5 型毒素である。SubAB は小胞体 (ER) シャペロンである BiP を切断し宿主細胞に ER ストレス性の細胞毒性を示す。本邦においては、散発的ではあるが SubAB を産生する STEC が毎年のように同定され、重症患者から分離された例もある。SubAB はマウスに対して致命的な腸管出血を誘導することから Stx と同様に強毒性の腸管毒素であると考えられる。しかしながら、感染病態における SubAB の役割については不明な点が多い。我々は、SubAB の毒性発現機構を解析するなかで、SubAB がマクロファージの自然免疫応答である一酸化窒素 (NO) の産生を阻害することを見出した。SubAB による NO 産生阻害はマクロファージ内に取り込まれた大腸菌の生存を允進した。この発見をもとに、我々は SubAB が STEC の生存に有利に働く因子である可能性に着目し、宿主生体防御機構に及ぼす SubAB の影響を解析してきた。特に、マウス感染モデルを樹立し、宿主生体防御応答のひとつであるインフラマソームの活性化を阻害することで大腸菌の腸内定着を促進することを見出した。さらに、SubAB の病原性発現においてレドックス制御タンパク質など複数の生体防御因子が関与していることを明らかにしてきた。本演題では、SubAB の毒性発現における宿主因子との相互作用や生体防御機構の破綻メカニズムなど、本毒素の病原性についてこれまで得られた知見を紹介したい。

S7-3

The mechanism of induction of antibody production by pneumococcal protein and glycolipid vaccine

○金城 雄樹^{1,2}, 林崎 浩史^{1,2}, 上井 康寛¹, 千葉 明生^{1,2}, 明田 幸宏³, 大石 和徳⁴ (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, 3感染研・細菌第一部, 4富山衛研)

○Yuki Kinjo^{1,2}, Koji Hayashizaki^{1,2}, Yasuhiro Kamii¹, Akio Chiba^{1,2}, Yukihiro Akeda³, Kazunori Oishi⁴ (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., 4Toyama Inst. Health)

Streptococcus pneumoniae, the leading cause of community-acquired pneumonia, causes invasive pneumococcal disease (IPD) such as bacteremia and meningitis. Although the current polysaccharide-based vaccines are effective to protect against *S. pneumoniae* infection with vaccine serotypes, the incidence of IPD with non-vaccine serotypes is increasing. To develop new vaccine that will provide broad protection against *S. pneumoniae* infection, we select pneumococcal surface protein A (PspA) as vaccine antigen. Because invariant natural killer T (iNKT) cells, innate-like lymphocytes, bridge innate and acquired immunity by producing large amounts of cytokines after glycolipid stimulation, we used the glycolipid as an adjuvant.

We found that the pneumococcal protein and glycolipid vaccine provided protection against *S. pneumoniae* infection through the production of the PspA-specific IgG. We also found that follicular helper NKT (NKT_{FH}) cells contributed to helping IgG production. Furthermore, we showed that interleukin-27, a cytokine derived from Gr-1⁺ monocytes and macrophages, was important for NKT_{FH} differentiation via supporting the energetic demand by stimulating mitochondrial metabolism. Our results on the mechanisms of iNKT cell-mediated vaccination provide insights into an important and broadly applicable vaccination strategy.

S7-4

Role of innate immune signals in severity of SARS-CoV-2 infection

○一戸 猛志 (東大医科研・ウイルス学)

○Takeshi Ichinohe (Inst. Medical Science, The Univ. of Tokyo)

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の死亡率は、高齢者や基礎疾患を有する者で高くなることが明らかとなっている (Wu et al. JAMA. 2020). COVID-19 の重症化メカニズムを解明するため、我々はさまざまなマウス馴化 SARS-CoV-2 を樹立した。マウス馴化 SARS-CoV-2 従来株は C57BL/6 マウスに致死的な感染を引き起こさなかった。一方、マウス馴化 SARS-CoV-2 デルタ株は C57BL/6 マウスに致死的な感染を引き起こすことが分かった。次に野生型および MyD88 欠損マウスにマウス馴化 SARS-CoV-2 従来株を感染させてみたところ、野生型マウスと比較して MyD88 欠損マウスの生存率が有意に高かった。本シンポジウムでは炎症性サイトカインが COVID-19 の重症化に与える影響を解析した最新の研究データを紹介するとともに、高齢者で COVID-19 の重症化リスクが高くなる理由について議論したい。

S7-5

Entry pathway of SARS-CoV-2 and host proteases

○竹田 誠 (東大・医・微生物学)

○Makoto Takeda (Dept. Microbiol., The Univ. Tokyo)

A respiratory infection caused by SARS-CoV-2 rapidly spread worldwide, leading to a global pandemic in 2020. Many viruses feature glycoprotein spikes on their surface, facilitating cell entry by binding to receptors and initiating membrane fusion. For spike proteins' membrane fusion, they must undergo appropriate cleavage by host cell proteases.

The spike protein of SARS-CoV-2 contains two distinct cleavage motifs, each cleaved by furin, a pro-protein convertase, and TMPRSS2, a type II transmembrane serine protease. In contrast, in cells lacking TMPRSS2 expression, SARS-CoV-2 utilizes cathepsins within endosomes. SARS-CoV-2 has continuously mutated into more transmissible variants. Initially, it was shown that the increase in utilizing TMPRSS2 was linked to their enhanced transmissibility. However, the Omicron variant, which emerged at the end of 2021 and became predominant globally, unexpectedly exhibited reduced TMPRSS2-using ability.

TMPRSS2 utilization enables coronaviruses to infect cells without relying on the endocytic pathway, providing an advantage in evading the innate immune response. Therefore, providing a comprehensive scientific explanation for its preference for the endocytic pathway is challenging. Thus, further research is needed to elucidate the activation mechanism of SARS-CoV-2, particularly the Omicron variant, and its mode of cell entry.

S8

日米医学協力計画 60 周年：日米医学協力計画と、
疾病対策のブレイクスルーを目指す感染症研究

コンピーナー：飯田 哲也 (大阪大学)
松本 壮吉 (新潟大学)

The 60th Anniversary of the U.S.-Japan
Medical Cooperative Medical Sciences
Program (USJCMSP): Toward Infectious
Diseases Control by Breakthrough Research

Conveners: Tetsuya Iida (Osaka University)
Sohkichi Matsumoto (Niigata University)

日米医学協力計画は、日米の協力によりアジアの疾病に対して立ち向かうべく、佐藤栄作首相とジョンソン大統領の共同声明に基づき 1965 年に発足した。当初の疾病対象は、「コレラ」「結核」「ハンセン病」「ウイルス性疾患」「寄生虫感染症」で、疾患毎に部会が組織され活動してきた。時代要請に応じて変遷し現在は「エイズ」「肝炎」「急性呼吸器感染症」「細菌性腸管感染症」「免疫」「がん」「栄養・代謝」が加わった 10 部会が活動している。これまで両国を代表する研究者が多数参画し、成果が産み出されてきた。本シンポジウムでは、60 周年を迎える日米医学協力計画について紹介すると共に、細菌学と関りの深い「コレラ」「抗酸菌」「免疫」「寄生虫」「急性呼吸器感染症」の 5 部会から研究者をお招きして旬の成果をお話いただき、感染症対策のブレイクスルーを担う研究について考え、議論し、学会員の研究活動を触発する場としたい。

共催：日米医学協力計画

Co-sponsorship: U.S.-Japan Medical Cooperative Medical Sciences
Program (USJCMSP)

S8-1

日米医学協力計画について

○飯田 哲也 (阪大・微研・細菌感染)

United States-Japan Cooperative Medical Sciences Program

○Tetsuya Iida (Dept. Bacterial Infect., Res. Inst. Microbial Dis., Osaka Univ.)

日米医学協力計画は、1965 年の佐藤栄作総理大臣とリンドン・ジョンソン大統領との会談に基づき、アジア地域にまん延している疾病に関する研究を日米両国で共有して行うことを目的として活動を続けている。現在は、コレラ・細菌性腸管感染症、ウイルス性疾患、抗酸菌疾患、寄生虫疾患、エイズ、肝炎、急性呼吸器感染症、がん、栄養・代謝、免疫分野の専門部会/部門がそれぞれの分野において研究を行っている。ほぼ毎年、日米医学協力計画の枠組みの中で「汎太平洋新興再興感染症国際会議」(International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim; EID 会議)を米国 NIH と共同で開催し、最新の研究成果を発表・議論する場を提供してきた。また、若手研究者育成のため、2016 年度から米国 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) と共同で「若手・女性育成のための日米共同研究公募」を実施している。本講演では、2025 年に 60 周年を迎える日米医学協力計画の概要について紹介する。

S8-2

腸炎ビブリオの腸管病原性発現戦略をさぐる

○松田 重輝^{1,2} (1大阪・微研・細菌感染, 2大阪・感染症総合教育研究拠点)

Virulence tactics of *Vibrio parahaemolyticus* for enteric infection

○Shigeaki Matsuda^{1,2} (1Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ., 2CiDER, Osaka Univ.)

腸炎ビブリオは1950年に大阪南部で発生した大規模食中毒事件を契機に発見された食中毒原因細菌であり、コレラ菌とともに病原性ビブリオの代表的な菌種の一つである。本菌感染症は主として菌の付着した海産魚介類が感染源となり、激しい下痢・腹痛などの急性胃腸炎症状を主徴とし、アジア諸国に多発するだけでなく、20世紀末よりその発生が世界的に拡大する傾向を示している。2003年に腸炎ビブリオのゲノムが初めて解読されたことで、染色体上にIII型分泌装置の遺伝子群を有する病原性アイランドの存在が発見された。さらに本菌の腸管病原性におけるIII型分泌装置の重要性が明らかとなり、腸炎ビブリオはコレラ毒素を最重要な病原因子とするコレラ菌とは異なる病原性発現機構をとることが分かってきた。以降、日米を中心に腸炎ビブリオのIII型分泌エフェクターの同定や機能解析がなされているが、本発表では我々が見出した、毒素のIII型分泌装置へのクロストーク分泌による腸管病原性発現について紹介させていただく。さらにIII型分泌装置をコードする病原性アイランドの遺伝子発現制御について、我々の研究を中心に最近の知見を紹介し、同属種であるコレラ菌のビルレンスレギュレーションとの同異についても議論したい。

S8-3

100日 で安全なワクチンを届けるためのサイエンスとデザイン

○石井 健 (東大・医学研究所・ワクチン科学)

Vaccine Science and Design for the 100days mission

○Ken Ishii (Div. Vaccine Science, The Inst. Medical Science, The Univ. of Tokyo (IMSUT))

新型コロナウイルスによるパンデミックは新興感染症に対する診断、治療、予防にかかわる医療の革命を引き起こした。ワクチンのサイエンスとデザインにおいても mRNA ワクチンが 300 日ほどで実用化され、次のパンデミックでは犠牲者を減らすべく 100 日で診断、治療、ワクチンを安全に届ける大きな目標が世界で掲げられた。100 日でワクチンを、は現状は技術的に不可能とされているが、感染症やそれら以外の疾患に対する治療、予防に対するワクチン療法、免疫制御方法の新しい考え方、対策へのイノベーションの地殻変動が進んでいる。ワクチンサイエンスでは抗原、デリバリーシステム、アジュバントの 3 つの必須要素の研究が他の領域の研究者、技術を巻き込み進化し、デザインへの大きな影響を及ぼしている。特に注目すべきはいわゆる抗原特異的な免疫反応に加え、訓練免疫や自然免疫記憶といった新しい免疫学のコンセプトとアジュバントの重要性があげられ、技術的にも 1 細胞生物学からウイルスや細胞外小胞などを含む細胞外のナノサイズの微粒子の網羅的解析の技術革新が進む。本発表では、サイエンスに基づいたワクチンや免疫療法のためのアジュバントの臨床開発に加え、グローバルに行われているワクチン科学のアウトリーチ活動についてお話ししたい。

Lab HP; <https://vaccine-science.ims.u-tokyo.ac.jp/en/>

S8-4

Development of a live attenuated markerless prophylactic vaccine for leishmaniasis

○濱野 真二郎 (長崎大・熱帯医学研究所・寄生虫学)

○Shinjiro Hamano (Dept. Parasitol., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

Background: Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Leishmania* transmitted by infected sandflies. Vaccination through leishmanization with live wild-type (WT) *Leishmania major* has been used but is no longer practiced, because it results in occasional skin lesions.

Methods: Centrin is a calcium-binding protein and essential in the duplication of centrosomes in eukaryotes, including *Leishmania*. Using CRISPR gene editing, we have developed a dermatotropic live attenuated centrin gene-deleted *L. major* (*LmCen*^{-/-}) strain.

Results: *LmCen*^{-/-} is antibiotic-resistant marker-free, does not have detectable off-target mutations and cannot duplicate as an amastigote in mammals. In immune-deficient C57BL/6 mice, such IFN- γ , STAT1, and Rag2 KO, *LmCen*^{-/-} does cause no symptoms. A single intradermal immunization of WT mice with *LmCen*^{-/-} results in protection. It also conferred robust and durable cross-protection to hamsters against lethal visceral leishmaniasis transmitted via sandflies infected with WT *L. donovani* and prevented mortality. The cGMP materials have been produced in India. We are compiling Chemistry, Manufacturing and Control (CMC) package together with the pharmaceutical company in India for the Investigational New Drug (IND) application submitted to US FDA.

Conclusion: *LmCen*^{-/-} can be advanced to human vaccine trials.

S8-5

Intrinsically disordered histone-like protein that induces mycobacterial dormancy

○西山 晃史¹, 清水 将裕^{2,3}, 古寺 哲幸², Anna Savitskaya¹, 尾関 百合子¹, 眞柳 浩太⁴, 山口 雄大^{1,5}, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (1新潟大院・医歯学総合・細菌, 2金沢大・ナノ生命科学研究, 3京大・複合原子力科学研究, 4九大・生体防御医学研, 5大阪公大院・医・分子病態薬理学)

○Akihito Nishiyama¹, Masahiro Shimizu^{2,3}, Noriyuki Kodera², Anna Savitskaya¹, Yuriko Ozeki¹, Kouta Mayanagi⁴, Takehiro Yamaguchi^{1,5}, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkichi Matsumoto¹ (1Dept. Bacteriol., Niigata Univ. Sch. Med., 2NanoLSI, Kanazawa Univ., 3Div. Quantum Beam Mater. Sci., Inst. Integr. Radiat. Nuclear Sci., Kyoto Univ., 4Med. Inst. Bioregul., Kyushu Univ., 5Dept. Pharmacol., Osaka Metro. Univ. Med. Sch.)

Dormant *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) persistently infects a quarter of human beings, and 5 to 10% of latent infection eventually become active tuberculosis that causes 1.5 million deaths annually. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) is a histone-like protein essential for *Mtb* growth and abundant in hypoxic dormant mycobacteria. MDP1 is capable to induce dormancy phenotypes, e.g., chromosome compaction and growth suppression. MDP1 is a mycobacterial orthologue of bacterial histone-like protein HU. Interestingly, MDP1 has a polycationic intrinsically disordered region (IDR) which is rare in bacterial histone-like proteins. We have reported that IDR is essential for MDP1 to induce dormancy phenotypes. Moreover, we clarified the molecular and structural mechanism of DNA compaction by MDP1. By combination of high-speed atomic force microscopy and coarse-grained molecular dynamics simulation, we revealed the dynamic DNA cross-linking model of MDP1 in which IDR cross-links two DNA duplexes like a double-sided tape. Accumulation of DNA cross-linking by MDP1 bundles two adjacent DNA duplexes side-by-side. This novel IDR-mediated reversible DNA cross-linking is a reasonable model for the suppression of the genomic function in the resuscitable non-replicating dormant mycobacteria.

S8-6

Pursuing Clinical Microbiology Research for Infectious Disease Diagnosis and Treatment

○長尾 美紀 (京大・医・臨床病態検査)

○Miki Nagao (Dept. Clin. Lab. Med., Kyoto Univ.)

The Acute Respiratory Infection Panel (ARI panel) has been organizing alternate conferences focusing on bacterial and viral fields since 2013.

Our research team at Kyoto university, composed of infectious disease physicians, specializes in clinical microbiology, particularly addressing human pathogenic bacteria, fungi, and acute respiratory viral infections. Since joining the ARI panel in 2019, we have presented molecular analyses and regional surveillance data of *Aspergillus spp.*, topics not previously covered in the ARI Section.

Furthermore, at the 2024 International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, we highlighted the results of our regional ARI surveillance system established in response to the COVID-19 pandemic.

In this symposium, I aim to discuss the research findings from our project and provide insights into the future prospects of the ARI panel in the United States-Japan Cooperative Medical Sciences Program.

S9

Bench to Bedside/Bedside to Bench
—基礎と臨床、現場をつなぐ—

コンピーナー：明田 幸宏 (国立感染症研究所)

Bench to Bedside/Bedside to Bench
—Bridging the gap between clinical, laboratory, field and epidemiological research—

Convener: Yukihiro Akeda (National Institute of Infectious Diseases)

新型コロナウイルス感染症の世界的な流行や薬剤耐性菌の蔓延等、感染症に対する認識が大きく変貌し、その対策が進められている。一方で病原体をモデル生物として活用した研究は、微生物の多様性やヒトにおける病態等、実臨床の場で経験する感染症の本質を捉えることが難しい状況にある。そのため基礎と臨床をつなぐ感染症研究 (Bench to Bedside/Bedside to Bench) の重要性が再認識されるようになってきている。本シンポジウムを通して、その臨床における対象感染症・疾患の重要性、また実験室でのアプローチ、どのように臨床現場と研究室をつなぐか等、幅広い内容についてご紹介頂き、今後の細菌学研究の一助となることを期待する。

S9-1

劇症型レンサ球菌感染症の病態解明に向けた臨床-基礎共同研究

○竹本 訓彦¹, 岩元 典子², 吉澤 定子³, 中村 ふくみ⁴, 稲田 誠², 久保 起人², 野本 英俊², 黒川 正美⁵, 本橋 亜耶乃⁵, 不破 法子² (1国立国際医療研究センター・感染症制御, 2国立国際医療研究センター・国際感染症センター, 3東邦大・医・臨床検査/微生物感染症学, 4都立墨東病院・感染症, 5国立国際医療研究センター・中央検査部・微生物)

Clinical-Basic Collaborative Study to Elucidate the Pathogenesis of Severe Streptococcal Infection

○Norihiro Takemoto¹, Noriko Iwamoto², Sadako Yoshizawa³, Fukumi Nakamura⁴, Makoto Inada², Taketo Kubo², Hidetoshi Nomoto², Masami Kurokawa⁵, Ayano Motohashi⁵, Noriko Fuwa² (1Dept. Infectious Diseases, Research Inst., NCGM, 2DCC, NCGM, 3Dept. Microbiol. Infect. Dis./Dept. Clin. Lab., Toho Univ. Sch. Med., 4Dept. Infect. Dis., Tokyo Metro. Bokutoh Hosp., 5Microbiol. Lab., Hospital, 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 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年まで日本での症例報告数は年間100件程度で原因菌は主にA群レンサ球菌であったが、2010年以降C/G群レンサ球菌による高齢者での症例が急増し、2019年には900症例近くが報告された。2020-2022年はCOVID-19の影響で減少したが2023年後半からA群レンサ球菌による50代以下での症例が急増している。A群レンサ球菌は基礎疾患のない比較的若い年齢でも重篤なSTSSを引き起こすのが特徴であり、コロナ以降の急増は懸念すべき状態で、早期の原因解明と対策が求められる。

我々はSTSSの病態形成機構を明らかにするためには、非侵襲性感染・非劇症型侵襲性感染・劇症型感染の全てを対象として、実際の感染症の起こっている場所、すなわち患者の感染叢で何が起きているのかを観察し、比較する必要があると考えた。加えて、宿主側の状態や遺伝子の違いが病態形成に関わり、細菌を特徴づける(選択する)可能性も考えられるため、細菌側の特徴と患者側の特徴を合わせて解析していく必要がある。

これらのコンセプトのもと、我々は現在、臨床現場を出発点とした基礎研究を実施している。本発表では、患者由来検体を対象とした臨床観察研究と実験室における基礎研究から見えてきたレンサ球菌による侵襲性感染症の発症機序について議論したい。

S9-2

ヒト胃に感染するピロリ菌以外のヘリコバクター属細菌に関する基礎・臨床研究

○林原 絵美子 (感染研・細菌第二部)

Basic and clinical research on non-*H. pylori* *Helicobacter* species infecting the human stomach

○Emiko Rimbara (Dept. Bacteriol II, NIID)

ヒト胃に感染する主要なヘリコバクター属細菌は *H. pylori* であるが、*H. pylori* 以外のヘリコバクター属細菌 (non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species: NHPH) もヒト胃に感染し、胃 MALT リンパ腫や消化性潰瘍などの胃疾患の原因となる。ヒト胃に感染する NHPH 菌種には複数の菌種が含まれるが、主な菌種としては、豚や猿を自然宿主とする *Helicobacter suis* や犬や猫を自然宿主とする *Helicobacter ailurogastricus* などが知られている。NHPH は *H. pylori* とは異なり培養が難しいことが研究のおおきな足かせになっていたが、近年我々は、難培養菌である *H. suis* や *H. ailurogastricus* をヒト胃から培養する方法を確立した。ヒト胃に感染する NHPH は PCR による菌種同定が困難であるケースが多かったが、培養された菌株のゲノム情報により正確な NHPH 菌種同定が可能となり感染経路を解明し感染を予防する方策をとるために重要な情報を還元できるようになった。NHPH 感染は尿素呼吸試験法や血清中 *H. pylori* 抗体価測定法などの *H. pylori* 感染診断法では陰性となることが多いため、検査法の開発が望まれている。また NHPH 感染胃疾患患者についてどこまでの疾患を除菌治療の対象とすべきかについては今後、基礎研究および臨床研究の双方によりエビデンスを蓄積していく必要がある。さらに除菌治療については *H. pylori* と同様な 3 剤除菌治療法が有用とする報告が多いが、NHPH の薬剤感受性については情報が少なく、薬剤耐性問題の観点からも最適な除菌治療法を評価していく必要がある。本講演では NHPH 感染症を理解するために解決しなければいけないこれらの課題について、現在行っている基礎研究および臨床研究を紹介する。

S9-3

多様性がもたらす細菌の病原性ダイナミクス

○明田 幸宏^{1,2} (¹感染研・細菌第一部, ²阪大・微研)

Heterogeneity in Bacterial pathogenesis

○Yukihiro Akeda^{1,2} (¹Dept. Bacteriol I, NIID, ²RIMD, Osaka Univ.)

病原細菌研究に限らず、一般的な生命科学研究は、これまで標準的なモデル生物を用いた実験手法が主流であった。このようなアプローチは、その詳細が不明な生物や生命現象を明らかにし、一般化する上で同じ個体における研究成果の蓄積が必要不可欠であることから、生命科学における数多くの発見をもたらしてきた。一方で実験室における現象が、ヒトや環境、多くの野生生物を含む実社会においては必ずしも再現できる訳ではない。医学研究においても、実験動物とヒトを対象とした研究では、それぞれで全く異なる結果が得られることもあり、その解釈には注意が必要である。特に近年は、生物のゲノム・トランスクリプトーム研究やシングルセル解析等を通じて、単一と思われていた個体・細胞集団が多様性を持ってダイナミックに変化し、環境に適応していることが明らかとなっている。このような背景から、本講演では、レンサ球菌におけるヘテロな集団の存在とそれぞれで異なる病原性発揮メカニズムや薬剤耐性菌におけるヘテロレジスタンス等の研究成果を具体例として紹介し、寒天平板上のシングルコロニーの中に存在する多様性、実際の感染症における多様性がどのように感染症そのものや治療方針を考える上で大きな問題となり得るのか等、今後の細菌学研究の方向性を考えるための議論の場を提供したい。

S9-4

H. pylori 感染者が胃がん患者になる分子理由

○津川 仁 (東海大・医・生体防御学領域・生物界間シグナル解析)

Molecular reason why gastric cancer patients are selected from *H. pylori*-infected patients

○Hitoshi Tsugawa (Div. Host Defense Mech., Tokai Univ. Sch. Med.)

細菌学に限らず基礎研究の世界では、ときに臨床情報がうまく反映されていない実験室固有の生命現象の議論に陥るケースがある。研究室内でモデル化された *in vitro* 並びに *in vivo* 研究の成果をいち早く臨床へ還元するためには、解決すべき臨床課題を的確に把握し、実験室内で明らかにされる生命現象を解決すべき臨床課題へ的確にリンクさせる必要がある。我々の研究室では、臨床→基礎→臨床の研究展開により基礎と臨床の交叉点を見失わないことを意識し、細菌感染症の発症メカニズムを分子レベルで理解することを目指している。*Helicobacter pylori* 感染は基礎医学的にも臨床疫学的にも胃がんの決定的なリスク因子である。しかし実臨床では、*H. pylori* 感染者のうち胃がんを発症するのは 3%程度であり、*H. pylori* 感染者の大多数は胃がんを発症しない。我々の *H. pylori* 研究における命題は、「多数の *H. pylori* 感染者の中から胃がん発症者はどの様な理由でセレクトされているのか？」を明らかにすることである。現段階で我々の基礎研究成果を臨床の場で活用するにはまだまだ多くの取りこぼしが存在するが、本演題では、これまでに我々が展開してきた *H. pylori* 感染者が胃がん患者となる理由の分子解析について紹介し、その基礎研究成果を臨床へつなげるための方法論について議論したい。

S9-5

疾患メタゲノム解析の新たな医療展開

○藤本 康介^{1,2} (¹大阪公大・医・ゲノム免疫, ²東大医科研・メタゲノム医学)

New medical development based on metagenomic analysis

○Kosuke Fujimoto^{1,2} (¹Dept. Immunol. Genom., Sch. Med., Osaka Met. Univ., ²Div. Metagenome Med., HGC, IMS, UTokyo)

次世代シーケンサーによるゲノム解析技術の向上により、ヒトゲノムだけでなく、さまざまな疾患で腸内細菌叢の構成異常が認められることが明らかとなった。さらに、疾患の発症や増悪に直接関わる腸内共生病原菌も同定され、その特異的な制御が強く望まれている。しかし、抗菌薬は有益菌をも殺傷する場合があり、腸内共生病原菌の制御に用いることは適切ではない。腸管内には常在ウイルス叢が形成されているが、その大部分はヒトを宿主とするウイルスではなく、腸内細菌を宿主とするバクテリオファージ (ファージ) で構成されている。ファージは宿主菌に対する特異性が非常に高いことから、ファージを用いた治療法 (ファージ療法) が腸内共生病原菌の制御に有用と考えられている。しかし、腸管内は嫌気的で特殊な環境であることから、宿主となる腸内細菌が培養できなければ、その腸内細菌に感染するファージの単離は難しい。さらに、腸内ファージのゲノム解析手法が世界的に確立されていなかったことから、これまで腸内ファージの全貌は明らかではなかった。本講演では、腸内ファージのゲノム解析手法などを紹介しながら、次世代戦略としての腸内共生病原菌に対する将来的なファージ療法の可能性について議論すると共に、国内初のファージ療法の臨床試験についても紹介する。

W1

細胞外小胞研究最前線

コンピーナー：三室 仁美 (大分大学)
安部 公博 (国立感染症研究所)

New Frontiers in Research on Extracellular Vesicles

Conveners: Hitomi Mimuro (Oita University)
Kimihiro Abe (National Institute of Infectious Diseases)

細菌が産生する菌体外膜小胞や真核細胞が産生するエクソソームなどの細胞膜小胞 (Extracellular Vesicles, EVs) は、脂質二重層で覆われた構造を有し、細胞内成分を含むナノ粒子として放出される。いずれの EVs も細胞集団内における物質輸送や遺伝子情報の水平伝達によって細胞間コミュニケーションを担うことが明らかとなっている。さらに、EVs の安定性と宿主免疫応答を活性化させる性質を利用することで、EVs は新たなモダリティとして、薬物送達システムやワクチンの開発などの医療応用にも期待されている。しかし一方で、EVs が細胞機能の変調を引き起こすことで、さまざまな感染性疾患や非感染性疾患の発症や増悪化に寄与することも明らかになってきている。本セッションでは、細菌学に関連する多方面にわたる様々な研究者に EV 研究の最前線を紹介していただき、EVs についての理解を深め、知見の統合を目指す。

共催：大分大学 グローバル感染症研究センター

Co-sponsorship: Research Center for GLOBAL and LOCAL Infectious Diseases, Oita University

W1-1

グラム陽性細菌における膜小胞形成

○安部 公博 (感染研・細菌第一部)

Biogenesis of membrane vesicles in Gram-positive bacteria

○Kimihiro Abe (Dept. Bacteriol. I, NIID)

Membrane vesicle (MV) とは、細菌が分泌する直径 20~400 nm 程度の膜小胞であり、核酸やタンパク質等の細菌由来の様々な成分が内包されている。近年になって MV の機能やその生理学的意義について盛んに研究されてきており、現在では MV を介した生体分子輸送が、細菌のバイオフィーム形成や病原性の発現に深く寄与している事例が数多く報告されている。一方で、細菌が MV を放出する現象自体は 1960 年代ごろから報告されているものの、MV の形成機構については未だ不明な点が多い。これまでに著者らは、グラム陽性細菌である枯草菌における、自己溶菌を伴う MV 形成について研究してきた。本ワークショップでは、枯草菌をモデルとしたグラム陽性細菌の話題を中心に、細菌の MV 産生機構について紹介したい。

W1-2

非モデル細菌のユニークな細胞外膜小胞生産メカニズム

○川本 純 (京大・化研)

Unique mechanism for extracellular membrane vesicle production in a non-model bacterium

○Jun Kawamoto (Insti. for Chem. Res., Kyoto Univ.)

細菌は、膜で覆われた微粒子を細胞外に分泌する。これらの粒子は細胞外膜小胞 (Extracellular membrane vesicles, EMVs) や外膜小胞 (Outer membrane vesicles, OMVs) と称される。EMVs は主に、細胞表層の突出と切り出し (Blebbing and Pinching-off pathway) と溶菌を伴う経路 (Explosive cell lysis) によって放出されると考えられているが、その分子基盤の詳細は不明な点が多い。我々が新規に採取した細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 は、近縁の *Shewanella* 属細菌や、大腸菌や *Pseudomonas* 属細菌といったモデル細菌に比べ、EMVs を高生産する。本菌の EMVs は、約 80 nm に均一化されていること、EMVs の主要な積荷タンパク質として機能未知のタンパク質 P49 を輸送していることから、本菌にはユニークな EMVs 分泌機構、特に P49 選択的な積荷輸送機構を有していることが予想された。本菌の高い EMVs 生産性や EMVs を介した選択的なタンパク質分泌機構は、EMVs をプラットフォームとするワクチンやナノリアクター、ドラッグデリバリーや異種タンパク質分泌系構築の基盤技術になると期待される。我々は、これまでに P49 遺伝子の近傍遺伝子群から、本菌が生産する新規のアミノ糖から成る表層多糖が積荷タンパク質の EMVs への輸送に加え、EMV 生産にも重要な機能を担うことがわかった。

W1-3

A role of periodontopathic bacterial extracellular vesicles in noncommunicable disease progression

○山口 雄大¹, 塩田 正之², 中尾 龍馬¹, 安部 公博¹, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細菌第一部, ²大阪公大・医・分子制御)

○Takehiro Yamaguchi¹, Masayuki Shiota², Ryoma Nakao¹, Kimihiro Abe¹, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept. Microbiol. I, National Inst. Infectious Diseases, ²Dept. Molecular Biol. Med., Sch. Med., Osaka Metropolitan Univ.)

Periodontal disease, which is caused by chronic infection of the periodontopathic bacteria, is widespread. More than half of the adult population is affected by periodontal disease in Japan, and there were 1 billion cases of severe periodontal disease globally. It is unveiled that periodontal disease causes not only tooth loss but also the systemic noncommunicable diseases (NCDs), such as cardiovascular diseases, liver cirrhosis, rheumatic arthritis, cancers, Alzheimer's disease and diabetes. However, the underlying mechanisms how periodontopathic bacteria causes the NCDs in remote organs from oral cavity is unclear. Periodontopathic bacteria produces nano-scale extracellular vesicles (EVs), which are derived from bacterial membrane. EVs contain proteins, lipids and nucleic acids, including bacterial toxins. EVs from periodontopathic bacteria may play an important role in the interorgan communications and may help the NCDs progression like exosomes from eukaryotic cells. Here, we focused the association between periodontal disease and pancreatic cancer and studied the role of EVs derived from periodontal bacteria in the progression of pancreatic cancer disease. In this workshop, we will report our recent knowledge about mycobacterial MVs.

W1-4

MVs derived from *Clostridium botulinum* induce inflammatory responses and disrupt intestinal barrier

○小林 伸英¹, 安部 公博^{2,3}, 赤木 佐千代¹, 北村 真悠¹, 野村 暢彦^{2,4}, 尾花 望^{4,5}, 藤永 由佳子¹ (1金沢大・医・細菌学, 2筑波大・生命環境, 3感染研・細菌第一, 4筑波大・MICS, 5筑波大・医・TMRC)

○Nobuhide Kobayashi¹, Kimihiro Abe^{2,3}, Sachiyo Akagi¹, Mayu Kitamura¹, Nobuhiko Nomura^{2,4}, Nozomu Obana^{4,5}, Yukako Fujinaga¹ (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Kanazawa Univ., 2Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3Dept. Bacteriol. I, NIID, 4MICS, Univ. Tsukuba, 5TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba)

Clostridium botulinum produces botulinum neurotoxin that cause botulism. Previous studies elucidated the molecular pathogenesis of botulinum neurotoxin; however, it currently remains unclear whether other components of the bacterium affect the host. We analyzed the cellular effects of membrane vesicles (MVs) isolated from 4 strains of *C. botulinum* with those of closely related *C. sporogenes*, and 2 strains of the symbiont *C. scindens*. MVs from all strains induced inflammatory cytokine expression in intestinal epithelial and macrophage cell lines. Cytokine expression was dependent on MyD88 and TRIF, signal adaptor proteins for TLRs. The inhibition of dynamin or PI3K suppressed the induction of cytokine expression by MVs, suggesting the importance of these factors downstream of TLR signaling. We next analyzed in vivo effect of *C. botulinum* Iwanai derived MVs. Oral administration of MVs only did not cause botulism in mice, however, combination of MVs and purified botulinum neurotoxin increased oral toxicity compared to the toxin only. Intestinal barrier function was disrupted in MV administrated mice, which may increase toxin absorption. In vitro analysis suggested that MVs indirectly increased epithelial permeability via immune cells. The present results provide new insights into the interactions between the host and the MVs from pathogens and symbiotic bacteria.

W1-5

Purification of *Pseudomonas aeruginosa* secretions that induce chemokines in macrophages

○岡 真優子¹, 篠原 明莉² (1京都府大院・生命環境・食環境安全性学, 2京都府立大・生命環境・食環境安全性学)

○Mayuko Oka¹, Akari Shinohara² (1Food Hyg. Env. Health., Grad. Sch. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Uni., 2Food Hyg. Env. Health., Fac. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, a gram-negative bacillus, is characterized by toxin production and biofilm formation that is regulated by a quorum sensing (QS) mechanism. The blue-green pigment, pyocyanin, which is one of the secreted toxins produced in a QS mechanism-dependent manner, has no role in inducer of chemokines in macrophages (Mφs). In contrast, molecules that increase the expression of chemokines (CCL2 and CXCL10) in Mφ were present in the residual layer fraction after pyocyanin was removed from bacterial culture medium using chloroform. In present study, we identified the chemokine-inducing molecules in *P. aeruginosa* secretions. The molecules of macromolecules were larger than 5 kDa by using ultrafiltration. After separated 20 fractions by anion chromatography (HiTrapQ HP), fractions 17-20 shown low absorbance at 280 nm, indicating the presence of protein, increased the mRNA levels of chemokines. The protease-treated fraction 19 increased the mRNA levels of chemokines in Mφs. Fraction 19 contained several proteins known to be present in the extracellular vesicles (EVs) from *P. aeruginosa*. EVs of 100-200 nm in diameter were detected by electron microscopy and nanoparticle analysis. Therefore, EVs from *P. aeruginosa* as a chloroform-resistant anionic substance were identified as a chemokine-inducing agent against Mφs.

W1-6

Klebsiella pneumoniae の菌体外膜小胞による生体ハイジャックが誘導する細菌転移

○津川 仁¹, 椿 翔吾¹, 田中 里佳², 津々木 博康³, 澤 智裕³, 松崎 潤太郎⁴ (1東海大・医・生体防御学領域・生物界間シグナル解析, 2東海大・医・生体防御学領域・免疫学, 3熊大院・微生物学講座, 4慶大・薬・薬物治療学)

Klebsiella pneumoniae-derived bacterial extracellular vesicles promote the bacterial translocation

○Hitoshi Tsugawa¹, Shogo Tsubaki¹, Rika Tanaka², Hiroyasu Tsutsuki³, Tomohiro Sawa³, Juntaro Matsuzaki⁴ (1Div. Host Defense Mech., Tokai Univ. Sch. Med., 2Div. Host Defense Mech., Tokai Univ. Sch. Med., 3Dept. Microbiol., Kumamoto Univ., 4Div. Pharmacotherapeutics, Keio Univ., Fac. Pharm.)

Klebsiella pneumoniae は腸内細菌のひとつであるが、高齢者には肝臓や肺炎を引き起こす。本菌感染症の特徴は消化管内に共生中の菌株が肝臓や肺へ転移し感染巣を形成する点にある。しかし、本菌がどの様に消化管内から遠隔臓器へ転移するのか明らかではない。我々は *K. pneumoniae* の放出する菌体外膜小胞 (KpEV) がマクロファージの極性を M2 に偏らせる一方で貪食活性を高め、IL-1β 分泌を促進させる一方で細胞死を抑制し、NO 産生を抑制することを見出した。KpEV によるこのようなマクロファージの modify は *K. pneumoniae* のマクロファージ内での生存性を顕著に高めた。マウス in vivo イメージング解析により、KpEV は血行性に肝臓及び肺への集積性を示すことを確認した。KpEV の肝臓及び肺への集積は、*K. pneumoniae* の消化管からの転移を有意に促進させた。ヒト血清中には *K. pneumoniae* のゲノム DNA にマッピングされる small RNA が検出される。我々はこの small RNA が KpEV に内包され、上皮細胞及びマクロファージ内へ送達されることを明らかにした。KpEV によるマクロファージ内への small RNA 送達は、*K. pneumoniae* 感染下での iNOS 発現を有意に抑制し、本菌のマクロファージ内での生存性を顕著に高めた。本演題では、*K. pneumoniae* の菌体外膜小胞による標的臓器でのマクロファージの機能変化が本菌の遠隔臓器への転移を達成させる分子メカニズムについて発表する。

W1-7

Clinical significance of bacterial microflora based on extracellular vesicles within blood

○河嶋 厚成¹, 神宮司 健太郎², 野々村 祝夫¹ (1阪大・医・泌尿器科, 2阪大・薬・細胞生理学)

○Atsunari Kawashima¹, Kentaro Jingushi², Norio Nonomura¹ (1Dept. Urology, Osaka Univ., Grad. Sch. Medicine, 2Lab Mol and Cell Phis, Osaka Univ., Grad. Sch. Pharmaceutical Sciences)

We are currently investigating the potential of bacterial genetic information derived from extracellular vesicles in the blood as effective diagnostic and therapeutic tools. We employed 16S rRNA metagenome sequencing on extracellular vesicles isolated from serum. For patients with renal cell carcinoma (RCC), we developed the BTS index, which incorporates genetic information from three bacterial species, including *Bacteroidia*. Moreover, the expression of *Bacteroidia* was significantly associated with the presence of regulatory T cells in the tumor microenvironment, and it could predict the clinical efficacy of cancer immunotherapy (Uemura T et al., Heilyon, 2023). In addition, the expression of the Firmicutes phylum in bladder cancer (UC) patients was correlated with the actual number of infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment, and these expressions could also predict the efficacy of cancer immunotherapy for UC patients (Jingushi K et al., Cancer Immunol Immunother, 2022). These findings indicate that bacterial genetic information in the blood could be valuable in diagnosing and treating urogenital cancers.

W1-8

進行肝硬変において腸内細菌の外膜小胞が炎症・線維化増悪をもたらす

○土屋 淳紀¹, 夏井 一輝¹, 岡 真優子² (¹新潟大・消化器内科, ²京都府立大院・生命環境・食環境安全性)

OMV of intestinal bacteria cause inflammation and fibrosis in advanced liver cirrhosis

○Atsunori Tsuchiya¹, Kazuki Natsui¹, Mayuko Osada-Oka² (¹Div. Gastroenterology and Hepatology, Niigata Univ., ²Food Hyg. Env. Health., Grad. Sch. Life. Env. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

【目的】肝硬変では長年の炎症・線維化が原因で高度な門脈圧亢進になり、腸管バリアが破綻した Leaky gut (LG) へとつながり、消化管内の LPS や PAMPs 等が侵入し、局所または全身で炎症を引き起こすがまだ概念的である。我々は代表的な腸内細菌である大腸菌が産生し 10-300nm の大きさで脂質二重膜を持つ外膜小胞 (Outer membrane vesicle; OMV) が進行肝硬変時に炎症・線維化の進行を促進し肝硬変の悪化につながる可能性を考え実験を行った。【方法】LG 由来と思われる原因不明の発熱を認めた肝硬変患者の臨床データを解析し抗 OMV 蛋白抗体の定量や腹水中からの OMV の抽出も試みた。In vitro では、大腸菌由来 OMV をマクロファージ、好中球、肝細胞、星細胞に添加して培養し、活性化や細胞死が起きるかを検討し、in vivo では CCl4 肝硬変マウスに大腸菌由来 OMV を経静脈投与し、single cell RNA 解析等を行った。【結果】LG 由来と思われる発熱を頻回に認めた患者は 41 名で、進行した肝硬変患者で多かった。肝硬変が進行すると血清中の抗 OMV 蛋白抗体 3 種が有意に増加し、患者腹水を精製したサンプルからは、電子顕微鏡で OMV と考えられる小胞を確認した。In vitro では、OMV 添加後、マクロファージ、好中球の炎症関連遺伝子の発現が有意に増加し、特に Clec4e の発現増加は顕著であった。In vivo では、OMV の投与により血清 Alb が低下し、肝組織で炎症・線維化の増悪を認めた。Single cell RNA 解析では、肝内で所謂、抗炎症性マクロファージが顕著に減少した。【結論】LG を伴う進行肝硬変患者では OMV の侵入により炎症・線維化の悪化が起こりうる。肝硬変以外の、他疾患でも細菌の小胞が病態を悪化させる可能性があると考えられる。

W2

選抜ワークショップ 1: 分類・疫学・感染症/生態

コンビーナー: 金城 雄樹 (東京慈恵会医科大学)
知花 博治 (千葉大学)

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

Conveners: Yuki Kinjo (The Jikei University School of Medicine)
Hiroji Chibana (Chiba University)

W2-1/P1-035

葉に棲息する共生細菌による気孔動態制御と植物の健康におけるその意義

○平田 梨佳子¹, Utami Yuniar Devi², 晝間 敬², 峯 彰¹ (¹京大院・農, ²東大院・総合)

Stomatal manipulation by leaf-inhabiting bacteria and its significance in plant health

○Rikako Hirata¹, Utami Yuniar Devi², Kei Hiruma², Akira Mine¹ (¹Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., ²Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. Tokyo)

動物の皮膚や体内には多種多様な細菌が棲息しており、代謝や免疫などの調節を通じて宿主の健康に影響を与えている。植物もまた全身に膨大な数の細菌を宿している。なかでも、葉は細菌が最も多く棲息する器官である。細菌が産生する代謝物が植物の成長促進やストレス耐性に寄与するという報告もある。しかし、これらは無数の細菌のごく一部であり、大部分の存在意義は不明である。

気孔は葉の表面に存在する孔 (あな) であり、植物にユニークな器官である。気孔の開き具合の調節は、植物の成長制御やストレス耐性の要となる。例えば、植物は気孔を開くことで光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを促進する一方で、乾燥時には気孔を閉じることで水分損失を防ぐ。加えて、植物は細菌を認識すると、その侵入口となる気孔を閉じるという免疫機構を備える。しかし、病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) は植物毒素コロナチンを産生し、気孔を再び開くことで植物体内に侵入して病気を引き起こす。他方、非病原性の細菌が気孔を開くかどうかは不明であった。我々は、モデル植物シロイヌナズナの葉の表面に定着する共生細菌 *Pseudomonas paralactis* (*Ppr*) が、気孔を再開口させること、および、成長を促進することを発見した。興味深いことに、*Ppr* による気孔開口は、*Pto* が産生するコロナチンによる気孔開口とは異なるメカニズムであることが明らかとなった。以上の結果を踏まえ、気孔を介した植物と共生細菌の関わり合いと植物の健康におけるその意義について議論したい。

W2-2/P1-044

複数のメタゲノム解析手法を用いた高解像度での口腔細菌叢の解析

○山口 雅也^{1,2,3,4}, 内橋 俊大⁵, 川端 重忠^{2,4} (1)阪大・院歯・バイオインフォ, (2)阪大・院歯・微生物, (3)阪大・微研・OUBIC, (4)阪大・CIDER, (5)阪大・院歯・顎顔面口腔外科)

Multiple metagenomic analysis for the oral microbiome at a high resolution

○Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Toshihiro Uchihashi⁵, Shigetada Kawabata^{2,4} (1)Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., (2)Dept. Microbiology, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., (3)Bioinform. Cent., RIMD, Osaka Univ., (4)CIDER, Osaka Univ., (5)Dept. OMFS, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

口腔細菌叢に含まれる細菌の一部は、種や含まれる遺伝子の同定が十分になされていない。本研究では、複数のメタゲノム解析手法にて唾液中の細菌種を同定するとともに、遺伝子の分布を調べることとした。同一個人から採取した唾液検体を、微生物を不活性化させる OMNIgene 保存液または培養可能なグリセロールストックにて保存した。保存した二種類の検体について、16S rRNA 解析、メタゲノムショットガン解析、細菌シングルセル解析を行った。16S rRNA 解析の結果、両検体で微生物叢構造は類似し、レンサ球菌属が優勢であった。また、メタゲノムショットガン解析では、検体中の DNA の約 80% が非細菌由来であったのに対し、シングルセル解析では、ゲノムあたりの平均汚染率が 10.4% であった。また、シングルセル解析により、不活化サンプルでは 48 ウェル中 43 ウェル、培養可能サンプルでは 48 ウェル中 45 ウェルのゲノム配列が得られた。薬剤耐性遺伝子に関して、88 ゲノム中 4 ゲノムが β -ラクタマーゼをコードする *cfxA* を、4 ゲノムがエリスロマイシン耐性遺伝子を保有していた。テトラサイクリン耐性遺伝子は 9 ゲノムで検出された。メタゲノムショットガン解析においては、*cfxA*, *ermF*, *ermX* の完全な配列が得られたが、*tetQ* など他の耐性遺伝子は断片として検出された。さらに、既知の病原因子を検索したところ、肺炎球菌由来の病原因子がもっとも多く、13 遺伝子が検出された。さらに、Average nucleotide identity 分析より、5 ゲノムについて新種である可能性が示された。本研究により、口腔細菌叢における種や遺伝子の分布について、シングルセル解析を併用することで高解像度の結果が得られることが示唆された。

W2-3/P1-017

Novel *Streptococcus* species forming extremely long chains isolated from the human oral cavity

○齋藤 真規, 桑原 紀子, 瀧澤 智美, 泉福 英信 (日大・松戸歯・感染免疫)

○Masanori Saito, Noriko Shinozaki-Kuwahara, Tomomi Hashizume-Takizawa, Hidenobu Senpuku (Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Matsudo, Nihon Univ.)

A novel species of facultative anaerobic, gram-stain-positive coccus, designated strain SN-1^T, was isolated from the oral cavity of a healthy human. The strain SN-1^T forms extremely long chains when cultured in liquid culture. Based on the 16S rRNA gene sequence analysis, strain SN-1^T belonged to the genus *Streptococcus* and was most closely related to *Streptococcus gwangjuense*, with 99.81% similarities. The genome sequence of strain SN-1^T was 2,111,706 bp and deposited in DDBJ under the accession number AP028929 (not published). The genomic DNA GC content of strain SN-1^T was 39.9 mol%. Genome-to-genome distance values and average nucleotide identity values between strain SN-1^T and its highly related taxa were below the threshold values (70% and 95%, respectively) for species delineation. Based on these results, strain SN-1^T (=JCM 36619^T, DSM 117271^T) should be classified as a novel species of *Streptococcus*, and we propose the name *Streptococcus catena* sp. nov.

Description of *Streptococcus catena* sp. nov.

Streptococcus catena (ca.te'na. L. fem. n. catena, a chain, in view of the extremely long chains formed in liquid culture).

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP20K10299.

W2-4/P1-034

Comparative genomic analysis of long-term colonization of *Bifidobacterium longum* in the human gut

○四宮 彩名^{1,2}, 月見 友哉¹, 渡部 翔¹, 吉田 祐真¹, 鈴木 治夫^{1,2}, 加藤 久美子³, 小田 巻 俊孝³, 佐藤 光彦⁴, 小椋 義俊⁵, 福田 真嗣¹ (1)慶大・先端生命科学研, (2)慶大・環境情報, (3)森永乳業(株)・基礎研, (4)かずさDNA研究所, (5)久留米大・医)

○Ayana Shinomiya^{1,2}, Tomoya Tsukimi¹, Tsubasa Watabe¹, Yuki Yoshida¹, Haruo Suzuki^{1,2}, Kumiko Kato³, Toshitaka Odamak³, Mitsuhiko Sato⁴, Yoshitoshi Ogura⁵, Shinji Fukuda¹ (1)Inst. Adv. Biosci, Keio Univ., (2)Fac. Environ. Info. Stud., Keio Univ., (3)Innov. Res. Inst., Morinaga Milk Indust., (4)Kazusa DNA Res. Inst., (5)Kurume Univ. Sch. Med.)

Bifidobacterium longum, exhibits genomic variations among individual hosts, contributing to human health. Notably, identical *B. longum* genomes persist within an individual over extended periods, suggesting the potential for modulating its abundance to contribute to human health maintenance. The aim of this study is to explore how *B. longum* adapt through adaptive mutations to establish colonization in the individual gut. We conducted isolation and cultivation of *B. longum* from fecal samples obtained at multiple time points over 13 years from 23 Japanese subjects, resulting in 475 draft genomes of *B. longum* strains through subsequent whole-genome analysis. Comparative genomic analysis revealed a consistent trend of a lower total number of SNPs per isolate at the same time point within a subject, compared to SNPs at different time points. Additionally, an observable clustering by time point indicated temporal variations in strains even within the same individual. Conversely, stable strains were identified, irrespective of the temporal sequence. The potential correlation between changes in bacterial strains and the gene set alterations suggests ongoing transformations in the gut microbiota. Subsequent investigations will delve into exploring subject information and conducting functional gene analyses to unveil the underlying factors contributing to these observed results.

W2-5/P1-032

乳酸菌から単離した胆汁酸耐性と抗生物質耐性を同時に付与する両機能性酵素の機能解析

○草田 裕之, 玉木 秀幸 (産総研・生命工学・生物プロセス)

Bile salt hydrolase degrades β -Lactam antibiotics and confers antibiotic resistance on *Lactobacillus*

○Hiroyuki Kusada, Hideyuki Tamaki (BPRI., Dept. Life Sci. Biotechnol., AIST)

Lactobacillus 属乳酸菌は古くからヒトの健康に有益な効果をもたらすプロバイオティクスとして関心を集めている。これら乳酸菌群が効果的にプロバイオティック機能を発揮するためには、ヒト腸内で安定的に生存・定着・増殖することが重要と考えられている。しかしながら、ヒト腸内は細菌にとって毒性の高い消化液成分の胆汁酸や抗生物質投薬の影響により、これら有益な乳酸菌群の腸内生残性は大きく低下すると予想される。近年、我々は胆汁酸のみならず抗生物質をも同時に分解する新規な胆汁酸塩加水分解酵素 (Bile salt hydrolase, BSH) をヒト由来乳酸菌から単離することに成功した。本発表では、胆汁酸と抗生物質の両耐性能に寄与する新規酵素について報告する。まず、*L. paragasseri* のゲノム解析から 2 つの BSH 候補遺伝子 (LpBSH・LapBSH) を見出し、大腸菌を宿主とした組換え酵素の発現系を構築した。酵素活性測定の結果、どちらの酵素も多様な抱合型胆汁酸のアミド結合の切断反応を触媒する BSH 活性を有することが判明した。さらに、LpBSH と LapBSH はペニシリン分解酵素 (Penicillin acylase) とも有意な相同性を有しており、実際にペニシリンをも分解可能な「両機能性酵素」であることが明らかとなった。本乳酸菌は高い胆汁酸耐性を示すと共に、ペニシリンを含む各種 β -ラクタム系抗生物質に対しても緩やかな耐性能を示したことから、本菌においては、これら両機能性酵素が胆汁酸耐性と抗生物質耐性という 2 つの異なる重要な微生物機能を担うことで、腸内生残性の向上に寄与している可能性が示唆された。

W2-6/P1-036

Bacterial Olympics Achieved by Microfluidic Devices

○島田 佳季¹, 吉岡 青葉², 上村 直輝², 中根 大介², 菅 哲朗¹ (電通大・機械知能, ²電通大・基盤理工)

○Yoshiki Shimada¹, Aoba Yoshioka², Naoki Uemura², Daisuke Nakane², Tetsuo Kan¹ (¹Dept. Mech. and Int. Sys. Eng., UEC, ²Dept. Eng. Sci., UEC)

Narrow and confined environments are ubiquitous in our surroundings. Both pathogenic and symbiotic bacteria pass through a limited space to reach the host cell surface, as the initial step of infection. However, the details of how a single bacterium moves in a narrow passage are still unknown. Here, we fabricated a microfluidic device that mimics the host surface using MEMS technology. The device has a large space, which is connected to a straight passage with 100 μm long. Twenty five types of widths of the passages are ranging from 0.5 to 10 μm on one chip. We confined nine bacteria, and evaluated their motility under optical microscopy quantitatively. This observation system named as Bacterial Olympics. In the wide passages, the standard strains for the research on bacterial motility ranked high, but in the narrow passage less than 1.5 μm, the ranking changed. *Vibrio fischeri* and *Campylobacter jejuni* ranked fast propulsion speed in the narrow passages. These bacteria are known to have a swimming style of flagellar wrapping, in which they wrap their flagella around their body. Our data suggests that the wrapping plays an important role in efficient movement in small spaces. The assay of Bacterial Olympic would be a useful tool for analyzing and evaluating the infection mechanism of pathogenic and symbiotic bacteria in the host's confined environment.

W2-7/P1-013

無症候性保菌者由来 *stx2f* 保有大腸菌, *E. albertii* の分子疫学

○菊池 賢¹, 荒井 裕子¹, 阿部 蘭¹, 野口 秋雄², 宇野 浩一², 金子 寛², 佐藤 寿夫² (¹東女医・感染, ²日本微生物研究所)

Molecular epidemiology of *stx2f* EHEC strains isolated from asymptomatic carriers

○Ken Kikuchi¹, Yuko Arai¹, Ran Abe¹, Akio Noguchi², Ko-ichi Uno², Hiroshi Kaneko², Toshio Sato² (¹Dept. Infect. Dis., Tokyo Women's Med Univ, ²Japan Microbiological Institute)

2021 年度に無症候性保菌者から分離された *stx2f* 保有 EHEC 41 株について, その病原性, 遺伝子背景, 薬剤感受性, 耐性遺伝子について検討を行った. *stx2f* 保有 41 株のうち, 大腸菌は 37 株で 4 株は, 類縁の *Escherichia albertii* であった. *stx2f* 以外では大腸菌 1 株が *stx1c*, *stx2b* を保有していた. 大腸菌 37 株の内訳では, 血清型 O-105, MLST 13581 が 15 株, O-63, MLST 583 4 株, O-148 MLST 11102 3 株, 同, MLST 3558 2 株, O-109, MLST 40 3 株などとなっており, *eae+* (subtype α2, β1, θ) が 72% と大半を占めていた. また, 他の病原因子では *astA+* が 49% に見られ, 病原性は高いことが示唆された. *E. albertii* は MLST 2683, 383-like, 5991-like で, いずれも *eae* (subtype γ5, ε3, N1.1), *cdt-II* を保有していた. 大腸菌 13 株は *cdt-I*, 1 株は *cdt-II* を持っていた. 薬剤感受性では *E. albertii* 2 株, 大腸菌 1 株が ESBL 産生菌であり, いずれも *bla_{TEM-1}* 保有株であった. *stx2f* は臨床検査で行われる *stx* 検査では検出できず, その実態はほとんど明らかになっていない. 今回の結果から, *stx2f* 保有株の高い病原性と, 一部にみられた薬剤耐性から, *stx2f* 保有株の臨床現場での感染実態などを早急に調査する必要性があると考えられ, これを検出できるシステム構築が喫緊の課題である事が明らかとなった.

W2-8/P2-171

National genomic surveillance of antimicrobial resistance in Japan: 1st phase of JARBS-GNR project

鹿山 鎮男, ○矢原 耕史, 菅原 庸, 川上 小夜子, 近藤 恒平, 左 弁, 沓野 祥子, 北村 徳一, 平林 亜希, 菅井 基行 (感染研・AMR研究センター)

Shizuo Kayama, ○Koichi Yahara, Yo Sugawara, Sayoko Kawakami, Kohei Kondo, Hui Zuo, Shoko Kutsuno, Norikazu Kitamura, Aki Hirabayashi, Motoyuki Sugai (AMR Research Center, NIID)

Antimicrobial resistance is a global health concern; Enterobacterales resistant to third-generation cephalosporins (3GCs) and carbapenems are of the highest priority. Here, we developed national genomic surveillance ("JARBS-GNR") that conducted genome sequencing and standardized quantitative antimicrobial susceptibility testing of 4,195 isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* resistant to 3GCs and Enterobacterales with reduced meropenem susceptibility collected across Japan. Our analyses provided a complete classification of 3GC resistance mechanisms. Analyses with complete reference plasmids revealed that among the ESBL *bla_{CTX-M}* genes, *bla_{CTX-M-8}* was typically encoded in highly similar plasmids. Our analyses identified strains positive for carbapenemase genes but phenotypically susceptible to carbapenems and undetectable by standard antimicrobial susceptibility testing. Systematic long-read sequencing enabled reconstruction of 183 complete plasmid sequences encoding three major carbapenemase genes and elucidation of their geographical distribution stratified by replicon types and species carrying the plasmids and potential plasmid transfer events. Overall, we provide a blueprint for a national genomic surveillance study that integrates standardized quantitative antimicrobial susceptibility testing and characterizes resistance determinants (*Nature Communications*, 2023).

W2-9/P1-029

Helicobacter pylori 母子感染モデルの水平感染効率の検討

○大崎 敬子¹, 北条 史², 岡 健太郎³, 蔵田 訓⁴, 高橋 志達¹, 三戸部 治郎¹, 神谷 茂^{1,3} (¹杏林大・医・感染症学, ²杏林大・医・実験動物施設, ³ミヤリサン製薬・研究開発本部, ⁴杏林大・保健・臨床検査微生物)

Efficiency of transmission of *Helicobacter pylori* in an animal model of mother-to-child infection

○Takako Osaki¹, Fuhito Hojo², Kentaro Oka³, Satoshi Kurata⁴, Motomichi Takahashi¹, Jiro Mitobe¹, Shigeru Kamiya^{1,3} (¹Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med., ²Inst. Lab. Animals, Grad. Sch. Med, Kyorin Univ., ³R&D Division, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd., ⁴Div. Microbial., Dept. Med Technol., Fac. Health Sci., Kyorin Univ.)

Helicobacter pylori はヒトを自然宿主として 4-5 歳ころまでに感染し, 除菌治療が施されない限り生涯にわたって持続感染する. 衛生状態の良い現在の国内では感染の主因は家族内感染である. これまで本学会において MPS マウスを用いて *H. pylori* の長期間持続感染を報告してきた. MPS マウスは *H. pylori* の経口投与によりほぼ 100% の確率で感染が成立し, 1 年以上感染が持続し, 易感染性であることを示した. そこで, MPS マウスを用いた *H. pylori* 母子水平感染の効率やそれに影響する環境因子を調べることを目的とし, 母マウスに感染後, 交配させるモデルを立ち上げた. MPS マウス 6 週齢雌に *H. pylori* を経口投与し, 10 週齢で交配, その仔への感染状況を調べた. 生後 1-4 週までの各週と, 5 週 (雄) および 10 週 (雌) の時点で, それぞれ評価した. 培養法による評価では仔マウスは全頭 *H. pylori* の感染が陰性であり, 母マウスは全頭感染陽性であった. マウスの母乳および血清中に抗 *H. pylori* 抗体を認め, 仔マウスの血清中に抗 *H. pylori* IgG 抗体が存在していた. 一方, 胃内総 DNA の定量 PCR により, 仔マウスの胃内にも *H. pylori* の DNA を認めたが, 母マウスと比較して 1/100 から 1000 程度であった. 本実験において, 母親由来の抗体の存在が仔マウスへの感染を防いでいる可能性が示された. 現在, 感染母マウスと, 非感染母マウスから生まれた仔マウスを入れ替える系を立ち上げており, 母親からの移行抗体の無い子供に *H. pylori* 感染が成立するかを検討している.

選抜ワークショップ 2：生態/生理・構造

コンピーナー：住友 倫子（徳島大学）
中根 大介（電気通信大学）

Selected from general presentations 2:
Ecology / Physiology / Structural biology

Conveners: Tomoko Sumitomo (Tokushima University)
Daisuke Nakane (The University of Electro-Communications)

W3-1/P1-058

A Gram-positive bacterium induces Quorum Sensing in a Gram-negative bacterium

○杉本 翠¹, 佐野 千佳歩¹, 永久保 利紀^{2,3}, 野村 暢彦^{2,3}, 豊福 雅典^{2,3} (筑波大院・生命地球科学研究群, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター)

○Sui Sugimoto¹, Chikaho Sano¹, Toshiki Nagakubo^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Masanori Toyofuku^{2,3} (¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ³MICS (Microbiology Research Center for Sustainability), Univ. Tsukuba)

Quorum sensing (QS) is a type of bacterial communication that is driven by signaling molecules which regulates various genes. Gram-negative bacteria use acyl-homoserine lactone (AHL) while Gram-positive bacteria mainly use peptide signals. We have isolated ST-17, a Gram-positive bacterium, from a field in University of Tsukuba, that can induce the QS response of *C. violaceum*, a Gram-negative bacterium. Genome analysis indicates that ST-17 possesses both putative AHL degradation gene and synthesis gene that is distinct from the lux family. To gain insights into the signal molecule that ST-17 produces, we constructed a strain expressing a well characterized lactonase gene *aiiA*. When this gene was expressed in ST-17, the strain could not induce the QS response in *C. violaceum* anymore. The result suggested that ST-17 produces a signaling molecule with a lactone ring. We also show that the putative lactonase in ST-17 do degrade AHL. To date, there are only few reports showing that Gram-positive bacteria can induce the AHL signaling of a Gram-negative bacterium. Our results will provide new insights into interspecies bacterial communications. In further study, we will identify genes involved in the QS of ST-17.

W3-2/P1-065

大腸菌由来の細胞外小胞による A 群レンサ球菌の細胞分裂障害機構の解明

○河岸 優, 村瀬 一典, 中川 一路 (京大・医・微生物感染症)

Cell division defect in Group A Streptococcus caused by E. coli-derived extracellular vesicle

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

細胞外小胞 (Extracellular vesicle: EV) は細菌が細胞外へ放出する 20-400 nm の球状の構造体であり, 細菌間のコミュニケーション等において重要な役割を果たすことが知られている. 先行研究において, 我々は, 大腸菌由来の EV が A 群レンサ球菌 (Group A Streptococcus; GAS) の増殖を抑制し, 隔壁の多重形成を特徴とする細胞分裂障害を引き起こすことを発見した. 本研究では, この分裂障害機構を解明し, 異なる菌種間で EV が介在する生理的機能を明らかにすることを目的とする. 細菌の細胞分裂はチューブリンホモログである FtsZ が細胞中央で重合し, Z-ring と呼ばれるリング状の構造体を形成することで開始する. 初めに, FtsZ と mNeonGreen の融合発現株を作製し, EV 処理時における菌体の Z-ring の形成・局在について, 共焦点顕微鏡を用いて観察した. 非処理細胞では, 単一の Z-ring が細胞中央に局在するのに対し, EV 処理条件では, 複数の Z-ring が近接して局在し, 多重の分裂環形成が確認された. さらに, EV 処理から細胞分裂障害が起こるまでのプロセスを明らかにするため, タイムラプス解析を行ったところ, 不完全な細胞伸長・分離を伴う細胞分裂が繰り返されていることが明らかとなった. また, d-アミノ酸蛍光プローブ HADA を用いて新しく合成される peptidoglycan (PG) を標識し, PG 合成に対する EV の影響についても観察した. 非処理細胞では HADA は隔壁 PG 合成と共に取り込まれ, 表層 PG 合成の進行に伴い細胞表層全体に拡散する. 一方, EV 処理細胞では, HADA は隔壁部分に蓄積し表層への局在は見られなかった. 以上の結果から, EV は GAS の PG remodeling を阻害することで, 細胞分裂障害を引き起こすと考えられる.

W3-3/P1-057

Narrow space triggers flagellar wrapping of *Helicobacter pylori*

○横濱 さらら¹, 林原 絵美子², 島田 佳季³, 菅 哲朗³, 見理 剛², 中根 大介¹ (¹電通大・基盤理工, ²感染研・細菌第二部, ³電通大・機械知能)

○Sarara Yokohama¹, Emiko Rimbara², Yoshiki Shimada³, Tetsuo Kan³, Tsuyoshi Kenri², Daisuke Nakane¹ (¹Dep. Eng. Sci., UEC, ²Dept. Bacteriol II, NIID, ³Dep. Mech. Intell. Syst., UEC)

Swimming motility is crucial for *Helicobacter pylori* infection. The bacterium swim by rotating flagella on one side of its helical shape to reach the gastric mucosal surfaces. However, the detailed behavior of single bacterium at the host surface has not been observed. Recently, non-*Helicobacter pylori Helicobacter* (NHPH) has also attracted attention in gastric disease, showing diversity in flagellar polarity and twist of helical cell shape, but their role during the infection is unknown. Here, we fabricated a 2 μm thick microfluidic device that mimics the gastric surface. When *H. pylori* and *H. heilmannii*, a type of NHPH, were confined in the device, *H. pylori* passed smoothly through the narrow space, while *H. heilmannii* formed aggregates. High-precision optical microscopy revealed that this difference was due to flagellar wrapping of *H. pylori*. Unexpectedly, the motility advantage of *H. pylori* was reversed in higher viscous solution with *H. heilmannii* swimming three times faster than *H. pylori*. In addition, 40% of *H. heilmannii* showed flagellar wrapping, which was not observed at low viscosity. These results suggest that *H. pylori* and NHPH optimize their motility in different viscous environments to avoid competition at the host surface.

W3-4/P1-071**Exploring Another Transition State of MFS-Type Drug Efflux Transporter MdfA in the Transport Cycle**

稲葉 (井上) 理美^{1,2}, 守屋 俊夫¹, 〇田辺 幹雄¹ (1高工ネ機構・物構研・構造生物, 2北大・先端生命)

Satomi Inaba-Inoue^{1,2}, Toshio Moriya¹, 〇Mikio Tanabe¹ (1SBRC, IMSS, KEK, 2Fac. Adv. Life. Sci., Hokkaido Univ.)

Multidrug efflux transporters transport antimicrobial agents and toxic substances out of the cell, rendering bacteria resistant to various compounds. Major Facility Superfamily (MFS)-type multidrug efflux transporters are known to transport substrates across the membrane through at least three steps: 1) substrate binding, 2) conformational change leading to the re-orientation of the substrate binding site, and 3) substrate release. These steps are thought to be a common mechanism in all MFS-type drug efflux transporters. Although individual steps have been characterized in several genetic, biochemical, structural, and simulation experiments, the understanding of these concerted movements in the transport cycle still needs to be improved. In this study, to bridge the gap between these three steps and further understand their dynamics and interactions with membranes. We aim to obtain another conformational state of the MFS-type multidrug efflux transporter MdfA in the membrane environment that more closely mimics its natural state using antibody fragments in combination with single-particle analysis using cryo-EM.

W3-5/P1-069**Reconstitution of *Haloplasma contractile* cell wall in JCVI-syn3.0**

〇笠井 大司¹, 加藤 真悟², 塩見 大輔¹ (1立教大・理・生命理, 2理研・バイオリソース・微生物材料)

〇Taishi Kasai¹, Shingo Kato², Daisuke Shiomi¹ (1Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ., 2JCM. BRC. RIKEN)

Haloplasma contractile was classified in the class *Mollicutes* that generally lacks a cell wall. The *H. contractile* genome contains the division and cell wall synthesis (DCW) gene cluster, which is conserved in almost all bacteria. The existence of the cell wall of *H. contractile* has not been confirmed. In the present study, we analyzed the cell wall synthesis pathway of *H. contractile*. First, we stained the *H. contractile* with wheat germ agglutinin conjugated with Alexa Fluor-488 (WGA-488) which binds to N-acetylglucosamine in the cell wall. The cells were labeled with WGA-488, suggesting that *H. contractile* cells have a cell wall. However, the gene manipulation technique in *H. contractile* has not been established. We attempted to reconstitute the cell wall synthesis pathway in JCVI-syn3.0 which is a bacterium with a minimal genome. JCVI-syn3.0 carrying the DCW cluster was labeled with WGA-488 and the fluorescent particles appeared in the culture. These particles were thought to be cell wall precursors released from cells because the DCW cluster did not contain genes involved in the anchoring of cell wall to the cell membrane. We introduced other cell wall synthesis genes into JCVI-syn3.0. Many of these cells were labeled with WGA-488. This result suggests that the cell wall-less bacteria acquired the cell wall synthesis ability.

W3-6/P1-048**Extended *Vibrio cholerae* cultivation induces flagella genes mutation with prolonged culturability**

〇岡田 和久, Amonrattana Roobthaisong, 浜田 茂幸 (阪大・微研・日夕イ感染症)

〇Kazuhisa Okada, Amonrattana Roobthaisong, Shigeyuki Hamada (RCC-ERI, RIMD, Osaka Univ.)

Understanding the survival strategies of pandemic cholera pathogens in aquatic environments is crucial for public health countermeasures. *Vibrio cholerae* undergoes a transition to a viable but non-culturable (VNC) state in response to various environmental stresses. Our study reveals that the motility defect reduces the transition to the VNC state of the organisms. In addition, organisms with impaired motility, resulting from various mutations in flagella-related genes, were predominantly obtained under the stress of long-term batch culture (M9 minimal medium supplemented with 0.2% glucose), highlighting the connection between motility and the VNC state. We found mutations occurred selectively in flagella-related genes, with other genomic regions remaining highly conserved. Longer cultivation for up to 300 days yielded additional mutations in metabolism-related genes and the loss of virulence factors (e.g., CTX phage) and large DNA regions (~35 kb), accompanying the loss of genomic integrity. Motility-defective variants with mutations in the acetate kinase gene became predominant in most of the culturable cells after long-term cultivation. Those findings provide insights into the dynamics of bacterial populations in long-term cultures under certain environmental conditions.

W3-7/P1-072**Characterization of a novel pneumococcal ABC transporter involved in antibiotic efflux**

〇田口 厚志^{1,4}, 藤田 純三², 田辺 幹雄³, 高谷 大輔⁴, 福澤 薫⁴, 難波 啓一², 西野 邦彦^{1,4} (1阪大・産研, 2阪大・生命機能研究, 3高工ネ研・構造生物, 4阪大・薬)

〇Atsushi Taguchi^{1,4}, Junso Fujita², Mikio Tanabe³, Daisuke Takaya⁴, Kaori Fukuzawa⁴, Keiichi Namba², Kunihiro Nishino^{1,4} (1SANKEN, Osaka Univ., 2Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ., 3SBRC, KEK, 4Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Multidrug efflux pumps play a major role in antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, but how Gram-positive bacteria utilize these membrane transporters remains poorly characterized. To identify membrane transporters involved in antibiotic resistance in the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, we constructed pneumococcal strains that overexpress putative efflux pumps and screened these strains against a panel of representative antibiotics. In this screen, we identified a previously uncharacterized ABC transporter that contributed to elevated resistance against a cell wall active antibiotic. Heterologous expression of this transporter in *Escherichia coli* resulted in a similar increase in resistance, suggesting that it does not require other pneumococcal proteins for its function. To understand the molecular basis for substrate transport, we reconstituted this transporter in proteoliposomes and found that the ATPase activity is not affected by the presence of the putative substrate. We succeeded in obtaining cryo-EM structures of the inward- and outward-facing conformations, which provide insight into the structural basis of substrate recognition. Together, this work advances our understanding of membrane transporters in Gram-positive bacteria.

W3-8/P1-047

Chlamydia trachomatis favors hypoxia because it suppresses methionine-related metabolites

○山口 博之¹, 李 睿語¹, 張 賽成¹, 黒岩 青空¹, 大久保 寅彦¹, Jeewan Thapa², 東 秀明³ (¹北大院・保科・病態解析, ²北大・バイオリソース部門・人獣共通感染症国際共同研究所, ³北大・感染免疫部門・人獣共通感染症国際共同研究所)

○Hiroyuki Yamaguchi¹, Ruiyu Li¹, Saicheng Zhang¹, Sora Kuroiwa¹, Torahiko Okubo¹, Jeewan Thapa², Hideaki Higashi³ (¹Fac. Health Science, Hokkaido Univ., ²Div. Bioresources, Int. Inst. Zoonosis Ctr., Hokkaido Univ., ³Div. Infection and Immunity, Int. Inst. Zoonosis Ctr., Hokkaido Univ.)

The intracellular energy parasitic bacterium *Chlamydia trachomatis* (Ct) is the leading cause of sexually transmitted infections and has been implicated in the etiology of cervical cancer. Since anaerobic glycolysis with pushing cellular proliferation can produce more ATP than under normoxia, Ct favors hypoxia rather than normoxia. However, it is unclear what role the activation of glycolysis under hypoxia plays in the growth of Ct, other than facilitating the acquisition of ATP. To understand why Ct favors hypoxia, we examined the dynamics of infected cells using glycolysis-related PCR array and metabolomic analysis. We found that, compared with the levels under normoxia, the expression of glycolysis-related genes was significantly increased under hypoxia and further promoted by infection. Meanwhile, among 194 metabolites identified, the levels of 55 metabolites were significantly decreased under hypoxia and became more pronounced by infection. Almost half were methionine-related metabolites, and the perturbation with adenosine derivatives significantly impaired the growth. Together, Ct favors a hypoxia because it suppresses methionine-related metabolites while increasing glycolysis. Non-member co-researchers: S. Otsuguro, A. Matsuda, K. Maenaka (Center for Research and Education on Drug Discovery, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

W4

事例に学ぶ細菌学

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

Bacteriology learnt from each case

Conveners: Shinji Yamasaki (Osaka Metropolitan University)
Hiromi Nakamura (Osaka Institute of Public Health)

新型コロナウイルス感染症が5類感染症に移行され、人々の行動が再び活発となり様々な食中毒や感染症が流行し始めている。また、COVID-19流行をきっかけとして食中毒や感染症の疫学解析にゲノム解析手法が積極的に用いられるようになった。本ワークショップでは近年発生した腸管病原性大腸菌 O45 による食中毒事例、湧水を使用した飲食物が原因となったカンピロバクター食中毒事例、宿泊施設の大浴場におけるレジオネラ症発生事例、同一クローン由来株に起因する *Salmonella* Oranienburg による菌血症事例とリアルタイム PCR によって検出できたエッシャーキア・アルバーティーの小児下痢症後の長期排菌事例を紹介する。これらの中には菌株のゲノム解析によって感染源の推定あるいは特定に繋がった事例もあった。このような実際の事例紹介により、聴講者とともに食中毒や感染症の疫学についての理解を深めるとともに、問題点を見出し、課題解決につながる共同研究に発展すれば幸いである。

W4-1

腸管病原性大腸菌 O45:H15 による食中毒事例の概要と分離菌株の遺伝学的解析

○若林 友騎¹, 齋藤 悦子², 荻田 堅一², 原田 哲也¹, 山口 貴弘¹, 河合 高生¹, 押部 智宏², 大岡 徹彦² (¹大安研・微生物, ²兵庫健科研・感染症)

A foodborne outbreak caused by EPEC O45:H15 and genomic characterization of the etiological agents

○Yuki Wakabayashi¹, Etsuko Saito², Kenichi Ogita², Tetsuya Harada¹, Takahiro Yamaguchi¹, Takao Kawai¹, Tomohiro Oshibe², Tetsuhiko Oooka² (¹Div. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health, ²Div. Infect. Dis., Hyogo Pref. Inst. Pub. Health Sci.)

下痢原性大腸菌の1つに分類される腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) は、小児下痢症患者からの分離例が多く、特に途上国の小児下痢症の主要な原因の1つとされている。国内においても散発例から分離されているほか、EPECによる食中毒も報告されているが、その発生はまれである。

2022年6月、近畿地方において、患者数が150名を超える食中毒が発生した。有症者、施設従業員および食品残品より EPEC O45:H15 が分離されたことから、当該事例は EPEC O45:H15 を原因とする食中毒と断定された。

本発表では、当該食中毒事例の疫学調査および細菌学的調査結果の概要について報告するとともに、原因菌として分離された EPEC O45:H15 の全ゲノム配列解析結果について報告する。

W4-2

湧水を使用した飲食物が原因となったカンピロバクター食中毒

○北川 恵美子¹, 緩詰 沙耶¹, 城座 美夏¹, 中村 幸子¹, 菅野 光², 浅田 征彦², 小坂 恵², 上杉 真由美² (1石川県保健環境センター, 2石川県石川中央保健所)

Campylobacter food poisoning caused by food and drink made with spring water

○Emiko Kitagawa¹, Saya Yuruzume¹, Mika Shiroza¹, Sachiko Nakamura¹, Hikari Kanno², Yukuhiko Asada², Megumi Kosaka², Mayumi Uesugi² (1Ishikawa Pref. Inst. Public Health and Environ. Sci., 2Ishikawa Chuo Public Health Center of Ishikawa Pref.)

2023年8月, 湧水を使用した飲食物を原因食品, *Campylobacter jejuni* (Cj) を病因物質とする食中毒事例が発生した。本件は, 帰省や観光シーズンと重なったこともあり, 患者は892人となり, 平成以降に石川県内で発生した食中毒患者数としては最多であった。原因施設を利用した1,298人について調査した結果, 892人が消化器症状又は発熱を有しており, この多くがカンピロバクター感染による潜伏期間と一致していた。患者及び従事者の便からCjが検出されたこと, 使用水の湧水(原水)からCjが検出され, 営業時は塩素消毒がされていないことが, 患者に共通するものは原因施設が提供した飲食物以外にないことからCjを病因物質とする食中毒と判断した。当センターで検出した患者便3検体, 従事者便5検体, 湧水(原水)由来のCjについて改良Penner PCR型別による血清型別試験の結果, 患者便のうち1検体はgB群, 2検体はgD群, 従事者便のうち2検体はgB群, 2検体はgD群, 1検体はgB群とgD群, 湧水(原水)はgB群とgD群であり, 国内で多く検出されている血清型であった。これらについて遺伝子解析(mP-BIT)を実施したところ, 血清型gB群の菌株は患者及び従事者便から検出された菌株と湧水(原水)の菌株は一致していたが, gD群の菌株は一致していなかったことから, 湧水は複数の血清型, 遺伝子型のCjで汚染されていたと推測された。本件は, 7月に発生した集中豪雨の影響で従来使用していた取水口が被災し, 新たに取水口を確保して営業開始することになったが, COVID-19の影響による営業自粛から4年ぶりの営業再開を優先するあまり水質検査を実施せず, 使用水の安全性を確認していなかったことが食中毒発生の大きな要因と考える。

W4-3

宿泊施設大浴場の循環式気泡浴槽を感染源としたレジオネラ症発生事例

○中西 典子, 野本 竜平 (神戸市健科研・感染症部)

Investigation of a *L. pneumophila* Outbreak at a Bath Facility Using WGS analysis

○Noriko Nakanishi, Ryohei Nomoto (Dept. Infec. Dis., Kobe Inst.)

宿泊施設の大浴場を利用した神戸市外の2名からレジオネラ症届出があった。大浴場はかけ流し式温泉と循環式気泡浴槽の2つの浴槽があった。施設調査の結果, 14か所からレジオネラ属菌が検出され, 施設の衛生管理の不備が認められた。患者1名の喀痰から選択培地上の複数のレジオネラ様コロニーを分離したところ, 全て *L. pneumophila* SG1 ST138 であった。また, 気泡浴槽水, 気泡板, ろ過等からも患者と同一遺伝子型の株が分離された。ST138は散发例や小規模アウトブレイクを引き起こす日本に特有の遺伝子型である。そこで, 同一患者由来14株と環境由来19株について全ゲノム解析による菌株の同一性を調べた。その結果, 同一患者由来14株間のSNVsは0~41個であり, 14株中12株は, 三つのClade (Clade I, II, III)に分かれた。Clade Iは患者株のみで構成され, Clade IIとIIIには患者由来株と環境由来株の両方の株が含まれ, SNVは4個以下であったことから, 当該施設が感染源であると判断した。同一患者由来株の多様性は同時に複数の遺伝子系統に暴露されたことを示しており, 浴槽などエアロゾルが発生する環境に長時間滞在することが影響していると考えられた。

さらに, 10年前に同一施設の循環式気泡浴槽から分離・保存されていた株との比較において, 患者由来株とのSNVs数は約30個, 浴槽・ろ過器由来株とのSNVsが10個以内であったことから, 少なくとも2013年から同一遺伝子型の株が施設内に定着しており, 多様に分岐した可能性が考えられた。

講演では, 施設のレジオネラ汚染実態や感染源特定のための一連の検査対応について報告する。

会員外共同研究者: 小松 頌子, 田中 忍, 向井 健悟 (神戸市健康科学研究所)

W4-4

2018年に発生した *Salmonella enterica* serovar Oranienburg 菌血症集積事例由来株の全国的蔓延

○大岡 唯祐 (鹿児島大・医歯学・微生物)

Nationwide spread of a *S. Oranienburg* clone caused a cluster of bacteremia cases in 2018 in Japan

○Tadasuke Ooka (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ.)

Salmonella enterica serovar Oranienburg は食中毒の原因菌の一つであるがまれに菌血症などの全身感染の原因にもなる。2018年8月に鹿児島市を中心とした本菌の同一クローン由来株に起因する菌血症集積事例(12例)が発生し, 集積事例とは関連のない鹿児島県の食品取り扱い従事者由来2株も集積事例株と同一クローン由来であることを明らかにした。しかしながら, 感染源の同定には至らなかったため, 共通感染源が存在する可能性を想定し, 鹿児島県で本菌による食中毒・感染事例を継続的にモニタリングしていたところ, 2022年7月に関連のない2人の感染事例(菌血症と下痢症)が報告された。

2022年鹿児島県感染事例由来2株と2018年菌血症由来12株, 加えて全国の食品取り扱い従事者由来株との関連を明らかにする目的で, 高精度ゲノム系統解析を実施した結果, 食品取り扱い従事者由来2019年分離株7株(福岡3株, 宮崎1株, 熊本1株, 大阪1株, 兵庫1株)と2022年鹿児島県感染事例由来2株, 2018年菌血症由来株が同一系統に分類された。この結果は, 2018年以降, 菌血症集積事例の原因となったクローンおよびその派生株が広い地域で分離されていることを意味するとともに, 現在も同株の感染源が維持されている可能性を示唆するものである。

本発表では, これまでの事例および解析結果を紹介するとともに, 本クローンの感染源を同定するため, 本菌に関して, 食中毒事例だけでなく菌血症事例にも注視し, 食品取り扱い従事者糞便の検査結果を共有するといった多面的なモニタリングの必要性について議論したい。

W4-5

リアルタイムPCRで検出できた小児胃腸炎患者が長期間 *Escherichia albertii* を排菌し続けた事例

○山崎 伸二 (大阪大・獣医・獣医国際防疫)

Detection of prolong excretion of *E. albertii* in stool of a child with gastroenteritis by qRT-PCR

○Shinji Yamasaki (Grad. Sch. Vet. Sci. Osaka Metropolitan Uni.)

新興人獣共通感染症起因菌として近年 *Escherichia albertii* が注目を集めている。我が国においては2003年以降, 少なくとも12件の集団食中毒事例が報告されている。推定原因食品も様々であり感染源や感染経路も不明である。*E. albertii* は細菌学的性状が大腸菌と酷似しており, 特異的な検出系や選択培地がなかった。*eae* 遺伝子や *cdt* 遺伝子を普遍的に保有していることや一部の *E. albertii* が *stx2a* あるいは *stx2f* 遺伝子を保有していることからEPECやEHECあるいはII型の細胞膨化致死毒素(CDT-II)産生大腸菌と誤同定されていた。それゆえ, *E. albertii* の環境中での分布, 感染源, 臨床疫学データや臨床症状など不明な点が多かった。近年, *E. albertii* の特異的な検出系, 選択増菌培地や鑑別培地などが開発され *E. albertii* の実態が少しずつ明らかとなってきている。本研究では, *E. albertii* の特異的に検出できるリアルタイムPCRと *E. albertii* の鑑別培地を組み合わせることにより同一クローンを約1ヶ月間にわたり排菌し続けた事例を経験したので報告する。

W5

膜タンパク質を介する生命現象の分子生理学

コンピーナー：田辺 幹雄（高エネルギー加速器研究機構）
西野 邦彦（大阪大学）

Understanding Biological Phenomena through the Molecular Physiology of Membrane Proteins

Conveners: Mikio Tanabe (KEK/High Energy Accelerator Research Organization)
Kunihiko Nishino (Osaka University)

細菌膜は物質の選択的透過、エネルギー生産、細胞外情報の感知と応答、分泌や細胞壁の形成等において様々な重要な役割を果たしています。細菌膜上にはそれらの化学反応を仲介する膜タンパク質が存在し、各々に関与することで生命活動を可能にしています。ゲノム編集、シーケンシング、クライオ電顕、AI等の技術の発展に伴い、マクロな現象や生命の全体像が明らかにされる中で、それら膜タンパク質自身がどう生命全体に影響を及ぼし合うのかを知るためには、タンパク質そのものへの理解が益々重要になってきています。膜タンパク質の分子レベルからの研究は取り扱いの難しさから可溶性タンパク質と比較して遅れをとってきました。本シンポジウムでは膜を介して様々な反応を行う代表的なタンパク質を取り上げ、専門家の先生方にこれらの発現や機能の変化は薬剤耐性、病原因子の獲得、細胞接着、毒素の透過等にどのように変化を及ぼすかを再度考えたいと思います。

W5-1

Identification of bacterial drug-resistant cells by deep learning in TEM images

○西野 美都子（阪大・産研）

○Mitsuko Hayashi-Nishino (SANKEN, Osaka Univ.)

The emergence of bacteria that are resistant to antibiotics is common in areas where antibiotics are used widely. The current standard procedure for detecting drug resistance is based on bacterial growth under antibiotic treatments. Here we describe the morphological changes in enoxacin-resistant *Escherichia coli* cells and deep learning used to identify these resistant cells in transmission electron microscopy (TEM) images without using antibiotics. Our approach was to create patches from TEM images of enoxacin-sensitive and enoxacin-resistant *E. coli* strains, use a convolutional neural network for patch classification, and identify the strains from the classification results. The proposed method was highly accurate in classifying cells, achieving an accuracy rate of 0.94. Using a gradient-weighted class activation mapping to visualize the region of interest, enoxacin-resistant and enoxacin-sensitive cells were characterized by comparing differences in the envelope. Moreover, Pearson's correlation coefficients suggested that four genes, including lpp, the gene encoding the major outer membrane lipoprotein, were strongly associated with the image features of enoxacin-resistant cells.

W5-2

Implication of membrane protein properties in small RNA-mediated regulations

○森田 鉄兵^{1,2}（¹慶大・先端生命研, ²慶大・院・政メ）

○Tepei Morita^{1,2}（¹Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.）

Bacteria sense environmental cues and control their gene expression, enabling them to rapidly adjust their physiology to environmental changes. For bacteria pathogens, such regulations of gene expression contribute to the production of virulence factors at specific stages of an infection. In the signal transduction cascades starting with signal cues, membrane proteins play the sensory role. A major type of membrane protein sensor is histidine kinases, which transfer the signals to cognate response transcription regulators in two component systems. In addition, mechanisms incorporating the membrane proteins' nature have been reported particularly in small noncoding RNA (sRNA) mediated post-transcriptional regulation. This talk will start with a pioneering study on the sRNA regulation for controlling the membrane protein level, that is our previous findings that the membrane targeting property of *E. coli* glucose transporter is pivotal for the regulation of its mRNA by an sRNA SgrS. I also present about the recent studies on the roles of membrane localization of sRNAs/protein partners and target mRNAs. The discussion focuses on the nature of membrane protein from the aspect of RNA regulation, which will be useful for understanding how bacteria adjust gene expression pattern in response to environmental cues.

W5-3

高病原性と薬剤耐性を同時に引き起こす大腸菌の遺伝子変異

○垣内 力（岡山大・院医歯薬・分子生物学）

Gene mutations that enhance virulence and antibiotic resistance in *Escherichia coli*

○Chikara Kaito (Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.)

細菌は宿主動物への侵入時に様々な抗菌物質に曝露され、殺菌される。宿主の抗菌物質に対する耐性の獲得は、細菌が宿主体内で増殖し病原性を示す上で必須のプロセスであり、病原性細菌の進化において重要なイベントだと推察される。しかしながら、細菌が宿主の抗菌物質に耐性化し、高病原性化する分子メカニズムについては十分な理解が得られていない。これまでに我々は細菌が宿主に対して高病原性化する分子メカニズムを明らかにすることを目的として、カイク感染モデルを用いて大腸菌の高病原性変異株を探索してきた。その結果、複数種の遺伝子変異株がカイクに対する病原性上昇を示すことを明らかにした。LPS トランスポーターのアミノ酸置換変異株、ペリプラズムグルカン合成酵素の欠損株、細胞膜リン脂質の輸送タンパク質の欠損株である。いずれの遺伝子変異株もカイクの抗菌ペプチドであるセクロピンに耐性を示すだけでなく、バンコマイシンなど複数種の抗生物質に耐性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、宿主抗菌物質と抗生物質の共通の作用機序に対する耐性の獲得が、高病原性かつ薬剤耐性の細菌を生み出すことを示唆している。

W5-4

グラム陰性菌外膜のβバレル型膜タンパク質のアセンブリー機構

○塩田 拓也¹, 丸野 友希¹, 阿蒜 侑佳², 塩見 大輔², Edward Germany¹, Nakajohn Thewasano¹ (1宮大・フロンティア, 2立教大・理・生命科学)

Assembly Mechanisms of β-Barrel Membrane Proteins in Outer Membrane of Gram-negative Bacteria

○Takuya Shiota¹, Yuki Maruno¹, Yuka Abiru², Daisuke Shiomi², Edward Germany¹, Nakajohn Thewasano¹ (1Front. Sci. Res. Cent., Univ. of Miyazaki, 2Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ.)

大腸菌などのグラム陰性菌外膜にはβバレル型の膜貫通領域をもつ外膜タンパク質が存在する。これらは、物質透過、毒素分泌、薬剤耐性など、外界と関わる様々な生命現象に関与する。外膜タンパク質がそれぞれの機能を発揮するためには、構造形成を伴った膜挿入（アセンブリー）が必要である。多くの外膜タンパク質のアセンブリーは、Beta-Barrel Assembly Machinery (BAM) 複合体によって行われる。BAM 複合体は、真核生物を含むすべての生物に保存されている BamA と、すべてのグラム陰性菌に保存されている BamD の2つのサブユニットが中心的な役割を担う。加えて大腸菌では、BamB, BamC, BamE の3つの補助因子が存在する。輸送される外膜タンパク質（基質）の最もC末端側のβストランドには、「βシグナル」と呼ばれる特徴的な配列が存在する。近年、BAM 複合体の分子機構について積極的な研究が進められている。我々は、BAM 複合体に親和性をもつ基質の領域を探索し、「内部シグナル」を発見した。内部シグナルは、βシグナルとともに BamD によって認識され、βバレルの構造形成が促進される。また、我々が開発した *in vitro* アセンブリー再構築実験により、BamE は BamA と BamD の連携を高めること、また、BamB は16本以上のβストランドからなる基質のアセンブリーに重要であることを突き止めた。さらに、我々の解析から、BamC は細胞壁合成が阻害された生育条件でのアセンブリーに必須であることが分かっている。すなわち、すべてのサブユニットの重要な役割が連携しアセンブリーが実現している。

W5-5

Analysis of type IX secretion system in periodontal bacteria

○内藤 真理子, 富永 孝志, 伊藤 李香, 雪竹 英治, 庄子 幹郎, 中山 浩次 (長崎大・院・医歯薬・口腔病原微生物学)

○Mariko Naito, Takashi Tominaga, Momoko Ito, Hideharu Yukitake, Mikio Shoji, Koji Nakayama (Dept. Microbiol. Oral Infect., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sci.)

Type IX secretion system (T9SS) was discovered in the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and distributed in the Bacteroidota phylum, including the periodontal pathogens *Tannerella forsythia* and *Prevotella intermedia*. Our mutant analysis indicated that T9SS is essential for their biological characteristics, colonial pigmentation, hemagglutination, and biofilm formation. It translocated several potent virulence factors across the outer membrane, like gingipain proteases and adhesins. Elucidating the function and structure of the T9SS is important for understanding the pathogenesis of periodontal pathogen and periodontal disease. *P. gingivalis* T9SS comprises at least 20 proteins (Por proteins). A two-component regulatory system, PorY-PorX, regulates the gene expression of some of the proteins. The T9SS core complex forms a large ring-shaped complex. There are still Por molecules whose functions are unknown. We investigated such outer membrane molecules. It was clarified that the peptidoglycan binding motif of one protein is essential for T9SS activity. Another Por protein presumably activates the signaling cascade by binding to PorY at the periplasm. Together, these findings might provide important insights regarding the pathogenesis of periodontal pathogens.

W5-6

Novel insights into the interplay between botulinum toxin and gut mucous membrane

○藤永 由佳子 (金沢大・医・細菌学)

○Yukako Fujinaga (Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

Botulinum neurotoxin (BoNT) causes botulism, a severe neurological disease characterized by flaccid paralysis. Food-borne botulism is the most common forms of human botulism; result from the absorption of botulinum neurotoxin (BoNT) from the digestive tract into the circulation. BoNT is a large protein toxin (approximately 150 kDa), but it is able to pass through the epithelial barrier in the digestive tract. Recent cellular and molecular biology studies have begun to unravel the mechanisms by which this large protein toxin crosses the intestinal epithelial barrier. This talk will provide our new finding on the interaction of the BoNT complex with intestinal mucus layer which dictates the entry route of the toxin into the body.

選抜ワークショップ3：遺伝・ゲノミクス・バイオテクノロジー/病原性

コンピーナー：桑原 知巳（香川大学）
三宅 仁美（大分大学）

Selected from general presentations 3: Genetics / Genomics / Biotechnology/ Ecology

Conveners: Tomomi Kuwahara (Kagawa University)
Hitomi Mimuro (Oita University)

W6-2/P2-077

Population genomics of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*

○高橋 弘喜¹, Xiaohui He¹, 楠屋 陽子², 萩原 大祐^{1,3}, 豊留 孝仁^{1,4}, 新居 鉄平¹, Cai Bian⁵, 永山 聖樹¹, 柴田 紗帆¹, 渡邊 哲¹ (1千葉大・真菌,²NITE, NBRC, ³筑波大・生命環境, ⁴帯畜大・獣医, ⁵BGI)

○Hiroki Takahashi¹, Xiaohui He¹, Yoko Kusuya², Daisuke Hagiwara^{1,3}, Takahito Toyotome^{1,4}, Teppei Arai¹, Cai Bian⁵, Masaki Nagayama¹, Saho Shibata¹, Akira Watanabe¹ (1Med. Mycol. Res. Cent., Chiba Univ., ²NBRC, NITE, ³Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁴Dept. Vet. Med., Obihiro Univ. A.V.M., ⁵BGI)

Aspergillus fumigatus is a pathogenic fungus with a global distribution. Although azole-resistant TR-mutants are widely distributed, only a few TR-mutants have been isolated in Japan. The emergence of azole-resistant *A. fumigatus* (ARAF) other than the TR-mutants is a problem in Japan. Additionally, the genetic diversity of *A. fumigatus* strains in Japan remains relatively unknown. In this study, we analyzed the genome sequences of 171 strains from Japan as well as the antifungal susceptibility of these strains. We found that 22 strains were highly tolerant to itraconazole. Next, we conducted a population analysis of 876 strains by combining the available genomic data for strains isolated worldwide, which were grouped in six clusters. We observed the geographic distributions of clusters such as Cluster 2 where the strains from Japan were over-represented. Finally, using 628 strains from Clusters 1, 2, and 4, the genomic loci associated with azole resistance were detected on the basis of a genome-wide association study. Thus, we revealed the complexity of the genomic mechanism underlying the emergence of ARAF strains other than the TR-mutants as well as the genomic diversity of *A. fumigatus* in Japan.

W6-1/P2-088

リードスルー転写がつなぐ正のフィードバックループによる腸炎ビブリオ病原性遺伝子の発現制御機構

○石井 英治^{1,2}, Dhira Saraswati Anggramukti¹, Andre Pratama¹, Mohamad Al Kadi³, 飯田 哲也^{1,2}, 児玉 年央⁴, 松田 重輝^{1,2} (1阪大・微研・細菌感染, ²阪大・感染症総合教育研究拠点, ³阪大・免フロ・ヒト免疫, ⁴長崎大・熱研・細菌学)

The regulatory circuit for pathogenicity by read-through transcription in *Vibrio parahaemolyticus*

○Eiji Ishii^{1,2}, Dhira Saraswati Anggramukti¹, Andre Pratama¹, Mohamad Al Kadi³, Tetsuya Iida^{1,2}, Toshio Kodama⁴, Shigeaki Matsuda^{1,2} (1Dept. Bac. Infect., RIMD, Osaka Univ., ²Cent. for Infect. Dis. Edu. Res., Osaka Univ., ³Hum. Immunol., IFREC, Osaka Univ., ⁴Dept. Bac., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

主要な食中毒菌である腸炎ビブリオは、腸管での病原性発揮に病原遺伝子アイランド (Vp-PAI) にコードされている 3 型分泌装置 2 (T3SS2) を要する。T3SS2 遺伝子群を含む Vp-PAI の遺伝子発現は、同じく Vp-PAI 内にコードされている転写因子 VtrB に依存しており、vtrB 遺伝子の発現は低食塩や胆汁酸といった刺激に反応して別の転写因子 VtrA と ToxR が vtrB 遺伝子のプロモーター領域に結合することで誘導される。本研究ではこの vtrB 遺伝子の転写が、細菌の転写因子にしばしばみられる正のフィードバック制御機構を持つことを明らかにした。しかしながらその活性化様式は一般的な自己プロモーターの活性化によるものではなく、vtrB 遺伝子から約 7 kbp 上流の vpa1356 遺伝子のプロモーター活性に依存していた。vtrB 遺伝子の上流域は vpa1356-49 の 8 つの遺伝子からなるオペロンで構成されており、VtrB 依存的に発現誘導される。VtrB によって活性化された上流からの転写が vtrB 遺伝子にリードインしてフィードバックループを形成するためには、オペロン最下流の vpa1349 遺伝子が有するターミネーターを超える必要がある。実際、このターミネーターは転写終結能を有していたが一部の転写はこのターミネーターをリードスルーし vtrB 遺伝子に到達していた。この位置に強力なターミネーターを導入しフィードバックループを止めた変異株では、VtrB 制御下の T3SS2 遺伝子の発現が減少し T3SS2 依存的な病原性も減弱した。本研究は VtrB の正のフィードバック制御が T3SS2 遺伝子群の効率的な発現に重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、細菌の転写因子における遺伝子発現の自己活性化の新たなメカニズムを提示するものである。

W6-3/P2-196

Novel Bacterial Production System: Achieving Endotoxin-Free Recombinant Bioactive Proteins

○鴨志田 剛^{1,2}, 山口 大貴², 山田 倫暉², 竹本 訓彦³, 八尋 錦之助², 森田 雄二¹ (1明治薬大・感染制御, ²京都薬大・微生物, ³国立国際医療研究センター)

○Go Kamoshida^{1,2}, Daiki Yamaguchi², Noriteru Yamada², Norihiko Takemoto³, Kinnoyuki Yahiro², Yuji Morita¹ (1Dept. Infect. Cont. Sci. Meiji Pharm. Univ., ²Lab. Microbiol. and Infect. Cont. Kyoto Pharm. Univ., ³Pathogenic Microbe Lab., Dept. Infect. Dis., NCGM)

Bacterial recombinant protein expression systems are essential tools in modern science and biopharmaceutical production. Endotoxins, also known as lipopolysaccharides (LPS), are potent immunostimulatory molecules that are of critical concern in bacterial expression systems. The Gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* exhibits an interesting and unique phenotype characterized by the complete loss of LPS. Herein, we innovated a novel system for producing recombinant proteins that are completely devoid of endotoxin contamination, using LPS-deficient *A. baumannii*. We successfully purified endotoxin-free functional GFP, which reduced endotoxin contamination by about three orders of magnitude. Additionally, we enabled the extracellular production of small-molecule antibodies, and a multivalent variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody (VHH) that specifically binds to the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was purified from the culture supernatant. A virus neutralization assay demonstrated the functionality of the purified antibody in suppressing viral infections. Our established novel recombinant protein expression system represents the first of completely endotoxin-free platform compared to other bacterial expression systems, and is expected to be applied in various fields, including clinical practice, in the future.

W6-4/P2-087

タンパク質合成を保証する「タンパク質」の解析

○茶谷 悠平¹, 上村 英里², 田口 英樹² (1岡山大学・学術研究院, 2東工大・研究院)

The ABCF proteins in *Escherichia coli* alleviate "hard-to-translate" amino acid sequences

○Yuhei Chadani¹, Eri Uemura², Hideki Taguchi² (1Fac. Env., Life., Nat. Sci., and Tech., Okayama Univ., 2IIR, Tokyo Inst. of Tech.)

生物の保有する遺伝情報は DNA から mRNA へと転写されたのち、細胞内装置リボソームによってタンパク質へと翻訳される。多種多様な配列のタンパク質を合成するにあたって、リボソームには非常に高い万能性が求められる。しかしリボソームにも得手不得手があり、たとえば連続したプロリン残基間の連結反応は著しく効率が低く、しばしば翻訳伸長が停滞してしまう。また我々のこれまでの解析から、負電荷アミノ酸を連続して翻訳した場合に確率的にリボソームが不安定化し、翻訳を途中で異常終了させてしまうことも明らかとなっている。このように合成されるタンパク質のアミノ酸配列自身に、合成を破綻させる様々なリスクが内包されることが明らかとなりつつある。では生物はそうしたリスクにどのように対処しているのでしょうか？上述したプロリン連続配列には翻訳伸長因子 EF-P が作用し、翻訳の停滞を解消してタンパク質合成を保証する機構が備わっている。EF-P のような翻訳伸長因子により、生物はアミノ酸配列による合成上の制約を取り払い、様々なタンパク質機能を獲得してきたものと考えられる。我々は、グラム陽性菌の薬剤耐性化に寄与することが報告されていた翻訳因子 ABCF タンパク質が、アミノ酸配列そのものに起因する様々な翻訳異常をも解消することを新規に見出した。生化学的、遺伝学的解析から得られた結果について報告するとともに、ABCF タンパク質群の新たな生理機能について議論したい。

W6-5/P2-093

ファージの KO ライブラリーを用いた攻撃システムの探索

○小島 新二郎¹, Aa Haeruman Azam¹, 近藤 恒平², 千原 康太郎¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈¹, 中村 暢宏^{1,3}, 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹, 氣 恒太郎¹ (1国立感染症研・治ワク, 2国立感染症研・薬剤耐性研究センター, 3酪農学園大・獣医・獣医生化学)

Systemic discovery of phage genes that inactivate bacterial immune systems

○Shinjiro Ojima¹, Aa Haeruman Azam¹, Kohei Kondo², Kotaro Chihara¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita¹, Tomohiro Nakamura^{1,3}, Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹, Kotaro Kiga¹ (1Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2AMR Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., 3Lab. Vet. Biochem. Dept. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ.)

バクテリオファージ (ファージ) は細菌を宿主として感染し殺菌するウイルスである。近年、ファージの感染メカニズムの解析が盛んに行われ、細菌側の防衛機構について明らかになってきた。しかし、ファージ側の攻撃的機構についてはいまだに明らかになっていない。ファージの攻撃的遺伝子を高効率に探索する方法が存在しないからである。本研究では、ファージの遺伝子欠損ライブラリーを利用することで、多数の攻撃的遺伝子を発見することに成功した。105 個の遺伝子を保有するファージから遺伝子一つずつ欠損させていき、最終的に 72 種類の欠損ファージライブラリーの構築に成功した。欠損できなかった遺伝子は、主にファージの構造タンパク質をコードする遺伝子であった。つづいて、防御システム保有菌株に対して、本ファージ遺伝子欠損株ライブラリーの感染性を調べた。その結果、33 種類の細菌由来防御システムに対して感染性が変化した遺伝子欠損ファージが 18 株検出された。ここで同定された 8 種類のファージ遺伝子が、実際に細菌由来防御機構を無力化することを実験的に確認した。我々は、これらの遺伝子をファージ由来攻撃システムと呼ぶことにした。本研究により、ファージには多くの攻撃システムがコードされていることが明らかになった。防御システムの攻略はファージ療法の課題でもあり、本研究成果は今後ファージ療法の更なる進展に寄与することが期待される。

W6-6/P2-127

ブドウ球菌エンテロトキシン A 産生における内在性制御因子とプロファージの協調

○佐藤 祐介¹, 久恒 順三², Aziz Fatkhanuddin³, 達川 伸行³, 中川 (柴田) 真里⁴, 小野 久弥⁵, 内藤 郁慶⁴, 重茂 克彦⁴, 菅井 基行² (1麻布大・獣・感染免疫, 2感染研・薬剤耐性研究センター, 3広島大・院・細菌学, 4岩手大・獣・食品安全, 5北里大・獣・人獣共通)

Coordination of prophage and global regulator lead to high SEA production

○Yusuke Sato¹, Junzo Hisatsune², Aziz Fatkhanuddin³, Nobuyuki Tatsukawa³, Mari Nakagawa-Shibata⁴, K. Hisaya Ono⁵, Ikunori Naito⁴, Katsuhiko Omoe⁴, Motoyuki Sugai² (1Lab. Infect. Cont. and Immun., Sch. Vet. Med. Azabu Univ., 2Antimicro. Resist. Res. Center, NIID, 3Bacteriol., Hiroshima Grad. Univ., 4Lab. Food Safety, Sch. Vet. Med. Iwate Univ., 5Lab. Zoonosis, Sch. Vet. Med. Kitasato Univ.)

【背景】ブドウ球菌食中毒は、ブドウ球菌が食品中で Staphylococcal enterotoxin (SE) を産生することが原因である。SE には 20 以上の型があり、その中でも SEA は食中毒事例から高頻度で検出されるため重要視されている。この要因として SEA 発現制御が遺伝子の存在するプロファージに影響されることが示唆されているが、その全容は不明である。そこで本研究では SEA 高産生系統 (CC81 subtype-1) の解析を行い、その詳細な制御機構の解明を行った。【方法】SEA 産生量比較のため、CC81 subtype-1 および同一の SEA 高産生型プロファージが溶原化している MW2 株を培地および加工肉で培養し、ELISA で定量した。これらの株は全ゲノム配列の比較を行った。遺伝子発現は RT-qPCR、プロテイン A (Spa) 発現はヒト IgG を用いた WB でそれぞれ行なった。リコンビナント SarS および SEA プロモーター配列を用いて、ゲルシフトを行なった。【結果・考察】まず、CC81 subtype-1 と MW2 株のプロファージの影響を検討した。SOS 応答を増強もしくは減弱させたところ、同一のプロファージにも関わらず両者の SEA 産生に差が認められ、コアゲノム側の要因が示唆された。ゲノム比較では、CC81 subtype-1 の 1 株で内在性制御因子 SarS のナンセンス変異が認められ、これを MW2 型に戻すことで SEA 産生が低下した。他の CC81 subtype-1 株では SarS および SarS の支配下にある Spa の発現低下が認められた。さらに SarS が SEA プロモーターに直接結合した。CC81 subtype-1 系統は高産生型ファージ溶原化と SarS の機能不全を伴うことで SEA 高産生を示すことが明らかになった。

W6-7/P2-115Exploring genes necessary for *Bordetella bronchiseptica* survival in *Acanthamoeba castellanii*

○ヌグラハ デンディクリスナ¹, 馬 幸延¹, 山口 博之², 堀口 安彦^{1,3} (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 Nugraha¹, Xingyan Ma¹, Hiroyuki Yamaguchi², Yasuhiko Horiguchi^{1,3} (1Dept. Mol. Bact. RIMD, Osaka Univ., 2Fac. Health Sci. Hokkaido Univ., 3CiDER, Osaka Univ.)

The respiratory pathogenic bacterium, *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*), can persistently survive in terrestrial and aquatic environments, serving as a potential source of infection. Given the possible encounters of *Bb* with environmental protists, we investigated the mode of bacterial interaction with a representative environmental amoeba, *Acanthamoeba castellanii* (*Ac*), and demonstrated that two Bvg⁺ phase-specific virulence factors, filamentous hemagglutinin and fimbriae, were targeted by *Ac* predation. The expression of these virulence factors is downregulated in the Bvg⁻ phase, emphasizing the vital role of the Bvg⁻ phase for survival within *Ac*. Although it is presumed that Bvg⁻ phase-related genes are also involved in *Bb-Ac* interaction, the details of such factors remain unknown. In this study, we attempted to search these factors by employing high-throughput transposon sequencing (Tn-seq) and identified six genes specifically expressed in the Bvg⁻ phase. Upon co-inoculation with the wild-type strain, mutant strains lacking each of the identified genes were eliminated by *Ac* predation. Microscopy analyses of co-infection assays indicated that *Bb* wild-type, but not the mutants, was frequently found within the contractile vacuole (CV). Our results suggest that these six genes may play a beneficial role in bacterial survival from *Ac* predation.

W6-8/P2-116

ネズミチフス菌による細胞内侵入の時空間的顕微解析

○久保田 寛頭¹, 下澤 東吾², 小林 甲斐¹, 水戸部 森歌¹, 鈴木 康規³, 鈴木 淳¹, 貞升 健志¹ (¹都健安研・微生物部, ²東大・理, ³北里大・獣医・獣医衛生学)

Spatiotemporal microscopic analysis of the *Salmonella* Typhimurium invasion

○Hiroaki Kubota¹, Togo Shimozawa², Kai Kobayashi¹, Morika Mitobe¹, Yasunori Suzuki³, Jun Suzuki¹, Kenji Sadamasu¹ (¹Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, ²Sch. Sci., The Univ. Tokyo, ³Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Salmonella Typhimurium の上皮細胞内侵入には細胞膜表面への吸着、細胞内へのエフェクターの注入、アクチン細胞骨格の再編成の誘発による細胞膜の変形 (Membrane Ruffling) といった一連の初期過程が伴う。本性質は古くから研究がなされてきた一方で時空間的な理解が不十分であり、細胞膜変形については顕微鏡を利用した平面的な観察に留まっている。本研究では *S. Typhimurium* の侵入がどのような時系列で進むのかを探るために、その動態を三次元的に把握することを試みた。まず、MDCK 細胞に蛍光ナノボディを導入して重合型アクチンを可視化するとともに、光ピンセットを用いて *S. Typhimurium* 一個体をプラスチックビーズに結合し、細胞膜表面に移動して吸着させた。すると、蛍光可視化したアクチンを通じて観察された Membrane Ruffle の広がり最大となるタイミングでプラスチックビーズが一気に沈み込み、この時点で *S. Typhimurium* が細胞内へと侵入することが明らかとなった。また、Membrane Ruffle の最大サイズはイベント毎に差があるものの、形成開始から最大となるまでの時間は共通して約 100 秒程度であった。*S. Typhimurium* には Membrane Ruffling を介した協同的病原性の存在が知られているが、本実験結果から、最初の個体の侵入は別の個体に 100 秒程度の吸着する時間的猶予を与え、Membrane Ruffle が閉じることでそれらをまとめて細胞内に取り込むというメカニズムが考えられた。

W7

多角的なアプローチから捉える細菌の薬剤耐性機構と生存戦略

コンピーナー：尾花 望 (筑波大学)
高田 啓 (京都産業大学)

Drug Resistance Mechanisms and Survival Strategies of bacteria from Multiple Approaches

Conveners: Nozomu Obana (University of Tsukuba)
Hiraku Takada (Kyoto Sangyo University)

薬剤耐性菌の出現と蔓延は大きな社会問題の一つである。このような状況で、抗生物質の詳細な作用機構の理解と、抗生物質や多様な環境から如何にしてバクテリアは生き残るのか、その生存戦略の理解が急務である。また、環境中の細菌が進化の過程で獲得した抗生物質耐性機構を俯瞰し、その発現制御機構・作用機序の多様性に関する研究を進めることは、約 30 億年前から微生物が脈々と繰り広げてきた競争・相互作用の結果を紐解くアプローチであり、臨床のみならず、基礎的な細菌学研究においても重要なトピックである。本ワークショップでは若手研究者が中心となり、遺伝学的・分子生物学的手法に加え、メタゲノム解析・Cryo-EM・シングルセル解析・微生物電気化学など革新的な技術を取り入れ、多角的なアプローチによって多様な抗生物質耐性機構の探索・解明に取り組んでいる現状を報告し、これら研究の将来展望を議論することを目的とする。

共催：科学技術振興機構 (JST) ACT-X 「環境とバイオテクノロジー」領域
Co-sponsorship: JST-ACT-X

W7-1

Genome-encoded ABCF factors implicated in pathogenic Clostridial intrinsic antibiotic resistance

○尾花 望 (筑波大・医)

○Nozomu Obana (Inst. Med., 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 an ARE-ABCF resistance factor (*cplR*: clostridial pleuromutilin lincosamide resistance) is encoded in genomes of a notorious human pathogen *Clostridioides difficile*, a causative agent of food poisoning *Clostridium perfringens*, and a gut commensal bacterium *Clostridium sporogenes*. The *cplR* genes contribute to the intrinsic resistance of these clostridia to lincomycin, clindamycin, and retapamulin. Given that clindamycin treatment is associated with CDI, *cplR*-mediated lincosamide resistance may be clinically important. Moreover, while the fully synthetic lincosamide, iboxamycin, defeats the resistance mediated by 23S rRNA methyltransferase gene, *erm*, the *cplR* synergize with *ermB* to provide high levels of iboxamycin resistance to *C. difficile*. Thus, the emergence and spread of ARE-ABCF genes in Clostridia are one of the risk factors for defeating next-generation lincosamide. Furthermore, antibiotic treatment induces the *cplR* gene expression, which depends on transcriptional attenuation and translational inhibition mediated by the 5' leader region. Finally, we discuss and introduce our recent attempt to overcome the emergence and colonization of this pathogenic bacteria.

W7-2

Mechanism analysis of multidrug-resistant factor, ARE-ABCF and 23s rRNA modification enzyme

○高田 啓 (富山県大・工・生工)

○Hiraku Takada (Dept. Biotech., Fac. Eng., Toyama Prefectural Univ.)

Protein synthesis in every cell is carried out by the ribosome, a molecular machine governed by specialised protein factors. Since protein synthesis is targeted by many clinically important antibiotic classes, bacteria employ numerous resistance mechanisms that protect the ribosome from antibiotic action. Two classes of antibiotic resistance determinants synergise to protect these functional sites: antibiotic resistance (ARE) ABCF ATPases that displace antibiotics that bind the ribosome and 23S rRNA methylases that modify the ribosomal RNA (rRNA) to thwart the productive binding of the antibiotic to its target. As expression of antibiotic resistance determinants can be associated with a significant fitness cost, bacterial often induce the expression of resistance genes only in the presence of the antibiotics. This kind of antibiotic-responsive inducible expression is commonly orchestrated through antibiotic-mediated ribosomal stalling on regulatory upstream open reading frame elements, resulting into mRNA structure remodelling that, in turn, allows production of the resistance determinant. In this talk, I am pleased to present my research using the model microorganism *Bacillus subtilis* to explore genetically and biochemically how bacteria develop antibiotic resistance

W7-3

公共メタゲノムデータから見る抗生物質耐性遺伝子の分布と多様性

○西村 陽介 (海洋研究開発機構)

Distribution and Diversity of Antibiotic Resistance Genes in Public Metagenome Big Data

○Yosuke Nishimura (JAMSTEC)

薬剤耐性菌は海水や土壌、河川といった環境中にも存在する。環境中に存在する抗生物質耐性遺伝子や、その運び手となるプラスミド等を含めた環境中の微生物の実態を理解することは、薬剤耐性菌の分布や多様性を把握し、さらなる拡大への対処法につながる。環境微生物の研究では、試料中の微生物 DNA の塩基配列を解読する「メタゲノム解析」が必要不可欠な手法として定着しており、世界中の様々な環境に由来するメタゲノムデータが公共データベースに爆発的な勢いで蓄積されている。発表者はバイオフィームを専門としており、メタゲノム配列解析技術を新しく開発するとともに、巨大な公共メタゲノムデータを環境横断的に収集し、統一された手法で再解析することによって、地球上の微生物を網羅的に理解するための情報解析を行ってきた。本発表では、大規模な配列情報に基づく遺伝子系統樹を解析基盤とすることで、抗生物質耐性遺伝子やその運び手となるプラスミドの多様性や環境中の分布を把握する取り組みとともに、抗生物質耐性遺伝子の進化についての話題を提供したい。

W7-4

シングルセルゲノム解析を用いた河川環境における薬剤耐性遺伝子の伝播解析

○西川 洋平^{1,2} (¹産総研・早大 生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ, ²早稲田大学 ナノ・ライフ創研)

Single-cell genome sequencing for analyzing the distribution of antibiotic resistance genes

○Yohei Nishikawa^{1,2} (¹AIST-Waseda CBB-D-OIL, ²Res. Org. Nano & Life Innov. Waseda Univ.)

環境中に発生した薬剤耐性遺伝子は、プラスミドなどの可動遺伝子を介して細菌間を伝播する。これらの薬剤耐性遺伝子の動態を詳細に解析するためには、それぞれの細菌が保有する遺伝子の情報を個別に解析することのできる技術が重要である。我々の研究では、ピコリットル容量の微小液滴（ドロップレット）を活用した1細胞ゲノム解析技術を応用することにより、薬剤耐性菌が発生しやすいホットスポットの一つである河川環境における薬剤耐性遺伝子の分布を明らかにすることを試みた。代表的な都市河川の一つである多摩川を対象として、複数地点・期間にわたって河川水を採取し、ゲノム解析を実施した。この結果、26門、329属にわたる合計3345個の1細胞ゲノム(SAG: Single amplified genome)を獲得した。また、各SAGに対してデータベースを参照することにより、全体の約9%にあたる306個のSAGから薬剤耐性遺伝子が検出された。さらに、薬剤耐性遺伝子を保有するSAGが検出された地点・季節を評価することにより、河川水中における薬剤耐性遺伝子の分布や伝播の様式を推定できることを明らかにした。我々はさらに、可動遺伝子の一つであるバクテリオファージに着目し、ドロップレットを用いたファージ1粒子レベルでのゲノム情報(vSAG: viral SAG)の獲得技術を開発した。また、これらの配列を解析することにより、水圏環境中においてファージによって運ばれる遺伝子や、ファージの宿主適応戦略に関わる遺伝子の同定が可能であることを明らかにした。本発表では、「多角的なアプローチ」の一例として、ドロップレットを用いた1細胞・1粒子レベルでのゲノム解析技術を紹介する。

W7-5

Electrical conduction as a bacterial energy conservation strategy linked with antibiotic resistance

○徳納 吉秀^{1,2}, 木暮 優芽³, 頓宮 弘将³, 豊福 雅典^{1,4}, 野村 暢彦^{1,4} (¹筑波大・生命環境, ²物材研, ³筑波大・生命地球, ⁴筑波大・微生物サステイナビリティ)

○Yoshihide Tokunou^{1,2}, Yugo Kogure³, Hiromasa Tongu³, Masanori Toyofuku^{1,4}, Nobuhiko Nomura^{1,4} (¹Dept. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²NIMS, ³Deg. Prog. Life Earth Sci., Univ. Tsukuba, ⁴Microbiol. Res. Cent. Sus., Univ. Tsukuba)

It is imperative to develop a methodology to control the metabolisms of multicellular assemblages (biofilms), as pathogenic biofilms create metabolic heterogeneity that leads to high antibiotic resistance. Inspired by the link between bacterial metabolisms and intracellular electron transport chains, we, hereby, examined how the control of electron flow inside biofilms impacts the spatial distribution of metabolic activity. We developed a technique to visualize three-dimensional images of thick bacterial assemblages based on confocal fluorescence microscopy and mapped the NADH/NAD⁺ ratio in an aerobic *Shewanella oneidensis* MR-1 colony. We controlled the biofilm electron transfer by deletion of genes for c-type cytochrome complexes on the outer membrane of MR-1. When the electrical conductivity was low, MR-1 showed a clear increase of NADH/NAD⁺ at the bottom of the colony due to oxygen depletion. In contrast, when increasing the electrical conductivity, the NADH/NAD⁺ ratio was spatially almost constant in the colony regardless of oxygen depletion, indicating that electrical conduction conserves energy in the oxygen-depleted zone in the colony. In the presentation, we will discuss the link between electrical conduction and antibiotic resistance in biofilms.

選抜ワークショップ 4：生体防御/病原性

コンピーナー：阿戸 学（国立感染症研究所）
八尋 錦之助（京都薬科大学）

Selected from general presentations 4: Host defense / Pathogenicity

Conveners: Manabu Ato (National Institute of Infectious Diseases)
Kinnosuke Yahiro (Kyoto Pharmaceutical University)

W8-1/P2-118

A role of *Aeromonas hydrophila* RtxA during necrotizing soft tissue infection

○山崎 浩平, 白石 圭, 滝沢 冴子, 柏本 孝茂（北里大・獣医・獣医公衆衛生）

○Kohei Yamazaki, Kei Shiraishi, Saeko Takizawa, Takashige Kashimoto (Vet. Public Health, Kitasato Univ.)

Aeromonas hydrophila is a pathogenic bacterium that causes necrotic soft tissue scarring. However, the pathogenic mechanism of this infection is not clear. RTX is a large toxin that is conserved in a variety of bacteria. It has been reported that *A. hydrophila* repeat in toxin A (RtxA) is cytotoxic, but pathogenicity has not been thoroughly analyzed. We aimed to determine whether it is involved in the proliferation within its host. To investigate this, we created a *rtxA* knockout strain, Δ *rtxA*. Subcutaneous inoculation of the parent strain (WT) or Δ *rtxA* into mice revealed that all mice inoculated with WT died, while some inoculated with Δ *rtxA* survived. To assess the effect of RtxA on the proliferation of *A. hydrophila*, we measured colony-forming units (CFUs) in the soft tissue and observed by In Vivo Imaging System (IVIS). The CFUs of WT were higher than those of Δ *rtxA* at 12 hours post-infection, indicating a defect in the proliferation of Δ *rtxA* in soft tissues. IVIS further demonstrated the impaired proliferation of Δ *rtxA* in soft tissues. These results indicate that RtxA is essential for the proliferation of *A. hydrophila* in soft tissue. Additionally, we observed that the range of soft tissue necrosis caused by Δ *rtxA* infection was narrower than that caused by WT infection. So, we conclude that RtxA is a crucial pathogenic factor of *A. hydrophila*.

W8-2/P2-119

Rop in enterohemorrhagic *Escherichia coli* enhances the general stress response via small RNAs

○清水 健¹, 鈴木 真¹, 濱端 崇²（¹千葉大・医・病原細菌, ²国立国際医療研究センター研究所・細菌感染）

○Takeshi Shimizu¹, Shin Suzuki¹, Takashi Hamabata²（¹Dept. Mol. Infectiol., Grad. Sch. Med., Chiba Univ., ²Bacterial Infection, Reserach Inst., NCGHM）

Rop encoded on pOSAK1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) enhances the general stress response such as increased NO resistance, although the mechanism of action remains unclear. Since the Rop is known as an RNA-binding protein, it is possible that small RNAs were involved in this action. Therefore, we confirmed the enhancement of NO resistance by Rop using small RNA-deficient EHECs. The results showed that the enhancements of effect by Rop were significantly reduced in 6 small RNA-deficient EHECs (DsrA, 6S RNA, RyhB, AcrZ, CyaR, and RprA). Among these, the small RNAs of DsrA, AcrZ, and RprA are known to be directly involved in the translational regulation of *rpoS* expression corresponding to the general stress response, suggesting that Rop regulates *rpoS* expression via small RNAs. Thus, using the 6 small RNA-deficient EHECs, we constructed 6 double mutant EHECs with an additional deletion of the 5'-upstream region required for *rpoS* translation regulation. As results, all double mutant EHECs recovered the enhancement of effect by Rop. Furthermore, Rop suppressed *rpoS* expression in the presence of NO stress. In summary, our results indicate that the Rop negatively regulates *rpoS* expression at the translation level via small RNA, thereby enhancing the general stress response in EHEC.

W8-3/P2-137

E3 ligase SIAH1 mediates Streptolysin O ubiquitination for xenophagy against Group A Streptococcus

○Min Wu, Xin Hu, 飯伏 純平, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 野澤 孝志, 中川 一路（京大・医・微生物）

○Min Wu, Xin Hu, Junpei Iibushi, Atsuko Nozawa, Kazunori Murase, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol, Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Upon pathogen invasion, host cells employ ubiquitination to label and initiate xenophagy, a selective autophagy process, to eliminate invading pathogens. However, the bacterial components targeted for ubiquitination and corresponding ubiquitin enzymes remain poorly understood. This study reveals the pivotal role of the E3 ligase SIAH1 in recognizing and ubiquitinating Streptolysin O (SLO), a toxin secreted by Group A Streptococcus (GAS), and promoting autophagosome formation and maturation. Since xenophagy against GAS is induced by SLO-mediated bacterial invasion into the cytosol, SLO itself was considered one of the ubiquitination targets. Super-resolution microscopy revealed colocalization of SLO and ubiquitin around intracellular bacteria. Ubiquitination assay and in situ proximity ligation assay (in situ PLA) confirmed its ubiquitination during GAS infection. We identified the PSVP motif in SLO as a candidate binding site for E3 ligase SIAH. Mutation of SLO decreased its ubiquitination and ubiquitin accumulation in bacteria. Furthermore, SIAH1 was recruited to intracellular GAS and colocalized with SLO. SIAH1 knockout diminished GAS ubiquitin-labeling, autophagosome formation, and increased GAS survival. This study highlights the crucial role of SIAH1-mediated ubiquitination of SLO in the xenophagy against GAS, offering potential avenues for therapeutic intervention.

W8-4/P2-141**Periodontitis vaccine using three different bacterial outer membrane vesicles in canine model**

○中尾 龍馬¹, 山口 雄大¹, 佐伯 潤², 安部 公博¹, 明田 幸宏¹, 中村 知世³, 西野 智彦³, 石原 和幸⁴, 大上 厚志⁵, 井上 智¹ (1)感染研・細菌1, (2)帝京大・アニマルサイエンス, (3)工科大・応生, (4)東歯大・衛生, (5)群大・バイオリソース)

○Ryoma Nakao¹, Takehiro Yamaguchi¹, Jun Saeki², Kimihiro Abe¹, Yukihiro Akeda¹, Tomoyo Nakamura³, Tomohiko Nishino³, Kazuyuki Ishihara⁴, Atsushi Jinno-Oue⁵, Satoshi Inoue¹ (1)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Dept. Ani. Sci., Teikyo Univ. Technol., (3)Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., (4)Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Coll., (5)Biores. Center, Gunma Univ.)

The aim of this study is to investigate whether bacterial outer membrane vesicle (OMV)-based periodontal vaccines induced humoral immune response in canines from a human vaccine development perspective. *c-Porphyrromonas gingivalis* (Pg) and *Treponema denticola* (Td), two major periodontal pathogens, were chosen as vaccine targets. Intranasal immunization with Pg OMVs and Td OMVs strongly elicited humoral immune responses, particularly when adjuvanted with a probiotic *Escherichia coli* derivative (EcNflhD)-derived OMVs. However, in beagles, intranasal immunization with the same Pg/Td/EcNflhD OMV vaccine insufficiently elicit humoral immune responses. Nevertheless, the subcutaneous booster with the same OMVs dramatically improved antibody responses in both systemic blood circulation and mucosal sites such as eyes, oral cavity, and upper and lower respiratory tracts. Metagenomic analysis revealed that the OMV vaccine changed the salivary microbial composition. In vitro Pg growth inhibition assay, serum samples from OMV-immunized beagles significantly inhibited growth of the gingipain-deficient strain but not the gingipain-expressing wild type strain. Taken together, our data offer the trivalent OMV vaccine strategy by IN-prime/SC-boost regimen, which could elicit robust mucosal immune responses, which may build sterilizing immunity in oral cavity.

W8-5/P2-146**Recombinant MDP1 with post-translational modifications enhances IFN-gamma production by blood cells**

○尾関 百合子¹, 西山 晃史¹, 立石 善隆¹, 前山 順一², 伊保 澄子³, 山本 十糸子², 林 大介⁴, 山本 三郎^{2,4}, Amina Kaboso Shaban¹, 松本 壮吉¹ (1)新潟大・医・細菌学, (2)感染研・村山, (3)パスツール研, (4)BCG研)

○Yuriko Ozeki¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Jun-ichi Maeyama², Sumiko Iho³, Toshiko Yamamoto², Daisuke Hayashi⁴, Saburo Yamamoto^{2,4}, Amina Kaboso Shaban¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (1)Dept. Bact. Sch. Med., Niigata Univ., (2)NIID, (3)Pasteur Center, (4)Japan BCG)

While BCG is an excellent vaccine, its drawback lies in the lack of sustained efficacy. We believe that booster vaccines are necessary to revive its effectiveness. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1, namely Rv2986c, hupB or HU) is a major Mycobacterium tuberculosis protein that induces vaccine-efficacy by co-administration with CpG DNA. To produce MDP1 for booster-vaccine use, we have created recombinant MDP1 produced in both *Escherichia coli* (eMDP1) and *Mycobacterium smegmatis* (mMDP1), an avirulent rapid-growing mycobacteria. We tested their immunogenicity by checking interferon (IFN)-gamma production by stimulated peripheral blood cells derived from BCG-vaccinated individuals. Similar to native *M. tuberculosis* MDP1, we observed that most lysin resides in the C-terminal half of mMDP1 are highly methylated. In contrast, eMDP1 had less post-translational modifications and IFN-gamma stimulation. mMDP1 stimulated the highest amount of IFN-gamma production among the examined native *M. tuberculosis* proteins including immunodominant MPT32 and Antigen 85 complex. MDP1-mediated IFN-gamma production was more strongly enhanced when combined with a new type of CpG DNA G9.1 than any other tested CpG DNAs. Taken together, these results suggest that the combination of mMDP1 and G9.1 possess high potential use for human booster vaccine against tuberculosis.

W8-6/P2-149**Metabolites from microbiota provide colonization resistance against *Candida albicans* in the gut**

○後藤 義幸, Bonita McCuaig (千葉大・真菌・感染免疫)

○Yoshiyuki Goto, Bonita McCuaig (Div. Mol. Immunol., MMRC., Chiba Univ.)

Candida albicans is an opportunistic fungus in the human gut. Recent reports have shown that *C. albicans* is associated with the development of invasive candidiasis. Although several groups have reported that commensal bacteria prevent the colonization of *C. albicans* in the gut, the molecular and cellular mechanisms are still largely unknown. Using a series of antibiotic-treated mice and NGS analysis, we found that Enterobacteriaceae have the potential to prevent *C. albicans* colonization. We further isolated Enterobacteriaceae and confirmed that these bacteria prevent *C. albicans* colonization using gnotobiotic mice. To identify bacteria-derived metabolites responsible for colonization resistance against *C. albicans*, we performed a metabolome analysis of feces from mice that allow or are resistant to *C. albicans* colonization. In addition, we found that the supernatant of the culture medium of isolated Enterobacteriaceae has the potential to kill *C. albicans*. After purification and GC-MS, LC-MS, and NMR analysis, we identified that indole derivatives had fungicide effects. Using CRISPR/Cas9-based genome editing, we created a bacterial strain that defects indole derivatives. In contrast to the wild-type strain, the strain failed to kill *C. albicans*. These results indicate that commensal bacteria produce indole derivatives for preventing *C. albicans* colonization in the gut.

W8-7/P2-150**様々なファージ因子を認識して活性化する抗ファージ防御システム Septu の多様性**

○千原 康太郎¹, 近藤 恒平², Aa Haeruman Azam¹, 小島 新二郎¹, 菅原 庸², 菅井 基行², 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹, 氣賀 恒太郎¹ (1)感染研・治療薬ワクチン開発研究センター, (2)感染研・薬剤耐性研究センター)

Diversity of Septu anti-phage defense system triggered by distinct phage components

○Kotaro Chihara¹, Kohei Kondo², Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Yo Sugawara², Motoyuki Sugai², Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹, Kotaro Kiga¹ (1)Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., (2)AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis.)

細菌はファージ感染を克服するために様々な抗ファージ防御システムを獲得している。制限修飾系や CRISPR-Cas システムはその代表例だが、近年の研究により、100 以上もの新たな抗ファージ防御システムが発見されている。一方で、これらの防御システムがファージ感染をどのように感知しているのかは未解明である。新規抗ファージ防御システムの 1 つである Septu はゲノムが解読された全細菌のうち約 4% に保存されたシステムであり、AAA ATPase ドメインを有する PtuA と HNH エンドヌクレアーゼドメインを有する PtuB から構成される。我々は、大腸菌臨床分離株から 15 個の Septu ホモログをクローニングし、そのファージ防御活性を評価したところ、様々な T 型ファージに対して非常に強力かつ多様な防御能を示すことが明らかになった。15 個の Septu ホモログの中でも幅広い防御能を示した Septu Ec^{B16} に着目して、Septu がどのようにファージ感染を感知しているのかを調査した。Septu Ec^{B16} に防御されないエスケープファージを獲得し、その全ゲノムを解読した結果、抗ファージ防御システム RexAB の阻害因子である RIIA や制限修飾系阻害因子である Ocr に変異が見つかった。さらに生化学的実験により、RIIA は Septu Ec^{B16} を構成する PtuA の突出領域に結合することで Septu Ec^{B16} を活性化することが明らかになった。PtuA の突出領域は 15 個のホモログの中で最も多様性のある構造領域であり、この多様性を持って異なる Septu ホモログが様々なファージ因子を認識して活性化する手段となっていると考えられる。以上のように、抗ファージ防御システムは感染を感知する領域に多様性を持たせることで、広範なファージに対応していると解釈される。

W8-8/P2-151

Transcription factor MafB regulates Mycobacterial infection in mice

○引地 遥香^{1,2}, 中村 創¹, 大森 志保¹, 瀬戸 真太郎¹, 土方 美奈子¹, 慶長 直人³ (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・院・医歯薬・新興感染症病態制御学, 3公益財団法人結核予防会結核研究所)

○Haruka Hikichi^{1,2}, Hajime Nakamura¹, Shiho Omori¹, Shintaro Seto¹, Minako Hijikata¹, Naoto Keicho³ (1Dept. Pathophysiology and Host Defense, RIT, JATA, 2Dept. Infection Research, Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sciences, 3The Research Inst. Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

MAFB, is a transcription factor that regulates macrophage differentiation. A genome-wide association study revealed that a single-nucleotide polymorphism in the neighborhood of *MAFB* is associated with early tuberculosis (TB) onset in Thai and Japanese populations. We have demonstrated that MAFB regulates interferon-related pathways in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-infected human macrophages (Hikichi H et al., Front Microbiol, 2022). These studies led to a hypothesis that *MAFB* is associated with TB susceptibility. To test this, we subjected macrophage-specific *MafB* conditional knockout (*MafB*-cKO) mice to aerosol infection with *Mtb*. *MafB*-cKO mice exhibited a higher bacterial burden and reduced survival. In the lungs of *MafB*-cKO mice, pathological examination demonstrated the presence of granulomas characterized by an indistinct boundary. Flow cytometry analysis revealed impaired recruitment of T cell and enhanced infiltration of Ly6G-positive neutrophil in *MafB*-cKO mouse lungs. Finally, we discuss the mRNA sequencing results of *Mtb*-infected mice lungs in the context of impaired immunity and higher susceptibility to *Mtb* infection. This study offers insights into the role of *MAFB* in TB progression, paving the way for the development of predictive biomarkers for TB onset, as well as novel anti-TB drugs targeting host factors.

W9

多様な宿主生物を用いた細菌研究の最前線

コンピーナー：清水 隆 (山口大学)
垣内 力 (岡山大学)

Frontiers in bacterial research using diverse host organisms

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

細菌と宿主生物の相互作用を理解するためには、感染実験が欠かせない。これまで感染実験には、マウス等のほ乳動物が主として用いられてきた。しかしながら、こうした動物実験では、動物福祉の観点から使用頭数の最小化が必須であり、多くの実験を試行錯誤することは困難である。また、細菌の自然環境における動態を理解するためには、自然界での自然宿主に近い感染モデルが必要である。しかしながら、そのようなモデル生物を準備することはこれまで困難であった。近年、このような倫理的問題やリソースの問題を低減するために様々な感染モデルが提唱されつつある。また、文部科学省が実施し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行っており、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、繊毛虫、カイコ、植物など様々な感染モデルを使用し、感染症の研究をおこなっている研究者がその最前線を紹介する

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

W9-1

野外繊毛虫を用いたレジオネラの新規病原因子の探索とその解析

○大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

Investigation and analysis of novel virulence factors of Legionella using wild ciliates

○Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci, Hokkaido Univ.)

レジオネラ (*Legionella pneumophila*) は水系環境に生息し、アメーバ等の原生生物を宿主として増殖しエアロゾル経路で肺炎を起こす。レジオネラは人から人には感染せず、原生生物の細胞内で増殖する通性細胞内寄生菌であるため、本菌がもつ病原因子の多くは野外環境の多様な原生生物と相互作用する過程で獲得したものだと考えられる。一方、過去のレジオネラ共培養実験は主にアメーバが用いられてきたため、他の原生生物とレジオネラの相互作用を調べることで未だ知られていないレジオネラの新規病原因子が発見できる可能性がある。そこで本研究では、当研究室が下水から分離した繊毛虫アンテグラウコーマ (*Anteglaucoma harbinensis*) とレジオネラ変異株の共培養実験を行ない、レジオネラがもつ新規病原因子の探索を行なった。この繊毛虫は他の繊毛虫と異なり、レジオネラと共培養すると48時間以内に死滅した。このレジオネラ感受性を利用し、繊毛虫とレジオネラ変異株 (トランスポゾン挿入変異株ライブラリ, n=787) を共培養して繊毛虫の生死を指標にレジオネラの病原因子候補を探索した。繊毛虫が生き残ったレジオネラ変異株 (n=56) の遺伝子を解析した結果、多くは既知の病原因子であるIV型分泌装置に変異があったが、病原性が未報告のプロテアーゼや仮想タンパク等に変異をもつ株が11株見つかった。以上より、野外繊毛虫とレジオネラの共培養実験を通してレジオネラの新規病原因子候補が発見できた。現在、候補株とヒト細胞の共培養を進めており、病原因子候補がヒトにも病原性があるかどうかを検討中である。

W9-2

野菜環境中での生育に関わる大腸菌遺伝子

○石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡山大・院医菌薬)

Escherichia coli genes responsible for growth in vegetable environments

○Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.)

大腸菌による食中毒は、温血動物から排出された菌によって汚染された食品を、生食することにより引き起こされることが多い。特に、腸管出血性大腸菌 O157 に汚染された野菜が原因となる食中毒が、世界的に頻繁に報告されている。したがって、野菜における定着や増殖に必要な大腸菌の遺伝子機能を理解することは公衆衛生的に重要であるが、これまでにほとんど研究対象とされてこなかった。そこで我々は、野菜環境での生育に関わる大腸菌遺伝子を網羅的に探索した。培地として、普遍的な野菜環境を再現するために、8種の野菜が混合された野菜ジュースを基にした「V8 培地」を使用した。その結果、V8 培地での生育が顕著に低下する株として、複数のシステイン生合成能欠損株が得られた。システイン生合成能欠損株の生育低下は、破碎したトマト、ニンジン、レタス、セロリでも見られ、これらの野菜はシステイン含量が比較的少なかった。これに対し、植物から分離されることの多い枯草菌や、植物病原細菌 *Pectobacterium carotovorum* は、大腸菌と同じシステイン合成酵素を欠損させても、V8 培地や野菜中での顕著な生育の低下は見られなかった。これらの細菌は細胞外プロテアーゼの分泌や、代替の経路によってシステインを獲得できると考えられた。以上のことから、大腸菌のシステイン生合成能は野菜環境での生育に不可欠な機能であることが示唆された。

W9-3

Phyllogen: a unique bacterial effector, utilizing host proteasome in a ubiquitin independent manner

○北沢 優悟¹, 岩瀬 望², 松本 旺樹², 鈴木 誠人², 笹野 百花², 前島 健作², 大島 研郎³, 難波 成任², 山次 康幸² (¹山口大院・創成科学, ²東大院・農, ³法政大・植医)

○Yugo Kitazawa¹, Nozomu Iwabuchi², Oki Matsumoto², Masato Suzuki², Momoka Sasano², Kensaku Maejima², Kenro Oshima³, Shigetou Namba², Yasuyuki Yamaji² (¹Grad Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., ²Grad. Sch. Agric. Life Sci., Tokyo Univ., ³Fac Biosci., Hosei Univ.)

Pathogenic bacteria secrete diverse effector proteins into host cells for regulating cell environment. Some effectors proteolyze target proteins via host ubiquitin-proteasome system, consisting of ubiquitination and following proteasomal degradation of ubiquitinated proteins. Such effectors mostly induces ubiquitination to target proteins. However, here, I present a ubiquitin-independent proteasomal utilization by an effector called phyllogen found in a plant pathogenic bacterial group. Phyllogen has a unique function that changes flowers into leaves by proteasomal degradation of proteins required for flower development (MADS-box transcription factor; MTF). Our co-immunoprecipitation assay showed that phyllogen interacts with MTF and RADIATION-SENSITIVE23 (RAD23) shuttle proteins, which deliver ubiquitinated proteins to the proteasome. The ternary interaction was detected not only in planta but also in vitro where ubiquitin is absent, indicating that phyllogen directly mediates interaction between MTF and RAD23. Phyllogen could induce degradation of a MTF mutant in which lysine, the canonical ubiquitin conjugating residue, were replaced to arginine. Phyllogen does not show structural similarity with ubiquitin, but it interacts with the ubiquitin-associated domain of RAD23. Our findings indicate that phyllogen acts as a mediator between MTF and RAD23 instead of ubiquitin.

W9-4

Silkworm models for Francisella infection

○清水 隆¹, 渡邊 健太¹, 宇田 晶彦², 度会 雅久¹ (¹山口大・獣・公衆衛生, ²感染研・獣医科学)

○Takashi Shimizu¹, Kenta Watanabe¹, Akihiko Uda², Masahisa Watarai¹ (¹Lab. Vet. Pub. Hlth., Jnt. Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ., ²Dept. Vet. Sci., NIID)

Francisella tularensis is a highly pathogenic intracellular bacterium that maintains a life cycle in wild animals and hematophagous arthropods. However, little is known about their behaviors in natural hosts. To understand the dynamics of *F. tularensis* in arthropods, we have developed a new infection models of *F. tularensis* using the silkworm (*Bombyx mori*). *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS strain strongly suppressed the immune system of silkworms and establishes a symbiotic relationship with the silkworms. Moreover, by continuously inducing of antimicrobial peptides over a long period of infection, resistance to pathogenic bacteria was conferred on the silkworms. On the other hand, *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) suppressed the immune system of silkworms, but proliferated inside the silkworms and killed them. Using this property, we screened *F. novicida* unable to grow in silkworms, and identified several genes important for pathogenicity to silkworm. These identified genes were also important for the pathogenicity in mammalian cells. These results suggest that silkworm-LVS strain model can be used as a symbiosis model and the silkworm-*F. novicida* model as a pathogenicity model.

W9-5

新規感染症治療薬の開発におけるカイコモデルの有用性

○浜本 洋 (山形大・医・感染症)

The utility of silkworm models in the development of novel infectious disease therapeutics

○Hiroshi Hamamoto (Dept. Infect. Dis., Yamagata Univ. Fac. Med.)

AMR 対策のために、画期的な作用機序に基づく新規治療薬の開発が必要とされている。従来は試験管内の増殖に必要な因子を標的とした化合物の探索が行われてきたが、近年では限界を迎えていると考えられている。実際、治療効果を示す新規クラスの抗菌薬の開発はわずかであり、既存品の改良による新規開発がほとんどである。大手製薬会社が抗菌薬の開発から撤退している中、ベンチャー企業やアカデミアにおける創薬にはコストが低く倫理的な問題がない、簡便な動物モデルが必要である。我々は、カイコ細菌感染モデルに着目し、定量的な抗菌薬の治療効果の評価系を確立した。そのために、カイコの基本的な体内動態や細菌の病原性の基本的な知見を集積し、マウスモデルとの比較により、その共通性をあきらかにし、医薬品探索モデルとしてのカイコの信頼性を確立してきた。様々な研究者がカイコを用いて、黄色ブドウ球菌をはじめとする細菌だけでなく、真菌や抗酸菌に至るまで、様々な菌種による感染モデルが確立されてきている。それらのモデルを用いて、我々が発見したライソシン E をはじめとする、複数の新規抗生物質が同定されている。本発表では、実に 20 年超にわたって研究されてきたカイコモデルの魅力と、これまでの成果及び利用法を紹介する。

W9-6

Evaluation of the virulence of live and killed *Streptococcus mutans* using a silkworm model

○野村 良太 (広島大・院・小児歯)

○Ryota Nomura (Dept. Pediatric Dentistry, Grad. Sch. Biomedical and Health Sciences, Hiroshima Univ.)

Streptococcus mutans, a major pathogen of dental caries, is also known as a causative agent of cardiovascular disease. A 120 kDa collagen-binding protein (Cnm) of *S. mutans* plays an important role in the pathogenicity of cardiovascular disease. Molecular biological techniques have detected live and dead bacteria in cardiovascular specimens, but the pathogenicity of dead bacteria remains unclear. Here, we analyzed the pathogenicity of live and killed *S. mutans*, focusing on their collagen-binding ability and the effects on silkworms. In live *S. mutans*, Cnm-positive *S. mutans* had high collagen-binding activity, whereas Cnm-negative *S. mutans* had no such activity. After treatment with killed Cnm-positive *S. mutans*, amoxicillin-treated bacteria still had collagen-binding ability, whereas lysozyme-treated bacteria lost this ability. Administration of live *S. mutans* or amoxicillin-killed *S. mutans* decreased survival of the silkworms. This reduction was more pronounced in Cnm-positive *S. mutans* infection than in Cnm-negative *S. mutans* infection. However, administration of any killed *S. mutans* treated with lysozyme did not reduce the survival rate. These results suggest that live and amoxicillin-killed Cnm-positive *S. mutans* strains have collagen-binding properties and pathogenicity in the silkworm model, and are possibly associated with pathogenicity in cardiovascular diseases.

W10

選抜ワークショップ 5: 抗菌性物質・薬剤耐性

コンピーナー: 柴山 恵吾 (名古屋大学)
小松澤 均 (広島大学)

Selected from general presentations 5: Antimicrobial agents and resistance

Conveners: Keigo Shibayama (Nagoya University)
Hitoshi Komatsuzawa (Hiroshima University)

W10-1/P2-185

国内の市販鶏肉における ESBL 産生大腸菌の汚染実態とその遺伝学的解析

○山本 詩織^{1,2}, 中山 達哉³, 石井 良和⁴, 五十君 静信⁵, 岡田 由美子² (1鎌倉女子大・家政・管理栄養, 2国衛研・食品衛生管理, 3広島大・総合生命, 4広島大・IDEC, 5東農大・総研)

Detection and genetic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* in retail chicken meat in Japan

○Shiori Yamamoto^{1,2}, Tatsuya Nakayama³, Yoshikazu Ishii⁴, Shizunobu Igimi⁵, Yumiko Okada² (1Dept. Nutr. Diet., Kamakura Women's Univ., 2Div. Biomedical Food Res., Nat. Inst. Health Sci., 3Grad. Sch. Int. Sci. for Life, Hiroshima Univ., 4IDEC Inst., Hiroshima Univ., 5Res. Inst., Tokyo Univ. Agr.)

基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生菌は、第三世代セファロスポリン系薬を分解する感染症起因菌の一つである。ヒト・ヒト間での水平伝播に加え、鶏肉の喫食を介した伝播経路も想定されている。我々はこれまでに市販鶏肉製品における ESBL 産生大腸菌の高率汚染を調査しており、本研究ではこれまでに得られた汚染成績を取り纏め、その汚染実態の推移ならびに分離菌株の遺伝的関係性を評価したので報告する。

2015 年度から 2021 年度にかけて入手した市販鶏肉計 557 検体を供試検体とした。ESBL 産生大腸菌の分離は、検体 25 g をセフトキシム加緩衝ペプトン水で集積後、クロモアガー ESBL 培地を用いて行った。得られた分離菌株は、薬剤感受性試験、ESBL 産生遺伝子グループ別試験、不和合性プラスミド型別試験に供した。

ESBL 産生大腸菌は総計 557 検体中 310 検体 (55.7%) より検出された。年度毎の同検出率では、2015 年度 (77.0%) から 2021 年度 (50.8%) にかけて経時的な減少傾向であった。分離菌株は、テトラサイクリン (71.3%) 及びストレプトマイシン (59.7%) に対して高い耐性率を示し、シプロフロキサシンに対しても比較的高めの耐性率が認められた (27.1%)。遺伝子型は、*bla*_{CTX-M-1} グループが 32.4% と最も多く、続いて *bla*_{CTX-M-9} グループが 18.9%、*bla*_{CTX-M-2} グループが 18.2% であった。また、分離菌株の 40.0% では、*Inc11* プラスミドの保有が認められた。以上より、国内の市販鶏肉検体における ESBL 産生大腸菌の高汚染状況が確認され、さらにヒト臨床分離株で多く報告される ESBL 産生遺伝子グループ並びに *Inc11* プラスミド保有株も認められたことから、ヒトへの影響が示唆された。

W10-2/P2-176**グラム陽性細菌のグリセロ糖脂質合成酵素の過剰発現はダプトマイシン耐性をもたらす**

○山本 凌吾¹, 石川 一也², 古田 和幸², 三好 伸一^{3,4}, 垣内 力² (1岡山大学・薬・分子生物学, 2岡山大学・院医歯薬(薬)・分子生物学, 3岡山大学・院医歯薬(薬), 4岡山大学・インド感染症共同研究センター)

Glyceroglycolipid synthase overexpression leads to daptomycin resistance in Gram-positive bacteria

○Ryogo Yamamoto¹, Kazuya Ishikawa², Kazuyuki Furuta², Shin-ichi Miyoshi^{3,4}, Chikara Kaito² (1Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., 2Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., 3Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., 4Collab. Res. Cent. Okayama Univ. Infect. Diseases. India)

カチオン性リポペプチド系抗生物質のダプトマイシンは、MRSA 感染症治療薬の一つとして使用されている。ダプトマイシンは Ca²⁺ 依存的に、細胞膜のホスファチジルグリセロール (PG) および lipid2 と複合体を形成し、膜穿孔を起こすことでグラム陽性細菌に対して殺菌作用を示す。近年、ダプトマイシン耐性株の出現が報告されており、ダプトマイシン耐性メカニズムを理解することへの重要性が高まっている。本研究では、グラム陽性細菌のダプトマイシン耐性化機構の解明を目的とした。枯草菌を用いて、ダプトマイシン耐性に関わる遺伝子の探索を行った結果、UgtP の過剰発現が枯草菌のダプトマイシン耐性をもたらすことを見出した。UgtP は UDP-glucose の glucose をジアシルグリセロール (DAG) に転移させ、ジグルコシルジアシルグリセロール (Glc₂DAG) を合成する酵素である。UgtP 過剰発現株では、Glc₂DAG が増加する一方で、酸性リン脂質であるカルジオリピンと PG、ならびに塩基性リン脂質であるリシルホスファチジルグリセロールが減少していた。UgtP 過剰発現株の菌体表面電荷は野生株と比べて変化しておらず、ダプトマイシン以外のカチオン性薬剤に対する耐性は見られなかった。また、黄色ブドウ球菌では、UgtP のホモログである YpfP と、Glc₂DAG を細胞膜の内側から外側へとフリップする LtaA を過剰発現することで、ダプトマイシン耐性が引き起こされた。以上の結果は、グラム陽性細菌においてグリセロ糖脂質 Glc₂DAG の増加がリン脂質組成の変化とダプトマイシン耐性をもたらすことを示唆する。

W10-3/P2-167**Bioinformatic analysis of morphologies of antibiotic-resistant Escherichia coli cells**

○池邊 美季^{1,2}, 青木 工太¹, 西野 美都子^{1,2,3}, 西野 邦彦^{1,2,4} (1阪大・産研, 2阪大・薬, 3阪大・産業科学AIセンター, 4阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Miki Ikebe^{1,2}, Kota Aoki¹, Mitsuko Hayashi-Nishino^{1,2,3}, Kunihiko Nishino^{1,2,4} (1SANKEN, Osaka Univ., 2Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., 3AIRC-ISIR, Osaka Univ., 4CIDER, Osaka Univ.)

In Gram-negative rods, maintenance of cell shape is important for normal development. It is known that bacterial cells exposed to some antibiotics show abnormal shape. However, there is currently a lack of knowledge regarding the morphological characteristics of the resistant cells themselves, without the exposure to antibiotics.

In this study, we conducted bioinformatic analysis to elucidate morphological characteristics of resistant cells. The phase contrast optical microscopic images of 10 experimentally evolved resistant *Escherichia coli* strains were taken in the absence of antibiotics, and quantitative morphological analysis at the single-cell level was applied. Furthermore, Weighted Gene Correlation Network Analysis was employed to identify those genes associated with morphological characteristics of the resistant cells.

Morphological analysis showed that the resistant cells used in this study had specific cell shapes, generally becoming more spherical. Exploring the genetic background of these characteristics suggested a possible link between the acquisition of resistance and morphological changes.

We propose that morphological perspectives are important to elucidate the phenomenon of antibiotic resistance from the aspect of complex life science systems.

W10-4/P2-175**AckA と Pta, Fis の機能欠失による大腸菌のホスホマイシン耐性化機構**

○平川 秀忠¹, 滝田 綾子¹, 佐藤 百美佳¹, 橋本 佑輔¹, 平本 卓², 大嶋 紀安³, 南嶋 洋司³, 村上 正巳², 富田 治芳¹ (1群馬大学・医・細菌, 2群馬大学・医・臨床検査, 3群馬大学・医・生化学)

Fosfomycin resistance in Escherichia coli caused by functional deletion of AckA and Pta, Fis

○Hidetada Hirakawa¹, Ayako Takita¹, Yumika Sato¹, Yusuke Hashimoto¹, Suguru Hiramoto², Noriyasu Ohshima³, Yoji Minamishima³, Masami Murakami², Haruyoshi Tomita¹ (1Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ., 2Dept. Clin. Lab. Med., Sch. Med., Gunma Univ., 3Dept. Biochem., Sch. Med., Gunma Univ.)

ホスホマイシンは、尿路病原性大腸菌 (UPEC) などによって惹き起こされる尿路感染症の治療薬として用いられてきた。近年、尿路感染症の治療薬として中心的に用いられてきたキノロン薬やβラクタム薬に対する耐性菌の蔓延により、ホスホマイシンが再注目を浴びている。私たちは、ホスホマイシン療法に影響を及ぼす UPEC の新規責任遺伝子の探索を行った。本研究では、トランスポゾン挿入による UPEC のランダム遺伝子破壊ライブラリを用いて、親株と比べてホスホマイシンに対する MIC が有意に増大した株のスクリーニングを行った。その結果、ackA と pta 遺伝子内部にトランスポゾンが挿入された株を得た。ackA と pta 遺伝子をそれぞれ in-frame で欠損させた ackA と pta 欠損株を作製した。当株は、親株と比べてホスホマイシンに対して 4 倍高い MIC 値を示した。ホスホマイシンは GlpT と UhpT 輸送体によって菌体内に取り込まれるが、上記の欠損株は、親株と比べて glpT の転写レベルが 10 倍程度低下しており、ホスホマイシン取り込み能も 8~47 倍低下していることが判明した。ackA と pta 遺伝子欠損によって glpT の発現が低下するメカニズムを検討した過程で、上記の欠損株は、親株と比べて核様体蛋白質 Fis の発現量が低下していることに気がついた。さらに、fis 遺伝子の欠損株および、過剰発現株、リコンビナント Fis 蛋白質を用いた一連の解析から Fis は glpT の遺伝子発現をポジティブに制御していることも明らかにした。本研究において、ホスホマイシンの抗菌活性に関与する新規責任因子として AckA, Pta 並びに Fis を発見し、これらの機能低下および、欠失することでホスホマイシンに対する感受性が低下することが示された。

W10-5/P2-177**Tmn 防御システムを克服するファージの構築**

○山下 和可奈^{1,2}, 千原 康太郎¹, アザム アアハエルマン¹, 小島 新二郎¹, 田村 あずみ¹, 常田 聡², 氣駕 恒太郎¹ (1国立感染症研・治ワク, 2早大・先進理工・生命医科)

Phage Engineering for Overcoming Tmn Defense System

○Wakana Yamashita^{1,2}, Kotaro Chihara¹, Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Azumi Tamura¹, Satoshi Tsuneda², Kotaro Kiga¹ (1Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

近年薬剤耐性菌の問題からバクテリオファージによる治療 (ファージセラピー) が注目を集めている。ファージセラピーにおける主な課題点は宿主域が狭いことである。宿主域が狭い原因の一つは細菌の持つディフェンスシステムによりファージが増幅できないことである。そこで本研究ではディフェンスシステムを阻害する因子を探索し、その因子を利用したファージ療法を開発することを目的とする。本研究で保有するファージライブラリーについて、33 種類のディフェンスシステムに対する感受性を調べた。その結果ゲノム相溶性が高い 7 ファージのうち、SMS22 ファージのみが transmembrane ATPase (tmn) と呼ばれるディフェンスシステムを逃れた。これより SMS22 は tmn に対する阻害因子を持つことが予想された。tmn は、ATPase ドメインと Transmembrane ドメインから構成される 1 遺伝子のディフェンスシステムであるが、そのファージ感染阻害メカニズムはいまだ明らかではない。本研究では、ゲノム相溶性が高い 7 つのファージのゲノムを比較し、SMS22 ファージに特徴的な遺伝子をつづつクアアウトすることにより tmn 阻害因子である anti-tmnn を同定した。また、tmn に感染を阻害されるファージに tmn 阻害因子を搭載することで、tmn に防御されないファージの合成に成功した。本研究はファージセラピーの治療効果の向上に寄与する可能性がある。

W10-6/P2-191

大腸菌外膜タンパク質 OmpC のアミノ酸配列に基づくファージ療法 の提案

○中塚 哉太¹, 森川 莉帆¹, 金子 知義^{1,2}, 相羽 由詞³, 宮永 一彦^{2,3}, 崔 龍
洙³, 丹治 保典², 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファ
ージセラピー研, ³自治医科大・医・細菌学)

Proposal of Phage Therapy Based on Amino Acid Sequences of Escherichia coli Outer Membrane Protein C

○Kanata Nakatsuka¹, Riho Morikawa¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Yoshifumi
Aiba³, Kazuhiko Miyanaga^{2,3}, Longzhu Cui³, Yasunori Tanji², Satoshi
Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda
Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ., ³Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi
Med. Univ.)

【背景】新たな細菌感染症治療法として着目されているファージ療法の課
題の一つにファージの感染宿主域の狭さが挙げられる。ファージの感染
性は、ファージ尾繊維先端のタンパク質と細菌側の外膜分子との相互作
用に依存し、大腸菌ファージの多くは、細菌外膜上のタンパク質を標的
に吸着する。本研究では、多様な大腸菌に広く溶菌できるファージ治療
を目指し、大腸菌着群での保存性が比較的高い Outer membrane protein
C (OmpC) を標的受容体とするファージカクテルの作製を目指した。

【方法】薬剤耐性臨床分離株を含む大腸菌 158 株とゲノムデータベース
より取得した国外の大腸菌 20 株、及び ATCC 43888 (O157:H7) 株、
BW25113 (K12) 株の計 180 株に対して Multi locus sequencing typing
(MLST) 解析と OmpC アミノ酸配列解析をそれぞれの株に対して行っ
た。次に、各 OmpC をコードする遺伝子を *ompC* 欠損株に形質転換し、
OmpC 多型ライブラリーを作製した。そして、OmpC を標的受容体とす
る天然ファージを都市下水中より単離し、OmpC 多型ライブラリーに対
する溶菌能の評価を行った。

【結果・考察】大腸菌 180 株の OmpC アミノ酸配列は 18 パターン (相
同性 < 99% は異なるパターンと判定) に分類され、180 株のうち 101 株
(56%) が Sequence Type (ST) 131 であり、ST と OmpC アミノ酸配列
パターンには強い相関性が認められた。また、取得した OmpC 標的
ファージは、複数の OmpC アミノ酸配列パターンを認識することが示さ
れた。これらのファージをカクテル化することで感染域の広域化が期待
されるほか、ST と OmpC アミノ酸配列パターンとの相関性に基づく有
効な個別型ファージ療法が提案できると期待される。

W10-7/P2-160

Construction of CRISPR-Cas13a antibacterial capsid for targeting Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

○Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦,
XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医科大・
医・細菌学)

○Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe,
Kazuhiko Miyanaga, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, Teppei
Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Gut bacteria play a pivotal role in human health, contributing to the
onset of various diseases. *Bacteroides fragilis*, a prominent member
of the gut bacteria, is divided into two subgroups based on enterotoxin
production: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and
Nontoxigenic *Bacteroides fragilis* (NTBF). ETBF produces the BFT
toxin and has been associated with inflammatory bowel diseases and
colorectal cancer. Currently, there is no efficient method for
selectively removing harmful bacteria from the gut, emphasizing the
urgent need for technology capable of eliminating pathogenic bacteria
while preserving beneficial ones. Our laboratory has developed a
system that utilizes the CRISPR-Cas13a system loaded into phage
capsid to eliminate target bacteria selectively. Our research aims to
develop a system for targeting and eliminating ETBF. To achieve this,
we have collected 314 strains of *B. fragilis*. 45 strains were confirmed
to be ETBF. Subsequently, we isolated 8 phages after induction of 92
B. fragilis strains. The host infection range was 4-16% on 45 ETBF
strains. These phages were characterized by whole genome
sequencing. We will employ phage 22 (46785 bp, 60 ORF), which has
a host infection range of 16%, to construct CRISPR-Cas13a
antibacterial capsid (AB capsid) by packaging Cas13a into its capsid.
This AB capsid will infect *B. fragilis* and only eliminate ETBF.

DP1-01-01/P1-001

New species belonging to the genus *Waltera*

○坂本 光央, 久富 敦, 大熊 盛也 (理研・バイオリソース・微生物材料)

○Mitsuo Sakamoto, Atsushi Hisatomi, Moriya Ohkuma (RIKEN BRC-JCM)

The genus *Waltera* was proposed in 2020 with *Waltera intestinalis* as the type species, which was isolated from pig intestine. *W. intestinalis* is considered to be a prevalent gut bacterial species in humans based on the overlap between pig novel taxa and the catalogue of human-associated bacteria. Recently, we isolated strains 17YCFACo10^T, 18YCFACo3Co2, and 19YCFACo3Co2 from human feces, which appear to be *W. intestinalis*. The aim of this study was to identify the taxonomic position of the three isolates. We characterized the isolates using a polyphasic approach integrating genomic analyses. All three isolates were characterized as obligately anaerobic, Gram-stain-negative, wavy rods. Moreover, the 16S rRNA gene sequence similarity of these isolates was the highest (99.2-100%) to *W. intestinalis* WCA3-601-WT-6H^T. The results show that strain 19YCFACo3Co2 can be classified as *W. intestinalis* based on the higher values of digital DNA-DNA hybridization (dddDH) and average nucleotide identity (ANI) (72% dddDH and 97% ANI) compared to *W. intestinalis* WCA3-601-WT-6H^T. Conversely, strains 17YCFACo10^T and 18YCFACo3Co2 were found to be different species from *W. intestinalis* due to the lower dddDH and ANI values (34% dddDH and 87% ANI). Based on the data collected, strains 17YCFACo10^T and 18YCFACo3Co2 represent a novel *Waltera* species and we propose the name *Waltera elongata* sp. nov.

DP1-01-02/P1-002

Clostridium 属菌鑑別 PCR の改良の必要性が示唆された死亡牛からの *Clostridium massiliodiemoense* 分離例

○馬田 貴史¹, 梅田 麻美², 児玉 彬², 高松 大輔^{1,3} (¹農研機構・動衛研・動物感染症, ²大分県・大分家保, ³岐阜大院・連合獣医)

Clostridium massiliodiemoense from dead cattle suggests the need for improved PCR for *Clostridium*

○Takashi Mada¹, Asami Umeda², Akira Kodama², Daisuke Takamatsu^{1,3} (¹Anim. Infect. Res. Div., Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO, ²Oita LHSC, Oita Pref., ³Utd. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

Clostridium massiliodiemoense (CM) は、2016年に人の腸内容物から分離され、新種として報告された菌である。これまで国内でCM分離例は報告されていなかったが、今回、同菌による菌血症を呈し死亡した牛の症例を経験した。しかし、*fljC* を標的とした現行の *Clostridium* 属菌鑑別 PCR (*fljC* PCR) では、本症例分離株は *Clostridium novyi* A 型 (CNA) と判定されたため、これら2菌種の関係性を調査した。患者は96ヶ月齢の黒毛和種の雌牛で、食欲廃絶と黒色水様便を呈した3日後に死亡した。同個体の心臓、肺、肝臓及び腎臓由来 DNA を用いた *fljC* PCR で CNA を示す大きさの増幅産物が認められたが、臓器から CNA は分離されず、肝臓と脾臓から分離された菌は 16S rDNA 解析で CM と同定された。*fljC* PCR は CM を標的としていない。しかし、分離 CM 株からも CNA を示唆する大きさの *fljC* 産物が増幅され、その配列は臓器由来産物の配列と 100%一致したため、臓器からの増幅産物は CM に由来することが示唆された。MiSeq 及び MinION を用いたゲノム解析の結果、本症例分離株と CNA 基準株及び CM 基準株の Average nucleotide identity は各々 90.37% 及び 96.37% であり、系統解析では分離株は CNA 株よりも既報の CM 株とより近縁な関係にあった。以上より、本症例分離株は CM であることが確認されたが、分離株由来の *fljC* PCR 産物の配列は、既報の CM 株の *fljC* 領域の配列 (一致率 91.7%) よりも CNA 株由来の配列 (一致率 92.7%) に類似しており、現行の *fljC* PCR は CNA の特異的検出に適していないことが示唆された。分離 CM 株は、CNA の毒素遺伝子は保有しておらず、CM の病原性及び CNA との差異を明確にするためには同菌について更なる解析が必要である。

DP1-01-03/P1-003

少量のシーケンスデータにより薬剤耐性菌の遺伝的特徴を推定可能な「Shallow-Seq」の確立

○屋宜 宣慶¹, 宮城 七彩², 平井 到² (¹琉球大・医・保健・生理機能, ²琉球大・保健・微生物)

Shallow-Seq; the method for presuming genetic lineage of bacteria with small amount of sequence data

○Nobuyoshi Yagi¹, Nanase Miyagi², Itaru Hirai² (¹Lab. Clin. Physiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus, ²Lab. Microbiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus)

薬剤耐性菌の蔓延状況は深刻であり、医療関連機関だけでなく、市中や環境からも検出されるようになった。薬剤耐性菌の拡散防止には、薬剤耐性菌拡散の実態解明が必要不可欠であり、最近では、薬剤耐性菌拡散の実態解明には全ゲノム (WGS) 解析を利用した分子疫学的手法が研究レベルでは主流となっている。また、それに伴い遺伝子データベース (DB) 上に記載される大腸菌などの主要細菌の全ゲノム配列の件数は充実しており、今後も増加が見込まれる。しかしながら、薬剤耐性菌拡散の実態解明には、数百から数千以上の薬剤耐性菌の解析が必要であり、検出された全薬剤耐性菌を WGS 解析するのは現実的ではない。そこで、本研究では、遺伝子 DB を利用することで解析に必要なシーケンスデータ量を最小化し、臨床分離株の遺伝系統を推定可能な新たな手法を確立した。

沖縄県内の医療関連機関から検出された臨床分離大腸菌 29 株について Nanopore シーケンサーにより解析し、得たリードを遺伝子 DB に記載される 3,185 の大腸菌ゲノムにアライメントした。通常、大腸菌ゲノムを *de novo* assembly により解析する際には、少なくとも 1GB 程度のデータ量が必要であるが、上記の手法を用いることで、約 130MB 程度のデータ量で大腸菌の遺伝系統を推定可能であることが示唆された。また、少量のデータ量でも薬剤耐性遺伝子を検出可能であった。以上の結果から、少量のデータでも薬剤耐性菌の遺伝系統をスクリーニング可能であることが示唆され、本手法を「Shallow-Seq」と命名した。Shallow-Seq を応用することで、これまで現実的ではなかった市中・環境の薬剤耐性菌の菌株ベースのモニタリングが可能となることが期待される。

DP1-01-04/P1-004

Molecular epidemiological characterization of MRSA from bloodstream infections in Hokkaido

○Meiji Soe Aung¹, 漆原 範子¹, 川口谷 充代¹, 大橋 伸英¹, 荒木 露羽², 松原 加奈², 伊藤 政彦², 小林 宣道¹ (札幌医大・医・衛生, ²札幌臨床検査センター)

○Meiji Soe Aung¹, Noriko Urushibara¹, Mitsuyo Kawaguchiya¹, Nobuhide Ohashi¹, Rou Araki², Kana Matsubara², Masahiko Ito², Nobumichi Kobayashi¹ (¹Dept. Hygiene, Sch. Med., Sapporo Med. Univ., ²Sapporo Clin. Lab. Inc.)

Objective: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major causative agent of community-acquired and healthcare-associated infections. We investigated the molecular epidemiological characteristics of MRSA from bloodstream infections in Hokkaido.

Methods: For two year-period from August 2019, we collected 279 MRSA isolates from blood samples in medical institutions in Hokkaido, and analyzed for their antimicrobial susceptibility, genotypes, antimicrobial resistance genes and virulence factors.

Results: CC5 (ST5/ST764)-IIa (SCCmec IIa) and CC1 (ST1/ST2725/ST2764)-IVa were the major genotypes, accounting for 47% and 42%, respectively. The proportion of CC1 increased significantly compared to that in 2017-2019. CC8 was detected in 9% of the total (CC8-IVa, 5%), of which ST8-IVa (7 isolates, 2.5%) were positive for the PVL (Panton-Valentine leukocidin) gene with *spa* type t008, which was considered the USA300 clone, the predominant community-acquired MRSA in the United States. Six of these strains had the ACME (arginine metabolic mobile genetic element) that is characteristic to USA300, but only one strain lacked it. Nine PVL-negative ACME-positive strains were detected, which belonged to CC5 (ST5/ST764)-IIa.

Conclusions: An increasing trend of genotypes CC1-IV was suggested among MRSA derived from bloodstream infections in Hokkaido.

DP1-01-05/P1-005

在宅診療患者における口腔由来多剤耐性菌の検出ならびに口腔疾患及び全身基礎疾患との関連性の検証

○西濱 早紀¹, 松尾 美樹^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, 荒井 千夏^{3,4}, 梶原 俊毅^{3,4}, 菅原 庸⁴, 大毛 宏喜^{3,5}, 菅井 基行^{3,4}, 柴 秀樹¹, 小松澤 均^{2,3} (1)広島大・医系科学研究科・歯髓生物学, (2)広島大・医系科学研究科・細菌学, (3)広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, (4)国立感染症研究所薬剤耐性研究センター, (5)広島大・感染症科)

Isolation of Oral Drug-Resistant Bacteria from Home-care Patient and Relation to Medical Information

○Saki Nishihama¹, Miki Matsuo^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, Chika Arai^{3,4}, Toshiki Kajihara^{3,4}, Yo Sugawara⁴, Hiroki Ohge^{3,5}, Motoyuki Sugai^{3,4}, Hideki Shiba¹, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (1)Dept. Biol. Endod., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., (3)Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., (4)Res. Cent for AMR, NIID, (5)Dept. Infectious Diseases, Hiroshima Univ. Hosp.)

【目的】多剤耐性菌 (ARB) の出現は世界的な傾向である。高齢者の口腔 ARB 保有率は高いとされているが、調査対象の多くは介護施設入居者である。世界的に高齢化社会が問題視される中で、高齢者の口腔 ARB 保有の実態を把握するには、在宅医療サービス利用の高齢者を対象とする調査も必要である。本研究では、在宅医療を受ける高齢者 101 名から口腔 ARB を分離し、耐性遺伝子保有と薬剤耐性を調べた。また、耐性菌の保有と医療情報との関連性も検証した。【方法】ARB は *Staphylococcus aureus* (S.a) とグラム陰性薬剤耐性菌 (GNARB) を対象とした。スワブ法により口腔内から検体を採取し、No.110 培地とクロモアガーTMESBL 培地を用いて分離した。分離菌から DNA を抽出し、全ゲノム塩基配列を決定し、菌種の同定と耐性遺伝子の保有状況を解析した【結果】在宅医療サービス利用者 101 名から、S.a が 32 名、このうちメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が 8 名、GNARB が 18 名であった。統計解析から S.a と MRSA の保有は義歯破損と関連が見られ、GNARB の保有は経管栄養の有無と関連していた。GNARB の全ゲノム塩基配列から菌種を同定し、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL)、カルバペネマーゼ関連遺伝子の保有を解析した。また、微量液体希釈法により最小発育濃度を決定し、CLSI 基準に基づいて薬剤耐性を判定した。その結果、薬剤耐性と耐性遺伝子の保有の関連が見られた。【考察】在宅医療を受ける高齢者は口腔内に様々な ARB を保有し、歯科治療や食事形態との関連性も示唆された。

DP1-01-06/P1-006

熊本患者および保護ネコから分離された *Corynebacterium ulcerans* の分子系統解析

○志多田 千恵¹, 山本 隆樹¹, 森口 美琴², 林 秀幸³, 森 美聡⁴, 徳岡 亮亮⁴, 松本 一俊⁴, 堀場 千尋⁵, 黒田 誠⁵, 高橋 元秀¹ (1)熊本大・生物毒素抗毒素, (2)熊本労災病院・検査部, (3)熊本大病院・検査部, (4)熊本保環研, (5)感染研・ゲノム)

Phylogenetic analysis of *C. ulcerans* isolated from patients and protected cats in Kumamoto

○Chie Shitada¹, Takatoshi Yamamoto¹, Mikoto Moriguchi², Hideyuki Hayashi³, Misato Mori⁴, Hideaki Tokukuwa⁴, Kazutoshi Matsumoto⁴, Chihiro Horiba⁵, Makoto Kuroda⁵, Motohide Takahashi¹ (1)Dept. Toxin and Biologicals., Kumamoto Health Science Univ., (2)Kumamoto University Hospital Clinical Laboratory Center, (3)Kumamoto Univ. Hospital Clinical Laboratory Center, (4)Kumamoto Prefectural Inst. Public Health and Environmental Science, (5)Pathogen Genomics Center Nat. Inst. Infect. Dis.)

【背景・目的】*Corynebacterium ulcerans* はグラム陽性短桿菌で、ジフテリア菌と似た毒素を産生する株が自然界に存在している。ジフテリアと同様、呼吸器に感染すると咽頭に偽膜を形成し嘔声など特徴的な症状がみられる。呼吸器以外にも皮膚の粘膜、潰瘍部などの感染例も報告されている。感染様式として、野良ネコ、狢犬等からヒトへの感染が強く疑われている動物由来感染症に分類され、国内では過去に 2 例の死亡報告もある。今回、熊本県内の入院患者の潰瘍部分の臨床分離株 (1 株) および保護ネコの分離株 (7 株) の関連性について分子系統解析をおこなった。【方法】患者潰瘍スワブを羊血液寒天培地で 35°C・12 時間・炭酸ガス培養し、継代単離コロニーから PCR にてジフテリア毒素陽性を確認した。臨床分離株と保護ネコ分離株を合わせた 8 株をゲノム解読した (QIAseq FX, iSeq 100)。抄録登録時点で臨床分離株の全ゲノム確定済み、保護ネコ分離株は解読・解析中であり、学会発表時に分子系統解析の結果を統合する。【結果・考察】患者と保護ネコからジフテリア毒素遺伝子を有する *C. ulcerans* を分離・同定した。ゲノム情報を用いた分子系統解析による菌株比較により、ジフテリア毒素を有する他の類縁菌である *C. pseudotuberculosis* との鑑別にも有効であった。患者が *C. ulcerans* に感染した背景を突き止めることはできなかったが、愛玩動物の健康管理、感染経路確認や環境調査など、*C. ulcerans* によるジフテリア様症状は引き続き注視すべき動物由来感染症と考える。

DP1-01-07/P1-007

インド・コルカタ市と富山県で分離された *C. jejuni* のゲノム比較解析

○森田 大地¹, 磯部 順子², 前西 絵美², 丸山 史人³, 山本 佑樹¹, 田原 崇俊¹, 大野 歩⁴, 北原 圭³, 三好 伸一^{4,5}, 黒田 照夫¹ (1)広島大・院・医系科学, (2)富山県衛生研究所, (3)広島大・IDEC, (4)岡山大・インド感染症共同研究センター, (5)岡山大・学術研究院・医歯薬学域)

Comparative genomic analysis of *C. jejuni* isolates from Kolkata, India and Toyama

○Daichi Morita¹, Junko Isobe², Emi Maenishi², Fumito Maruyama³, Yuki Yamamoto¹, Hidetoshi Tahara¹, Ayumi Ohno⁴, Kei Kitahara³, Shin-ichi Miyoshi^{4,5}, Teruo Kuroda¹ (1)Grad. Sch. Bio. Heal. Sci., Hiroshima Univ., (2)Toyama Inst. Heal., (3)The IDEC Inst., Hiroshima Univ., (4)Collab. Res. Cent. of Okayama Univ. for Inf. Diseases. India, (5)Grad. Sch. Med., Dent. & Pharm. Sci., Okayama Univ.)

インドは多様な下痢性感染症の流行地域であり、加熱処理が不十分な鶏肉や生水が原因となる *Campylobacter* 食中毒は多くみられるものの、その混入ルートや疫学調査のための遺伝情報が欠落している。本研究では、インド・コルカタ市で 2019 年に下痢症患者から分離された 90 株と 2016 年から 2020 年に富山衛生研究所において分離された 116 株の *C. jejuni* の全ゲノム解析を行い、遺伝的特徴を比較解析した。系統解析では日本株は世界的な流行型の Clonal Complex (CC) 型である CC21 に分類されるものが多かったが、インド株では CC21 は見られず、CC353 が多く見られた。検出された耐性遺伝子の種類は両国で大きな違いは見られなかったが、*tet(O)*, QRDR 変異, 23S rRNA 変異の保有率はインド株の方が高かった。また、*blaOXA* の保有率は日本株の方が高かったが、*blaOXA* の発現上昇に関与するプロモーター変異はインド株で多く見られた。病原性遺伝子では大きな違いは見られなかったが、日本株では稀な VI 型分泌装置をインド株では約半数が保有していた。コルカタ市における *C. jejuni* の遺伝的系統は世界的な流行傾向と異なった株が多くみられた。またインド株では日本株よりも薬剤耐性の保有率が高く、特にほぼ全ての株で QRDR 変異, 10%で 23S rRNA 変異が確認され、*Campylobacter* 症の治療薬に対する選択が狭まっていた。この結果は、インドにおける本細菌種の全ゲノム解析の有用性と全域でのサーベイランスによるインド特異グループの分布調査を行う重要性を示した。

DP1-01-08/P1-008

Whole-genome analysis of *Bordetella parapertussis* Isolated in Japan

○小出 健太郎¹, 小野寺 梓², 小棚 雅寛², 市村 辰太郎², 大塚 奈緒¹, 後藤 雅貴¹, 蒲地 一成¹, 見理 剛¹ (1)感染研・細菌二, (2)埼玉医大病院・中央検査部)

○Kentarō Koide¹, Azusa Onodera², Masahiro Kodana², Shintarou Ichimura², Nao Otsuka¹, Masataka Goto¹, Kazunari Kamachi¹, Tsuyoshi Kenri¹ (1)Dept. Bact. II, Nat. Inst. Infectious Diseases, (2)Dept. Clin. Lab., Saitama Med. Univ. Hosp.)

Bordetella pertussis and *B. parapertussis* are the causative agents of pertussis. *B. parapertussis* is less often involved in the disease than *B. pertussis* and no isolate of *B. parapertussis* was identified in Japan between 2019 and 2022 in our study. However, three isolates of *B. parapertussis* (isolate IDs: BPP43, 44, 45) were collected in 2023. Multi-locus variable-number tandem-repeat analysis showed these isolates harbored the MT21 genotype, which was rare in Japanese isolates collected before 2018. In this study, we performed whole-genome analysis to gain further insight into the genetic relationship among the Japanese isolates. The three isolates and 14 Japanese isolates collected between 2005 and 2018 were sequenced. Single nucleotide variants (SNVs) were then identified by comparison to a Japanese isolate BPP01. Together with BPP01 and 102 global isolates whose sequence data were publicly available, a total of 120 isolates were included in the analysis, and SNV-based phylogenetic tree was constructed. BPP43, 44 and 45 clustered together on the phylogenetic tree. These isolates were genetically closer to the global isolates than to other Japanese isolates. This result suggests a potential spread of the distinct lineage, likely introduced from abroad. These findings underscore the importance of surveillance and investigation of *B. parapertussis*.

DP1-01-09/P2-001

国内流通食品における *Listeria monocytogenes* 汚染状況

○岡田 由美子¹, 都丸 亜希子¹, 西田 智子¹, 山本 詩織^{1,2}, 下島 優香子³
(¹国立衛研・食管, ²鎌倉女子大・家政・管理栄養, ³東洋大・食環境科学・食環境科学)

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan

○Yumiko Okada¹, Akiko Tomaru¹, Tomoko Nishida¹, Shiori Yamamoto^{1,2}, Yukako Shimojima³ (¹Div. Biomed. Food Res., Nat. Inst. Health Sci., ²Dept. Nutr. Diet., Kamakura Women's Univ., ³Dept. Food Life Sci., F. Food Nutr. Sci., Toyo Univ.)

【背景・目的】*Listeria monocytogenes* (リステリア) は主に食品を介してヒトに髄膜炎や敗血症, 流死産を引き起こす。国内リステリア症例数は不明だが, 院内感染データベース JANIS を用いた調査では, 2016年の菌血症患者は220例あり, 2011年の98例から大幅に増加した (Kusama)。国内症例の原因食品はほぼ同定されていないが, 欧米では患者及び食品由来株のゲノム解析により集団事例及びその原因食品の同定を実施し, 冷凍野菜やパックサラダ等, 野菜類を原因とする事例が数多く検出されている。一方, 国内で流通している野菜加工品の本菌汚染実態は不明な点が多い。本研究では, 国内で流通している冷凍野菜及び野菜の浅漬けにおけるリステリアの汚染実態を調べた。【方法】2023~2024年に購入した冷凍野菜46検体 (枝豆21, コーン12, ミックスベジタブル9, アボカド4) 及び浅漬け16検体 (白菜3, ナス3, 大根・カブ3, ミックス4, キャベツ1) について, ISO 11290-1:2017 (定性法) 及び2 (定量法) に従ってリステリアを分離した。【結果・考察】冷凍野菜46検体中4検体 (8.7%) がリステリア陽性であり, 全て枝豆であった。他の冷凍野菜類はリステリア陰性であったが, 2020~2021年に行った先行研究では冷凍コーンは陽性率8.7%で (2023年本学会), 汚染率の低下が認められた。浅漬け16検体中3検体 (18.8%) が陽性であり, 2検体がナスの浅漬け, 1検体は白菜及び小松菜等のミックスであった。枝豆4検体とナス浅漬け1検体の汚染レベルは定量法の下限值 (10 cfu/g) 未満, ナス浅漬け及びミックス漬け各1検体では20 cfu/gであった。今後, 分離菌株の分子疫学的解析により国内患者分離株等との比較を行う。

DP1-01-10/P2-002

Differential angiogenic properties and phylogenetic characteristics of *Bartonella henselae* strains

近藤 由佳¹, 鈴木 匡弘¹, 佐藤 真伍², 丸山 総一², 土井 洋平^{1,3}, 塚本 健太郎⁴ (¹藤田医大・医・微生物, ²日大・生物資源・獣医公衆衛生, ³藤田医大・医・感染症, ⁴阪大・微研・人獣共通細菌)

Yuka Kondo¹, Masahiro Suzuki¹, Shingo Sato², Soichi Maruyama², Yohei Doi^{1,3}, Kentaro Tsukamoto⁴ (¹Dept. Microbiol., Fujita Health Univ. Sch. Med., ²Dept. Vet. Med., Coll. Bioresource Sci., Nihon Univ., ³Dept. Infect. Dis., Fujita Health Univ. Sch. Med., ⁴Dept. Bact. Zoonoses, RIMD, Osaka Univ.)

Bartonella henselae, the etiological agent of cat-scratch disease, causes bacillary angiomatosis in immunocompromised individuals by inducing angiogenesis. Previously, we identified BafA as a determinant responsible for *Bartonella*-induced angiogenesis. In this study, we explored the correlation between the phylogenetic clades of *B. henselae* strains and variations in their proliferative capacity against vascular endothelial cells (ECs).

Thirteen *B. henselae* strains were used to inoculate ECs. The strains induced differential proliferation of ECs. All the strains possessed the *bafA* gene, and the encoded BafA proteins were categorized into two variants based on their amino acid sequences, both of which exhibited comparable dose-dependent proliferation of ECs. Distinct amounts of BafA were detected within the culture supernatants of individual strains, eliciting variable proliferative effects on ECs. Based on whole genome sequencing of all strains, clusters identified through core genome SNP analysis fully correlated with the variant type of BafA in each strain.

In conclusion, *B. henselae* strains showed distinct proliferative potential against ECs. Their heterogeneous ability to proliferate ECs, despite possessing identical BafA sequences, implies the existence of yet unidentified mechanisms in *Bartonella*-induced angiogenesis.

DP1-01-11/P2-003

Mannheimia haemolytica の莢膜合成遺伝子群の多様性に基づく血清型別 PCR 法の開発

○井口 純¹, 奥野 未来², 小椋 義俊², 星野尾 歌織³, 上野 勇一³, 高松 大輔³ (¹宮崎大・農・畜産草地, ²久留米大・医・感染, ³農研機構・動衛研)

Development of PCR-based serotyping method for *Mannheimia haemolytica*

○Atsushi Iguchi¹, Miki Okuno², Yoshitoshi Ogura², Kaori Hoshino³, Yuichi Ueno³, Daisuke Takamatsu³ (¹Fac. Agr., Miyazaki Univ., ²Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med., ³Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO)

Mannheimia haemolytica (Mh: マンヘミア・ヘモリチカ, グラム陰性桿菌) はウシの上気道の常在菌であるが, 長距離輸送や飼養環境によるストレス感作などに伴って増殖し, 牛呼吸器症候群 (BRDC: Bovine Respiratory Disease Complex) の原因となる。BRDC 発症牛の一部は死亡することがあるため, その予防や対策が必要となる。Mh は莢膜に多様性があり, これまでに12種類の血清型 (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16, A17) が認められている。流行型である A1, A2, A6 に対する PCR 検査法は開発されているが, その他の型に対する検査法は確立されておらず, それらの分布や特徴については不明な点が多い。本研究ではすべての血清型株のゲノム配列 (2.4~2.6 Mbp) を用いて, 系統的関係と莢膜合成遺伝子群の整理を行った。さらに, それぞれの莢膜合成遺伝子群上に血清型を特異的に判定できる PCR プライマーを設計し, すべての血清型を効率的に判定できる2種類のマルチプレックス PCR キットを開発した。現在, Mh 野生株を用いた実用評価を行っており, 本会ではその成果も踏まえて報告したい。

DP1-01-12/P2-004

A novel *Filobacterium* sp. detected in deposited 16S rRNA metagenome data of rhesus macaque

○池 郁生 (理研BRC)

○Fumio Ike (RIKEN BRC)

Archive of metagenomic 16S rRNA genes read by next-generation sequencing (NGS) is a wealth of unidentified bacterial resources. *Filobacterium* spp., formerly known as CAR bacillus, is a Gram-stain-negative filamentous rod that colonizes various animals' ciliated respiratory epithelium. Here, we report reanalyses of the deposited metagenomic data of rhesus macaques' bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the detection of *Filobacterium* sp. by using human-originated 16S rRNA sequences of *Filobacterium* sp. as the queries. **Materials and methods:** The deposited PRJNA800766 SRA data from healthy rhesus macaques was filtered to 16S rRNA gene amplicons and BALF specimens. Then, NCBI BLASTn was used to pick out sequences similar to the human-originated *Filobacterium* sp. 16S rRNA sequence (JQ745859 listed in SILVA SSU r138.1) from each Run data. **Results and Discussion:** BLASTn search of 68 BALF Run data of rhesus macaques against JQ745859 revealed that 15 Run data (15/68) had sequences higher than 97% identity for both paired-ends. In one of these Run data, all its top 500 significant alignments exhibited more than 97.0% identity to JQ745859. Similar results were obtained by using other human-originated rRNA sequences as queries. These results suggest that a novel *Filobacterium* sp. similar to its human type constitutes a part of rhesus macaque's normal lower respiratory microbiome.

DP1-01-13/P2-005

分離元の異なるバンコマイシン耐性腸球菌株間の *vanB* 遺伝子を含む Tn1549/5382 領域の塩基配列の比較

○中山 孝子, 菊池 俊, 蜂巣 友嗣, 安藤 直史, 中村 正樹, 植田 菜月, 岸澤 充 (千葉県衛研・細菌)

Comparison of Tn1549/5382 containing *vanB* gene among VRE strains from different sources

○Takako Nakayama, Takashi Kikuchi, Yushi Hachisu, Naoshi Ando, Masaki Nakamura, Natsuki Ueda, Mitsuru Kishizawa (Div. Bact., Chiba Pref. Inst. Pub. Health)

【背景】国内で問題になる主なバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は VanA 型, VanB 型だが Mobile genetic elements (MGEs) 上にバンコマイシン耐性遺伝子が存在し菌株間, 菌種間をまたいで遺伝子を伝達することがわかっている。2022 年に千葉県内の一部地域の患者より分離された VRE 47 株は全て *vanB* 遺伝子保有の *Enterococcus faecium* と同定された。これらの菌株の MGEs である約 34kbp の Tn1549/5382 を解析し, PFGE の結果と比較したので報告する。【方法】リファレンス配列を基に Tn1549/5382 を構成する *orf13* 及びインテグラーゼ遺伝子上にプライマーを設計した。2022 年に千葉県で分離された VanB 型 VRE 3 株から抽出した DNA を鋳型とし, *vanB* 遺伝子を含む Tn1549/5382 領域を増幅した。分離株の内訳は PFGE で一致した 2 株及び異なる由来を示した 1 株を用いた。PCR 増幅産物を精製し, MiSeq を用いて塩基配列を獲得した。得られた塩基配列のデータをリファレンス配列 (GenBank Accession No. AF192329, KR066794, LRAQ01000090) と比較した。【結果と考察】解析に使用した 3 株のうち PFGE で同一由来株であった 2 株は Tn1549/5382 の塩基配列が同一であった。一方 PFGE で異なる由来を示した 1 株は他の 2 株の塩基配列と比較して 1 つの SNV が存在し, さらに 1 つの IS が挿入されていた。SNV は *vanB* 遺伝子上に存在しトレオニンがセリンへ変異していた。挿入されていた IS は韓国で初めて報告され国内でも検出報告のある *ISEnfa3* であり, *vanX* 遺伝子より下流に挿入されていた。一方, リファレンス配列と千葉県分離株の Tn1549/5382 を比較すると, 千葉県の 3 株は非常に類似しており, 関連が疑われる結果となった。

DP1-01-14/P2-006

国産食肉および家畜から分離した薬剤耐性大腸菌の系統解析

○河原 隆二¹, 山口 貴弘¹, 若林 友騎¹, 松本 悠希², 元岡 大祐², 中村 昇太², 中山 達哉³, 山本 容正⁴, 川津 健太郎¹ (¹大安研・微・細菌課, ²大阪大・微研・感染症メタゲノム, ³広大・統合生命科学, ⁴岐大・連合創薬医療情報)

Phylogenetic analysis of drug-resistant *Escherichia coli* isolated from domestic meat and livestock

○Ryuji Kawahara¹, Takahiro Yamaguchi¹, Yuki Wakabayashi¹, Yuki Matsumoto², Daisuke Motoooka², Shota Nakamura², Tatsuya Nakayama³, Yoshimasa Yamamoto⁴, Kentaro Kawatsu¹ (¹Div. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health, ²Dept. Infect. Metagenomics, RIMD, Osaka Univ., ³Integ. Sci. Life, Hiroshima Univ., ⁴Drug Discov. Med. Info. Sci., Gifu Univ.)

「薬剤耐性菌 (ARB) は, ヒトの感染症の難治化や畜水産業の経済被害等を引き起こす世界規模の問題であり, ヒト, 環境, 畜産の各分野における多角的な種々の取り組みが求められている。畜産においても抗菌薬が大量に使用され, ARB が食肉や家畜から検出されており, さらにヒト由来 ARB と共通の薬剤耐性遺伝子が検出されることも多いことから, 畜産-ヒト間でなんらかの伝播が生じている可能性が指摘されている。そこで本研究では, 2020-2022 年に国内の食肉および家畜から分離した ESBL や AmpC 等を保有する薬剤耐性大腸菌 287 株から得た全ゲノムデータを用いて系統解析を実施し, ヒト病原性大腸菌との関連性について検討した。解析には, DNBSEQ-G400 (MGI 社) で得た各菌株の全ゲノムデータから Unicycler により構築したドラフトゲノムを用いた。各菌株のゲノムを 104 株の代表的な大腸菌ゲノム (Microbial Genomics 2023; 9:000959) とともに *pym1st* にてデータベース化し, core genome MLST に基づいた系統樹解析を行なった。菌株の多くが牛をはじめとする家畜に関連した大腸菌に分類されたが, 主に鶏肉および鶏から分離された約 27% の菌株がヒトと関連するとされる系統に分類され, 主に ST69, ST117, ST362 で構成されていた。これらの系統の大腸菌にはヒトへの病原性があると報告されているものが含まれており, 食肉等を介してヒトへ薬剤耐性の拡散や健康上のリスクとなりうる事が示唆された。

DP1-01-15/P2-007

Streptococcus mutans コラーゲン結合アドヘジン *cnm* の遺伝子多様性とその結合能の解析

○米澤 英雄, 菊池 有一郎, 国分 栄仁, 石原 和幸 (東京歯大・微生物)

Genetic diversity and binding ability of *Streptococcus mutans* collagen binding adhesin Cnm

○Hideo Yonezawa, Yuichiro Kikuchi, Eitoyo Kokubu, Kazuyuki Ishihara (Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Col.)

【目的】*Streptococcus mutans* はう蝕の主要な病原体であることが知られているが, 近年感染性心内膜炎, 特に脳出血を引き起こす原因細菌であることが注目されている。この発症に関わる因子としてコラーゲン結合アドヘジン (Cnm) が挙げられる。Cnm を保有する *S. mutans* は 20% 程度といわれ, こうした *S. mutans* を口腔内に保菌すると脳出血などの全身疾患のリスクとなることが明らかとされた。今回研究室保有 *S. mutans* Cnm 保有株において遺伝子多様性と, 遺伝子配列の違いがコラーゲン結合能に影響を及ぼしているかについて検討した。【方法】*S. mutans* 46 株の Cnm 陽性株の *cnm* とその上流領域の遺伝子配列を決定した。コラーゲン結合能は, I 型コラーゲンを固相化した plate に生菌を作用させることで検討を行った。Cnm 領域内の違いが認められる配列は, 遺伝子配列を置換した変異株を作製してそのコラーゲン結合能への影響について検討した。【結果・考察】Cnm 陽性 46 株のうち 2 株でコラーゲンへの結合を示さない株が認められた。これらは *cnm* 内の DNA 挿入および欠失によるフレームシフトが原因であった。また変異を解消した置換株ではコラーゲン結合能が回復したことから, 制御因子等他の因子は関与していないことが推測された。Cnm 内のコラーゲン結合ドメイン 遺伝子配列は, 2 つのクラスターに分けることが出来たものの, その結合能, リピート配列の量には差が認められなかった。一方で血清型別の比較および *cnm* 上流領域の遺伝子配列の解析から, クラスター 2 に属する株はゲノム安定性が保持されている可能性が示唆された。

DP1-01-16/P2-008

Development of multiplex PCR for virulence-associated genes in *Bacillus cereus sensu lato*

○岡本 陽 (愛教大・養教)

○Akira Okamoto (Sch. Health Sciences, Aichi Univ. Edu.)

Background: Several species belonging to the genus *Bacillus* are pathogens to organisms, including humans. Although microbiological, biochemical, or molecular methods have been developed, the phylogenetic classification results of pathogenic isolates may sometimes be misidentified. Several genes have been noted as virulence factors of *B. cereus*, but there is no consensus on a toxin that makes the isolate harmful. In order to assess the pathogenicity of isolates, it is necessary to know what genetic patterns are possessed. We developed a multiplex PCR to five genes, *hbl*, *nhe*, *panC*, *cytK*, and *ces*, to quickly evaluate pathogenicity.

Methods: Primer pairs for PCR targeting each toxin gene were prepared to detect the *hbl*, *panC*, and *cytK* inheritance concerning previous studies. In addition, considering the interference of mobility in electrophoresis and the Tm value, we designed primer pairs to detect the *nheC* and the *ces* genes. Strains already known to harbor these genes were used as a positive control of the multiplex PCR method.

Results: It was confirmed that the gene patterns were detected by electrophoresis using each strain as a template. Based on this study, we will detect the gene patterns of *Bacillus* sp. isolated from various environments, including clinical settings, to efficiently screen environments inhabited by potential pathogens and conduct potential risk assessments.

DP1-01-17/P1-009

Drug Resistance and Molecular Typing of *Campylobacter* Associated with Food Poisoning in Saitama

○古山 裕樹, 久保川 竣介, 八木 耕太郎, 荒島 麻美, 貫洞 里美, 土井 りえ, 成澤 かずみ (埼玉衛研・食品微生物)

○Yuki Koyama, Shunsuke Kubokawa, Kotaro Yagi, Asami Arashima, Satomi Kando, Rie Doi, Kazumi Narisawa (Dept. Food Microbiol., Saitama Inst. Pub. Health)

There is little information on drug resistance and molecular epidemiology of *Campylobacter* associated with food poisoning in Japan. In this study, we analyzed their characteristics of *Campylobacter* isolated in Saitama, Japan. A total of 150 *C. jejuni* and 20 *C. coli* strains isolated from stool specimens of food poisoning patients were tested for susceptibility to erythromycin (EM), tetracycline (TC), and quinolones (nalidixic acid (NA), ciprofloxacin (CPFX), norfloxacin (NFLX), and ofloxacin (OFLX)). Of the strains tested for drug susceptibility, 38 *C. jejuni* and 20 *C. coli* strains were typed by MLST. The results showed that 26% of *C. jejuni* strains were resistant to TC, 46% to quinolones, and none were resistant to EM, whereas 60% of *C. coli* were resistant to TC, 50% to quinolones, and 25% to EM. For MLST, *C. jejuni* were classified into 20 sequence types (STs) and nine clonal complexes (CCs). ST-4526 was the most common type, and all strains of this ST were resistant to quinolones. In *C. coli*, they were classified as one CC despite the identification of 14 STs. The drug resistance profiles of *C. jejuni* and *C. coli* were similar to those of previous studies. The distribution of ST in *C. jejuni* seems to be unique to Japan, as ST-4526 has been isolated only in Japan so far. In addition, it was suggested that quinolone resistance is highly conserved in ST-4526.

DP1-01-18/P1-010

Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. in bats in Japan

○及能 和輝¹, 西里 美優香¹, 胡 蔚殷¹, 光永 早紀¹, 村上 崇史², 小藪 大輔³, 高野 愛⁴, 小泉 信夫⁵, 下田 宙¹, 早坂 大輔¹ (1)山口大・獣・獣医微生物, (2)美祿市・文化財保護課, (3)筑波大・プレジジョンメディスン開発研究センター, (4)山口大・獣・獣医疫学, (5)感染研・細菌第一)

○Kazuki Kiuno¹, Miyuka Nishizato¹, Weuyin Hu¹, Saki Mitsunaga¹, Takashi Murakami², Daisuke Koyabu³, Ai Takano⁴, Nobuo Koizumi⁵, Hiroshi Shimoda¹, Daisuke Hayasaka¹ (1)Dept. Micro., Vet. Med., Yamaguchi Univ., (2)Div. Cultural Properties Protection, Mine City, (3)Dept. Precision Medicine, Res and Dev. Ctr., Tsukuba Univ., (4)Dept. Epi., Vet. Med., Yamaguchi Univ., (5)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

Leptospirosis is a prevalent zoonosis having a broad host range. Although bats are known to be one of the reservoirs of pathogenic *Leptospira* spp., there are no report on the detection of *Leptospira* spp. from bats in Japan. In this study, the prevalence and genetic diversity of bat *Leptospira* spp. in bats were investigated. Kidney tissue samples were collected from five species of bats, 37 *Rhinolophus ferrumequinum* (Rf), 6 *R. cornutus* (Rc), 37 *Miniopterus schreibersii* (Ms), and 15 *Myotis macrodactylus* (Mm) in Yamaguchi and 19 *Vespertilio sinensis* (Vs) in Hokkaido, during 2021 to 2023. PCR were performed based on the lipL32 and 16s rRNA genes, followed by multi-locus sequence typing (MLST) on positive samples. Nucleotide sequences of the amplicons were determined by direct sequencing, and phylogenetic analysis were performed. As a result, the prevalence of *Leptospira* spp. was 2.7%, 33.3%, 16.2%, 73.3%, and 11.1% in Rf, Rc, Ms, Mm, and Vs, respectively. Most of the genes determined were novel alleles. Phylogenetic analysis demonstrated that the concatenated sequences from 2 Mm were clustered with *L. kirshneri* closely related to the one detected from *Myotis* spp. in China. This is the first report on pathogenic *Leptospira* spp. detected from bats in Japan. Further analysis is required to determine their pathogenicity and transmission cycle to assess the risk of human infection.

DP1-01-19/P1-011

分子疫学解析による富山県内のレジオネラ症患者の実態把握と感染源調査

○金谷 潤一, 磯部 順子, 木全 恵子, 池田 佳歩, 齋藤 和輝, 前西 絵美, 大石 和徳 (富山衛研・細菌)

Molecular epidemiological analysis of Legionnaires' disease in Toyama Prefecture, Japan

○Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Keiko Kimata, Kaho Ikeda, Kazuki Saito, Emi Maenishi, Kazunori Oishi (Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health)

【目的】レジオネラ症の原因菌であるレジオネラ属菌は、土壌、河川などの自然環境だけでなく、公衆浴場、冷却塔などの人工環境にも広く分布している。本研究では、積極的な喀痰培養検査によってレジオネラ症患者の実態を把握し、患者や環境中から分離したレジオネラ属菌の遺伝子解析を行って、患者の感染源について精査した。【方法】レジオネラ症患者（疑い症例を含む）の呼吸器検体から培養検査を実施し、レジオネラ属菌を分離した。レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1 (Lp1) については SBT 法による遺伝子型別、一部はドラフトゲノム配列による系統解析も実施した。【結果及び考察】レジオネラ症と診断された患者喀痰 65/177 検体 (36.8%) から Lp1 が分離された。また、尿中抗原陰性のレジオネラ症疑い患者の喀痰 2/24 検体 (8.3%) から Lp2 が分離され、尿中抗原検査では診断できない潜在的なレジオネラ症患者の存在が示唆された。SBT 法による Lp1 の遺伝子型別の結果、ST502、ST505 の Lp1 は、入浴施設から多く検出されており、これらが分離された患者は入浴施設で感染したことが示唆された。一方、ST23、ST120 は土壌や水たまりなどからも分離されたため、これらの自然環境も患者の感染源となりうる環境要因であることが明らかとなった。また、上記の 4 遺伝子型の菌についてドラフトゲノム配列による系統解析を実施した結果、同一事例で分離された患者および患者が利用した入浴施設等環境由来の株は、それぞれ互いに近縁な系統であり、疫学調査の結果を反映していた。本研究で検討した全ゲノム配列による系統解析は、今後、より高精度な型別法として感染源調査に活用できると考えられた。

DP1-02-01/P1-049

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¹, 村瀬 良朗¹, 近松 絹代¹, 山田 博之¹, 青野 昭男¹, 五十嵐 ゆり子¹, 高木 明子¹, 御手洗 聡^{1,2} (1)結研・抗酸菌, (2)長崎大院・医歯薬・基礎抗酸菌症)

Serum albumin promotes reactivation of VBNC (viable but non-culturable) *Mycobacterium tuberculosis*

○Yuta Morishige¹, Yoshiro Murase¹, Kinuyo Chikamatsu¹, Hiroyuki Yamada¹, Akio Aono¹, Yuri Igarashi¹, Akiko Takaki¹, Satoshi Mitarai^{1,2} (1)Dept. Mycobac. Ref. Res., Res. Inst. Tubercul., JATA, (2)Dept. Basic Mycobacteriol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

【背景・目的】VBNC を含む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 を用いる方法 (Yeware et al. 2019) を応用して VBNC 状態へ誘導した結核菌 H37Rv 株を、0.1% 血清アルブミンを含む Dubos 培地に 1/10 量接種し、37°C で 20 日間 5% CO₂ 培養し、コロニー形成能 (CFU/mL) を指標として再活性化能を調べた。血清アルブミンは、市販品の複数動物種を使用した。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、Adenylyl cyclase 阻害薬 SQ22536 及び Ser/Thr キナーゼ阻害薬 H89, Staurosporine, 同キナーゼ阻害活性を有する抗悪性腫瘍薬 Mitoxantrone 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 10² 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 10⁷⁻⁸ CFU/mL に増加した。興味深いことに、血清アルブミンの再活性化促進効果は動物種によって異なり、マウス及びラット血清アルブミン、卵白アルブミンでは認められなかった。また、血清アルブミンによる再活性化は Ser/Thr キナーゼ阻害薬および Mitoxantrone で阻害された。

【考察】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。また、血清アルブミンの構造的差異が再活性化に影響す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。

DP1-02-02/P1-050

Malate dehydrogenase and malate: quinone oxidoreductase works as NADH oxidation system in *C. jejuni*

○カボンゴ オーガスティン^{1,2}, Rajib Acharjee^{1,2}, Sakura Takaya^{1,2}, Ozan Gundogdu⁴, Tomoo Shiba³, Kiyoshi Kita⁵, Daniel Ken Inaoka^{1,2} (1Dept. Glob. Health, Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., 2Dept. Mol. Infect. Dyn., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., 3Grad. Sch. Sc. Tech., Kyoto Inst. Techn., 4London Sch. Hyg. Trop. Med., 5Dept. Host Defens. Biochem., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

○Augustin Kabongo^{1,2}, Rajib Acharjee^{1,2}, Sakura Takaya^{1,2}, Ozan Gundogdu⁴, Tomoo Shiba³, Kiyoshi Kita⁵, Daniel Ken Inaoka^{1,2} (1Dept. Glob. Health, Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., 2Dept. Mol. Infect. Dyn., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., 3Grad. Sch. Sc. Tech., Kyoto Inst. Techn., 4London Sch. Hyg. Trop. Med., 5Dept. Host Defens. Biochem., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

Campylobacter jejuni possesses a complex and highly branched electron transport chain (ETC) which is characterized by the absence of the classic NADH dehydrogenases of type 1 and 2. Therefore, the mechanism of NADH oxidation remains unclear in this pathogen. However, the genes of malate dehydrogenase (CjMDH) and malate: quinone oxidoreductase (CjMQO), two enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA), are conserved in the genome of *C. jejuni*. The CjMQO catalyzes the oxidation of malate to oxaloacetate and reduces the quinone pool in the ETC while the CjMDH reversibly catalyzes the oxidation of malate to oxaloacetate. The co-presence of both enzymes could potentially be redundant or play a specific function such as an alternative NADH oxidation system. This study is undertaken to verify the later hypothesis and provide the first biochemical characteristics of these two enzymes. Thus, CjMQO and CjMDH were purified in their active form as recombinant proteins and the first report of their biochemical features is provided in this study. The reconstitution of NADH oxidation in vitro was successful using purified CjMQO and CjMDH. Moreover, the CjMDH and CjMQO were found to be active in the lysate of *C. jejuni*. Interestingly, the malate-dependent NADH oxidation was detected in the lysate of *C. jejuni* which suggests that both enzymes could act as NADH oxidation systems in vivo.

DP1-02-03/P1-051

Tolerance to oxidative stress by sulfide; quinone oxidoreductase in *Mycobacterium smegmatis*

○松尾 祐一¹, 志波 智夫², 伊豫田 健次², 中井 宇智², 太田 明菜², 北 潔^{3,4}, 稲岡 健久^{3,5} (1熊本大院・生命科学研究所・生体情報解析学, 2京都工芸繊維大・工学部・応用生物学, 3長崎大院・熱帯医学グローバルヘルス研究科, 4長崎大・熱帯医学研究所・感染生化学, 5長崎大・熱帯医学研究所・感染分子ダイナミクス)

○Yuichi Matsuo¹, Tomoo Shiba², Kenji Iyoda², Uta Nakai², Akina Ota², Kiyoshi Kita^{3,4}, Daniel Ken Inaoka^{3,5} (1Dept. Health Sciences, Sch. Med., Kumamoto Univ., 2Dept. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., 3Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., 4Dept. Host-Defense Biochem., Inst. of Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ., 5Dept. Molecular Infection Dynamics, Inst. of Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ.)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the etiological agent of tuberculosis, is an extremely successful pathogen that adapts to survive within the host. Hydrogen sulfide enhances the growth of Mtb by activating oxygen respiration via sulfide; quinone oxidoreductase (SQOR). However, the biochemical features of MtbSQOR are unclear. In this study, enzyme kinetics and crystal structure of MtbSQOR were revealed by using recombinant MtbSQOR. In Proteobacteria, SQOR utilizes hydrogen sulfide, quinone, and sulfur acceptor as a substrate, and flavin adenine dinucleotide as a cofactor for electron transfer. However, the sulfur acceptor was unnecessary for MtbSQOR. And MtbSQOR structure at 2.18 Å demonstrated the active center, consisting of two cysteine residues, Cys-160 and Cys-338. Moreover, ¹⁶⁰Cys-S-S₄-S-³³⁸Cys bridge was confirmed by cocrystallization with hydrogen sulfide and ubiquinone-1. These results suggest that MtbSQOR may produce cyclo-octasulfur by polysulfide of cysteine. Understanding a physiological function of MtbSQOR, it was overexpressed in *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) lacking SQOR, evaluating the tolerance of oxidative stress by hydrogen peroxide. MtbSQOR contributed to resistance to oxidative stress in *M. smegmatis*. In conclusion, Mtb may produce cyclo-octasulfur as a sulfur product and resist oxidative stress in phagosome by SQOR.

DP1-02-04/P2-048

Exploring novel metabolism of modified nucleosides in bacteria

○西口 葉生^{1,2}, 永芳 友^{1,2}, 山村 遼介^{1,2}, 富澤 一仁¹ (1熊本大・医・分子生理, 2熊本病院・腎臓内科)

○Kayo Nishiguchi^{1,2}, Yu Nagayoshi^{1,2}, Ryosuke Yamamura^{1,2}, Kazuhito Tomizawa¹ (1Dept. Mol. Physiol., Fac. Life. Sci., Kumamoto Univ., 2Dept. Nephrol., Fac. Life. Sci., Kumamoto Univ.)

RNA modification contribute to the stability of RNA structure and translational efficiency. Modified RNAs are finally degraded to nucleosides, and the modified nucleosides are excreted outside the cell. In addition, certain modifications are species-specific, and there are differences between bacteria and mammals. In this study, we focused on modified nucleoside profiling induced by co-culture experiments of bacteria and cultured cells. First, we performed co-cultured experiments using *E. coli* and THP-1 cells. LC-MS analysis in the culture medium revealed a novel metabolite under the same mass as methyladenosine. We also performed same experiments using other 23 pathogenic bacterial species. The metabolites was not detected in co-cultures of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus caprae*. We hypothesized that RNA modification enzymes are involved in the appearance of new metabolites. We examined the RNA modification profiling of the two strains. The results showed that the bacterial-specific RNA modification 2-methyladenosine (m2A) was absent in the two strains. From this result, We performed co-culture experiments using RlmN, the m2A modification enzyme, deficient *E. coli*. The new metabolite did not detect from this co-culture medium. These results suggest that RlmN, a bacterial-specific RNA modification enzyme, is involved in the appearance of new metabolites.

DP1-02-05/P2-049

生物種横断的な環化超硫黄分子の生成および生理機能の解明

○松永 哲郎¹, Uladzimir Barayeu¹, 清水 隆之², 守田 匡伸¹, 緒方 星陵¹, Minkyung Jung¹, 増田 真二³, 吉沢 道人⁴, 本橋 ぼつみ⁵, 赤池 孝章¹ (1東北大・院医・環境医学, 2奈良女子大・自然科学・生物科学, 3東工大・生命理工, 4東工大・化生研, 5東北大・院医・医化学)

Generation and physiological functions of cyclo-octasulfur conserved from bacteria to mammals

○Tetsuro Matsunaga¹, Uladzimir Barayeu¹, Takayuki Shimizu², Masanobu Morita¹, Seiryu Ogata¹, Minkyung Jung¹, Shinji Masuda³, Michito Yoshizawa⁴, Hozumi Motohashi⁵, Takaaki Akaike¹ (1Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., 2Fac. Div. Nat. Sci., Biol. Sci. Res. Group, Nara Women's Univ., 3Sch. Life Sci. & Tech., Tokyo Tech, 4Lab. Chem. Life Sci., Inst. Innov. Res., Tokyo Inst. Tech., 5Dept. Med. Biochem., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】我々は、硫黄原子が連鎖・重合（カテナーション）した超硫黄分子種が生体内で豊富に生成され、硫黄酸化酵素である sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) を介して硫黄呼吸など多様な生理機能を発揮することを明らかにしてきた。本研究では、未だ不明な点が残されている硫黄依存型エネルギー代謝の分子メカニズムの詳細な解析、および、環化超硫黄分子（cyclo-octasulfur, S₈）に着目した解析を行った。

【方法・結果】単離ミトコンドリアを用いた硫黄呼吸の可視化・定量解析法を独自に開発し、超硫黄分子による膜電位形成を精度よく定量解析した。その結果、マウス胎児線維芽細胞（MEF）の単離ミトコンドリアにおける膜電位形成が、硫黄ドナー（NaHS および Na₂S₂）の添加により増加し、SQR 依存的であった。一方、超硫黄 S₈ を効率良く捕捉する分子カプセルを用いた質量分析により、硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* および *Allochromatium vinosum* の菌体内で生成する S₈ が検出され、HEK293T 細胞では硫黄細菌に匹敵する高いレベルの S₈ 生成が示された。さらに、シングルミトコンドリア解析により、分子カプセルを添加した直後に HEK293T のミトコンドリア膜電位が著しく消失した。

【考察】本研究において開発した単一ミトコンドリア機能解析システムを用いて、超硫黄分子に依存したミトコンドリアの膜電位形成を精度良く定量分析することで、真核生物の酸素呼吸が、実際は、超硫黄分子と酸素分子によるハイブリッド型のエネルギー代謝であることが示唆された。

DP1-02-06/P2-050

NADPH オキシダーゼおよび一酸化窒素合成酵素を介した超硫黄分子活性化と宿主防御機構

○守田 匡伸¹, 高田 剛¹, 松永 哲郎¹, 井田 智章¹, Minkyung Jung¹, 土屋 幸弘², 渡邊 泰男², 本橋 ほづみ³, 住本 英樹⁴, 赤池 孝章¹ (1東北大院・医・環境医学, 2昭和薬大・薬理学, 3東北大・加齢医学・遺伝子発現制御, 4九州大院・医・生化学)

Supersulfide activation and host defense through NADPH oxidase and NO synthase

○Masanobu Morita¹, Tsuyoshi Takata¹, Tetsuro Matsunaga¹, Tomoaki Ida¹, Minkyung Jung¹, Yukihiko Tsuchiya², Yasuo Watanabe², Hozumi Motohashi³, Hideki Sumimoto⁴, Takaaki Akaike¹ (1Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., 2Dept. Pharm., Showa Pharm. Univ., 3Dept. Gene Exp. Reg., IDAC, Tohoku Univ., 4Dept. 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。これは 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宿主防御機能の解明を目指した。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, 硫黄代謝物を網羅的に解析した結果, 酵素発現に依存してグルタチオンパーサルフィド (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, 連結した硫黄から閉環した八硫黄 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へのネズミチフス菌 (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宿主防御機能を発揮していることが示唆された。

DP1-02-07/P1-052

The Role of Morphological Adaptability in *Vibrio cholerae*'s Motility and Pathogenicity

○許 駿¹, 阿部 圭吾², 児玉 年央³, Marzia Sultana⁴, 久場 恵梨香¹, 角田 志悠¹, 中村 修一², 山城 哲¹ (1琉球大・医・細菌, 2東北大・工・応用物理, 3長崎大・医・熱研, 4Infectious Diseases Division, ICDDR, B.)

○Jun Xu¹, Keigo Abe², Toshio Kodama³, Marzia Sultana⁴, Erika Kuba¹, Shiyu Tsunoda¹, Shuichi Nakamura², Tetsu Yamashiro¹ (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, 2Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 3NEKKEN, Grad. Sch. Med., Nagasaki Univ., 4Infectious Diseases Division, ICDDR, B.)

Vibrio cholerae, the causative agent of cholera, is known for its remarkable adaptability, a crucial factor in its pathogenicity and impact on global health. This study aims to understand the morphological adaptability of *V. cholerae*, focusing on the differences in motility and pathogenicity between its filamentous and comma-shaped forms in diverse viscosity environments. Utilizing the *V. cholerae* O1 El Tor strain, we induced filamentous transformation and conducted a comparative analysis with its native form. Our methods included measuring movement patterns, swimming speeds, rotation rates, kinematics, and reversal frequencies, utilizing dark-field microscopy and high-speed imaging techniques. Our results show that filamentous *V. cholerae* maintains enhanced motility in viscous environments despite a reduction in swimming speed, suggesting an evolutionary adaptation for survival in varied habitats, including the human gastrointestinal tract. Notably, filamentous cells exhibited frequent reversal behavior at mucin borders, potentially aiding in mucus layer penetration. These insights into *V. cholerae*'s morphological flexibility in response to environmental viscosity emphasize the bacterium's complex survival and infection strategies, offering crucial information for understanding cholera dynamics and developing effective control strategies.

DP1-02-08/P1-053

Distinct roles of sheath proteins in coiling and rigidity reinforcement of *Leptospira* flagella

○小泉 信夫¹, 川本 晃大², 栗林 稔樹³, 森田 昌知¹, 中村 修一³ (1感染研・細菌第一, 2阪大・蛋白研, 3東北大院・応用物理)

○Nobuo Koizumi¹, Akihiro Kawamoto², Toshiki Kuribayashi³, Masatomo Morita¹, Shuichi Nakamura³ (1Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., 2IPR, Osaka Univ., 3Dept. Appl. Phys., Tohoku Univ.)

The flagella of *Leptospira* spp. exhibit a coiled shape when isolated, which is indispensable for bending cell ends. Leptospiral flagella are composed of a core filament and a sheath and the sheath contains at least three proteins, FcpA, FcpB, and FlaA. In this study, we addressed the role of each sheath protein in the formation of flagella in *L. biflexa*. Cryo-electron microscopy of flagella isolated from wild type strain showed the localization of the sheath formed by FcpA and FcpB proteins at the outside of the curved flagella. The lack of FlaA2 affected the asymmetric sheath localization of FcpA and FcpB, synthesizing straight flagella isotropically covered by FcpA and FcpB. Therefore, FlaA2 is an essential protein for controlling the localization of FcpA and FcpB and then generating the curve structure of PFs. The asymmetric localization of FcpA in the FcpB-deficient mutant curved the flagella, suggesting that FcpA is a major flagellar coiling protein. Though the FcpB-deficient mutant displayed unbent cell ends, the isolated FcpB-deficient flagella maintained the curvature as much as the wild-type flagella. Linear elastic theory predicted the decrease in stiffness of the FcpB-deficient flagella, suggesting that FcpB likely acts as a wedge to reinforce the stiffness of the flagella.

DP1-02-09/P1-054

Water flow triggers adhesion of gliding bacteria to solid surfaces

○荒木 亘, 上村 直輝, 中根 大介 (電通大・基盤理工)

○Motomu Araki, Naoki Uemura, Daisuke Nakane (Dept. Eng. Sci., UEC)

Many bacteria belonging to the phylum *Bacteroidota*, adhere to and move over surfaces in a process called gliding motility. The gliding motility is unrelated to flagellar or pili, but instead relies on a novel mechanism, where the adhesive protein are propelled along a helical track on the cell surface. However, the physiological role of the gliding motility remains unclear. Here, we constructed a flow chamber connected with a syringe pump to apply a precisely controlled fluid flow, and observed the behaviors of *Flavobacterium johnsoniae*, a standard strain for the research on the gliding motility, under an optical microscopy. The cells adhered to the surface of the chamber efficiently at the flow speed of 100 $\mu\text{m/s}$, and exhibited positive rheotaxis at the cell velocity of 1 $\mu\text{m/s}$ with their longer axis parallel to the flow direction. The cell adhesion was triggered under low nutrient condition, and the surface protein SprB functioned without proton motive force as energy source. The flow-induced surface binding was also observed in another closely related bacterium of *Robiginitalea bififormata*. These results provide insights into the role of gliding motility to seek for optimal growth environments in response to mechanical forces of fluid flow.

DP1-02-10/P1-055

An outer membrane protein governs cell rigidity and swimming stability of *Leptospira interrogans*

○中村 修一¹, 阿部 圭吾¹, 高崎 寛子², 廣瀬 未果², 高部 響介³, 加藤 貴之², 小泉 信夫³ (1東北大・院工, 2阪大・蛋白研, 3感染研・細菌)

○Shuichi Nakamura¹, Keigo Abe¹, Hiroko Takazaki², Mika Hirose², Kyosuke Takabe³, Takayuki Kato², Nobuo Koizumi³ (1Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 2IPR, Osaka Univ., 3Dept. Bacteriol. I, NIID)

Leptospira interrogans is the major pathogen of the worldwide zoonosis leptospirosis and exhibits motility driven by two flagella residing within the periplasmic space of a spiral cell body. *Leptospira* spp. possess many kinds of outer membrane proteins (OMPs). The roles of some OMPs have been investigated, suggesting responsibilities for binding to host cell components and immune evasion, but most have not been unveiled. Here we focused on a prominently abundant OMP LipL32 and examined its deficit effect on *L. interrogans*. The swimming speed of the Δ LipL32 strain was almost the same as the wild type, whereas the long-term diffusive locomotion of Δ LipL32 was limited. A large fluctuation of the cell body angle was observed in the Δ LipL32 swimming. We also found that Δ LipL32 reduces the rigidity of the leptospiral cell body. These results suggest that the cell rigidity of *Leptospira* depends on LipL32 and its loss affects the swimming stability. Despite the pathogen-specific protein, the association of LipL32 with the *Leptospira* pathogenicity has not been elucidated. Environmental leptospires need migration to the host and penetration through complicatedly structured skin dermis. Taken together with the past insights, LipL32-dependent swimming stability and cell rigidity might be involved in the early stages of infection, assisting in confronting difficulties for the spirochetes.

DP1-02-11/P1-056

Correlation between morphological and motile traits indicated by artificial intelligence

○高部 響介¹, 宇川 聡一², 小泉 信夫¹, 中村 修一² (1感染研・細菌一, 2東北大・院工・応物)

○Kyosuke Takabe¹, Souichi Ugawa², Nobuo Koizumi¹, Shuichi Nakamura² (1Dept. Bacteriol. I, NIID, 2Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Leptospira spp. are members of spirochetes, and the pathogenic species cause leptospirosis. It is believed that the motility of *Leptospira* spp., mainly 'crawling', is involved in the accomplishment of infection, but its practical role as a virulence factor remains unclear. During crawling, individual cells exhibit diverse morphological traits e.g., cell length, cell end curvature, etc. A deeper understanding of the crawling mechanism will extend our countermeasures for infectious disease. However, technical difficulties of quantitative measurements of the complicated motility in a high throughput manner have hampered elucidating the crawling dynamics. Here, we applied artificial intelligence (AI) to quantitative characterization of the shape and motility of crawling leptospires in combination with high-speed live imaging. Our model trained with dark-field microscopic images of leptospires detected crawling cells from the observed populations with high accuracy, enabling us to automatically measure morphological and motile traits of multiple cells at the single-cell level. Principal component analysis indicated that the crawling ability seemed to be a positive correlation, although rather weak, especially with the cell length. We are convinced that our method will accelerate bacterial motility studies and shed lights on underlying principles in the propulsive force generation.

DP1-02-12/P2-051

Investigation of cell motility mechanism of *Spiroplasma* using a minimal synthetic bacterium

○木山 花¹, 柿澤 茂行², 高橋 大地^{1,3}, 宮田 真人^{1,4} (1大阪公大・院理, 2産総研・生物プロセス, 3岡山大・異分野基礎科学, 4大阪公大・複合先端)

○Hana Kiyama¹, Shigeyuki Kakizawa², Daichi Takahashi^{1,3}, Makoto Miyata^{1,4} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2Bioproduction Res. Inst., AIST, 3Res. Inst. Interdisciplinary Sci., Okayama Univ., 4OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

Wall-less helical bacteria *Spiroplasma* are parasitic bacteria that infect plants and arthropods, and are widely distributed globally. *Spiroplasma* exhibits a unique swimming motility by alternately switching between left- and right-handed helices of the cell using an intracellular ribbon structure containing five types of bacterial actin, MreBs (MreB1–5). Our previous study using a minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B revealed that co-expression of two different bacterial actins, MreB4–MreB5, reconstructs the swimming motility. However, the mechanism by which the two MreBs drive motility remained unclear. In this study, to discuss relation between the two MreBs and their individual roles, various mutations were introduced into MreB and expressed in JCVI-syn3B. We analyzed helix formation, handedness, and switching behavior of JCVI-syn3B expressing MreB5–MreB4 using optical microscopy. The results suggest the following three points. 1) ATPase activities of both MreB4 and MreB5 are important for switching helicity from right- to left-handed. 2) C-terminal region of MreB5, which is involved in membrane binding, is important for helix formation. 3) The hydrophobic core of domain IA of MreB5 is responsible for the formation of stable right-handed helices.

Based on these results, we propose a model for the swimming mechanism in which MreB4 changes the filament structure of MreB5.

DP1-02-13/P2-052

Sheet-like structure of bacterial actin MreBs driving helicity switching by cryo electron tomography

○湯浅 永¹, 笹嶋 雄也¹, 木山 花¹, 高橋 大地^{1,2}, 豊永 拓真^{1,3}, 宮田 知子^{4,5}, 牧野 文信^{4,5,6}, 難波 啓一^{4,5}, 宮田 真人^{1,3} (1大阪公大・院理, 2岡山大・異分野基礎, 3大阪公大・複合先端, 4阪大・生命機能, 5阪大・日本電子 YOKOGUSHI 協働研究所, 6日本電子株式会社)

○Haruka Yuasa¹, Yuya Sasajima¹, Hana Kiyama¹, Daichi Takahashi^{1,2}, Takuma Toyonaga^{1,3}, Tomoko Miyata^{4,5}, Fumiaki Makino^{4,5,6}, Keiichi Namba^{4,5}, Makoto Miyata^{1,3} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2RIIS, Okayama Univ., 3OCARINA, Osaka Metropolitan Univ., 4Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., 5JEOL YOKOGUSHI Res. Alliance Lab., Osaka Univ., 6JEOL Ltd.)

Spiroplasma are parasitic bacteria that infect arthropods and plants. They exhibit a unique swimming behavior in viscous liquids by switching handedness of their helical cells. Previously, our group reconstituted the helicity switching swimming in a nonmotile minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B (syn3B) by expressing MreB4 and MreB5. Here, we performed cryo-electron tomography to visualize the MreB filaments reconstituted in syn3B, which is advantageous for observation of internal structures because of the cell thickness. Syn3B cells expressing MreB showed a various morphology, we focused on a strain expressing an ATPase-deficient mutant of MreB4 and the wild-type MreB5, which showed high proportion of helical cells. Sheet-like structures composed of 6 to 10 protofilaments aligned underneath the cell membrane. The sheet-structure was partially double-layered. A strain only expressing the wild-type MreB5 showed sheet-like structure as well.

DP1-02-14/P2-053***Haloplasma* motility reconstituted in minimal synthetic bacterium, JCVI-syn3B**

○三村 萌音¹, 木山 花¹, 加藤 真悟², 笹嶋 雄也¹, 上野山 敦子¹, 柿澤 茂行³, 宮田 知子⁴, 牧野 文信⁴, 難波 啓一⁴, 宮田 真人^{1,5} (大阪公大・院理, ²理研・BRC・JCM, ³産総研・生物プロセス, ⁴大阪大・院理・生命機能, ⁵大阪公大・複合先端)

○Mone Mimura¹, Hana Kiyama¹, Shingo Kato², Yuya Sasajima¹, Atsuko Uenoyama¹, Shigeyuki Kakizawa³, Tomoko Miyata⁴, Fumiaki Makino⁴, Keiichi Namba⁴, Makoto Miyata^{1,5} (Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²RIKEN BRC., JCM, ³Bioproduction Res. Inst., AIST, ⁴Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ⁵OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

MreB is a bacterial actin protein that serves as a scaffold for peptidoglycan synthesis. However, *Spiroplasma*, parasitic bacteria lacking the cell wall, have five types of MreB and swim by switching their helicity between left and right. Previously, our group reconstructed *Spiroplasma* swimming in JCVI-syn3B (Syn3B), a spherical, non-motile minimal synthetic bacterium, by expressing pair of MreB. In this study, we focus on a deep sea bacterium, *Haloplasma contractile* which positions phylogenetically close to walled bacteria in wall less class Mollicutes including *Spiroplasma*. *Haloplasma* have 7 MreB homologs named HMreBs 1~7, which are related distantly to *Spiroplasma* MreBs. We succeeded in reconstructing *Haloplasma* like coiling motility by expressing all 7 HMreBs in Syn3B. The Syn3B cell formed coils along the long axis of the cell, distinct from *Spiroplasma* swimming. Sequence analysis revealed that HMreBs can be categorized into three phylogenetic groups. We found that the expression of HMreB pairs from different groups gives rise to motility in Syn3B. These results suggest that *Haloplasma* motility was generated by differentiation and combination of two MreB proteins.

DP1-02-15/P2-054**Stator dynamics of hybrid-fuel *E. coli* flagellar motor observed by fluorescence microscopy**

○庄司 智哉¹, 日高 直樹², 蔡 荣淑³, 曾和 義幸^{1,2} (法政大・生命・生命機能, ²法政大・ナノテク, ³大阪大・院生命機能)

○Tomoya Shoji¹, Naoki Hidaka², Yong-Suk Che³, Yoshiyuki Sowa^{1,2} (Dep. Front. Biosci., Hosei Univ., ²Micro-Nano Tech., Hosei Univ., ³Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ.)

The bacterial flagellar motor rotates driven by an electrochemical ion gradient across the membrane. It consists of a rotor and multiple ion-conducting stator units. The binding of stator units to a rotor is enhanced by the ion-motive force for the coupling ion and the rotational torque (Fukuoka et al. Ito et al.). The rotational torque, however, is closely related to the ion-motive force; therefore, it is unclear whether coupling ion is directly required for the stator assembly. *E. coli* has an H⁺-driven stator in Nature, and a chimeric stator supports the rotation of an *E. coli* motor driven by Na⁺. When *E. coli* cells express wild-type H⁺- and chimeric Na⁺- stator units, their motor works as a hybrid fuel type. This motor can be driven by both H⁺ and Na⁺ in the presence of Na⁺ and only by H⁺ in the absence of Na⁺. In this study, we attempted to monitor the assembly of GFP-fused chimeric Na⁺ stator units in the motor driven by only H⁺- stator units without Na⁺. We first constructed a GFP-fused chimeric stator and confirmed it disassembled without Na⁺. We then measured the rotation of the *E. coli* cells' motor with H⁺- and GFP-fused Na⁺- stator and confirmed it works as a hybrid-fuel motor. We will discuss the stator dynamics at varying Na⁺ concentrations in functioning motors by combining motor rotation assay and total internal reflection fluorescence microscopy.

DP1-02-16/P2-055**Inner cellular structure of *Mycoplasma mobile* gliding machinery observed by electron cryotomography**

○福島 秀実¹, 宮田 知子^{2,3}, 難波 啓一^{2,3}, 豊永 拓真¹, 宮田 真人^{1,4} (大阪公大・院理, ²大阪大・院生命機能, ³大阪大・日本電子YOKOGUSHI協働研究所, ⁴大阪公大・複合先端研)

○Minoru Fukushima¹, Tomoko Miyata^{2,3}, Keiichi Namba^{2,3}, Takuma Toyonaga¹, Makoto Miyata^{1,4} (Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ³JEOL YOKOGUSHI Res. Alliance Lab., Osaka Univ., ⁴OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

Mycoplasma mobile features a unique gliding machinery located at the cell pole. This machinery comprises both inner and surface structures. The surface structures consist of three proteins, including an adhesion protein. The inner structure is divided into a bell and chains, with the chains anchored to the bell and aligned along the cell membrane. The components of the chain are gliding motors and spacers. The gliding motor is a complex which evolved from the F-type ATP synthase and generates gliding force through the hydrolyzation of ATP. Previous reports indicated that the chains form a sheet by linking adjacent ones, and the spacer is a cylindrical structure with a 6 nm diameter and 13 nm height, extending vertically to the cell membrane. The formation of the sheet, which supports the membrane, is believed to maintain the shape of the wall-less *M. mobile*. In the present study, we employed electron cryotomography for a detailed observation of the machinery. Our findings reveal that the spacer also extends 24 nm horizontally toward the cell membrane. Overlaying the chain structure with the previously observed sheet structure suggests that the spacer is involved in linking adjacent chains. Furthermore, the spacer may play a role in anchoring the chain to the cell membrane. We will discuss about construction of the machinery, focusing on connection of each complex.

DP1-02-17/P2-056**Visualization and analysis of MreBs driving *Spiroplasma* motility in minimal synthetic bacterium**

○田中 芳樹¹, 木山 花¹, 豊永 拓真^{1,2}, 宮田 真人^{1,2} (大阪公大・院理, ²大阪公大・複合先端)

○Yoshiki Tanaka¹, Hana Kiyama¹, Takuma Toyonaga^{1,2}, Makoto Miyata^{1,2} (Grad. Sch. Sci., Osaka Metro Univ., ²OCARINA, Osaka Metro Univ.)

Spiroplasma, parasitic bacteria, swim by switching the handedness of their helical cell body. Previously, our group reconstituted this motility in JCVI-syn3B, a minimal synthetic bacterium, by expressing bacterial actin proteins MreB4 and MreB5, two of the five MreBs involved in *Spiroplasma* swimming (Kiyama H et al., Sci Adv 2022). Fluorescence observation of mCherry-fused MreB5 in live cells suggested that MreB5 forms relatively stable filaments. On the other hand, fluorescent labeling at 16 locations of MreB4 did not result in motile strains, suggesting stringent structural constraints on MreB4's function. We also discussed the function of MreB through the changes in cell motility by the addition of the MreB polymerization inhibitor A22. Single residue substitution known to confer A22 resistance in other bacteria, was introduced in MreB4, to limit the effect of A22 solely on MreB5. The construct showed cells with reduced helicity and motility even in the presence of A22, while the WT exhibited stalling and straightening, suggesting that de novo MreB5 polymerization might not be necessary for the motility. In order to trace behavior of MreB5 molecules, Halo-Tag was inserted at the same position with the mCherry fusion and observed by TIRF microscopy. Fluorescent particles were observed to travel along the cell axis in cells with reduced movement and shorter helical pitch.

DP1-03-01/P1-031

Reactivity of autologous serum IgG to gut microbes in pediatric ulcerative colitis patients

○Tabassum Nafisa¹, 今大路 治¹, 近藤 健夫², 近藤 園子², Emmanuel Munyeshyaka¹, 多田 彩乃¹, 日下 隆², 桑原 知巳¹ (1香大・医・分子微生物, 2香大・医・小児科)

○Tabassum Nafisa¹, Haruyuki Imaohji¹, Takeo Kondo², Sonoko Kondo², Emmanuel Munyeshyaka¹, Ayano Tada¹, Takashi Kusaka², Tomomi Kuwahara¹ (1Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., 2Dept. Pediatr., Sch. Med., Kagawa Univ.)

Ulcerative colitis (UC) is caused by excessive immune response to gut microbiota. IgG-coated gut bacteria increase with disease severity, while no change in the abundance of IgA-coated bacteria. However, the role of IgG-coated bacteria in the disease activity remains to be elucidated.

Serum and colonoscopic lavage fluids were collected from pediatric UC patients (n=37) including 5 pairs of serum and lavage samples from the individual patients in active and remission stages. *Lactobacillus paracasei* (Lc) and *Escherichia coli* (Ec) were isolated from the lavage fluid. Western blotting was conducted to evaluate the reactivity of serum IgG to microbes-derived proteins or PFA-fixed bacterial cells. The reactivity of Lc-absorbed IgG to the isolated bacteria was also investigated. Activation of the complement pathway by the immune complex formed with serum IgG and Ec or Lc was examined. The study was approved by the Ethical Committees of Kagawa University.

The IgG of UC patients showed high reactivity to *Lactobacillus*, *Enterococcus* and Ec regardless of disease activity. The Lc-absorbed IgG reduced its reactivity to all the bacterial strains. Lc inhibited the complement activation by Ec-IgG immune complex. These results might indicate that Lc nonspecifically traps the IgG recognizing the epitope derived from other bacteria, reducing the inflammatory immune complex formation in the gut.

DP1-03-02/P1-033

Comparative analysis of Legionella symbiosis mechanisms between different protist hosts

○渡邊 健太, 清水 隆, 度会 雅久 (山口大・共同獣医・獣医公衆衛生)

○Kenta Watanabe, Takashi Shimizu, Masahisa Watarai (Dept. Vet Med., Yamaguchi Univ.)

Paramecium and *Tetrahymena* are freshwater ciliates and found widely in environmental water. Their capability as host organisms that maintain other species including *Legionella* in environment has been studied. However, the details of their symbiotic mechanisms are largely unknown. In our previous studies, we have reported a case in which some *Legionella* strains isolated from the environment killed *Paramecium* hosts, preventing a symbiotic relationship. Therefore, when these *Legionella* strains were also examined to infect *Tetrahymena* cells, similar cytotoxicity was observed. In infection experiments with both host cells, the morphological abnormalities of the *Legionella*-containing vacuoles and the time required for the cells to be killed were similar. Although we had identified LefA of *Legionella* as a factor required for cytotoxicity to *Paramecium* hosts, it did not have a function as a cytotoxic factor against *Tetrahymena* hosts. On the other hand, the type IV secretion system (T4SS) was not involved in the cytotoxicity against *Paramecium* hosts, while in *Tetrahymena* hosts, a reduction in cytotoxicity was observed in the infection of the T4SS deletion mutant. In nature environment, *Legionella* may establish various relationships with a wide variety of protist hosts, and it is possible that the mechanisms and factors defining these relationships may also vary among different hosts.

DP1-03-03/P2-031

The inhibition of Staphylococcus aureus by commensal bacterium via its metabolites

○田嶋 亜紀子^{1,2}, 金城 雄樹^{1,2} (1慈恵医大・医・細菌, 2慈恵・バイオフィルム研究センター)

○Akiko Tajima^{1,2}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol. The Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Ctr. Biofilm Sci. & Tech.)

The human skin microbiota plays an essential role in the protection against pathogens, and we hypothesized that commensal bacteria antagonize pathogens by cooperating with host molecules such as free fatty acids (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 unsaturated FFAs. Competitive interaction between species can be due to limiting nutrients or the production of antimicrobial compounds, and the latter were often encoded by biosynthetic gene clusters (BGCs) which are responsible for the production of secondary metabolites involved in microbial interference competition. Genome analysis of this bacterium revealed the presence of several putative BGCs. Using a comparative genomics approach, we found the BGC which absent in the non-inhibitory *Corynebacterium* species genomes. Deletion of this BGC led to loss of inhibitory activity, suggesting that inhibition was due to antimicrobial production. The identified this BGC consists of genes encoding a putative bacteriocin, which belongs to a family of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). These results suggested that commensal *Corynebacterium* sp. inhibit *S. aureus* growth through bacteriocin production.

DP1-03-04/P2-032

Indoor Microbiome: Interactions with Occupants and Environmental Factors in Residential Settings

○侯 建建¹, 中嶋 麻起子^{2,3}, 藤吉 奏^{1,2}, 西内 由紀子¹, 小椋 大輔^{2,4}, 丸山 史人^{1,2} (1広島大・IDEC, 2広島大・CHOBE, 3広島工業大・工・建築工学, 4京大・院・工学)

○Jianjian Hou¹, Makiko Nakajima^{2,3}, So Fujiyoshi^{1,2}, Yukiko Nishiuchi¹, Daisuke Ogura^{2,4}, Fumito Maruyama^{1,2} (1IDEC Inst., Hiroshima Univ., 2CHOBE, Hiroshima Univ., 3Fac. Engineer., Hiroshima Inst. Tech., 4Grad. Sch. Engineer., Kyoto Univ.)

The connection between indoor microbiomes and human health, particularly allergies, is increasingly recognized. This research comprehensively studies microbiota in residential settings, examining bacterial and eukaryotic compositions in air, dust, and water to understand their interactions with occupants and indoor greenery (biotope). In occupied, unoccupied, and biotope-integrated environments, we collected 159 samples from aerosols, dust, and water-related sources. Amplicon sequencing highlighted the diverse microbial presence, illustrating the complex relationship between indoor microbiomes, humans, and greenery. Our analysis reveals that the presence of occupants significantly influences bacterial and eukaryotic communities in dust and water-related samples, albeit not in aerosols. Biotope presence predominantly affects bacterial communities, especially within water-related environments. We identified distinct microbial taxa associated with different residential contexts. Specific pathogen-associated bacteria, fungi, amoeba, and house dust mites were prevalent in certain samples, underscoring potential health implications. Network analysis facilitated the identification of core interactive taxa within these residential ecosystems. The humidity and temperature exhibited varied correlations with microbiota, indicating their role in shaping indoor microbial communities.

DP1-03-05/P2-033

Ingestion of *Campylobacter jejuni* by *Acanthamoeba polyphaga*

北出 真子¹, ○下畑 隆明^{1,2} (1福井県立大・海洋生物資源, 2徳島大・院医歯薬・予防環境栄養)

Mako Kitade¹, ○Takaaki Shimohata^{1,2} (1Marine-Bio, Fukui Prefectural Univ., 2Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch.)

Background: *Campylobacter jejuni* causes human food-borne disease in the world. In *C. jejuni*-infections are associated contaminated food, consumption of undercooked chicken meat, and unchlorinated water. A number of studies have enlightened the role of unicellular eukaryote, particularly free living amoebae (FLA) for survival and dissemination of many water borne pathogenic bacteria. Nevertheless, there is a few experimental reports that examines participation of FLA for the survival and dissemination in *C. jejuni*. Herein, we examined *C. jejuni* internalization and intracellular survival in *Acanthamoeba polyphaga*, a modl of FLA. **Method:** HeLa cells and *A. polyphaga* were incubated with wild type (WT) *C. jejuni* (NCTC11168) or CapA::cmr mutant strain, which deficient internalization factor for HeLa cells. The bacterial internalization and intracellular survival were estimated in 25°C and 37°C by gentamycin protection assay. **Results & Discussion:** WT-*C. jejuni* was internalized in HeLa cell, but CapA::cmr mutant strain decreased in internalization in HeLa cell in 37°C. Those internalization of bacterial cells were abolished in 25°C. On the other hands, internalization level between WT and CapA::cmr mutant strain were similar in *A. polyphaga* in 37°C and 25°C. Those data indicates that *C. jejuni* were internalized in *A. polyphaga* with different mechanisms from epithelial cells.

DP1-03-06/P2-034

Symbiotic bacteria break through narrow passage by flagellar wrapping

吉岡 青葉¹, 菅 哲朗², 竹下 和貴³, 和田 浩史⁴, 菊池 義智⁵, ○中根 大介¹ (1電通大・基盤理工, 2電通大・機械知能, 3秋田県立大・生物資源, 4立命館大・物理, 5産総研・生物プロセス)

Aoba Yoshioka¹, Tetsuo Kan², Kazutaka Takeshita³, Hirofumi Wada⁴, Yoshitomo Kikuchi⁵, ○Daisuke Nakane¹ (1Dept. Eng. Sci., UEC, 2Dept. Mech. Int. Sys. Eng., UEC, 3Fac. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ., 4Dept. Phys., Ritsumeikan Univ., 5Biopro. Res, Inst, AIST)

Narrow environments are frequently encountered in natural settings, such as intra-animal habitats. Despite the prevalence of such environments, research on the bacterial behavior in these confined spaces is limited. Here, we have developed a microfluidic device based on MEMS technology that comprises hundreds of linear passages with 1- μm width in parallel, allowing the movement of a single bacterium in one dimension. We detailed the behavioral patterns of 14 species of *Burkholderia sensu lato* within the device. Essential to the directional movement in the device was the flagellar wrapping around the bacterial cell body. The flagellar wrapping of *Caballeronia insecticola* was directly visualized by *in vivo* live imaging at the limited space in the organ of a bean bug, *Riptortus pedestris*. Mathematical calculations and gene swapping experiments showed that the stiffness of the hook, a soft polymer at the base of each flagellum, is necessary for facilitating mobility within the device and enhancing flagellar wrapping efficiency. The microfluidic device stands as a useful tool for studying host-specific swimming styles of bacteria where spatial limitations act as mechanical stimuli. These findings are valuable for understanding the role and mechanism of motility in both symbiotic and pathogenic bacteria during host infection.

DP1-03-07/P2-035

細菌が産生する揮発性有機化合物による大腸菌の抗菌薬耐性の誘導

○見坂 武彦^{1,2}, 西澤 佳穂², 土居 奈津美² (1摂南大・理工, 2大阪大谷大・薬)

Induction of antibiotic tolerance of *Escherichia coli* by microbial volatile organic compounds

○Takehiko Kenzaka^{1,2}, Kaho Nishizawa², Natsumi Doi² (1Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ., 2Fac. Pharm., Osaka Ohtani Univ.)

真菌や細菌は様々な揮発性物質を産生し、その揮発性物質が他の生物の生育に影響を与える場合がある。本研究では、シトロバクテラ属菌由来の揮発性有機化合物 (MVOC) が細菌の抗菌薬に対する突然変異および耐性に与える影響について検討した。同じ密封容器の中で、*Escherichia coli* および *Citrobacter freundii* をそれぞれ LB 寒天培地で培養したところ、*E. coli* の生菌数は変化することなく、ストレプトマイシン耐性の突然変異頻度は約 10 倍増加した。GC-MS により MVOC 成分を分析したところ、主要成分として 3-メチル-1-ブタノール、ジメチルジスルフィド、5-ジメチルピラジン、フェノールが検出され、ジメチルジスルフィドは約 20 倍変異頻度を増加させる効果があった。また *E. coli* の抗菌薬感受性を調べたところ、*C. freundii* およびジメチルジスルフィド存在下でアミノグリコシド系・ニューキノロン系抗菌薬に対する MIC は有意に増加した一方、影響のない抗菌薬もあった。*E. coli* の RNA-seq 解析の結果、*C. freundii* の存在下では sulfate transport, sulfur metabolism, thiamine biosynthesis 系などに関連した遺伝子発現が低下し、L-leucine biosynthesis, L-arginine degradation I, Arginine transport system, cellular response to hydrogen peroxide などの遺伝子発現が上昇した。これらの結果から特定の MVOC 成分が空間を隔てた状態で細菌の抗菌薬耐性を誘導することがわかった。

DP1-03-08/P2-036

昆虫と植物をまたぐ共生メカニズムの解明に向けた挑戦

○森村 洋行¹, 竹下 和貴², 石神 広太^{1,3}, 松浦 優⁴, Peter Mergaert⁵, 菊池 義智^{1,3} (1産総研・生命プロセス, 2秋田県立大・生物資源・応用生物, 3北大大学院・農学研究院, 4琉大・熱研セ, 5I2BC, CNRS, Paris-Saclay Univ.)

A challenge toward discover of symbiotic mechanism over Insects-Plants

○Hiroyuki Morimura¹, Kazutaka Takeshita², Kota Ishigami^{1,3}, Yu Matsuura⁴, Peter Mergaert⁵, Yoshitomo Kikuchi^{1,3} (1Biopro. Res. Inst., AIST, 2Dept. Biotech., Appl. Biol. Sci., Akita Pref. Univ., 3Grad. Sch. Ag., Hokkaido Univ., 4TBRC, Univ. Ryukyus, 5I2BC, CNRS, Paris-Saclay Univ.)

自然界では多くの動植物が微生物と共生関係を結んでおり、緊密な相互作用を行っている。マメ科植物と根粒菌の共生系はよく知られた例であり、共生細菌が行う窒素固定により宿主植物は大きな利益を得る。また、陸上最大の動物群である昆虫も多様な共生系を発達させており、腸内や特殊な細胞の細胞質内に共生細菌を持ち、それら共生細菌が餌の分解や、餌に不足する栄養素の供給に重要な役割を果たしている。このように動植物に広くみられる微生物共生系であるが、共生メカニズムの共通性や異質性についてはあまり調査されていない。重要害虫として知られるホソヘリカメムシ *Reptortis pedestris* とその近縁カメムシ類は、環境土壌中から *Caballeronia* 共生細菌を獲得し、消化管に発達する袋状組織の内腔に保持する (即ち細胞外共生を行う) ことが知られている。最近我々は、コバネヒョウタンナガカメムシ *Togo hemipterus* が、土から獲得した *Caballeronia* を腸管上皮細胞中に取り込むだけでなく、細胞内共生を行うことを発見した。このようなナガカメムシの共生系は、共生細菌を土から獲得し細胞内共生を行うという点で、よく知られたマメ科植物-根粒菌の共生系と大きな共通性を持つ。今回我々は、ナガカメムシにおける細胞内共生の分子基盤解明に向けて、オミクス解析、変異株スクリーニング、宿主遺伝子の RNAi を行ったところ、面白いことにマメ科植物-根粒菌共生系と共通のメカニズムで昆虫の細胞内共生が成立していることが明らかとなった。本発表ではそのメカニズムの詳細について報告する。

DP1-03-09/P1-037

歯科治療による歯周病寛解後も口腔細菌叢の dysbiosis は残存する
○山和馬, 井口 拓弥, 佐藤 惇志, 堤 康太, 柿澤 恭史 (ライオン (株)・研究開発本部)

Dysbiosis of oral microbiome persists after treatment-induced remission of periodontal disease

○Kazuma Yama, Takuya Inokuchi, Atsushi Sato, Kota Tsutsumi, Yasushi Kakizawa (R&D., Lion Corp.)

【目的】歯周病は細菌感染症であり, 口腔細菌叢の乱れ (dysbiosis) が発症・進行に関わると考えられている。歯科治療後も再発しやすい疾患のため, 治療前後の口腔状態と口腔細菌叢及び代謝物質の関連性を明らかにすることが再発予防に重要と考えた。そこで本研究では, 歯周病罹患患者 (歯周病群) の治療前・治療完了時及びその数か月後の状態を口腔健康者 (健康群) と比較解析する臨床研究を実施した。

【方法】日吉歯科診療所に来院した健康群 22 名, 歯周病群 18 名を対象とした (UMIN000031334)。口腔検査前に唾液検体として洗口吐液を採取し凍結。融解し遠心分離後, 上清を CE-MS による代謝物質分析, 沈殿物を NGS による細菌叢測定に供した。細菌叢測定は細菌の 16S rRNA 遺伝子 V1-2 領域を対象とし各サンプル 10,000 リード取得した。

【結果・考察】歯周病群は, 歯科治療によってプロービング時の出血が減少するなど歯肉の状態が改善し, 治療完了から数か月経過しても状態は悪化しなかったことから, 歯周病は寛解したと考えられた。一方, 口腔細菌叢は寛解後も健康群と有意に異なり, 疾患関連細菌や硝酸塩還元細菌の存在比率も有意に異なった。また, 代謝物質は寛解後も重度歯周炎罹患患者で増加検出報告のあるトレオン酸やヒスチジンの濃度が健康群よりも高く, ピリミジン代謝関連物質にも有意な差が認められた。これら代謝物質の違いは治療後も口腔内に疾患関連細菌が潜むことを反映していると推察される。

【結論】歯科治療による歯周病症状寛解後も, dysbiosis は継続し再発リスクが高い状態にあることが示唆された。歯科治療後の再発リスクを下げるためには, dysbiosis を解消する新たな介入が必要であると考えられる。

DP1-03-10/P1-038

An intestinal mucosa-associated bacterium which attenuates colitis

○楊佳約¹, 尾花 望^{2,3}, 中藤 学⁴, 野村 暢彦³, 福田 真嗣^{1,5} (慶大・先端生命科学研, ²筑波大・医学医療系・TMRC, ³筑波大・生命環境系, ⁴神奈川産技総研, ⁵メタジェン株式会社)

○Jiayue Yang¹, Nozomu Obana^{2,3}, Gaku Nakato⁴, Nobuhiko Nomura³, Shinji Fukuda^{1,5} (Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²TMRC, Inst. Med., Univ. of Tsukuba, ³Inst. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁴KISTEC, ⁵Metagen. Inc.)

Various commensal bacteria inhabit the human intestine. In particular, intestinal mucosal bacteria are reported to affect host health through modulation of host immune system. However, knowledge of mucosa-associated bacteria is limited due to the invasiveness of conventional sampling methods. In this study, we have developed a non-invasive sampling method for mucosa-associated bacteria from stool samples. Through a murine experiment, we found that swab samples of fecal surfaces display a similar microbiome profile as mucosa-associated bacteria. With this method, we found a genus which has few literatures, inhabits the colon mucosal layer. To examine its function, we colonized the type strain to germ-free mice. The colonization of this bacterium greatly improved the survival rate and attenuated the symptoms of colitis in gnotobiotic mice. Metabolome analysis showed that taurine was significantly accumulated in the cecum content of the gnotobiotic mice. Besides, taurine supplementation significantly attenuated colitis. Deconjugation of taurine from conjugated bile acids is the major pathway of taurine production by gut microbes. In vitro assay suggested that this bacterium has high deconjugation ability to produce taurine. It is suggested that the high deconjugation ability of this bacterium contributes to the accumulation of taurine in the cecum and the attenuation of colitis.

DP1-03-11/P1-039

Gut microbiota controls the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

○池田 恵莉¹, 山口 雅也^{1,2,3,4}, 川端 重忠^{1,3} (大阪大・院歯・微生物, ²大阪大・院歯・バイオインフォ, ³大阪大・CiDER, ⁴大阪大・微研・バイオインフォ)

○Eri Ikeda¹, Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Shigetada Kawabata^{1,3} (Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³CiDER, Osaka Univ., ⁴Bioinfo, RIMD, Osaka Univ.)

Gut dysbiosis characterized by an imbalanced microbiota is closely involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Our aim was to investigate the impact of the gut microbiota on susceptibility in a mouse model of ulcerative colitis. We compared the susceptibility to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis of inbred BALB/c mice obtained from the three main distributors of laboratory animals in Japan. Clinical symptoms of the colitis and the faecal microbiota were assessed. The DSS colitis model showed differences in the susceptibility of BALB/c mice from the vendors. Analysis of the gut microbiota using 16S rRNA sequencing revealed clear separation of the gut microbial composition among mice from the vendors. Notably, the abundance of the phylum Actinobacteriota was strongly associated with disease activity. We also observed the expansion of butyrate-producing Roseburia species in mice with decreased susceptibility of the disease. Further cohousing experiments showed that variation in clinical outcomes was more correlated with the gut microbiota than mouse genetic variants among substrains from different suppliers. A BALB/c substrain was resistant to DSS-induced colitis, and the severity of DSS-induced colitis was mainly influenced by the gut microbiota. Targeting butyrate-producing bacteria could have therapeutic potential for colitis.

DP1-03-12/P1-040

Subgingival Plaque-Specific Bacteria in Severe Periodontitis Identified by Long-Read Sequencing

○馬 佳楽, 影山 伸哉, 朝川 美加李, 竹下 徹 (九大・院歯・口腔予防)

○Jiale Ma, Shinya Kageyama, Mikari Asakawa, Toru Takeshita (Sect. Prev. Public Health Dent., Grad. Sch. Dent., Kyushu Univ.)

Objective: The subgingival plaque's bacteria reside at the forefront of the periodontal pockets, playing a crucial role in the advancement of periodontal lesions. In this study, we aimed to accurately identify subgingival plaque-specific bacteria (SUBP bacteria) and further understand their distribution within other oral niches. **Methods:** We collected subgingival plaque (SUBP), supragingival plaque (SUPP) and tongue coating (TC) samples from 39 severe periodontitis patients with $\geq 20\%$ of probing sites with probing depth (PD) ≥ 4 mm. The bacterial composition of each sample was analyzed using PacBio single-molecule long-read sequencing of the full-length 16S rRNA gene and the amplicon sequence variant (ASV) approach. **Results:** Nineteen SUBP bacteria, including *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Tannerella forsythia* (*Tf*), were identified after comparing SUBP both with SUPP and TC (paired Wilcoxon test, FDR < 0.05 ; Benjamini-Hochberg). *Mogibacterium timidum*, *Tf* and *Fretibacterium fastidiosum* were highly significantly different (FDR adjusted p-values [q-values] < 0.0001). Interestingly, compared with *Tf*, the distribution of *Pg* was less significantly different between SUBP and TC. **Conclusion:** We have newly identified 19 SUBP bacteria through a high-resolution approach. Different distribution preferences of the SUBP bacteria between dental plaque and TC were precisely detected.

DP1-03-13/P1-041**皮膚細菌叢と肌健康状態との関連性**

○門屋 亨介, 近藤 彩乃, 松川 彩花 (唱山女大・生活・管理栄養)

Relationship between the skin bacterial community and skin condition

○Ryosuke Kadoya, Ayano Kondo, Ayaka Matsukawa (Dept. Food and Nutrition, Sch. Life Studies, Sugiyama Jogakuen Univ.)

皮膚は体重の約 16%を占める人体最大の臓器であり、腸内と同様に約 20 種、数千億個の細菌が生息しており皮膚細菌叢を形成している。これら皮膚細菌叢が皮膚の健康維持に重要な役割を担っていることが最近の研究で示唆されている。*Staphylococcus epidermidis* は皮膚のバリア機能をもつグリセリン関連物質の生成・分泌、遊離脂肪酸を分泌し肌を弱酸性に保つ、肌荒れやアトピー性皮膚炎を引き起こす黄色ブドウ球菌を退治する抗菌ペプチドの産生など皮膚を守る役割を担っている。一方、*Cutibacterium acnes* は皮脂で毛穴が詰まり嫌気環境になることで急激に増殖しニキビの原因菌となることが知られている。しかしながら、皮膚の健康状態を表すパラメーターである「普通肌」、「脂性肌」、「乾燥肌」、「混合肌」と *S. epidermidis* 等の皮膚細菌との関わりは明らかではない。本研究では皮膚常在細菌群を解析することで、皮膚健康と細菌群との関わり合いを明らかにすることを目的とする。22 才女性を対象に肌状態測定と鼻筋から細菌を収集し 16S rDNA 配列を用いた細菌叢解析を行った。すべての肌質で *S. epidermidis* は表皮細菌叢中 1%から 50%存在しており肌質間で有意差は無かった。また、表皮に存在する細菌数にも大きな変化は無かった。アルファ多様性解析では細菌属数と Chao1 に普通肌とその他の肌質との間に有意差があることを示し、ベータ多様性解析では普通肌細菌叢がクラスターを形成していることが示された。さらに、LEfSe 解析では普通肌には 8 種類の細菌属が有意に存在することが明らかになった。表皮細菌叢解析の結果、肌の健康状態を保つには *S. epidermidis* 以外の細菌も関与している可能性が示された。

DP1-03-14/P1-042**Characterization and application of lytic bacteriophage to control *T. ramosa* in microbial consortia**

○Priyanka Baranwal, 宮永 一彦, 日高 侑也, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Priyanka Baranwal, Kazuhiko Miyanaga, Yuya Hidaka, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Recently, Obesity poses a significant global health risk. It has been reported that certain bacteria in the gut microbiota strongly contribute to obesity. Existing treatments have limitations, necessitating simpler interventions. Bacteriophages (phages) are gaining recognition for their directly targeting bacteria. In this study, we focused on one of the obesity-related bacteria, *T. ramosa*. Lytic phages (phiTR001, phiTR002, phiTR003) were isolated from JMU hospital sewage, with different host ranges. We evaluated phiTR001's *in vitro* and *in vivo* efficacies, noting its relatively broad host range. *In vitro* experiments demonstrated that phiTR001 specifically hindered the growth of *T. ramosa* in pure culture and in environment with other bacteria derived from mice gut, and this effect depended on multiplicity of infection (MOI). Notably, some uninfected bacterial cells, isolated during phage interactions, exhibited transient resistance to the phages. Our *in vivo* investigations showcased the remarkable efficacy of phiTR001 in eliminating *T. ramosa*, even within the mice gut environment. In conclusion, this study underscores the potential of bacteriophage intervention for controlling the targeting strain. We anticipate that administering phage cocktails with brief treatment pauses would optimize their potential to eliminate transient phage-resistant mutants.

DP1-04-01

【発表取り下げ】

【Withdrawn】

DP1-04-02/P2-100**尿路病原性大腸菌(UPEC)の病原性とマイクロコロニー形成における硫黄転移酵素複合体 TusDCB の役割**○佐藤 百美佳¹, 滝田 綾子¹, 鈴江 一友², 橋本 佑輔¹, 平本 卓³, 村上 正巳³, 富田 治芳¹, 平川 秀忠¹ (¹群馬大・医・細菌, ²群馬大・医・生体防御, ³群馬大・医・臨床検査)**The role of TusDCB, a sulfur transferase complex on pathogenesis and microcolony formation in UPEC**○Yumika Sato¹, Ayako Takita¹, Kazutomo Suzue², Yusuke Hashimoto¹, Suguru Hiramoto³, Masami Murakami³, Haruyoshi Tomita¹, Hidetada Hirakawa¹ (¹Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ., ²Dept. Host Def., Sch. Med., Gunma Univ., ³Dept. Clin. Lab. Med., Sch. Med., Gunma Univ.)

UPEC は、尿路感染症の主要な起因菌であり、尿路上皮細胞へ侵入し、バイオフィルム様のマイクロコロニーを形成することで、様々な抗菌薬や自然免疫に対して抵抗性を示すことが知られている。私たちは、UPEC 感染症の難治化因子であるマイクロコロニー形成に着目している。本研究では、UPEC のマイクロコロニー形成に関わる新規責任因子のスクリーニングを行った過程で、硫黄転移酵素複合体 TusDCB を発見し、さらにその機能解析を行った。私たちは、tusDCB 欠損株を作製し表現型の解析を行った。tusDCB 欠損株は、人工尿培地においては親株と同程度の Growth を示したが、膀胱上皮細胞に感染させたところ、欠損株が作るマイクロコロニーは親株よりも低密度であった。tusDCB 欠損株を経尿道的にマウスに感染させたところ、腎臓および膀胱に感染した菌数は、親株感染時よりも 10 倍以上低い値を示した。我々の過去の研究から、UPEC のマイクロコロニー形成には、1 型線毛及びべん毛が関与していることが明らかとなっている。赤血球凝集試験、運動性試験、定量 PCR の結果から、tusDCB 欠損株では 1 型線毛及びべん毛の発現レベルが親株より 4 倍以上低いことが分かった。さらに、TusDCB の硫黄転移活性を欠いた変異株では、tusDCB 欠損株と同程度のマイクロコロニー形成能を示した。TusDCB は、近年システインから tRNA への硫黄分子の転移に関与していることが明らかにされているものの、病原性との関係を含めその生理機能の全容は明らかになっていない。本研究により、TusDCB は UPEC のマイクロコロニー形成や病原性に寄与することが示されたことから、本蛋白質は UPEC 感染症の新規治療標的候補になりうるものと期待している。

DP1-04-03/P2-101

ヒト由来大腸菌におけるシャペロン・アッシャー線毛の遺伝的多様性に関する *in silico* 分析

○井上 陽晴¹, 和田 崇之^{1,2} (¹大阪公大院・生・食栄養・微生物, ²大阪国際感染症研究センター)

In silico analysis of genetic diversity in chaperone-usher fimbria of *E. coli* from human samples

○Hiharu Inoue¹, Takayuki Wada^{1,2} (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metropolitan Univ., ²Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis.)

【背景と目的】微生物は外界との接着を担う分子機構(接着因子)を菌体表面に露出している。シャペロン・アッシャー(CU)線毛は、最も多様かつ一般的な接着因子である。CU線毛はヒトのみならず家畜などの病原因子を含み、感染宿主への適応と拡散にも関わっていると考えられるが、その多様性の全貌は未解明である。本研究では、ヒト由来の大腸菌におけるCU線毛の保有状況や多様性を比較し、全体像を把握することを目的とした。【方法】データベース(BV-BRC)からヒト由来大腸菌株(腸管由来:6,204株,尿由来:2,599株,血液由来:1,467株)のゲノム配列を取得した。アッシャー遺伝子をlocal BLASTによって抽出し、系統クラスに分類後、保有率および菌株あたりの保有数を比較した。さらに、各配列を相同性に仕掛けてクラスターリングし、レアファクション解析およびα多様度の算出・比較を行った。【結果と考察】抽出された全アッシャー遺伝子数は106,330個であり、1株あたりの保有数は10.4個となった。これらは8クラスに系統分類され、由来ごとに各系統の保有率に有意な差が認められた。腸管由来株を下痢症患者と健康者の由来に分けて比較したところ、保有率、多様度に有意差がみられ、一部のクラスに病原接着因子が集中している可能性が示唆された。一方で、レアファクション曲線はいずれのクラスにおいてもプラトーに到達せず、CU線毛の全体像を把握するためにはより多くのデータが必要であることが示唆された。また、下痢症由来株において多様度が極めて高いクラス(γ3)が見出された。CU線毛の多様性にみられる由来ごとの相違は、菌株のニッチを規定する要因として重要であり、さまざまな比較検証が求められる。

DP1-04-04/P2-102

P. gingivalis が持つ Mfa 線毛の構築機構および細菌間結合領域と宿主免疫回避に関与する構造

○柴田 敏史^{1,2}, 松波 秀行², 應原 一久⁴, 谷口 友梨⁴, 庄子 幹郎³, Matthias Wolf² (¹鳥取大・医・感染制御学・細菌学, ²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, ³長崎大・院医歯薬・口腔病原微生物学, ⁴広島大・院医系科学・歯周病態学)

Assembly mechanism and structural insights into the Mfa1 minor pilus from *Porphyromonas gingivalis*

○Satoshi Shibata^{1,2}, Hideyuki Matsunami², Kazuhisa Ouhara⁴, Yuri Taniguchi⁴, Mikio Shoji³, Matthias Wolf² (¹Div. Bacteriol, Dept. Microbiol. Immunol., Med., Tottori Univ., ²Molecular Cryo-Electron Microscopy Unit, OIST, ³Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Bio. Sci., Nagasaki Univ., ⁴Dept. Periodontal Medicine, Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ.)

Porphyromonas gingivalis は歯周病を引き起こす主要な病原菌であり、Fim線毛とMfa線毛と呼ばれる2種類のV型線毛を有している。これらの線毛は宿主への付着、バイオフィーム形成、病原性に重要である。以前、我々はFim線毛の構成ピリントタンパク質FimAの重合体構造とFimAがプロテアーゼによる切断修飾をきっかけにストランド交換反応によって重合することを明らかにした。一方で、Mfa線毛の構造や重合機構は不明であった。本研究では、Mfa線毛の主要構成ピリンMfa1の重合体をクライオ電子顕微鏡で構造解析した。この結果、Mfa1ピリンはFimA同様にプロテアーゼ依存のストランド交換反応によって重合することが明らかになった。また、Mfa1上にある口腔内連鎖球菌と特異的に相互作用する領域の構造はモノマーと重合体で異なることが判明した。構造解析に加えて、変異株作成や生化学的解析により、Mfa1はカルシウムイオン結合領域を持ち、カルシウムイオンの結合が宿主の自然免疫認識回避に寄与することが示唆された。機能的な天然状態であるMfa1重合体構造は、歯周病や*P. gingivalis*に関連した全身疾患の治療薬開発のための鋳型として活用されることが期待できる。

DP1-04-05/P2-103

Identification of diffusely adherent *Escherichia albertii* from raccoon

○日根野谷 淳¹, Sharda Awasthi^{1,2,3}, 畑中 律敏^{1,2,3}, 山崎 伸二^{1,2,3} (¹阪公大・獣医・獣医国際防疫, ²阪公大・アジア健科研, ³阪公大・大阪国際感染症研セ)

○Atsushi Hinenoya¹, Sharda Awasthi^{1,2,3}, Noritoshi Hatanaka^{1,2,3}, Shinji Yamasaki^{1,2,3} (¹Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ., ²Asian Health Sci. Res. Inst., Osaka Metro. Univ., ³Osaka Int. Res. Cent. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

Escherichia albertii is an emerging zoonotic enteropathogen that has caused several human foodborne outbreaks. Generally, this bacterium forms localized-like adhesion using a type 3 secretion system. However, we found a strain showing diffused adhesion (DA) on HeLa cells. This study was aimed to identify and characterize the responsible factor for the DA. Whole genome sequencing of the *E. albertii* strain RAC112 revealed a chromosome (4.6 Mb) and 3 plasmids (I:84.6, II:100 and III:109 kb). A novel chaperone/usher system gene cluster (~10.5 kb), similar to that of F4 fimbria, was identified on plasmid I. A deletion mutant of *faeG*-like gene, encoding putative fiber major subunit protein, lost the ability of DA, while the complementary strain restored DA phenotype. Functional cloning experiments revealed that *E. coli* transformant of a laboratory strain with pBR322 bearing the gene cluster could exhibit DA. Immunofluorescence microscopy revealed that the adhering bacterial cells showed fluorescence, indicating the surface expression of the FaeG-like protein. In addition, plasmid I was transferable to both *E. coli* and *E. albertii* strains, and the resulting transconjugants showed diffusely adherence. This is the first report regarding the identification of diffusely adherent *E. albertii* and its related genes. The strain could show DA by expressing a novel F4 fimbria on the cell surface.

DP1-04-06/P1-098

Biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans* associates with genes expression regulated by Hfq

○大貝 悠一, 松本 愛理, 中田 匡宣 (鹿児島大・歯・口腔微生物学)

○Yuichi Oogai, Airi Matsumoto, Masanobu Nakata (Dept. Oral-Microbiol., Sch. Med. and Dent., Kagoshima Univ.)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a Gram-negative bacterium that colonizes the human oral cavity and causes periodontitis. The bacterium can form biofilm on periodontal tissue and occasionally causes systemic diseases, such as endocarditis. Hfq is an RNA-binding protein that mediates small non-coding RNA and mRNA base pairing. The base pairing associated with the regulation of several genes involved in metabolisms, stress responses, virulence. In this study, we investigated the effect of Hfq on biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans*. The inactivation of *hfq* reduced mass of biofilm on a polystyrene plate. Furthermore, the *hfq* mutant showed increased transcription of *dspB* and decreased transcription of *emaA* compared to wild-type strain. The *dspB* gene encodes dispersin B, an enzyme that catalyzes poly-N-acetylglucosamine hydrolysis, and dispersin B has been reported to function as a factor that contributes to detachment of cells from biofilm. The oligomeric autotransporter EmaA mediates the interaction between *A. actinomycetemcomitans* and collagen. Additionally, we found that the inactivation of *emaA* showed drastically reduced biofilm mass. These results suggest that biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans* is modulated in part by Hfq-mediated regulation of dispersin B and EmaA expression.

DP1-04-07/P1-099**Identification of *Clostridium perfringens* FbpA binding site to dermatopontin**

○松永 望, 遠藤 晃範, 榎本 泰雄, 片山 誠一 (岡山理大・理・臨床生命)

○Nozomu Matsunaga, Akiba Endo, Yasuo Hitsumoto, Seiichi Katayama (Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

Fibronectin (Fn) is an approximately 450 kDa glycoprotein that is comprised of 12 type I, 2 type II, and 15-17 type III modules. Fibrillation of Fn is important in the wound healing process. Dermato-pontin (DPT), a 22 kDa non-collagenous extracellular matrix protein, interacts with Fn type III₁₂₋₁₄ (III₁₂₋₁₄), leading to a change in Fn conformation and promoting Fn fibrillation. Furthermore, a region called DP-4 (PHGQVVAVRS, 11 residues) in DPT is known to mainly promote Fn fibrillation.

On the other hand, we previously reported that *Clostridium perfringens* fibronectin-binding proteins A and B (FbpA and FbpB) bound to DPT, resulting in the inhibition of Fn-fibrillation.

Here we found the interaction of DP-4 with FbpA and FbpB by enzyme-linked avidin-biotin complex (ELABC) and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (competitive ELISA), and identified FbpA binding site (NEKILSRFSELSNEEKELIDINKITDPLHI and IGNDETEVAFVSALCKTSNPEQGTYSIGFD) to DPT by several assays (ELABC, competitive ELISA, ligand blotting, and Fn-fibrillation assay) using FbpA Overlapping peptide (split FbpA into 20-30 residues each).

DP1-04-08/P1-100**Colocalization of GAPDH and autolysin on the *Clostridium perfringens* cell surface**○青野 りよ^{1,2}, 松永 望¹, 榎本 泰雄¹, 片山 誠一¹ (1岡山理科大・理・臨床生命科学科, 2香川県立保健医療大・臨床検査)○Riyo Aono^{1,2}, Nozomu Matsunaga¹, Yasuo Hitsumoto¹, Seiichi Katayama¹ (1Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. of Sci., 2Dept. Med. Tech., Kagawa Pref. Univ. of Health Sci.)

Clostridium perfringens, the cause of gas gangrene and food poisoning, is known to have the peptidoglycan-associated fibronectin-binding proteins including FbpC (CPE0625; 56kDa), FbpD (CPE0630; 45 kDa), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, CPE1304; 40 kDa). GAPDH, one of the glycolytic enzymes, is expressed on some bacterial cell surface including *C. perfringens*. In *Staphylococcus aureus*, it is thought that the interaction of GAPDH with autolysin could occur by back-binding of the excreted GAPDH to the autolysin. We found that *C. perfringens* autolysin (Acp, CPE1231) worked as an Fn receptor and that rGAPDH bound to rAcp. In this work, we investigated the interaction Acp with GAPDH on the *C. perfringens* cell surface. Each anti-GAPDH antibody and anti-AcpCD antibody, labelled fluorescently, was incubated with fixed *C. perfringens* cells growth up to early-log phase, and then the cells were visualized with Confocal Laser Scanning Microscope. Both GAPDH and Acp displayed at the mid-cell region and at the septal division site. Neither GAPDH nor Acp were detected on the acp null mutant (strain 13 *acp::erm*) cells. The Acp-GAPDH complex bound to Fn in zone at septal division site. These results suggested that GAPDH might be expressed on the cell surface by binding to Acp and that the Acp-GAPDH complex might function as an Fn receptor.

DP1-04-09/P1-101**ETEC colonization factor CS6 binds to β -actin and myosin-9 on epithelial cells**

○Alafate Ayibieke, 西 宇希, 濱端 崇 (国際医療研究センター・研究所・感染症制御)

○Alafate Ayibieke, Takaki Nishi, Takashi Hamabata (Dept. Infect. Dis., RI., NCGM)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the leading causes of diarrhea in young children in underdeveloped nations and the primary cause of travelers' diarrhea among visitors to these areas. The virulence of ETEC is attributed to its heat-stable and heat-labile toxins, as well as colonization factors (CFs). CS6 is one of the most prevalent CFs among the more than 25 identified CFs in ETEC. Previously, we demonstrated that CS6 is not only capable of cell adhesion but also of invading epithelial cells. Although it has been shown that CS6 binds to crude mucin and sulfatide, the cell surface receptors for CS6 are still not fully understood. In this study, to identify cell surface proteins that interact with CS6, we constructed a plasmid encoding a histidine-tagged CssB subunit of CS6. We then performed a pulldown assay using the tagged CssB as bait to isolate CssB-binding proteins from the cell lysates of INT407 and Caco-2 cells. Subsequent analysis of the isolated proteins using SDS-PAGE and nanoLC-MS/MS led to the identification of β -actin and myosin-9 as potential receptors for CS6. Given that both proteins are present on the cell surface, it is possible that they are involved in ETEC CS6-mediated cell adhesion and invasion, which requires further investigation.

DP1-04-10/P1-102**腔常在乳酸桿菌の腔粘膜定着機構の解明**

○吉岡 桐佳, 伊藤 雅洋, 田端 里帆, 三木 剛志, 羽田 健, 岡田 信彦 (北里大・薬・微生物)

Clarification of the colonization mechanism of vaginal *Lactobacillus* on the vaginal Mucosa

○Kirika Yoshioka, Masahiro Ito, Riho Tabata, Tsuyoshi Miki, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada (Dept. Microbiol., Sch. Pha., Kitasato Univ.)

【目的】ヒト成年期の女性生殖器には主に乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) が最優勢菌として常在しており, 病原微生物の増殖を抑えるなどその存在は有益であると考えられてきた。しかしながら近年, 日本人女性の約 30%が該当する *L. iners* を最優勢菌として有する女性では, *L. crispatus* と比較し月経時に細菌叢が大きく変化し, 細菌性陰症起因細菌が最優勢である細菌叢へと変遷しやすいと報告されている。本研究では, ヒト腔上皮における *L. iners* および *L. crispatus* 定着機構の解明を試みた。

【方法】*L. iners* HM-704 および *L. crispatus* HM-637 を MRS 液体培地にて 24 時間静置培養した。培養後, 菌体の表面タンパク質を CBB 染色にて確認し, それぞれの細菌種において認められた特徴的なタンパク質を nano LC/MSMS 解析にて同定した。また, 培養後の菌体をヒト腔上皮細胞 VK2/E6E7 に感染後, 培地を細胞培養用培地または羊脱繊維血と交換した。一定時間培養後, 腔上皮細胞に付着する細菌数を計測した。

【結果・考察】*L. iners* および *L. crispatus* の菌体表面タンパク質を解析したところ, それぞれにおいて細菌種特異的なタンパク質が同定され, これらが腔粘膜での定着に関与する可能性が考えられた。*L. iners* のみに認められたタンパク質は, 生体環境条件により局在が変化しやすいことが示唆され, *L. iners* の腔上皮細胞への付着数は *L. crispatus* とは異なり, 血液により減少すると示唆された。したがって, *L. iners* の特徴的な表面タンパク質の局在の変化が細菌叢の変遷のしやすさと関連があると推察された。

DP1-04-11/P1-103

肺炎球菌の炎症誘導能に対するリポタンパク質シグナルペプチダーゼの作用解析

○土門久哲^{1,2}, 平山 悟¹, 磯野 俊仁¹, 齋藤 瑠都¹, 柳原 克紀³, 寺尾 豊^{1,2}
(¹新潟大・院医歯・微生物, ²新潟大・院医歯・高口研セ, ³長崎大・院医歯薬・病態解析)

The role of lipoprotein signal peptidase in the innate immune stimulatory activity of pneumococci

○Hisanori Doman^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Toshihito Isono¹, Rui Saito¹, Katsunori Yanagihara³, Yutaka Terao^{1,2} (¹Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ²Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ³Dept. Lab. Med., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci.)

【目的】 *Streptococcus pneumoniae* は、細菌性肺炎において高頻度に分離されるグラム陽性球菌である。宿主細胞は主に Toll-like receptor 2 (TLR2) を介してリポタンパク質を認識し、炎症性サイトカインを産生する。本研究では、*S. pneumoniae* リポタンパク質の成熟に必要なリポタンパク質シグナルペプチダーゼ LspA の遺伝子欠失株を作製し、その炎症誘導能を解析した。

【方法】 *S. pneumoniae* NU4471 株 (野生株) および同株由来 *lspA* 遺伝子欠失株 (Δ *lspA* 株) を増殖定常期まで培養し、Triton X-114 二層抽出法および BCA 法を用いて、各菌株におけるリポタンパク質の産生量を測定した。続いて、ヒト TLR2 を強制発現させた HEK293 (HEK-TLR2) 細胞培養系に、各菌株の培養上清、破碎上清もしくはエタノール処理した死菌体を添加して一定時間培養し、転写因子 NF- κ B の活性化に伴い上清中に分泌されるアルカリフォスファターゼ活性を測定した。さらに、THP-1 細胞に各菌株サンプルを添加して培養後、上清中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA で定量した。

【結果】 Δ *lspA* 株では、野生株と比較して有意にリポタンパク質産生量が少なかった。また、 Δ *lspA* 株培養上清、破碎上清および死菌体の全ては、野生株とそれぞれ比較し、HEK-TLR2 細胞におけるアルカリフォスファターゼ誘導能が低かった。同様に、 Δ *lspA* 株サンプルは、野生株と比較し、THP-1 細胞に対する TNF- α および IL-6 誘導能が低かった。

【考察】 *LspA* はリポタンパク質を産生させて TLR2 を活性化し、次いで炎症性サイトカインを増加させることが明らかとなった。

DP1-04-12/P1-104

Mycobacterium avium complex 由来 D アミノ酸によるマクロファージの遺伝子発現の変化

○多田納豊¹, 宗像 達夫¹, 澤井 円香¹, 八木 秀樹², 佐野 千晶³, 富岡 治明⁴ (国際医療福祉大・福岡薬, ²国際医療福祉大・薬, ³島根大・医・地域医療支援, ⁴島根大・医)

Alteration of gene expression in macrophages by D-amino acids from *Mycobacterium avium* complex

○Yutaka Tatano¹, Tatsuo Munakata¹, Madoka Sawai¹, Hideki Yagi², Chiaki Sano³, Haruaki Tomioka⁴ (¹Dept. Pharm. Sci., Sch. Pharm. Fukuoka, IJHW, ²Dept. Pharm. Sci., Sch. Pharm., IJHW, ³Dept. Community. Med. Mgt., Fac. Med., Shimane Univ., ⁴Fac. Med., Shimane Univ.)

【目的】 非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症の予防および治療効果を上げるためには、NTM と宿主との相互作用についての解明が重要となる。しかしながら、病原菌が産生する D-AA と宿主における感染防御機構との関連性は不明であるため、*Mycobacterium avium* complex (MAC) が産生する D-AA がマクロファージ (M ϕ) の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的として種々の検討を行った。

【方法】 MAC 菌株として *M. intracellulare* N260 株を供試した。網羅的遺伝子発現解析は、各種 D-AA について 100 μ M 存在下で 4 日間培養した Raw264.7 細胞から精製した RNA を用いて、RNAseq 解析にて行った。RNAseq 解析は Veritas 社 (シーケンス) および cBio 社 (発現量比較解析) に委託した。

【結果・考察】 MAC での産生が認められた 5 種類の D-AA を添加し 4 日間培養した M ϕ (RAW264.7 細胞) から RNA を精製し RNAseq 解析を行った。その結果、脂肪酸代謝関連の遺伝子発現の増加とコラーゲンを主とする細胞外マトリックス形成に関わる遺伝子の発現減少や、細胞傷害応答遺伝子の増加と細胞外マトリックス形成関連遺伝子、イオンチャネルやトランスポーターの発現減少など、添加した D-AA 毎に様々な遺伝子の発現変動が認められた。特に、ペプチドグリカン構成する D-AA は、マクロファージによるコラーゲン形成関連遺伝子の制御に働いている可能性が示唆された。

DP1-04-13/P1-105

Investigation of LCV-mitochondria communication machinery through Rab32 function

○生出 紘夢, 新崎 恒平 (東薬大・生命科学・分子細胞生物学)

○Hiromu Oide, Kohei Arasaki (Dept. Mol. Cell Biol., Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm and Life Sci.)

After internalization human host cells, *Legionella pneumophila* (*L.p.*) secretes bacterial proteins called *Legionella* effectors into host cytosol for establishment of specialized infectious niche termed *Legionella*-containing vacuole (LCV). Although several works reported that LCV may contact mitochondria, molecular machinery of this contact has been obscured. To examine this, we have focused on host GTPase, Rab32 because Rab32 is recruited to the LCV and regulates mitochondrial morphology though its mitochondria-associated ER membrane distribution. Here we show that silencing of Rab32 inhibits *L.p.* growth and causes dissociation of LCV-mitochondria proximity, suggesting that Rab32 regulates LCV-mitochondria communication. We next tried to identify the *Legionella* effector that is required for recruitment of Rab32 to the LCV. To do this, we examined whether host Rab32-GEF (HPS1/HPS4 complex) are recruited to the LCV because GEF is necessary for activation of Rab protein and found that HPS4 is specifically recruited to the LCV. Furthermore, we could successfully identify *Legionella* effector(s) that has responsible for recruitment of HPS4 to the LCV. Because HPS4 forms a tight complex with HPS1 in host cells, our identified effector(s) may have functions for dissociation of HPS4 with HPS1 and recruitment of dissociated HPS4 to the LCV and we are currently examining this possibility.

DP1-04-14

【発表取り下げ】

【Withdrawn】

DP1-04-15/P1-107

***Vibrio vulnificus* の致死性毒素 MARTX 毒素の C 末端側ドメインの機能解析**

○倉田 寧々¹, 竹内 祥子¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹
(¹大阪医薬大・薬・感染制御, ²大阪医薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of C-terminal side domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Nene Kurata¹, Shoko Takeuchi¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (¹Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., ²Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。基礎疾患を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り死亡する。我々は本菌の臨床分離株は実験動物においても重篤な全身症状を示し死に至らしめることを明らかにしてきた。ビブリオ属細菌の Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素は複数のドメインを有しており、本毒素が細胞内に侵入した後にシステインプロテアーゼドメインが各ドメインに自己切断することにより機能的に働いていると考えられているが、各ドメインの機能や本毒素の細胞内への侵入経路は明らかとなっていない。そこで、本毒素の機能的ドメインの役割を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて MARTX 毒素自身が自己切断する C 末端側の 3 つのドメインの欠損株を作製するために、欠損部位の上流域と下流域の塩基配列を pDM4 に挿入し、組換えプラスミドを作製し、大腸菌 SM10 λ pir 株を形質転換した。大腸菌 SM10 λ pir 形質転換株から M2799 株に接合伝達し、セレクションを行い、欠損株を作製した。同様に、機能的ドメインすべての欠損株も作製した。各種細胞に対する本菌および欠損株の細胞傷害活性を測定し、比較検討した。

【結果と考察】本菌の C 末端側の 3 つのドメインの欠損株とすべての機能的ドメインの欠損株を作製した。得られた欠損株の DNA 配列を解析し、どちらもインフレーションで目的遺伝子が欠損していることが確認された。現在、両欠損株を野生株の各種細胞に対する細胞傷害活性を測定し、MARTX 毒素の各ドメインの機能を解析している。

DP1-04-16/P1-196

A water-in-oil droplet-based method for detecting and isolating infectious bacteriophage particles

○星野 美羽¹, 大田 悠里^{2,3}, 陶山 哲志², 森下 祐至³, 常田 聡⁴, 野田 尚宏^{1,2,4} (¹東大院・新領域・メディカル情報生命, ²産総研・バイオメディカル, ³(株) オンチップ・バイオテクノロジーズ, ⁴早大院・先進理工・生命医科)

○Miu Hoshino¹, Yuri Ota^{2,3}, Tetsushi Suyama², Yuji Morishita³, Satoshi Tsuneda⁴, Naohiro Noda^{1,2,4} (¹Dept. CBMS, Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, ²Biomed. Res. Inst., Natl. Inst. of Adv. Sci. & Tech. (AIST), ³On-chip Biotechnologies Co., Ltd., ⁴Dept. Adv. Sci. & Eng., Grad. Sch. Adv. Sci. & Eng., Waseda Univ.)

Bacteriophages (phages) have been isolated and studied mainly using plaque assay, where phages and host cells are mixed into molten soft agar, which is then poured over an agarose plate and incubated. While this method can produce visible plaques in areas where virulent phage is extant, it is lacking in throughput and prone to fluctuations in experimental procedures. To improve the robustness and stability of phage screening, we develop a phage screening method employing water-in-oil (w/o) droplets, which are minuscule drops of aqueous solution dispersed in oil. In this system, fluorescent staining of progeny phage within w/o droplets differentiates droplets with and without virulent phage. YOYO-1, a cell-impermeant nucleic acid intercalating dye, was used for this purpose. To demonstrate this proof-of-concept, we generated w/o droplets containing T2 phage and *Escherichia coli* and attempted to recover phage from individual droplets based on YOYO-1 fluorescence. As a result, we successfully recovered phage from droplets ruptured and upscaled following isolation into 96-well plates. Phage recovery rates from fluorescent droplets were approximately 35%. In contrast, non-fluorescent droplets had a 0% phage recovery rate. This shows that the existence of a virulent phage within a droplet will consistently result in the elevation of droplet fluorescence intensity in our model.

DP1-05-01/P2-133

Alendronate augments lipid A-induced IL-1 β release via activation of ASC or AP-1, but not caspase-11

○玉井 利代子, 清浦 有祐 (奥羽大・歯・口腔病態解析制御)

○Riyoko Tamai, Yusuke Kiyoura (Dept. Oral Med. Sci., Sch. Dent., Ohu Univ.)

Purpose: The present study aimed to examine whether alendronate (ALN), an anti-bone-resorptive drugs, augments lipid A-induced IL-1 β release using mouse macrophage-like J774.1 cells, ASC-deficient RAW264 cells, or caspase-11-deficient RAW264.7 cells. Caspase-11 is a receptor of LPS.

Method: Cells were pretreated with or without ALN, and then incubated with or without lipid A. For inhibition assays, the cells were pretreated with inhibitors for 1 h or antibodies for 30 min prior to the addition of ALN. Levels of secreted mouse IL-1 β in culture supernatants and activation of AP-1 were measured by ELISA. Expression of caspase-11, ASC, and actin was analyzed by Western blot analysis. Toll-like receptor (TLR) 4 expression was analyzed by flow cytometry.

Results: Pretreatment of the cells, even caspase-11-deficient RAW264.7 cells, with ALN significantly augmented lipid A-induced IL-1 β release although ALN did not upregulate the expression of TLR4. Anti-ASC antibody inhibited ALN-augmented IL-1 β release in J774.1 cells. However, ALN upregulated the activation of AP-1 in RAW264 cells. Furthermore, pretreatment with the AP-1 inhibitor SR11302 before addition of ALN inhibited ALN-augmented IL-1 β release by lipid A-treated RAW264 cells.

Discussion: These findings collectively suggested that ALN augmented lipid A-induced IL-1 β release via activation of ASC or AP-1, but not caspase-11.

DP1-05-02/P2-134

Detection of bacteria by immune activating receptor via plasma components

○李 一凡¹, 平安 恒幸¹, 長谷川 玄¹, 富田 陽生², 橋川 裕子³, 荒瀬 尚^{4,5}, 華山 力成^{1,3} (¹金沢大・先進, ²金沢大・医薬・免疫, ³金沢大・ナノ研, ⁴阪大・微研・免疫, ⁵阪大・免フロ・免疫)

○Yifan Li¹, Kouyuki Hirayasu¹, Gen Hasegawa¹, Yosei Tomita², Yuko Hashikawa³, Hisashi Arase^{4,5}, Rikinari Hanayama^{1,3} (¹Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., ²Dept. Immunol., Med. Pharm., Kanazawa Univ., ³NanoLSI., Kanazawa Univ., ⁴Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., ⁵Lab. Immunochem., IFRc, Osaka Univ.)

Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) family is a primate-specific immunoreceptor, widely expressed on most immune cells, regulating immune responses through interactions with various ligands. The inhibitory type of LILRBs has been widely studied and many ligands such as HLA class I have been found. On the other hand, little is known about the activating type of LILRAs. We previously identified microbially cleaved immunoglobulin as a non-self ligand for LILRA2. Here, we found an endogenous ligand for LILRA2 that recognized the plasma component. LILRA2, upon recognition of the plasma component, activated human primary monocytes and promoted the expression of a variety of inflammation-related genes. It was previously reported that a variety of bacteria can evade immunity by binding to the plasma component on the bacterial surface. We confirmed that the plasma component bound to the bacterial surface. Although LILRA2 was unable to recognize bacteria directly, bacteria that bound the plasma component was recognized by LILRA2. Our findings suggest that LILRA2 is a sensor of bacterial immune evasion, which reflects the co-evolution of the immune system and bacteria.

DP1-05-03/P2-135

RSウイルス感染による鼻咽頭定着肺炎球菌の増殖機構

○石川 紗妃¹, 岡田 七海², 福井 優珠², 中村 茂樹¹, 伊藤 利洋², 柴田 岳彦¹ (¹東医大・医・微生物, ²奈医大・医・免疫)

Growth of *S. pneumoniae* colonized in the nasopharynx associated with RSV infection

○Saki Ishikawa¹, Nanami Okada², Yuzu Fukui², Shigeki Nakamura¹, Toshihiro Ito², Takehiko Shibata¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Tokyo Med. Univ., ²Dept. Immunol., Sch. Med., Nara Med. Univ.)

20-50%の小児の鼻咽頭には肺炎球菌が定着している。この肺炎球菌が増殖すると、肺炎などの重症化をもたらすことがある。定着状態では無症候であるが、何らかのきっかけにより肺炎球菌が増殖することがある。しかし、この肺炎球菌の増殖機構は解明されていない。そこで本研究では、これまでに我々が見出した新規免疫抑制シグナル growth arrest-specific protein 6 (Gas6) /Axlに着目し、この機構を解明することを目的とした。

肺炎球菌鼻咽頭定着モデルマウスにRSウイルスを感染させると、RSウイルス非感染グループと比較して鼻咽頭洗浄液 (NAL) と気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の肺炎球菌数が増加した。また、RSウイルス感染グループではNALとBAL中の好中球数が増加し、肺炎像も観察された。さらに、肺炎球菌定着モデルマウスにRSウイルスを感染させたのち、Axl阻害剤であるBGB324を投与すると、RSウイルス感染に伴う肺炎球菌数の増加が抑制された。一方、定着モデルマウスにRSウイルスの代わりにリコンビナント Gas6を鼻咽頭に投与すると、肺炎球菌が増殖した。そして、Gas6/Axlシグナルによる肺炎球菌の増殖は、このシグナルによるマクロファージのフェノタイプの変化が原因である可能性が見出された。

以上の結果より、RSウイルス感染に伴い誘導される Gas6 がマクロファージのAxlに作用し、鼻咽頭定着肺炎球菌を増殖させることが示唆された。この成果は、Gas6/Axlシグナルあるいはマクロファージを標的とした肺炎球菌感染症の重症化予防・治療法の開発につながる可能性がある。

DP1-05-04/P2-136

A balance of paired immune receptors and bacterial pathogenicity

○長谷川 玄¹, 平安 恒幸¹, 李 一凡¹, 荒瀬 尚^{2,3,4}, 山口 雅也^{4,5,6,7}, 川端 重忠^{4,7}, 華山 力成¹ (¹金沢大・先進, ²阪大・微研・免疫, ³阪大・免フロ・免疫, ⁴阪大・CiDER, ⁵阪大・院歯・バイオインフォ, ⁶阪大・微研・バイオインフォ, ⁷阪大・院歯・微生物)

○Gen Hasegawa¹, Kouyuki Hirayasu¹, Yifan Li¹, Hisashi Arase^{2,3,4}, Masaya Yamaguchi^{4,5,6,7}, Shigetada Kawabata^{4,7}, Rikinari Hanayama¹ (¹Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., ²Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., ³Lab. Immunochem., IFRc, Osaka Univ., ⁴CiDER, Osaka Univ., ⁵Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ⁶Bioinform. Cent., RIMD, Osaka Univ., ⁷Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

Leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor (LILR) is a paired receptor family expressed on various cells in primates. The LILR family shares extracellular domains characterized by high homology and transduce activating or inhibitory signals based on the difference of the intracellular structure. The activating receptor LILRA6 and inhibitory receptor LILRB3 show remarkably high homology in their extracellular domains, making them indistinguishable by antibodies. Additionally, numerous non-synonymous polymorphisms in LILRA6 and LILRB3 suggest complex regulation of immune activity. Consequently, it is conceivable that LILRA6 and LILRB3 are subject to substantial selective pressure. Nevertheless, their specific ligand remains unidentified. Through comprehensive screening of various pathogens, we discovered that LILRA6 and LILRB3 specifically recognize a certain bacterium. Furthermore, a statistically significant association was found between infection history and the polymorphic variations within LILRA6 and LILRB3 polymorphism, suggesting that LILRA6 and LILRB3 play an important role in the susceptibility to the bacteria. Moreover, the identified ligand also exhibits genetic diversity, leading to variations in molecule expression levels. Based on these findings, we propose a competitive co-evolution model of human-pathogen interactions mediated through immune receptors.

DP1-05-05/P2-138

Rab13 GTPase is involved in ubiquitin-mediated recognition of Group A Streptococcus in xenophagy

○Xin Hu, Min Wu, 飯伏 純平, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大院・医・微生物)

○Xin Hu, Min Wu, Junpei Iibushi, Atsuko Nozawa, Kazunori Murase, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Pathogenic bacteria can invade host cells, multiply and spread infection. This triggers a response from the cell-autonomous immune system. Group A Streptococcus (GAS) invades human epithelial cells through a process called endocytosis. Cytosolic GAS is coated with a protein called ubiquitin, which helps in efficiently eliminating it by xenophagy. Our research on small GTPase Rab proteins, which are master regulators of membrane trafficking, has revealed their roles in autophagosome trafficking, bacterial recognition, xenophagy activation and membrane repair during GAS infection. Rab proteins are involved in membrane trafficking, and we believe that they can unveil novel cell-autonomous immunity signaling pathways. In this study, we screened 60 Rab GTPases in GAS infection and discovered that Rab13 colocalized with xenophagosomes. Knockdown or knockout of Rab13 significantly decreased ubiquitin-positive bacteria and xenophagosome formation, suggesting that Rab13 is involved in ubiquitin-mediated recognition of bacteria during GAS infection for xenophagy. Moreover, we found that E3 ligase RNF115 that ubiquitinates Rab13 localized to xenophagosomes and was involved in ubiquitin-associated xenophagosome formation. Collectively, these results imply that Rab13 and RNF115 play a role in recognition of intracellular GAS in xenophagy.

DP1-05-06/P1-132

Tannerella forsythia induces inflammasome activation by triggering both NLRP3 and Caspase-4

○Chenwei Hsu, 岡野 徳壽, 鈴木 敏彦 (東京医科歯科大・医歯・細菌感染)

○Chenwei Hsu, Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki (Dept. Bact. Pathogenesis, TMDU)

Periodontitis is chronic inflammatory disease infected by periodontal bacteria like *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*). This disease causes the production of inflammatory cytokines, such as Interleukin (IL)-1 or TNF α . The production is significant in forming the pathology of periodontitis. However, the mechanism of the cytokine production is unclear. Among inflammatory cytokines, IL-1 is produced by the particular signaling pathway because this cytokine lacks the signal sequence for spontaneous secretion. The expressed pro-IL-1 is proteolytically processed by activated caspase-1 and converted as mature cytokines. The inflammasome regulates the caspase-1 activation. Our research explores the inflammasome activation elicited by *T. forsythia* during macrophages infection. This study provides that the Type IX secretion system that is one of the bacterial protein secretion systems in *T. forsythia* can enhance inflammasome activation. We also found that caspase-4 cleavage, leading to activate inflammasome, is controlled by Nod like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) in the infection. These data elucidate the molecular mechanism underlying *T. forsythia* triggers inflammasome activation.

DP1-05-07/P1-133

結核菌感染マクロファージで活性化する2つのNF-κBサブファミリー

○篠原 明莉¹, 堀口 安彦², 岡 真優子³ (¹京都府大・農学食科学・食環境安全学, ²阪大微研・分子細菌学, ³京都府大院・生命環境科・食環境安全学)

Two sub-families of NF-κB are activated in macrophages infected with *M. bovis* BCG

○Akari Shinohara¹, Yasuhiko Horiguchi², Mayuko Osada-Oka³ (¹Food Hyg. Health., Agric. Food. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., ³Food Hyg. Env. Health., Grad. Sch. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染により形成される肺肉芽腫を特徴とする。肉芽腫には結核菌を貪食したマクロファージ (Mφ) が集積し、宿主の殺菌作用から逃れた一部の結核菌が Mφ 内に持続潜伏感染している。Mφ の結核菌排除には、転写因子 NF-κB により誘導される複数の炎症性因子が関わり、NF-κB の p65 によって誘導される腫瘍壊死因子 (TNF-α) および誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) がよく知られている。我々は、マウス肺結核肉芽腫に NF-κB の p100 の発現を捉えた。これまで結核菌感染 Mφ での p100 の転写活性は報告がなかったことから、本研究では結核菌感染 Mφ における p65 と p100 の役割を比較した。ウシ型結核菌 (*M. bovis* BCG) を感染させたマウス Mφ (RAW264.7) では、p65 と p100 のリン酸化の亢進 (すなわち活性化) が認められた。そこで、Mφ p65 欠損株 ($\Delta p65$)、p100 欠損株 ($\Delta p100$)、p65 および p100 欠損株 ($\Delta p65/\Delta p100$) を作製した。BCG の感染は $\Delta p65$ 株でリン酸化 p100 (p-p100) を、 $\Delta p100$ 株で p-p65 を Mφ 野生株 (WT) と同程度に増大させ、p65 または p100 欠損は互いの活性化に影響しなかった。次に、BCG 感染時の炎症性因子の mRNA 発現を WT と比較したところ、*Tnf-α* mRNA 発現は、WT に比べて $\Delta p100$ 株で約 55% に抑制され、 $\Delta p65$ 株で全く発現しなかった。*iNos* mRNA 発現は、WT に比べて $\Delta p65$ 株および $\Delta p100$ 株で共に約 80% に抑制され、 $\Delta p65/\Delta p100$ 株では全く発現しなかった。また *Il-1β* mRNA 発現は、WT に比べて $\Delta p100$ 株で約 10% にまで抑制されたが、 $\Delta p65$ 株では約 60% に抑制された。よって結核菌感染 Mφ では、NF-κB の p65 に加えて、p100 が炎症性因子誘導に大きく寄与することが明らかとなった。

DP1-05-08/P1-134

好気条件で膜小胞を産生する乳酸菌の選抜

○稲垣 日奈子¹, 菅野 美月², 二又 裕之^{1,2,3}, 田代 陽介^{1,2} (¹静大院・総合科技, ²静大院・創造, ³静大・グリーン研)

Selection of a lactic acid bacterium that produces membrane vesicles under aerobic conditions

○Hinako Inagaki¹, Mizuki Kanno², Hiroyuki Futamata^{1,2,3}, Yosuke Tashiro^{1,2} (¹Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ³Res. Inst. Green. Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

細菌は直径 20 - 400 nm のリボソーム様球状構造体である膜小胞 (Membrane vesicles; MVs) を放出する。膜小胞はタンパク質、脂質、核酸など細菌由来の物質を保持し、それらを輸送することにより細菌-細菌間および細菌-宿主相互作用に深く関与している。また膜小胞は抗原提示細胞に取り込まれやすいサイズであり、免疫調節機能を有していることから、ワクチンや薬物送達への医療応用に向けた研究が加速化している。現在主な研究対象であるグラム陰性菌由来の膜小胞は、炎症の要因となりうるリポ多糖を保有している。そのため、より安全性が高く生体に有益な効果をもたらす乳酸菌の膜小胞をカスタマイズすることができれば、医療応用に有望なツールとなりうる。乳酸菌などのグラム陽性菌は一般的にグラム陰性菌に比べて膜小胞形成量が少ないことから、本研究では好気条件下でも膜小胞を高生産する乳酸菌株の探索を試みた。乳酸菌ライブラリ 86 株より好気条件下で 1 次スクリーニングを行い、培養上清中のリン脂質濃度が高い株が一株選抜され、16SrRNA 解析の結果 *Leuconostoc pseudomesenteroides* であった。透過電子顕微鏡観察ならびにナノ粒子トラッキング解析を行ったところ、放出された膜小胞の直径は約 20 - 400 nm に分布していた。また SDS-PAGE の結果、特定のタンパク質が優先的に膜小胞に含有されていた。さらに本菌が好気で産生する膜小胞はマクロファージのサイトカイン IL-6 の放出を誘発することが示された。以上より、本研究では医療応用に向け膜小胞デザイン候補となりうる乳酸菌株を特定した。現在選抜した乳酸菌の全ゲノム解読と膜小胞構成タンパク質の同定を試みている。

DP1-05-09/P1-135

低コピープラスミドにクローニングされたパルミチン酸転移酵素遺伝子による大腸菌リポド A の改変

○野中 優希, 野口 翔, 田中 恵理, 尾之上 さくら, 川原 一芳 (関東学院大・理工・生命)

Modification of *E. coli*/lipidA using palmitoyltransferase genes cloned in low-copy number plasmids

○Yuki Nonaka, Sho Noguchi, Eri Tanaka, Sakura Onoue, Kazuyoshi Kawahara (Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

【目的】LPS が示す免疫活性の強さはリポド A を構成する脂肪酸の鎖長、結合位置、および分岐構造に依存している。分岐構造は生合成の後半で脂肪酸転移酵素によって形成されるが、我々はこれまで大腸菌に他菌種の脂肪酸転移遺伝子を導入することでリポド A の構造を改変してきた。遺伝子のクローニングと導入には pUC 系プラスミドを使用してきたが、形質転換で導入したプラスミドが容易に脱落するという問題点が見られた。この原因としてプラスミドのコピー数の多さが考えられたため、不和合性が異なり共存可能な低コピープラスミドに、異なるパルミチン酸 (C_{16:0}) 転移酵素遺伝子を組み込む方法、および 2 つの遺伝子を 1 つのプラスミドに同時に組み込む方法によりリポド A の改変を試みた。【方法と結果】LPS の抽出は 45% 熱フェノール法で行い、GLC で脂肪酸を定量した。リポド A の質量分析は MALDI-TOF MS で行った。C. jejuni 由来 *lpxJ* (3'位の分岐を形成) を組み込んだ pACYC177-tet-*lpxJ* をあらかじめ大腸菌変異株 KGU0377 株¹⁾ に導入し、さらにサルモネラ由来 *pagP* (2'位の分岐を形成) を組み込んだ pBR322 を導入したところ、2 つ目のプラスミド導入による C_{16:0} 量の変化はほとんどなく、pBR322 が脱落する傾向が見られた。次に *lpxJ* と *pagP* を 1 つの pACYC177-tet に組み込み、KGU0377 株に導入したところ、プラスミドは安定に存在し、C_{16:0} 量が増加した。C_{16:0} を 2 分子持つリポド A は検出されたが少量であった。今後は、目的の構造を持つリポド A の産生量を上げるために、プラスミドの改良を行う予定である。1) Sugawara, T. et al., *Microbiol. Immunol.*, 62, 497-506 (2018).

DP1-05-10/P1-136

大腸菌外膜小胞に含まれた抗原タンパク質による抗体産生誘導

○富永 龍之介^{1,2}, 安部 公博¹, 中村 知世^{2,3}, 西野 智彦^{2,3}, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹, 中尾 龍馬¹ (¹感染研・細菌¹, ²工科大院・バイオニクス, ³工科大・応生)

Induction of antibody production by antigen proteins encapsulated in *E. coli* outer membrane vesicles

○Ryunosuke Tominaga^{1,2}, Kimihiro Abe¹, Tomoyo Nakamura^{2,3}, Tomohiko Nishino^{2,3}, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiko Akeda¹, Ryoma Nakao¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., ³Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

【背景と目的】タンパク質の抗体取得においては、通常、精製したタンパク質を抗原として使用するが、今回、大腸菌の培養上清から抗原を封入した外膜小胞を回収し、これを動物に免疫することで新たな抗体作製方法を確立できるのではないかと考えた。本研究では、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* のペリプラズムタンパク質である PGN_1513 をモデル抗原として、大腸菌のマルトース結合タンパク (MBP) 融合タンパク質としてペリプラズム領域で発現させ、その培養上清から外膜小胞を回収した。これをマウスに免疫して抗体産生を誘導できるか検討した。

【方法】PGN_1513 に、MBP タグを付加させた発現ベクターを大腸菌に導入し、菌体へ浸透圧ショックを加えた後に回収したペリプラズム画分をアフィニティ精製したタンパク質、および培養上清から回収した外膜小胞を得て、それぞれ BALB/c マウスの皮下に 3 週間おきに計 3 回免疫を行った。免疫後血清中の抗体産生を ELISA とウエスタンブロットにより評価した。

【結果と考察】MBP 融合 PGN_1513 は、外膜小胞の主要なタンパク質として内封されることを確認された。外膜小胞の免疫によって得られる血清中の抗体産生量は、精製タンパク質による場合と同等かそれ以上であり、抗原を封入した外膜小胞の高い免疫原性が確認された。この方法はタンパク質の精製を行わずに、容易に抗体を取得する手法としての利用が期待できると考えられた。今後、免疫計画の最適化、異なる抗原、異なる大腸菌株の外膜小胞による免疫原性の検討などを行う予定である。

DP1-05-11/P1-137

キチン由来オリゴ糖による、カイコの Immune Priming の誘導

○三上 雄大¹, 田淵 史晃², 石井 雅樹³, 宮下 惇嗣¹ (1)帝京大・医療技術・臨床検査, (2)帝京大・医真菌・抗真菌免疫生物, (3)武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Induction of Immune Priming in the silkworm, Bombyx mori, by chitin-derived oligosaccharide

○Kazuhiro Mikami¹, Fumiaki Tabuchi², Masaki Ishii³, Atsushi Miyashita² (1)Dept. Med. Tech., Grad. Sch. Clinical Lab Sci., Teikyo Univ., (2)Lab. Antifungal Immunobiol., Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ., (3)Lab. Mol. Cell Biol., Sch. Pharm., Musashino Univ.)

昆虫は Immune priming と呼ばれる、自然免疫機構の活性化によって感染症に対する抵抗性を獲得する事が知られている。我々はこれまでに、菌体成分の投与により、カイコの Immune priming が誘導されることを示した。しかしながら、単一の分子により本現象が誘導された例は現在までに報告されていない。

本研究ではまず、免疫細胞を刺激することが知られている PMA により、カイコの Immune priming が誘導されるかを検討した。その結果、0.5 ng の PMA をカイコに投与しても 4 種の病原菌 (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae*) に対するカイコの感染抵抗性の誘導は見られなかった。

次に、植物やマウスの感染抵抗性を誘導する事が報告されている Chitohexaoxe (GN6) をカイコに投与し、Immune priming が誘導されるかを検討した。その結果、GN6 を前投与されたカイコは、*P. aeruginosa* 及び *Candida albicans* に対して感染抵抗性を示した。この時、カイコの *P. aeruginosa* 感染抵抗性を誘導するために必要な GN6 の 50% 有効量 (ED₅₀ 値) は 0.54 µg/larva であった。一方、*S. aureus*, *A. fumigatus*, 及び *R. oryzae* に対しては GN6 を投与されたカイコは感染抵抗性を示さなかった。

さらに、GN6 を投与したカイコの体液中に、抗菌ペプチドであるセクロビンが経時的に誘導されることが明らかとなった。

以上の結果は、キチン由来のオリゴ糖が、PMA では作用しない経路を介して、カイコの自然免疫応答を活性化し、カイコの感染症に対する抵抗性を誘導することを示唆している。

本研究は、生研支援センター「オープンイノベーション研究・実用化推進事業」(JPJ011937) の支援を受けて行った。

DP1-05-12/P1-138

自然免疫系を介して感染抵抗性を付与する植物精油の探索

○丸山 奈保^{1,2}, 宮下 惇嗣¹ (1)帝京大・医真菌研, (2)帝京平成大・健康メディカル・健康栄養)

Search for essential oils that confer infection resistance through the innate immune system

○Naho Maruyama^{1,2}, Atsushi Miyashita¹ (1)Teikyo Univ. Inst. Medical Mycology, (2)Dept. Health and Dietetics, Teikyo Heisei Univ.)

植物精油は、古くから抗菌作用や抗炎症作用、免疫調整作用を持つとして利用されてきた。我々は、精油やその成分であるテルペノイド類が自然免疫担当細胞(好中球、マクロファージ)の機能を調節する作用を有することを報告している。他方では、自然免疫システムに依存した生体防御の仕組みを構築しているカイコを用い、病原体由来成分や乳酸菌など多様な化合物群が、カイコの自然免疫を刺激し、*P. aeruginosa* や *C. albicans* に対する感染抵抗性を導くことを見出している。しかしながら、精油が動物個体レベルで自然免疫の増強により感染抵抗性を導くことの検証については、未だ知見が乏しい。そこで本研究では、カイコを用い、自然免疫システムを介して感染抵抗性を付与する精油の探索を行った。

カイコにレモングラス油およびゼラニウム油を混ぜた餌を与え、約 17 時間後に病原性微生物を感染させ、27°C で飼育し生存時間を観察した。その結果、上記の餌を与えられたカイコは *P. aeruginosa* や *C. albicans* 感染に対する抵抗性は示さなかったものの、糸状菌である *R. oryzae* 感染時の生存時間の延長が認められた。これらの結果は、精油成分の中に、カイコに対する感染抵抗性を付与する物質が存在することを示唆している。今後、精油や投与経路の違いにより、様々な病原性微生物への感染抵抗性に差が生じるかを調べるとともに、作用機序についても検討を行う予定である。

DP1-05-13/P1-139

キメラ毒素を基にした神経細胞特異的抗体送達キャリアーの開発およびげっ歯類モデルにおける活性評価

○宮下 慎一郎, 金澤 あかね, 大野 倫太郎, 相根 義昌 (東京農大・生物産業・食香粧化学)

Delivering of antibodies into neuron by chimeric-toxin: a follow-up study in rodent models

○Shin-Ichiro Miyashita, Akane Kanazawa, Rintaro Ohno, Yoshimasa Sagane (Dept. Food Aroma Cosme. Chem., Fac. Bio-ind., Tokyo NODAI)

ボツリヌス中毒は弛緩性筋麻痺を特徴とする重篤な症状を引き起こす可能性のある疾患である。*Clostridium botulinum* が産生するボツリヌス神経毒素 (BoNT, A-G 型) は三つのドメイン (LC-H_N-H_C) から構成される。まず受容体結合ドメイン (H_C) が神経細胞の受容体に特異的に結合し、チャンネル形成ドメイン (H_N) がエンドソーム膜から細胞質内へ酵素活性ドメイン (LC) を送達する。LC は神経伝達物質の放出に関与する SNARE 蛋白質を切断することで神経麻痺を引き起こす。我々は神経細胞内の LC を中和するための抗体送達キャリアーとして無毒化キメラ毒素を開発した。キメラ毒素は、BoNT 由来の H_C および BoNT-like 毒素である X 型 BoNT 由来の不活性 LC と H_N から構成される (^αBoNT/XA; ^αLCH_N/X-H_C/A)。本研究では、BoNT-like 毒素である BoNT/En あるいは PMP1 の LCH_N ドメインを用いた新規キメラ毒素を作製し、その VHH 抗体送達活性とマウスに対する毒性を評価した。その結果、VHH-^αBoNT/XA が BoNT/A に対してマウスに毒性を示さず、かつ最も高い抗体送達活性を示した。VHH-^αBoNT/XA はラット Digit Abduction score assay およびモルモット Bioassay においてボツリヌス中毒症状を緩和することが示された。今後は、神経変性疾患の病原蛋白質を標的とした抗体あるいはペプチド送達について検証する予定である。

DP1-05-14/P1-140

サルモネラワクチンにより誘導される菌排除機構の解析

○中山 ももこ¹, 江口 正浩¹, 小川 洋介² (1)農研機構・動衛研・動物感染症研究領域・細菌グループ, (2)農研機構・動衛研・衛生管理研究領域・病理生産病グループ)

Salmonella eliminating mechanism introduced by vaccination

○Momoko Nakayama¹, Masahiro Eguchi¹, Yohsuke Ogawa² (1)National Inst. Animal Health, NARO, (2)National Inst. Animal Health, NARO)

Salmonella 属菌による家畜のサルモネラ症が畜産分野に与える被害は甚大であり、また、畜産物を介して食中毒の原因となることから、その予防法のさらなる発展が望まれている。過去に、当研究室は *Salmonella* 属菌経口感染の防御には *Salmonella* 属菌分泌タンパク質 SseJ と O 抗原の両者が必要であることを示した。さらに、SseJ と O 抗原接種マウスにおける宿主免疫応答を解析し、経口感染の防御には液性及び細胞性免疫の両者が関与することを明らかにした。しかし、液性及び細胞性免疫応答に続く宿主細胞による菌の排除機構については解明できていない。そこで、本研究では菌の排除機構に関する解析を実施した。はじめに、BALB/c マウスに O 抗原として *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) の死菌を免疫し、脾臓細胞の反応をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、顆粒球様細胞集団の増加が認められ、当該細胞集団には CD11b の発現状態が異なる少なくとも 2 種の細胞が含まれていた。そこで、ST の死菌を免疫した BALB/c マウスに ST を経口感染させ、当該細胞集団の反応を解析すると、経口感染により集団内で CD11b 中等度発現細胞の比率が増加することが判明した。本 CD11b 中等度発現細胞はマウス好中球あるいはマクロファージマーカーである Ly-6C 及び CD11c を発現しておらず、現在、顆粒球及び単球に関するより詳細な表面抗原の解析を継続しており、さらに感染時の細胞の活性化について検討するために炎症性サイトカイン分泌能を中心に解析中である。

DP1-05-15/P1-141

結核菌感染マウス肺における乾酪壊死を伴う肉芽腫の単細胞 RNA シークエンス

○瀬戸 真太郎, 土方 美奈子, 慶長 直人 (結核研究所・生体防御部)

Single cell RNA sequencing of necrotic granulomas in active tuberculosis mouse model

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

生体に結核菌が感染すると、感染局所で肉芽腫を形成して、感染結核菌を拡散させないように封じ込める。しかし、肉芽腫内で結核菌の増殖が制御できない場合、感染マクロファージは泡沫化して細胞死が起こり、乾酪壊死を形成する。このことは、泡沫化マクロファージが肉芽腫内での感染結核菌のリザーバーであることを示唆する。ヒト結核の肉芽腫は乾酪壊死を伴う肉芽腫が特徴であるが、一般的なマウスでは結核菌を感染させても乾酪壊死を伴う肉芽腫は形成されない。近年、C3HeB/FeJ マウスでは感染肺に乾酪壊死を伴う肉芽腫が形成されることが明らかになっている。本研究では、本マウスモデルを用いて乾酪壊死を伴う肉芽腫の単細胞 RNA シークエンスを行った。遺伝子発現の特徴から、乾酪壊死を伴うマウス結核肉芽腫は好中球、マクロファージなどの貪食細胞のほかに、 $\gamma\delta$ T 細胞を含む T 細胞、NK 細胞、B 細胞、樹状細胞、形質細胞様樹状細胞などから構成されていた。 $\gamma\delta$ T 細胞は IL-17 を発現する細胞が多くを占め、CD4 T 細胞の画分にはナイーブ T 細胞が含まれていた。次にマクロファージ画分について解析した。泡沫化マクロファージのマーカー遺伝子である Plin2 遺伝子の発現が他画分よりも有意に増加しているマクロファージ画分を決定して、この画分で発現増加している複数の遺伝子を同定した。これらの遺伝子から、免疫染色によって泡沫化マクロファージで特異的に発現しているタンパク質を見出した。本研究結果から、詳細な遺伝子発現解析によって、結核菌増殖の場と封じ込める場の両方の特徴を持つ肉芽腫の結核病態における意義を明らかにすることができる。

DP1-05-16/P1-142

Impact of lactoferrin on the interaction between vaginal *Lactobacillus crispatus* and vaginal mucosa

○伊藤 雅洋, 田端 里帆, 三木 剛志, 羽田 健, 岡田 信彦 (北里大・薬・微生物)

○Masahiro Ito, Riho Tabata, Tsuyoshi Miki, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada (Dept. Microbiol., Sch. Ph., Kitasato Univ.)

Human lactoferrin (hLf) is present in human vaginal mucus, and its concentration increases as serum estrogen levels increase. The human vagina is mainly dominated by lactobacilli and their presence, particularly *L. crispatus*, is highly correlated with low bacterial diversity and overall female reproductive tract health. Here, we report that hLf significantly enhanced the adhesion ability of *L. crispatus* to vaginal epithelial cells, but not other vaginal *Lactobacillus* species. This increase of the adhesion ability of *L. crispatus* decreased when hLf or CD14 was inhibited, suggesting that hLf and CD14 are key components of the adhesion of *L. crispatus* to the vaginal mucosa. The increase of adhesion ability to vaginal epithelial cells significantly increased the production of anti-microbial peptide human β -defensin 2 along with JNK phosphorylation. Our findings indicate that lactoferrin acts as a kind of selective prebiotics for *L. crispatus* and further enhances its host-protective effects on the vaginal mucosa.

DP1-05-17/P1-143

A standardized evaluation method for bacterial UV sensitivity using light-emitting diodes

○石田 快¹, 斧田 優志^{1,3}, 石川 寧子¹, 相澤 俊彦³, 山内 繁晴³, 藤川 康夫³, 田中 智毅³, 上増 喬^{1,2}, 馬渡 一論^{1,2}, 高橋 章^{1,2} (1徳大院・医歯薬学・微生物防除, 2徳大院・医歯薬学・予防環境栄養, 3日亜化学工業(株))○Kai Ishida¹, Yushi Onoda^{1,3}, Yasuko Ishikawa¹, Toshihiko Aizawa³, Shigeharu Yamauchi³, Yasuo Fujikawa³, Tomotake Tanaka³, Takashi Uebanso^{1,2}, Kazuaki Mawatari^{1,2}, Akira Takahashi^{1,2} (1Dept. Microbiol. Cont., Inst. Biomed Sci., Tokushima Univ., 2Dept. Prev Environ Nutr., Inst. Biomed Sci., Tokushima Univ., 3Nichia Corp.)

UV light has different biological effects depending on wavelength. And the properties of light that can be used in living spaces have been diversified due to the development of light emitting diodes (LEDs). Therefore, it is important to examine the biological effect for UV irradiation using evaluation method suitable for LED optical characteristics and the unified light irradiation method. In this study, we analyzed bacterial photo-inactivation using unified UV-LED device. A unified irradiance device with LEDs of 250 to 365 nm developed and quantified optical characteristics. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Salmonella enterica* and *Enterococcus faecalis* were used for these experiments. The UV irradiation effects were evaluated using colony forming units. We established the unified UV irradiation conditions from device validity investigations. The results of 280 nm UV irradiation for bacteria showed that it was required for 4-35 mJ/cm² to inactivate -1 log. The wavelength dependence of 13 LEDs showed a strong wavelength dependence of the inactivation effect at wavelengths from 250 nm to 300 nm. These results were considered to be important knowledge for the development of sanitation management method by photo-inactivation.

DP1-06-01/P2-152

MRSA の抗菌薬感受性に対する β -caryophyllene の影響○野村 陽恵¹, 佐久間 克也², 一色 恭徳¹ (1城西大・薬・病原微生物, 2小川香料(株))Effects of β -caryophyllene on antimicrobial susceptibility of MRSA○Harue Nomura¹, Katsuya Sakuma², Yasunori Isshiki¹ (1Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Josai Univ., 2Ogawa & Co., Ltd.)

【背景】MRSA は、医療関連感染症の原因菌として広く知られている。現在、抗 MRSA 薬は僅か 6 剤のみであり、新たな治療薬の開発が求められている。そこで、MRSA が耐性を獲得したことで使用できない既存抗菌薬を再利用することを目的として、MRSA の抗菌薬感受性を増強させた β -caryophyllene の作用解析を行った。【材料】試験菌は、*Staphylococcus aureus* JCM2413 (MSSA), ATCC43300 (MRSA), JBCC018 (MRSA, 臨床分離株) を使用した。 β -caryophyllene は、小川香料株式会社より分与された。抗菌薬感受性増強効果の解析は、checkerboard 法を用いて評価した。また、RT-PCR とウェスタンブロットニング (WB) を用いて作用解析を行なった。【結果・考察】これまでに約 1000 香料について MRSA の抗菌薬感受性に対する影響を評価した結果、クローブやホップに含まれる香り成分である β -caryophyllene が β -lactam 系抗菌薬との併用により強い増強効果を示した。RT-PCR 解析の結果、 β -caryophyllene 存在下において *mecA* 遺伝子と *blaZ* 遺伝子の発現が減少し、WB 解析においても PBP2a 発現量が減少した。さらに、菌体膜への影響を評価した結果、脂質二重膜内部の流動性を上昇させた。これらのことから、 β -caryophyllene は菌体膜の流動性を変化させることで、菌体膜上に存在し、PBP2a や β -lactamase 発現を調節する MecR1 や BlaR1 に影響することで、MRSA の β -lactam 系抗菌薬に対する感受性を増強することが示唆された。

DP1-06-02/P2-153

バンコマイシン耐性腸球菌に対するハスカップ果実の抗菌効果

○南 正明¹, 中村 峰夫² (¹名古屋市大・医・細菌, ²中村薬局)

Antibacterial effect of *Lonicera caerulea* fruit against vancomycin-resistant enterococci

○Masaaki Minami¹, Mineo Nakamura² (¹Dept. Bacteriol. Nagoya City Univ. Grad. Sch. Med., ²Nakamura Pharm.)

【背景】近年、ヒトだけでなく家畜も含めた抗生物質耐性菌が増加しており、その中でバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が問題視されている。ハスカップは北海道固有の植物で、不老長寿の果実として知られている。我々はハスカップの抗菌効果についてこれまで本学会で報告してきたが、薬剤耐性菌に関する薬剤感受性に関する検討等は未だなされていない。本研究では、バンコマイシン (VCM) との併用効果を考慮したハスカップ果実の VRE に対する抗菌作用を検討した。【方法と材料】HKP エキスは、厚真産ハスカップ果実からメタノール抽出した。VRE は ATCC700221 を使用した。VCM 濃度は CLSI ガイドラインを参考に 32µg/mL を基準とした。薬剤感受性はディスク拡散法で、バイオフィルムの確認はサフラニンレッド染色法による光学顕微鏡で観察した。細菌の形態はネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡で観察した。【結果】ディスク拡散法による薬剤感受性試験では、HKP エキスを添加した VCM は VCM 単独よりも有意に細菌阻止円が拡大し、判定が薬剤耐性菌から薬剤感受性菌に変化した。また、サフラニンレッド染色によるバイオフィルム確認法では、HKP エキスを添加した VCM は VCM 単独よりも有意にバイオフィルム形成が抑制された。さらに、透過型電子顕微鏡によるネガティブ染色法での細菌形態確認方法では、HKP エキスを添加した VCM は VCM 単独よりも菌体が凝縮崩壊していた。【結論】我々の結果から、VRE に対して HKP エキスには VCM との併用による薬剤感受性増強作用や、バイオフィルム形成の抑制効果や、細菌菌体の凝縮崩壊効果が示唆された。

DP1-06-03/P2-154

A 群レンサ球菌の糖結合蛋白質 SPs0871 の機能を阻害する阻害剤の探索

○山脇 つくし¹, 中木戸 誠¹, 長門石 暁¹, 相川 知宏², カアベイロ ホセ³, 中川 一裕⁴, 津本 浩平^{1,5} (¹東大院・工, ²帯広畜産大・畜産, ³九大・院薬, ⁴京大院・医, ⁵東大・医科研)

The development of inhibitors that regulate the function of a sugar-binding protein of *S. pyogenes*

○Tsukushi Yamawaki¹, Makoto Nakakido¹, Satoru Nagatoishi¹, Chihiro Aikawa², Jose Caaveiro³, Ichiro Nakagawa⁴, Kouhei Tsumoto^{1,5} (¹Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, ²Sch. Agri., Obihiro Univ., ³Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyusyu Univ., ⁴Sch. Med., Univ. of Kyoto, ⁵Inst. of Med. Sci., The 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。SPs0871 は A 群レンサ球菌由来のマルトデキストリン結合蛋白質であり、病原性に欠かせない炭水化物の代謝に必要なマルトデキストリンを取り込む ABC トランスポーターの構成蛋白質である。本研究では、SPs0871 特異的に結合しマルトデキストリン獲得を阻害する新たな阻害剤の開発を目的とした。その中で、阻害剤の分子モダリティとして、高い親和性と高い特異性がある一方で、分子量が大きくコストのかかる抗体と、親和性と特異性は低い、分子量が小さく低コストである低分子を選択し、分子レベルでの制御様式の違いと抗菌活性の相関について解析した。抗体に関しては、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トションにより、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。低分子に関しては、*in silico*・*in vitro* スクリーニングを経てヒット化合物を 1 つ獲得した。この低分子は、マルトデキストリンの結合と競合し、菌の増殖も抑制した。いずれの阻害剤もリガンドの結合と競合する一方で、菌の増殖抑制能に違いが見られたのは、モダリティによる菌体表面へのアクセス性の違いに起因すると考えられる。原因として、A 群レンサ球菌が防御機構として毛莖膜を考慮しており、この点についても議論したい。

DP1-06-04/P2-155

Lonidamine as an inactivator for the BvgAS system of *Bordetella pertussis*

○大田 菜都子¹, 上野 俊哉¹, 平松 征洋¹, 堀口 安彦^{1,2} (¹阪大・微研・分子細菌学, ²阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Natsuko Ota¹, Toshiya Ueno¹, Yukihiko Hiramatsu¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (¹Dept. Mol. Bacteriol., RIMD., Osaka Univ., ²CiDER., 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⁺ and avirulent Bvg⁻ phases, the conversion of which is regulated by the BvgAS two-component system. *Bp* in the Bvg⁻ phase is incapable of establishing infection. Thus, substances leading *Bp* to the Bvg⁻ phase by inactivating the BvgAS system may provide an antibiotic-free therapeutic measure. Previously, we found a compound, lonidamine, as a promising candidate for this purpose after screening an FDA-approved drug library. In this study, we analyzed the action mode of lonidamine. Lonidamine was ineffective on a Bvg⁺-locked strain with a mutation in the gene of BvgS, a sensor kinase (*Bp* BvgS_{R570H}). The isothermal titration calorimetry revealed the direct binding of lonidamine to the periplasmic VFT2 domain of BvgS. These results indicate that lonidamine directly interacts with BvgS but not BvgA. A comparative study with analogs of lonidamine suggested that the carboxyl group of lonidamine is involved in the binding to VFT2. We are now investigating the structure of a lonidamine-VFT2 complex to further understand the interaction mechanism.

DP1-06-05/P2-156

Isolation and characterization of a useful broad-host-range prophage from *E. coli*

○Justin Edrian Revilleza, Ho Thi My Duyen, Kanate Thitiananpakorn, Ola Alessa, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Srivani Veeranarayanan, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Justin Edrian Revilleza, Ho Thi My Duyen, Kanate Thitiananpakorn, Ola Alessa, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyana, Srivani Veeranarayanan, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Antibiotic resistance among bacteria is rapidly spreading. To address this, our lab has established AB Capsid, an antibacterial agent loaded with CRISPR-Cas13a on phage capsids, showing its skill to sequence-specifically target antibiotic-resistant *E. coli* strains. Yet, the limited infection range of existing phages poses a clinical challenge. This study focuses on finding a broad-host range phage to enhance the application of AB capsid against *E. coli*.

Prophages were induced from 136 *E. coli* strains by Mitomycin C induction, and the host range was determined against 689 *E. coli* strains. Bacteriocin and prophage were separated with trypsin; prophages were characterized by whole genome sequencing and TEM observations. Then, bacterial receptor essential for phage infection was identified.

From 167 crude phage solutions, 64 showed bactericidal activities, and lysates of 25 kept their activity after trypsin exposure, yielding bacteriophages with infection rates of 0.15% to 33.67%. Phage φDon1, identified as a wide infection host range, possesses a genome size of approximately 32 kb and belongs to the *Myoviridae* family, as shown by TEM observation. Furthermore, it was found that φDon1 uses LPS as a bacterial receptor for phage infection.

The future plan is to construct an AB capsid with CRISPR-Cas13 system onto φDon1 capsid and evaluating its sequence-specific bactericidal activity.

DP1-06-06/P2-157

β-グリチルレチン酸がヒト歯肉縁上バイオフィームに与える影響の解析

○加藤 慎也^{1,2}, Xiangtao Ma¹, 佐藤 佳昌³, 奥村 綾³, 吉村 賢治³, 吉成 伸夫^{1,2}, 吉田 明弘^{1,4} (1松歯大・院歯・口腔科学, 2松歯大・歯周, 3花王株式会社ヒューマンヘルスケア研究所, 4松歯大・微生物)

Analysis of the effect of β-glycyrrhetic acid on human supragingival biofilms

○Shinya Kato^{1,2}, Xiangtao Ma¹, Kayo Satou³, Aya Okumura³, Kenji Yoshimura³, Nobuo Yoshinari^{1,2}, Akihiro Yoshida^{1,4} (1Dept. Oral Health Sci., Grad. Sch. Matsumoto Dent. Univ., 2Dept. Periodontol., Matsumoto Dent. Univ., 3Human Health Care Products Research, Kao Corporation, 4Dept. Microbiol., Matsumoto Dent. Univ.)

【目的】β-グリチルレチン酸 (BGA) は甘草由来の抗炎症・抗菌成分である。我々は BGA のヒト歯肉縁上歯垢から採取した細菌 (口腔細菌) によるバイオフィーム (縁上歯垢 BF) への影響を解析した。【方法】BGA および塩化セチルピリジニウム (CPC) の口腔細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、BF への影響を解析する濃度とした。チャンバースライドシステムに形成した縁上歯垢 BF に、BGA と CPC を 6 時間作用させ、生菌死菌の割合を Live/Dead 染色と蛍光顕微鏡を用いて解析した。BGA と CPC の BF の剥離効果について、ポリスチレンプレート上の縁上歯垢 BF に BGA, CPC を 6 時間曝露後、浮遊細菌量を指標に解析した。縁上歯垢 BF の脆弱性については、BGA, CPC を 6 時間曝露した縁上歯垢 BF に超音波照射を行い、剥離 BF 量を解析した。【結果と考察】口腔細菌に対する BGA および CPC の MIC は、それぞれ 128μg/ml および 40μg/ml であった。この濃度を縁上歯垢 BF に作用させ Live/Dead 染色を行ったところ、抗菌物質を含まない対照群の全細菌に対する死菌の割合は 40.0% であったが、CPC は 85.7%, BGA は 60.0% であった。BF の脆弱性については BGA, CPC および対照群について差は見られなかった。これらの結果から、BGA は縁上歯垢 BF を殺菌し、化学的作用により剥離する効果はあるものの、BF の脆弱性に影響を与えるものでないことが示唆された。

DP1-06-07/P2-158

Photothermal Ablation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by Phage Gold Nanorod Bioconjugates

○Sarangi Jayathilake, 川口 智史, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, XinEe Tan, 相羽 由詞, 宮永 一彦, Longzhu Cui (自治医科大・医・細菌学)

○Sarangi Jayathilake, Tomofumi Kawaguchi, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, XinEe Tan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Longzhu Cui (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen implicated in severe, challenging-to-treat infections due to its intrinsic nature of antimicrobial resistance and tolerance. Although phage therapy is considered as an effective therapeutic option, the concerns persist regarding post-therapy containment and safety risks. In this study, we propose an antibacterial approach that involves the use of *P. aeruginosa* phages conjugated to gold nanorods (AuNR) to achieve targeted photothermal therapy. Phages were decorated with a gold-binding peptide through phage display, and AuNRs were allowed to bind on phages. The morphological, physical, and chemical properties of conjugates were characterized and after confirming successful conjugation, their targeted photothermal therapeutic potential was assessed under near-infrared (NIR) irradiation by mixing the conjugates either with *P. aeruginosa* suspension or mature biofilms. Post therapy, *P. aeruginosa* planktonic cell number exhibited a 5-log reduction compared to untreated controls. In mature biofilm, a 4.6-log reduction was observed without compromising the viability of the surrounding mammalian cells. This study demonstrates the successful utilization of phages' bacteria-targeting property combined with the photothermal properties of AuNR to develop a simple yet powerful method to eradicate complex biofilms systematically.

DP1-06-08/P2-159

脂肪酸の黄色ブドウ球菌および化膿レンサ球菌に対する抗菌活性

○大段 慶十郎^{1,2}, 鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, 荒井 千夏^{3,4}, 久恒 順三^{3,4}, 菅原 庸^{3,4}, 相川 友直², 菅井 基行^{3,4}, 小松澤 均^{1,3} (1広島大・医系科学研究科・細菌学, 2広島大・医系科学研究科・口腔外科学, 3広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, 4国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Antibacterial activity of fatty acids against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*

○Keijuro Ohdan^{1,2}, Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, Chika Arai^{3,4}, Junzo Hisatsune^{3,4}, Yo Sugawara^{3,4}, Tomonao Aikawa², Motoyuki Sugai^{3,4}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,3} (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 2Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 3Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., 4Antimicrobial Resistance Res. Ctr., National Inst. Infectious Diseases)

【背景】*Staphylococcus aureus* (Sa) と *Streptococcus pyogenes* (Sp) は、健康なヒトの鼻腔や咽頭に常在するが、時に重大な疾患を引き起こすことがある。一方、ヒトの皮膚や鼻腔には抗菌活性を持つ遊離脂肪酸が存在し、細菌の定着・侵入を防ぐ役割があることも知られている。本研究では、皮膚や鼻腔にみられる遊離脂肪酸と、Sa 及び Sp の 2 菌種における脂肪酸の感受性について検証した。【方法】ヒトに存在する Myristic acid (MA), Stearic acid (SA), Palmitic acid (PA), Linoleic acid (LA), Palmitoleic acid (PTA), Oleic acid (OA) の 6 つの脂肪酸について、Sp SF340 株および Sa MW2 株を用いてディスク法及び増殖曲線の測定によって抗菌活性を測定した。LA, PTA については、Sa 54 株の MIC を測定し、Sa については薬剤耐性遺伝子の保有との関連性について検討した。【結果】ディスク法において、Sp は、MA, LA, PTA に対し感受性を認め、Sa では、PTA のみ感受性を認めた。増殖阻害実験の結果、200μM の LA と PTA を加えた培地において、Sa の増殖阻害が認められた。Sa 54 株における感受性試験について、PTA の MIC はおおよそ 37.5~75μM であり、良好な感受性を示した。一方、LA の MIC については 46 株が 75μM 以上を示し、PTA に比べ感受性が低かった。また、*mecA* を保有する MRSA は MSSA に比較し、有意に PTA の MIC が高かった。【考察】ヒトの皮膚に存在する脂肪酸のうち、特に LA と PTA は 2 菌種に対し強い抗菌活性があり、PTA の方が LA より Sa に対して強い抗菌活性を示した。さらに、MRSA は PTA 感受性が低く、これは MRSA の脂肪酸抵抗性を介した皮膚・鼻腔定着力につながっている可能性がある。

DP1-06-09/P2-161

WQ-3810: A Novel Fluoroquinolone Exhibiting Potency Against Fluoroquinolone-Resistant *M. avium*

○Sasini Jayaweera¹, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima^{1,2}, Yasuhiko Suzuki^{1,2} (1Div. Bioresources, International Inst. Zoonosis Control, Hokkaido Univ., 2Inst. Vaccine Research and Development, Hokkaido Univ.)

○Sasini Jayaweera¹, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima^{1,2}, Yasuhiko Suzuki^{1,2} (1Div. Bioresources, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., 2Inst. Vaccine Research and Development, Hokkaido Univ.)

M. avium, part of the *M. avium* complex (MAC), is an opportunistic pathogen causing MAC lung diseases. Fluoroquinolones (FQs) are recommended for macrolide-resistant MAC infection, but overuse may lead to resistance. WQ-3810, a new FQ with significant efficacy against FQ-resistant pathogens, lacks sufficient studies on its activity against *M. avium*. This study assesses WQ-3810's inhibitory effect on recombinant wild-type (WT) gyrase A, B, and four mutant gyrase A proteins (Ala91Val, Asp95Ala, Asp95Gly, and Asp95Tyr) using a DNA supercoiling inhibitory assay, determining the drug concentration inhibiting half of the enzyme activity (IC₅₀). WQ-3810's Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was tested against 11 clinical *M. avium* isolates (7WT, 2Asp95Gly and, 2Asp95Tyr), and results were compared with Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Levofloxacin from a previous study. WQ-3810 exhibited dose-dependent inhibition against WT and mutant gyrase A. All four mutant DNA gyrase A showed higher IC₅₀s (2.60 - 4.47 fold) than the WT. In comparison, Ciprofloxacin had the highest IC₅₀s for all mutants, while WQ-3810 had the lowest IC₅₀s for three mutants. Additionally, WQ-3810 MICs were comparable to Moxifloxacin for the WT and half of the MICs for mutants, suggesting a favorable inhibitory profile against both WT and mutant *M. avium* DNA gyrase A, highlighting its therapeutic potential.

DP1-06-10/P2-162

Development and Evaluation of Antibacterial Capsids Against Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

○川口 智史¹, 渡邊 真弥¹, 劉 怡¹, 氣 篤 恒太郎^{1,2}, XinEe Tan¹, 崔 龍洙¹ (自治医科大・医・細菌学, ²感染症・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Tomofumi Kawaguchi¹, Shinya Watanabe¹, Yi Liu¹, Kotaro Kiga^{1,2}, XinEe Tan¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Drug and Vaccine Development, NIID)

Antimicrobial resistance (AMR) is a growing global threat, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) stands out as one of the most pressing AMR pathogens. Stemming from the stagnation in antibacterial drug development, bacteriophages (phages), which are viruses that infect bacteria, have attracted attention for their potential in combating the AMR. This study aimed to develop a novel phage formulation, the antibacterial capsid (AB-capsid), designed to selectively eliminates *P. aeruginosa* harboring a targeted gene. This was achieved by encapsulating CRISPR-Cas13a, an enzyme with sequence-specific bactericidal activity, within phage capsid. *P. aeruginosa* strains expressing *bla*_{IMP-1}, a carbapenem resistance gene, were employed as a model to assess the bactericidal activity of the AB-capsid. Seven spacers, previously demonstrated to be effective in *Escherichia coli*, were loaded into *P. aeruginosa* phage capsid alongside CRISPR-Cas13a system. AB-capsids were collected at a titer of 10⁸ TFU/mL. The presence of an inducer triggered the expression of *bla*_{IMP-1} in target host, and spacer IMP1_702 was shown to have pronounced effect eliminating *P. aeruginosa* expressing *bla*_{IMP-1}. These findings highlight the successful construction of an AB-capsid, a genetically modified *P. aeruginosa* phage carrying CRISPR-Cas13a, and its ability to eradicate target *P. aeruginosa*.

DP1-06-11/P2-163

クオラムセンシング阻害剤 Furanone C-30 は緑膿菌のニトロソ化ストレス感受性を上昇させる

○鈴木 真^{1,3}, 森田 雄二², 石毛 昭太¹, 甲斐 心皓¹, 川崎 健治³, 松下 一之³, 小倉 康平⁴, 秋山 徹⁵, 清水 健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, ⁴京都大・農学・食品生物学専攻食品生産工学, ⁵国立国際医療研究センター・研究所・感染症制御)

Quorum-sensing inhibitor furanone C-30 increases nitrosative stress susceptibility of *P. aeruginosa*

○Shin Suzuki^{1,3}, Yuji Morita², Shota Ishige¹, Kiyohiro Kai¹, Kenji Kawasaki³, Kazuyuki Matsushita³, Kohei Ogura⁴, Tohru Miyoshi-Akiyama⁵, Takeshi Shimizu¹ (¹Dept. Molecular Infectiology, Grad. Sch. Medicine, Chiba Univ., ²Dept. Infection Control Science, Meiji Pharmaceutical Univ., ³Dept. Laboratory Medicine, Chiba Univ. Hospital, ⁴Div. Food Science and Biotechnology, Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ., ⁵Dept. Infect. Dis. Nat. Center. Global Health Med.)

【目的】緑膿菌による慢性気道感染症には低用量マクロライド療法が有効であり、マクロライドはクオラムセンシング (QS) の阻害に関与することが明らかになっている。しかし、マクロライド処理後に一酸化窒素 (NO) への抵抗性を示す株が一定数存在することも明らかになっている。そこで QS 阻害剤である Furanone C-30 (C-30) を用いて緑膿菌の NO 感受性に与える影響を検討し、さらに C-30 の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 PAO1, 薬剤排出ポンプ単独保持株, 薬剤排出ポンプ強制発現株, 臨床分離株を対象とした。NO 感受性の測定は、10 µg/mL エリスロマイシン (EM), 10 µM C-30, NO ドナーは 100 µM DETA NONOate, 排出ポンプ阻害剤は 10 µg/mL PAβN を用いた。薬剤排出ポンプ遺伝子発現解析はリアルタイム RT-PCR 法により行い、薬剤排出ポンプおよび QS 関連遺伝子の変異解析は次世代シーケンサーによる全ゲノム解析により行った。

【結果】PAO1 および薬剤排出ポンプ単独保持株では、C-30 添加時に EM 添加時以上または同等程度に NO 感受性が上昇した。また、MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM の過剰発現株においても C-30 により感受性が上昇した。MexAB-OprM の過剰発現株においては C-30 による感受性の変化はみられなかったが、PAβN を追加することにより感受性は上昇した。臨床分離株では 11 株中 9 株で C-30 により大幅に感受性は上昇し、残りの 2 株は PAβN の追加により 9 株と同等程度の感受性を示した。遺伝子変異解析の結果、この 2 株には *mexAB-oprM* の抑制遺伝子 *nalD* にフレームシフト変異が認められた。これらの結果より、C-30 は MexAB-OprM の過剰発現により効果が阻害されることが示唆された。

DP1-06-12/P2-164

腸球菌臨床分離株における bacteriocin 遺伝子の分布および抗菌活性の解析

○藤井 愛弓^{1,2}, 松尾 美樹^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, 荒井 千夏^{3,4}, 久恒 順三^{3,4}, 菅原 庸⁴, 相川 友直², 菅井 基行^{3,4}, 小松澤 均^{1,3} (広島大・医系科学研究所・細菌, ²広島大・医系科学研究所・口腔外科, ³広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, ⁴国立感染症・薬剤耐性センター)

Distribution and antibacterial activity of bacteriocin genes in clinical isolates of Enterococci

○Ayumi Fujii^{1,2}, Miki Matsuo^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, Chika Arai^{3,4}, Junzo Hisatsune^{3,4}, Yo Sugawara⁴, Tomonao Aikawa², Motoyuki Sugai^{3,4}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,3} (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., ³Project Research Center for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., ⁴Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Inst. Infectious Diseases)

【背景】Bacteriocin とは近縁の細菌に抗菌活性を示すペプチドの総称であり、腸球菌は複数の bacteriocin を産生することが報告されている。近年、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含む薬剤耐性菌が世界的に問題となっており、新しい抗菌薬の開発が期待される。本研究では、VRE に有効な bacteriocin の探索を目的とし、腸球菌臨床分離株における bacteriocin 遺伝子の保有状況ならびに種々の細菌種に対する抗菌活性を網羅的に解析した。

【方法】広島大学病院にて臨床的に分離された腸球菌 (7 菌種) 165 株を使用した。各菌株の全ゲノム塩基配列を決定し、bacteriocin 探索ソフト (BAGEL4) を用いて bacteriocin 遺伝子の同定を行った。腸球菌が産生する bacteriocin の抗菌活性は、VRE を含む腸球菌属に対して軟寒天オーバーレイ法を用いて評価した。

【結果】全ゲノムデータを用いた解析の結果、Cytolysin (32%), Bacteriocin T8 (8.4%), Enterocin NKR-5-3B (6.7%), Enterocin B (0.6%), Enterocin P (3.0%), Enterolysin A (14%) をコードする bacteriocin 遺伝子を認めた。また、1 つの株で 2 つの bacteriocin 遺伝子を保有する株も認められた。抗菌活性については、Cytolysin 遺伝子を保有する *E. faecalis* は、*E. faecalis* や *E. faecium* に活性を認めた。Bacteriocin T8 を保有する *E. faecium* は *E. faecalis* に活性を示すが、*E. faecium* に対する活性は多様性を認めた。Enterolysin A を保有する *E. faecalis* は *E. faecalis* に比較し、*E. faecium* で強い活性を認めた。その他の遺伝子保有株ではほとんど活性は認められなかった。以上の結果より、腸球菌は多様な bacteriocin を産生し、一部、VRE にも有効であることが示された。

DP1-06-13/P2-165

Optimizing Cas13 variants in engineered bacteriophages for potent bactericidal activity against MRSA

○Adeline Yeo Syin Lian, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, 相羽 由詞, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Adeline Yeo Syin Lian, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyana, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The rise in MRSA infections demands innovative therapies, with bacteriophages emerging as promising candidates. We have developed a CRISPR-Cas13a-engineered bacteriophage targeting MRSA, yet challenges persist in synthesis and potency. This study aims to enhance the antimicrobial efficacy against MRSA in engineered bacteriophages by optimizing diverse CRISPR-Cas13 variants. Five Cas13 subtypes and five Cas13a class variants were curated, codon-optimized, and synthesized for targeting *Staphylococcus aureus* (SA). Synthesized Cas13 variants were cloned into plasmids containing *mecA* guide RNA. Bactericidal activity was assessed using a dual plasmid system by introducing the cloned plasmids into SA strains harboring a plasmid expressing *mecA* or a null expression plasmid. The Cas13 variants were loaded into a non-propagating engineered bacteriophage, rebooted, and evaluated for bactericidal activity. Cas13a displayed robust bactericidal activity among subtypes. Smaller subtypes, Cas13x and Cas13y, showed higher bacteriophage rebooting efficiency, albeit no observed bactericidal activity. Cas13a class variants showed strong bactericidal activity, and the construction of engineered bacteriophages is ongoing. The results suggest that the CRISPR-Cas13 system, especially Cas13a, in tandem with engineered bacteriophages, holds promise as a potent antimicrobial agent against MRSA infections.

DP1-06-14/P1-153**Isolation and Characterization of Broad-Host-Range Prophages Against MRSA**

○Tergel Nayanjin, XinEe Tan, Anujin Batbold, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 宮永 一彦, 笹原 鉄平, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitianapakorn, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Tergel Nayanjin, XinEe Tan, Anujin Batbold, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Teppei Sasahara, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitianapakorn, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Antimicrobial resistance poses a formidable global health challenge, exacerbated by the emergence of multidrug-resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Conventional antibiotic treatments prove ineffective in these cases, driving interest in alternative solutions like phage therapy. In our laboratory, we've explored the application of CRISPR-Cas13a-loaded phage capsid as a novel antimicrobial agent targeting MRSA. However, similar to other phage-based methods, our approach encounters limitations due to its inability to infect a diverse range of *S. aureus* strains. Therefore, it is crucial to identify novel prophages with a broader host range to enhance the applicability of the antimicrobial agent. To address this, we induced 138 crude phage solutions using Mitomycin C from our collection of *S. aureus* clinical strains. When tested against 64 target MRSA strains, 56 of the phage solutions exhibited varying degrees of host range, ranging from 1.6% to 81.3%. The top 5 phage solutions with the broadest host range showed an expanded infectivity (39.1 to 81.3%), compared to our previously isolated phages. In this study, we successfully isolated a few candidate phage solutions with broader host ranges, showcasing their versatility for use in combination to achieve enhanced antimicrobial effectiveness.

DP1-06-15/P1-154**Regulation of *Staphylococcus aureus* growth by *Pseudomonas aeruginosa* extracellular vesicles**

○Phawinee Subsomwong¹, 石合 崇人¹, 成田 浩司², 中根 明夫^{3,4}, 浅野 クリスナ^{1,3} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ³Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ⁴Hirosaki Univ. Health Welf.)

○Phawinee Subsomwong¹, Takahito Ishiai¹, Kouji Narita², Akio Nakane^{3,4}, Krisana Asano^{1,3} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ³Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ⁴Hirosaki Univ. Health Welf.)

Pseudomonas aeruginosa (Pa) and *Staphylococcus aureus* (Sa) commonly coexist in chronic wounds. Although the exoproducts of Pa have been observed to affect growth and pathogenicity of Sa, the detailed mechanism, particularly by Pa-derived extracellular vesicles (PaEVs), is unknown. In this study, we revealed the inhibitory effect of PaEVs on Sa growth. We found that PaEVs inhibited Sa growth independently of the pyocyanin component and iron chelation, and showed no bactericidal activity. Differences in protein profile of Sa between PaEV-treated and non-treated groups were analyzed by LC-MS/MS. We found a significant decrease in lactate dehydrogenase 2 and formate acetyltransferase enzymes in the pyruvate fermentation pathway after treating Sa with PaEVs. Additionally, the inhibitory effect of PaEVs was abolished in the presence of pyruvate or oxygen. Furthermore, proteomic analysis of PaEVs identified three candidate lytic enzymes including Lap aminopeptidase, Las protease, and RlpA endolytic peptidoglycan transglycosylase that have the potential to affect the pyruvate metabolic enzymes in Sa. Elucidation of this molecular mechanism is thought to be useful for controlling Sa infections in the future. In conclusion, this study demonstrated that PaEVs downregulate the pyruvate metabolic enzymes, resulting in an inhibition of Sa growth.

DP1-06-16/P1-155**Antimicrobial Activity of Bahia Propolis and its Fractionation Effects on Oral Bacteria**

○瀧川 博樹¹, 真下 千穂¹, 池上 志穂², 八巻 礼訓², 円山 由郷¹, 南部 隆之¹, 沖永 敏則¹ (¹大歯大・歯・細菌, ²株式会社山田養蜂場・健康科学研究所)

○Hiroki Takigawa¹, Chiho Mashimo¹, Shiho Ikegami², Ayanori Yamaki², Hugo Maruyama¹, Takayuki Nambu¹, Toshinori Okinaga¹ (¹Dept. Bact., Sch. Dent., Osaka Dent Univ., ²Yamada Bee Company Health Science Labo.)

Propolis is a resinous mixture composed of plant-derived substances and bee saliva collected by bees. We have previously reported the antimicrobial activity of ethanol-extracted propolis (EEP) from the state of Bahia, Brazil, against oral bacteria, particularly periodontal pathogenic bacteria. In this study, we fractionated the antimicrobial compounds of Bahia EEP provided by Yamada Bee Company, Inc., and investigated the impact of these fractions on *Actinomyces oris* (*A. oris*), an early dental plaque-forming bacterium, and *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), a periodontal pathogen. Five fractions from Bahia EEP were prepared using HPLC, and antibacterial activity against both bacteria was observed in fraction 5. Subsequently, seven sub-fractions (5a-g) were obtained from fraction 5, and experiments revealed that only sub-fraction 5e inhibited the growth of *A. oris* and *P. gingivalis*. To identify the active components within sub-fraction 5e, three additional sub-fractions were created. One sub-fraction showed a noticeable effect on the growth of both *A. oris* and *P. gingivalis*. These results suggest the presence of antimicrobial components in propolis from Bahia, Brazil. The ongoing work involves the identification of these specific components.

DP1-06-17/P1-156**Antimycobacterial activities of tanshinones and speculations on their mechanism of action**

○森 茂太郎¹, 田村 敏生², 前田 百美², 塚本 裕美子², 阿戸 学², 見理 剛¹ (¹感染研・細菌第二部, ²感染研・ハンセン病研究センター・感染制御部)

○Shigetaro Mori¹, Toshiki Tamura², Yumi Maeda², Yumiko Tsukamoto², Manabu Ato², Tsuyoshi Kenri¹ (¹Dept. Bacteriology II, NIID, ²Dept. Mycobacteriology, LRC, NIID)

In this study, we screened a natural compound library for anti-tuberculosis activity and discovered that tanshinones (tanshinone I, tanshinone IIA, dihydrotanshinone I, dihydroisotanshinone I, and cryptotanshinone) exhibited potent antituberculosis activity. Tanshinones are natural compounds isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and classified as abietane diterpenoids. Tanshinones exhibited antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, which are resistant to existing anti-tuberculosis drugs, and against non-tuberculous mycobacteria. In addition, dihydrotanshinone I and dihydroisotanshinone I showed the most potent antitubercular activity against *M. tuberculosis* H37Rv strain in macrophages. Furthermore, tanshinone showed an additive effect when used in combination with rifampicin. Next, strains with reduced susceptibility to tanshinone were generated and their genomes were analyzed to identify the site of the mutation. The results showed that the gene responsible for cell wall biosynthesis was mutated, suggesting that the cell walls are targets for the mechanism of action of the compound. On the other hand, mutations were also found in the genes encoding MmpL5 and its regulators, suggesting the presence of intracellular targets of tanshinones. These findings are expected to lead to the development of anti-tuberculosis drugs with novel mechanisms of action.

DP1-07-01/P1-012

2023年に小児から分離された肺炎球菌の血清型分布の動向

○川口谷 充代¹, 漆原 範子¹, Meiji Soe Aung¹, 大橋 伸英¹, 木村 優希², 堀野 裕香², 伊藤 政彦², 小林 宣道¹ (1札幌医科大学・医・衛生学, 2札幌臨床検査センター株式会社)

Current trends in serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in 2023

○Mitsuyo Kawaguchiya¹, Noriko Urushibara¹, Meiji Soe Aung¹, Nobuhide Ohashi¹, Yuuki Kimura², Yuuka Horino², Masahiko Ito², Nobumichi Kobayashi¹ (1Dept. Hygiene, Sapporo Medical Univ. Sch. Med., 2Sapporo Clinical Laboratory Inc.)

【背景】本邦では13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)が小児への定期接種として使用されている。PCVの世界的普及により、本ワクチンに含まれない血清型による肺炎球菌感染症の増加およびその薬剤耐性が臨床上の問題となっている。米国では2023年6月からPCV13に7つの血清型を加えたPCV20に切り替えられており、一方、本邦におけるPCV20の小児への適用は現在承認申請中である。本研究では2023年に分離された小児由来肺炎球菌の血清型分布を調査した。【対象・方法】2023年3月~7月に北海道内の医療機関から集められた小児由来肺炎球菌353株を対象とした。血清型の判別はCenters for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html>)に記載されている多重PCR法を用い、血清型群6, 15, 24亜型の判別には我々が考案した鑑別法(Kawaguchiya et al., J Med Microbiol.2018他)を用いた。【結果・考察】対象株は鼻汁(53.6%), 鼻腔(42.2%), 咽頭, 耳漏から分離され、全菌株中、PCVワクチンに含有される血清型の割合はPCV13において3.1%, PCV20においては22.1%であった。血清型の分布では23A(16.1%)が最も多く、次いで35B(15.3%), 15A(10.5%), 15C(9.3%), 34(9.1%)で、これら5つのPCV非含有血清型で全体の60.3%を占めていた。加えて莢膜を持たない無莢膜型(2.0%)も確認された。本研究から本邦への導入前のPCV20に含まれない血清型の分布率が77.9%と高いことが明らかとなったことから、継続的なサーベイランスの実施が重要であると考えられた。これら菌株における薬剤感受性の結果および考察は、本総会で合わせて報告する。

DP1-07-02/P2-013

Genomic characteristics and drug susceptibility of *Helicobacter suis* from humans, monkeys, and pigs

○林原 絵美子¹, 鈴木 仁人², 青木 沙恵¹, 松井 英則¹, 柴山 恵吾³, 見理 剛¹ (1感染研・細菌第二部, 2感染研・薬剤耐性研究センター, 3名古屋大 院・医・細菌学)

○Emiko Rimbara¹, Masato Suzuki², Sae Aoki¹, Hidenori Matsui¹, Keigo Shibayama³, Tsuyoshi Kenri¹ (1Dept. Bacteriol. II, Nat. Inst. Infect. Dis., 2Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis., 3Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

Helicobacter suis infecting pigs and monkeys is known to infect human stomach and cause gastric diseases. In this study, genomic characteristics and drug resistance of difficult-to-culture *H. suis* isolates from patients were compared with those of isolates from monkeys and pigs. Whole genome sequences of 49 human and pig isolates were determined so far; 13 draft genome sequences of pigs and monkeys isolates obtained from NCBI were also included in the analysis. Phylogenetic analysis showed all human isolates belonged to the clade as the pig isolates, that were genetically distinct from the monkey isolates. Furthermore, the genetic background of human isolates tended to be related to the geographical region of the patients' residence, though further analysis is needed to confirm this trend. Antimicrobial MICs of human isolates were similar to pig isolates, although one human isolate showed a high MIC for clarithromycin and harbored A to G mutation in 23S rRNA position, known to contribute to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. The results obtained in this study will provide valuable information for understanding the transmission route as well as the eradication strategies of *H. suis* infection in human.

Non-member collaborators: Kengo Tokunaga, Toshihisa Tsukadaira, Akira Takeda, Sohachi Nanjo, Naoko Kitazawa, Daisuke Chinda, Makoto Sasaki, Katsuhiko Mabe

DP1-07-03/P1-014

日本の犬膿皮症由来メチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* の分子疫学

○佐々木 崇¹, 山崎 真大², 原田 和記³, 西藤 公司⁴ (1札幌大・医・動物実験, 2岩手大・農・小動物病態診断学, 3鳥取大・農・獣医内科学, 4東京農工大・農・動物生命科学部門)

Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in canine pyoderma

○Takashi Sasaki¹, Masahiro Yamasaki², Kazuki Harada³, Koji Nishifuji⁴ (1Animal Research Center, Sch. Med., Sapporo Med. Univ., 2Lab. Vet. Small Animal Int. Med., Facult. Agr., Iwate Univ., 3Dept. Vet. Int. Med., Facult. Agr., Tottori Univ., 4Div. Animal Life Sci., Fac. Agr., Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

犬膿皮性膿皮症は、*Staphylococcus* 属を主な起因菌とする細菌性皮膚疾患であり、セファレキシン(CEX)が第一選択薬とされている。2000年代以降、院内感染型メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) クローンが世界的に蔓延しているが、本疾患におけるMRSP クローンの国内動向や海外流行クローンとの関連は不明であった。本研究では、本疾患一次診療症例分離株の薬剤耐性とMRSP クローン動向の把握を目的とした。2018-2023年の分離株に対し、薬剤感受性試験、全ゲノム解析による遺伝子型解析と分子系統解析を行った。

全82株中、*S. pseudintermedius* が76.8%, *S. schleiferi* が23.2%を占め、*S. aureus* は0%であった。メチシリン耐性率は26.8%であった。メチシリン感受性株では、CEX感受性率100%に対し、フルオロキノロン系感受性率が50.8%と顕著に低く、過去の国内高次診療症例報告の同値[Kawakamiら(2007-2009年):66.2%, Kasaiら(2009-20014年):63.2%]をも下回ったことから、市中動物病院におけるCEX回避傾向とフルオロキノロン使用増が示唆された。MRSP株に対する遺伝子型解析から、院内感染型MRSP クローン(ST71-SCCmec III型)はわずか1株と稀であった。一方、ST121-SCCmec V型の互いに近縁な市中感染型MRSP クローンの国内流行が確認され、海外の流行報告がないことから日本固有の現象と考えられた。当クローンについて、リスク要因解析と継続監視が求められる。

DP1-07-04/P1-015

広範囲薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii* ST1050 の全ゲノム解析

○西田 智¹, 斧 康雄^{1,2}, 吉野 友祐¹ (1帝京大・医・微生物, 2帝京平成大・健康メディカル)

Whole genome sequence analysis of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST1050

○Satoshi Nishida¹, Yasuo Ono^{1,2}, Yusuke Yoshino¹ (1Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., 2Fac. Health Med. Sci., Teikyo Heisei Univ.)

【目的】*Acinetobacter baumannii* は日和見感染症の病原体であり、多剤耐性 *A. baumannii* (MDRA) による感染症は有効な治療薬の少ないことから临床上重要な問題となっている。近年、MDRAよりも広範囲に薬剤耐性の *A. baumannii* (XDRA) が分離されている。海外治療歴のある患者から分離されたXDRAの薬剤耐性機構と分子疫学解析を目的として全ゲノム配列(WGS)を解析した。

【方法】帝京大学医学部附属病院においてインドネシアで治療歴のある日本人患者から分離されたXDRAからゲノムDNAを抽出した。WGSはIllumina MiSeqおよびOxford Nanopore Technologies GridIONを用いたハイブリッドゲノムシーケンシングにより決定した。

【結果】*de novo* アセンブリーの結果、3.9 Mbの染色体と70 kbおよび8.7 kbのプラスミドの塩基配列を決定できた。MLSTはOxford ST1050及びPasteur ST2であり、グローバルクローン2(GC2)に属していた。カルバペネマーゼ遺伝子として bla_{OXA-23} と bla_{OXA-66} を有していた。キノロン耐性遺伝子として $gyrA$ S81Lと $parC$ S84Lの変異を有していた。また、高度アミノグリコシド耐性遺伝子 $armA$ を保有していた。更に、アミノグリコシド耐性トランスポゾン $TnaphA6$ を接合伝達プラスミドに保有していた。

【考察】本分離株は全ゲノム解析からオーストラリアと北米で近年確認されたMDRAと類似していた。ST1050株は2010年に北米で分離された後、オーストラリアの集中治療室でアウトブレイクを起こしている。最近では、南アジア、中東での分離が確認され、アフリカの病院でアウトブレイクが起きている。今後、本研究の分離株や類縁のST1050株については引き続き病院や地域での広がりを注視していく必要がある。

DP1-07-05/P1-016

Specific clonal types of MRSA associated with skin and soft tissue infections

金子 寛, 小林 華, 大竹 省吾, 柳 侑花, 齊藤 拓光, 金井 美樹, 〇中南 秀将 (東京薬大・薬・臨床微生物)

Hiroshi Kaneko, Hana Kobayashi, Shogo Otake, Yuka Yanagi, Takumi Saito, Miki Kanai, 〇Hidemasa Nakaminami (Dept. Clin. Microbiol., Sch. Pharm., Tokyo Univ. Pharm. and Life Sci.)

Staphylococcus aureus cause skin and soft tissue infections (SSTIs). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) accounts for approximately 25% of the strains isolated from outpatients with SSTIs in Japan. Exfoliative toxin and Panton-Valentine leukocidin (PVL) have been reported to be associated with impetigo and deep-seated SSTIs, respectively. We analysed molecular epidemiological characteristics of MRSA isolated from patients with SSTIs in Japan to clarify these associations.

A total of 979 *S. aureus* strains isolated from SSTI patients in Japan between 2018 and 2021 were assessed. Molecular epidemiological characteristics were analysed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis.

The mean prevalence of MRSA among *S. aureus* was 29.8%. MRSA strains were most frequently isolated from patients with impetigo, followed by furuncles/carbuncles. Clonal complex (CC)121 and CC89 strains accounted for 56.9% and 13.7%, respectively, of the MRSA isolated from patients with impetigo. PVL-positive CC8 strains were the major strains of MRSA in furuncles/carbuncles, abscesses and cellulitis, which are classified as deep-seated SSTIs. Most PVL-positive CC8 strains were classified as the globally disseminated PVL-positive clone USA300 and its variants.

This study revealed that certain MRSA genotypes are associated with specific SSTI types.

DP1-07-06/P2-009

国内ウシおよびヒト由来腸管出血性大腸菌の全ゲノム配列および志賀毒素ファージの比較解析

〇李 謙一¹, 伊豫田 淳¹, 泉谷 秀昌¹, 名塚 岳宏², 楠本 正博³, 秋庭 正人⁴, 菅原 庸⁵, 菅井 基行⁵, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細1, (2)さいたま市・食肉衛生検査, (3)農研機構・動衛研, (4)酪農大・獣医細菌, (5)感染研・AMR)

Comparative genomics of whole genome and Shiga toxin phage of EHEC from bovine and human

〇Ken-ichi Lee¹, Sunao Iyoda¹, Hidemasa Izumiya¹, Takehiro Nazuka², Masahiro Kusumoto³, Masato Akiba⁴, Yo Sugawara⁵, Motoyuki Sugai⁵, Yukihiko Akeda¹ (1)Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Meat Hygiene Inspect., Saitama City, (3)Natl. Inst. Animal Health, NARO, (4)Vet. Bacteriol., Rakuno Univ., (5)AMR Center, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、国内で年間3,000名以上の感染者が継続して報告されている。EHECの自然宿主はウシなどの反芻類であり、ウシなどの反芻類からヒトにいたるまでの伝播経路を明確にすることがEHEC感染症の制御のためには重要である。また、EHECの主な病原性因子である志賀毒素 (Stx) は染色体上のプロファージ領域にコードされており、水平伝播するとされている。そこで、EHECおよびStxファージの伝播動態の理解のために、国内ウシおよびヒト由来株の志賀毒素 (Stx) ファージの塩基配列を決定し、比較解析を行った。【材料および方法】2000年から2020年に全国で分離されたウシ由来EHEC計185株 (O113, O157, O26等) について、HiSeqX (Illumina) でWGSを解析した。感染研・細菌第一部でWGS解析を行った約10,000株のヒト由来から、10か所以内のSNPを有する株を抽出した。また一部の株 (22株) については、MinION (Oxford Nanopore) によってStxファージの全長配列を決定し、ウシおよびヒト由来株間での比較を行った。【結果および考察】WGS解析を行ったウシ由来株のうち、18株 (O157, 15株; O103, 2株; O26, 1株) で、ヒト由来株と10か所以内のSNPとなる株が見出された。Stxファージ配列の比較からは、近縁なStxファージ (average nucleotide identity > 99%) がOX21:H19およびOUT:H2間、およびO111:H8およびO156:H25間で見出された。これらの菌株は系統的に大きく離れており、Stxファージが系統を越えて水平伝播していることが示唆された。これらの結果から、ウシはヒトに感染するEHECクローンを保菌するとともにStxファージのリザーバーでもある可能性が示された。

DP1-07-07/P2-010

Epidemiological shifts in and impact of COVID-19 on streptococcal toxic shock syndrome

〇池辺 忠義¹, 山口 貴弘², 奥野 ルミ³, 大塚 仁⁴, 溝腰 朗人⁵, 池田 佳歩⁵, 渡邊 奈々子⁵, 伊達 佳美⁵, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細1, (2)大安研・微生物部, (3)都健安研・微生物部, (4)山口県環境センター・保健科学部, (5)溶血レンサ球菌レファレンスセンター)

〇Tadayoshi Ikebe¹, Takahiro Yamaguchi², Rumi Okuno³, Hitoshi Otsuka⁴, Akito Mizokoshi⁵, Kaho Ikeda⁵, Nanako Watanabe⁵, Yoshimi Date⁵, Yukihiko Akeda¹ (1)Dept. Bacterol. I, NIID, (2)Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, (3)Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, (4)Dept. Pub. Health Sci., Yamaguchi Pref. Inst. Pub. Health & Env., (5)The Working Group for Beta-Hemolytic Streptococci in Japan)

Streptococcal toxic shock syndrome (STSS) is caused by group A *Streptococcus* (GAS; *Streptococcus pyogenes*) strains. In Japan, the number of STSS cases has decreased during COVID-19 pandemic; however, the underlying reason remains unclear. Moreover, information on distribution and prevalence of specific *emm* types in STSS cases is scarce. Hence, we investigated the reason for the decreased number of STSS cases in Japan.

We genotyped *emm* of 526 GAS isolates obtained from 526 patients with STSS between 2019 and 2022. The distributions of *emm* types in each year were compared. The *emm1* type was predominant, with the highest proportion in 2019, which decreased after 2020 following the onset of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Strains isolated during the pandemic correlated with strains associated with skin infection, whereas those isolated during the pre-pandemic period correlated with strains associated with both throat and skin infections. The decrease in the annual number of STSS cases during the COVID-19 pandemic could be due to a decreased proportion of strains associated with pharyngeal infections.

Potential associations between pandemic and STSS numbers with respect to public health measures, such as wearing masks and changes in healthcare-seeking behavior, may have affected the number of GAS-induced infections.

DP1-07-08/P2-011

鹿児島県内土壌中の破傷風菌の分布調査

〇大岡 唯祐¹, 志多田 千恵², 山本 隆敏², 坂本 智代美², 堀場 千尋³, 黒田 誠³, 西 順一郎¹, 高橋 元秀² (1)鹿児島大・医歯学・微生物, (2)熊本保健科学大・生物毒素・抗毒素共同研究講座, (3)国立感染研・病原体ゲノム解析研究センター)

Characterization of *Clostridium tetani* detected from the soil in Kagoshima prefecture

〇Tadasuke Ooka¹, Chie Shitada², Takatoshi Yamamoto², Chiyomi Sakamoto², Chihiro Horiba³, Makoto Kuroda³, Junichiro Nishi¹, Motohide Takahashi² (1)Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., (2)Tox. Biol. Res. Lab., Kumamoto Heal. Sci. Univ., (3)Pathogen Genomics Center, NIID)

【背景・目的】全国の破傷風患者は年間100例以上の報告がある。破傷風トキソイドの定期予防接種が開始された1968年以前に生まれた人は、ワクチン接種の機会を逸し、中和抗体価も低い。そのため50歳以上での患者報告件数が特に多く、全体の90%以上を占めている。我々は2023年に報告した熊本県内土壌中の破傷風菌分布調査で感染リスクを科学的に証明し、ゲノム多様性や毒素産生性が異なる菌株を特定、薬剤耐性菌の存在も明らかにした。今回は隣県の鹿児島県内の土壌から破傷風菌分離を試み、分離菌の遺伝的多様性や過去に報告された菌の性状と比較検討した。

【方法】県内の土壌10か所を任意に選び、1か所につき地表面と10cm下層の2検体を採取した。クックドミート培地に添加後、80°C, 60°Cの処理後および非加熱の条件で37°C培養した。分離同定方法は、(1)細菌学的検査：各培養菌液は血液寒天培地に接種し37°Cで嫌気培養後、培地表面を遊走した先端をグラム染色し、特徴的なフィラメント状の長桿菌を確認した。(2)遺伝学的検査：PCRによる破傷風毒素遺伝子を確認した。(3)生化学的検査：Rapid ID 32A Api キットを用いて菌の同定を実施した。

【結果・考察】本土、奄美大島それぞれ5ヶ所から16株 (3ヶ所) と11株 (3ヶ所) を分離同定した。全体の陽性率は60.0%、分離率は45.0%であり、熊本県の調査に比べて両者ともやや低い値であった (陽性率71.7%、分離率57.1%)。分離率の比較では、本土と奄美大島で検出率に大きな差はなかった。分離した菌株のゲノム解析と奄美大島以外の諸島の土壌中の破傷風菌分布調査は継続中である。

DP1-07-09/P2-012

Genetic analysis of coagulase-negative staphylococci colonizing healthy adults

○廣瀬 弥奈¹, Meiji Soe Aung², 小林 宣道² (1北医療大・歯・小児歯, 2札幌大・医・衛生)

○Mina Hirose¹, Meiji Soe Aung², Nobumichi Kobayashi² (1Dept. Ped. Dent., Div. Oral Growth and Development, Sch. Dent., Health Sciences Univ. Hokkaido, 2Dept. Hygiene. Sch. Med. Sapporo Med. Univ.)

Objective: Antimicrobial resistance and pathogenic traits of coagulase-negative staphylococci (CoNS) colonizing healthy adults were analyzed to understand their potential risk of infection.

Methods: Saliva and hand swabs were collected from 444 university students who consented, and cultured on selective agar plate. Bacterial species were identified by 16S rRNA gene sequence, and genes associated with virulence of *S. capitis* were analyzed by PCR and sequencing. Antimicrobial susceptibility was measured by broth microdilution test.

Results: CoNS were recovered from 158 subjects (221 isolates), and classified into 18 species, with *S. capitis*/*S. caprae* being the most common (39%), followed by *S. warneri* (19%), *S. epidermidis* (16%). *mecA* was detected in 11 isolates that were mostly *S. epidermidis*, showing multiple drug resistance. Arginine catabolic mobile element (ACME) was detected in only *S. capitis* and *S. epidermidis* in more than half of isolates. Among *S. capitis*, any virulence factors associated with NRCS-A clone (*nsr*, *ebh*, *tarJ*) were found in 69% (59/86), with 5 isolates harboring all the three genes. An *S. capitis* isolate with *mecA* had *ebh* and *tarJ*, and showed multiple drug resistance.

Conclusion: ACME and the virulence traits of the NRCS-A clone were revealed to be prevalent among *S. capitis* colonizing healthy individuals.

DP1-07-10/P2-014

Characteristics of Staphylococcaceae in Retail Meat Products in Hokkaido: A One Health Perspective

○漆原 範子¹, アウン メイジソウ¹, 川口谷 充代¹, 大橋 伸英^{1,2}, 小林 宣道¹ (1札幌医科大学・医・衛生, 2札幌医科大学・医・口腔外科)

○Noriko Urushibara¹, Meiji Soe Aung¹, Mitsuyo Kawaguchiya¹, Nobuhide Ohashi^{1,2}, Nobumichi Kobayashi¹ (1Dept. Hygiene, Sch. Med., Sapporo Med. Univ., 2Dept. Oral Surgery, Sch. Med., Sapporo Med. Univ.)

This study investigates bacteria population in retail meat products and potential public health risks associated with food consumption, focusing on grained chicken and pork from retail outlets in Sapporo City. A total of 207 colonies (133 chicken, 74 pork) were recovered from Mannitol salt agar plate. Sequence analysis of the 16S rRNA V1-V4 region identified 6 *S. aureus*, 189 Non-*aureus* staphylococci and mammaliococci, 5 *Macrococcus*, and other miscellaneous strains (n=7). The most prevalent species group¹⁾ in chicken was Simulans (40/133), while Saprophytic group dominated in pork (28/74). Antibiotic resistance profiles of the 200 Staphylococcaceae, except for seven classified as 'others,' were distinct from those found in healthcare settings. Anti-Fosfomycin resistance was the most prevalent (n=25, 12.5%), followed by anti-Erythromycin resistance (n=13, 6.5%). Resistance rates against other antimicrobials were below 5%. Six *S. aureus* isolates were identified in chicken products, belonging to the avian-associated lineage: ST5-t3478 (n=3), ST5-t242 (n=2), single locus variant of ST15-t084 (n=1). The three ST5-t3478 isolates, additionally, harbored chicken-specific mobile genetic elements. Variation in microbial composition and antibiotic resistance profiles suggests no direct bacterial transmission between retail meat products and humans.

¹⁾Lamers RP et al, BMC Evol Biol, 2012

DP1-07-11/P2-015

埼玉県内の下水における ESBL 産生大腸菌および MRSA の分離状況

○村井 美代¹, 村山 浩基¹, 滝野 景¹, 菅原 庸², 于 連升², 鹿山 鎮男², 久恒 順三², 岸井 こずゑ¹ (1埼玉県立大院・保健医療福祉, 2感染研・AMR研究センター)

Survey of ESBL-producing *Escherichia coli* and MRSA from wastewater in Saitama, Japan

○Miyo Murai¹, Hiroki Murayama¹, Hikari Takino¹, Yo Sugawara², Liansheng Yu², Shizuo Kayama², Junzo Hisatsune², Kozue Kishii¹ (1Dept. Health Soc. Serv., Grad. Sch. Saitama Pref. Univ., 2AMR-RC, NIID)

【緒言】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や基質拡張型 βラクタマーゼ産生大腸菌 (ESBL-Ec) の臨床分離率は、依然高い割合で推移している。その一因に、薬剤耐性菌の保菌が市中の健康者との広まりがある。我々は健康人における薬剤耐性細菌の保菌状況の一端を探るため、下水流入水中の細菌に占める薬剤耐性菌の割合を、ESBL-Ec と MRSA を指標に継続的に調査している。今回は 2023 年の 8 月末から 9 月にかけて、埼玉県内の 4 ヶ所の下水処理場から採取した下水流入水における薬剤耐性菌分離率の比較を行った。併せて、分離された薬剤耐性細菌 clone の分布に地域差があるのか検討する。【方法】下水流入水を、大腸菌及び黄色ブドウ球菌の選択培地 TBX 培地および X-SA 培地に接種し 37°C で一晚培養した。増殖した大腸菌および黄色ブドウ球菌を示す青色コロニー 100 個程度を、CTX 5µg/ml 添加 TBX または CFX 含有 X-MRSA に穿刺し、翌日増殖した菌株を ESBL-Ec または MRSA とした。得られた菌株は同定の後、PCR で ESBL 型別または *mecA* の保有と SCC*mec* 型、TSST-1, PVL 等の遺伝子を確認した。現在全ゲノム配列決定中である。【結果と考察】下水中の菌濃度は、大腸菌が平均 5.7×10⁴ CFU/ml、黄色ブドウ球菌が平均 1.0×10² CFU/ml で、両菌とも最大で 6 倍差の流域人口による違いは見られなかった。ESBL-Ec 率は平均 3.82% で処理場間に差はなく、MRSA 率は平均 13.4% だったが、採取施設により 3.8~35.2% とばらついた。ESBL 遺伝子型は CTX-M-9G が多数を占めたが、1カ所では CTX-M-1G の割合が半数を占めた。MRSA で TSST-1 や PVL の保有株は、処理人口の多い施設に集中する傾向があった。全ゲノム配列が得られ次第、詳細な clonality について解析する。

DP1-07-12/P2-017

新興下痢症原因菌 *Escherichia albertii* における道内ヒト由来株と野鳥由来株の比較

○佐藤 凜¹, 伊藤 政彦², 柞刈 貴洋³, 櫻井 由絵⁴, 池田 徹也¹ (1北海道立衛生研究所・細菌, 2札幌臨床検査センター, 3北海道社会事業協会富良野病院, 4道総研審試)

Comparison of human- and bird-derived strains of *Escherichia albertii* in Hokkaido

○Rin Satoh¹, Masahiko Ito², Takahiro Kinebuchi³, Yosie Sakurai⁴, Tetsuya Ikeda¹ (1Div. Bacterial., Hokkaido Inst. Public Health, 2Sapporo Clinical Laboratory Inc., 3Furano Hosp., Hokkaido Institutional Society, 4Natl. Inst. of Animal Industry., Hokkaido Research Organization)

【背景】*Escherichia albertii* は、2003 年に *Escherichia* 属の新菌種として発表された比較的新しい腸管病原菌である。*E. albertii* は出血性大腸炎など重篤な症状を引き起こす可能性が指摘されており、公衆衛生上、重要視されつつある。本菌はべん毛が無く非運動性とされてきたが、低浸透圧下ではべん毛を産生し運動性を示し、腸管上皮細胞内へ侵入するようになることが報告されている。また、鳥類は自然界での重要な保菌動物と考えられており、これまでも野鳥からの分離報告はあったが、ヒト由来株との比較はほとんどされていない。そこで本研究では、北海道内で分離されたヒト由来及び野鳥由来 *E. albertii* を対象とし、株の由来による運動性の違いを解析することを目的とした。【方法】北海道内で 2008 年 8 月から 2024 年 1 月にかけて分離された *E. albertii* 220 株 (ヒト由来株 131 株, 野鳥由来株 89 株) を調査に供した。供試菌株を 10 倍希釈 TSB に接種して 20°C で 18~24 時間、深底シャーレで静置培養した後、顕微鏡で生菌観察を行い、運動性を確認した。また、一部の菌株については SNVs (一塩基多型) 解析を行うことで、分離株同士の関連性についても調査した。【結果と考察】ヒト由来株は他の細菌感染症と同様に夏季 (7~8 月) の分離が多い傾向にあった。ヒト由来株の運動性陽性率 (67.9%) は野鳥由来株の運動性陽性率 (39.3%) より有意に高かった (χ^2 検定, $p<0.01$)。SNVs 解析では、4 つのクラスターに分けられた。いずれのクラスターにも野鳥株とヒト株が混在し、運動性株と非運動性株も混在しており、特定の系統にだけ非運動性株が見られるわけではないことが明らかになった。

DP1-07-13

【発表取り下げ】

【Withdrawn】

DP1-07-15

【発表取り下げ】

【Withdrawn】

DP1-07-14/P1-019

口腔・鼻腔から分離したグラム陰性薬剤耐性菌の性状解析および細菌叢との関連性

○川柳 智暉^{1,2}, 松尾 美樹^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, 朝川 美加李⁴, 菅原 庸⁵, 荒井 千夏⁵, 竹下 徹⁴, 柴 秀樹¹, 菅井 基行⁵, 小松澤 均^{2,3} (1)広島大・医系科学研究科・歯髄生物学, (2)広島大・医系科学研究科・細菌学, (3)広島大・口腔感染症プロジェクト研究センター, (4)九州大・歯学研究院・口腔予防医学, (5)国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Characterization of GN-ARB from nasal and oral cavities and their relationship to bacterial flora

○Tomoki Kawayanagi^{1,2}, Miki Matsuo^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, Mikari Asakawa⁴, Yo Sugawara⁵, Chika Arai⁵, Toru Takeshita⁴, Hideki Shiba¹, Motoyuki Sugai⁵, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (1)Dept. Biological Endodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed., Hiroshima Univ., (3)Project. Research Center for Oral Infectious Diseases., Hiroshima Univ., (4)Sec. Preventive & Public Health Dentist., Div. Oral Health., Growth and Deve., Kyushu Univ., (5)Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Inst. Infectious Dis.)

【目的】薬剤耐性菌 (ARB) の問題は世界的な公衆衛生上の脅威である。最近、口腔内にも内科領域で問題となるようなグラム陰性薬剤耐性菌 (GN-ARB) である腸内細菌目細菌、アシネトバクター、緑膿菌などの分離が報告されている。その詳細な実態を明らかにするため、鼻腔・口腔から GN-ARB を分離した (昨年度の本総会で報告)。今回、分離した GN-ARB のゲノム解析、および GN-ARB の有無と細菌叢との関連性を検討した。【方法】広島大学病院歯科外来を受診した患者 514 名の口腔・鼻腔から分離した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 144 株 (口腔: 131 株, 鼻腔: 13 株) を用いた。ゲノム解析によって分離株の菌種と薬剤耐性遺伝子 (ESBL・カルバペネマーゼ等) を同定し、細菌叢解析により GN-ARB 保有 (定着) に関与する要因を検討した。【結果と考察】ESBL 遺伝子 (blaCTX-M-15, blaCTX-M-27 と blaTEM-1B および blaCME-1) はそれぞれ E.coli 1 株, E.coli 3 株および Elizabethkingia sp. 1 株 (合計 5 株) から検出され、カルバペネマーゼ遺伝子 (blaOXA 型, blaIND 型, blaGOB 型と blaB 型および blaLI 型) はそれぞれ Acinetobacter 属 15 株, Chryseobacterium 属 6 株と Pseudomonas 属 1 株, Elizabethkingia 属 1 株および Stenotrophomonas 属 34 株 (合計 57 株) から検出された。特にこれらの遺伝子保有株は 1 株 (Chryseobacterium sp.) を除いて全て口腔からの分離株であった。ARB 保有の有無で、口腔細菌叢の全体的な細菌組成や優勢に存在する常在細菌の存在量に有意差は認められなかったが、通常口腔では構成比率の低い特定の菌種 (S.aureus, C.simulans, Klebsiella aerogenes) が ARB 保有群で有意に検出された。

DP1-07-16/P2-016

Prevalence and characteristics of *Escherichia fergusonii* isolated from farm animals in Japan

○桃木 杏奈¹, 玉村 雪乃¹, 新井 暢夫¹, 岩田 剛敏¹, 渡部 綾子¹, 楠本 正博^{1,2} (1)農研機構・動衛研, (2)大阪公立大院・獣医)

○Anna Momoki¹, Yukino Tamamura-Andoh¹, Nobuo Arai¹, Taketoshi Iwata¹, Ayako Watanabe-Yanai¹, Masahiro Kusumoto^{1,2} (1)Natl. Inst. Anim. Health, NARO., (2)Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Escherichia fergusonii was proposed as a new bacterial species in 1985 and has been isolated from cases of human and animal infections. The multidrug-resistant strains with plasmids similar to those found in *E. coli* and *Salmonella enterica* have also been reported, and there is concern about the potential health hazards to humans and animals caused by *E. fergusonii*. In this study, we collected 3,998 fecal samples obtained from healthy farm animals (1,592, 1,843, and 563 from cattle, swine, and chicken, respectively) in Japan and analyzed a total of 1,213 *E. fergusonii* isolates for virulence genes and antimicrobial susceptibilities. The prevalence of *E. fergusonii* in cattle, swine, and chicken were 16.9% (269/1,592), 36.8% (679/1,843), and 41.0% (231/563), respectively. The gene encoding EAST1 was found in one (0.4%) cattle, 15 (2.2%) swine, and 12 (4.7%) chicken isolates, suggesting that virulence factor-producing *E. fergusonii* is potentially present in farm animals. *E. fergusonii* isolates were more resistant to ampicillin, streptomycin, and tetracycline (the resistance rates were 6.3%-58.9%, 8.1%-54.5%, and 17.6%-55.7%, respectively) than to other antimicrobial agents in each animal, and the distribution of *E. fergusonii* resistance was similar to that of *E. coli* isolated from the same fecal samples.

DP1-07-17/P2-018

尿路感染症による血流感染から分離された ESBL 産性大腸菌の遺伝学的性質

○田中 真由子¹, 須田 智也¹, 近藤 恒平², Aa Haeruman Azam³, Minh Le Nhat², 八代 龍⁴, 丹治 保典⁵, 氣駕 恒太郎³, 松田 剛明^{1,5}, 花輪 智子¹ (杏林大・医・総合医療学, ²国立感染症研・AMRセンター, ³国立感染症研・治ワク, ⁴国立感染症研・ハンセン病研究センター, ⁵杏林大・医・救急医学)

Genetic Characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections

○Mayuko Tanaka¹, Tomoya Suda¹, Kohei Kondo², Aa Haeruman Azam³, Minh Le Nhat², Ryu Yashiro⁴, Yasunori Tanji⁵, Kotaro Kiga³, Takeaki Matsuda^{1,5}, Tomoko Hanawa¹ (1Dept. Gen. Med., Kyorin Univ. Sch. Med., ²AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ³Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Leprosy Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁵Dept. Traum. Crit. Care Med., Kyorin Univ. Sch. Med.)

【背景・目的】基質拡張型β-ラクタマーゼ産性大腸菌 (ESBL-Ec) の臨床分離株の解析は、AMR 対策に重要となる。本研究では尿路感染症による血流感染から分離された ESBL-Ec の遺伝学的性質を明らかにすることを目的とした。【材料・方法】ESBL-Ec は、2017-22 年に杏林大学医学部付属病院救急科および救急総合診療科を受診した尿路感染症の患者血液由来の 46 株を用いた。ST131 の検出には Cica Geneus E. coli POT KIT (関東化学) を用い、Phylogroup は Clermont らの方法 (Clermont et al, 2019) で決定した。MLST, 血清型, fimH 型はゲノム情報より解析した。また、病原性関連遺伝子 (VAGs) は、PCR 法と in silico 解析で検出した。敗血症の判定はカルテ情報を元に行った。【結果・考察】今回用いた 46 株の phylogroup 内訳は、B2 が 43 株、D が 3 株であった。ST131 は 38 株検出され、non-ST131 の株については ST1193, 38 が各 3 株、ST95, 73 が各 1 株であった。ST131 からランダムに抽出した 15 株のうち 11 株は、世界的に流行している ST131-B2-O25:H4-fimH30 であった。PCR で検出した尿路病原性大腸菌 (UPEC) に代表的な 15 種の VAGs 保有数は、phylogroup D で少ない傾向がみられたが、in silico 解析の結果では ST131 では分泌システム関連遺伝子が少ないなど、non-ST131 の株と比較して VAGs 数が有意に少なかった。一方、non-ST131 が分離された症例の 68% が敗血症を引き起こしていたのに対し、ST131 では 21% であり有意に少なかった。以上の結果から、UPEC に特徴的な VAGs のレパートリーは、MLST により異なっていることが示唆され、さらに重症化と関連する可能性が考えられた。今後、オープンデータのゲノム情報を含めて詳細に解析する予定である。

DP1-07-18/P2-019

Pathogenicity of the novel *Helicobacter* spp. infecting the stomach of dogs and cats in Japan

○青木 沙恵¹, 鈴木 仁人², 松井 英則¹, 森 茂太郎¹, 柴山 恵吾³, 見理 剛¹, 林原 絵美子¹ (1感染症研・細菌第2部, 2感染研・AMRセンター, 3名古屋大・医・分子病原細菌学)

○Sae Aoki¹, Masato Suzuki², Hidenori Matsui¹, Shigetaru Mori¹, Keigo Shibayama³, Tsuyoshi Kenri¹, Emiko Rimbara¹ (1Dept. Bacteriol. II, NIID, ²Antimicrobial. Resist. Res. Cent., NIID, ³Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

Helicobacter pylori is the most prevalent gastric *Helicobacter* species infecting human, while gastric *Helicobacter* species infecting dogs and cats, such as *Helicobacter ailurogastricus*, are also known to infect human and cause gastric diseases. By survey of cats and dogs visiting veterinary clinic, we isolated three novel *Helicobacter* species strains: NHP19-003, NHP19-012, and NHP21-005. An analysis based on *ureAB* genes amplified from DNA of gastric biopsies indicated that 85% of dogs and 33% of cats were infected with one of the three novel species. To assess the pathogenicity of gastric *Helicobacter* species infecting dogs and cats, *in vivo* and *in vitro* infection experiments were conducted. In mice infection experiments, the number of T cells infiltrating the gastric mucosa differed among strains, particularly in mice infected with *H. ailurogastricus* NHP21-4376 strain from human and the novel *Helicobacter* species strain NHP21-005 from a cat. In cell infection experiments, differences in cytotoxicity between strains were also observed. An additional experiment is currently ongoing and its results will be presented at the meeting. Further investigation is needed to verify the pathogenic difference among gastric non-*H. pylori* *Helicobacter* species infecting dogs, cats and humans.

Non-member collaborators; Wan-Ying Du, Sachiyo Nomura, Taisuke Nakagawa, Yuko Goto-Koshino, Koichi Ohno

DP1-07-19/P2-020

大阪で分離した *emm1* 型 A 群溶血性レンサ球菌からの M1UK 株の検出について

○山口 貴弘^{1,2}, 安楽 正輝¹, 山本 香織¹, 土井 健司¹, 原田 哲也¹, 河原 隆二¹, 池辺 忠義², 河合 高生¹ (1大安研・微生物部, 2感染研・細菌第一部)

Detection of M1UK from *emm1* type group A *Streptococcus pyogenes* isolated in Osaka

○Takahiro Yamaguchi^{1,2}, Masaki Anraku¹, Kaori Yamamoto¹, Takeshi Doi¹, Tetsuya Harada¹, Ryuji Kawahara¹, Tadayoshi Ikebe², Takao Kawai¹ (1Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, 2Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

M タンパク遺伝子 *emm1* 型の溶血性レンサ球菌 (GAS) は GAS の中でも、病原性が強いと言われてきた。この *emm1* 型 GAS がより高病原性となった「M1UK 株」が、2015 年頃から英国、デンマーク、米国、カナダ、オーストラリアなど世界各国で相次いで報告され、さらに日本国内でも検出されることが報告された。日本国内の M1UK 株の実態を把握するため、本発表では過去に大阪府の GAS による侵襲性および非侵襲性症例から分離した *emm1* 型 GAS について、M1UK 株の鑑別を実施した。実験に供した株は 2015 年 1 月から 2024 年 1 月にかけて大阪府で収集した *emm1* 型の 74 株を使用した。鑑別法は、国立感染症研究所の A 群溶血性レンサ球菌検査マニュアルに記載されているコンベンショナル PCR 法を用いて実施した。その結果、侵襲性感染症由来の 3 株 (2018 年, 2019 年, 2020 年にそれぞれ 1 株) が M1UK 株であることが明らかとなった。一方で咽頭炎などの非侵襲性感染症由来分離株では M1UK 株は検出されなかった。この結果から、大阪においても M1UK 株が存在することが明らかとなった。現在、コロナ禍も落ち着いてきたことに伴って、例年以上に GAS 感染症が流行している。M1UK 株のリスクや流行状況を把握するためにも、侵襲性および非侵襲性由来の GAS を解析することが重要である。特に大阪では、今後インパウンドの増加が見込まれ、海外から M1UK 株がさらに入来する恐れもあることから、菌株解析を継続して実施する必要があると考えられた。

DP1-08-01/P1-059

A lipoprotein involved in membrane vesicle-mediated iron acquisition in *Corynebacterium glutamicum*

○藤田 真愛¹, 永久保 利紀^{2,3}, 川島 花雪¹, 野村 暢彦^{2,3}, 豊福 雅典^{2,3} (1筑波大院・生命地球科学研究群, 2筑波大・生命環境系, 3筑波大・微生物サステナビリティ研究センター)

○Mao Fujita¹, Toshiki Nagakubo^{2,3}, Kayuki Kawashima¹, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Masanori Toyofuku^{2,3} (1Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2Fac. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3MICS (Microbiology research Center for Sustainability), Univ. Tsukuba)

Membrane vesicles (MVs), which are mainly composed of lipid bilayers and proteins, are released by bacteria and have diverse biological functions. Although MV-mediated cargo delivery has the potential in applications in the fields of medicine and biotechnology, the molecular mechanisms by which bacterial cells receive MVs have remained elusive. In this study, we used *Corynebacterium glutamicum*, a model organism of diderm mycolic acid-containing bacteria, to elucidate the mechanism of MV uptake in this bacterial group.

In our previous study, we found that MVs of *C. glutamicum* have iron adsorption activity and these MVs can transfer iron among *C. glutamicum* and related species (*Rhodococcus* and *Mycobacterium*) (Kawashima et al. Microbiology Spectrum 2023). Here, we show that in-frame deletion of a gene whose transcription level was altered upon the addition of MVs led to the limited utilization of MV-associated iron. We also conducted an immunological detection of the gene product, with a predicted lipoprotein secretion signal peptide, by western blotting, and the result suggests that it is mainly localized at lipid membrane. For mechanistic insights into the MV-mediated iron transfer, we are currently analyzing the interaction between the above gene product and MVs.

The results of this study may lead to a new MV-based methodology for controlling mycolic acid-containing bacteria.

DP1-08-02/P1-060

ボツリヌス菌・スポロゲネス菌の運動及び走化性能の解析

○西山 宗一郎, 小池 祥平, 岩橋 菜桜 (新潟薬科大・応用生命・食品安全学)

Chemotaxis and motilities of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*

○So-ichiro Nishiyama, Shohei Koike, Nao Iwahashi (Fac. App. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Med. 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、少なくともうち一部の菌種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、毒素非産生性代替菌であるスポロゲネス菌 *C. sporogenes* は、周毛性のべん毛を有し、運動や走化性を担う遺伝子群をもつ。また、走化性のセンサーである走化性受容体ホモログも 30 種前後備えている。本研究では *Clostridium* 属細菌の病原性と走化性の機能相関を見出すことを目的として、当該菌の運動や走化性能の解析を行った。まずは扱いやすいスポロゲネス菌を用い、走化性能の観察に適した培地条件を検討した。標準培地を段階希釈した軟寒天培地を用い、走化性の指標であるスウォーム（遊走）の観察に成功した。走化性候補物質を含有した寒天プラグを用いたアッセイにより、菌は数種のアミノ酸に対し誘引応答を示した。この実験条件を適用し次にボツリヌス菌の解析を行った。異なる毒素タイプの複数菌株を試し、遊走しない菌株もあったが、多くが良好なスウォーム像を呈した。並行してゲノム情報からのアプローチも行った。まずコレラ菌の既知のアミノ酸走化性受容体と、スポロゲネス菌・ボツリヌス菌の受容体に配列比較を行い、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ものをそれぞれ数種見出し、遺伝子クローニングを行った。次に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応答解析を行った。結果、数種のキメラ受容体が複数のアミノ酸への走化性応答を媒介した。以上の結果から、本研究によりスポロゲネス菌・ボツリヌス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。

DP1-08-03/P1-061

Chlamydia trachomatis が感染細胞内で利用する MAPK および PI3K-AKT 経路に付随する新たな標的分子の探索

○黒岩 青空, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

Exploration of target molecules involved in the MAPK and PI3K-AKT pathway used by *C. trachomatis*

○Sora Kuroiwa, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

性感染症の主な原因菌である *Chlamydia trachomatis* は、エネルギー源の ATP を感染細胞に依存する偏性細胞内寄生性細菌である。しかし、感染細胞内で利用している情報伝達経路やその標的分子は、未だ遺伝子改変が自由にできないこともありその全容は明らかになっていない。一方、私達は、*Chlamydia trachomatis* L2/434/Bu 株 (Ct) が細胞内で増殖する際に、通常酸素環境 (21%O₂) では炎症応答に関与する MAPK 経路を、低酸素環境 (2%O₂) では解糖系の活性化と細胞の生存性の維持を司る PI3K-AKT 経路を利用していることを明らかにした (Thapa ら, *Microbes Infect*, 2020., Thapa ら, *Front Cell Infect Microbiol*, 2022.)。そこで、MAPK および PI3K-AKT 経路に関する詳細な分子機構を明らかにするために、阻害剤パネルを用いたスクリーニングを行い、その結果から Ct が細胞内増殖の際に利用する両経路に付随する新規分子の探索を試みた。阻害剤のスクリーニングには MAPK (234 薬剤) および PI3K-AKT (319 薬剤) 阻害剤パネル (TargetMol) を使用し、両経路の阻害剤存在下における Ct の生菌数を IFU assay にて算出したところ、酸素分圧に関わらず Ct の細胞内増殖は有意に抑制された。また、その結果から得られた阻害効果のパターンを主成分分析にて可視化することで、チロシンキナーゼのアダプター分子が Ct の細胞内増殖に重要な働きをしている可能性が示唆された。そこで、両経路のすぐ上流に位置するアダプター分子 "Gab2" に着目し、ウェスタンブロッティングや siRNA によるサイレンシングにて検証したところ、興味深いことに Gab2 の細胞内発現量は、Ct 感染に伴い顕著に減少した。(非会員共同研究者: 高橋小夏, 中村穂香)

DP1-08-04/P1-062

青枯病菌 OE1-1 株において 2 つの Fur は鉄に応答して異なる作用機序ではたらく

○館田 宇宙, 植山 竜弥, 木場 章範, 大西 浩平, 曳地 康史, 都筑 正行 (高知大・農林海洋)

Distinct iron-responsive regulation by Fur1 and Fur2 in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1

○Sora Tateda, Tatsuya Ueyama, Akinori Kiba, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Masayuki Tsuzuki (Fac. Agric. and Mar. Sci., Kochi Univ.)

350 種の植物種に萎凋症状をもたらす土壌生息性グラム陰性細菌 *Ralstonia solanacearum* species complex (青枯病菌) は、鉄欠乏の土壌環境と鉄豊富な植物体内で適切に遺伝子を発現する必要がある。これまで、ゲノム情報を基にした系統解析から、青枯病菌は、金属結合領域を有する転写制御因子 Ferric uptake regulator (Fur) として、特徴的に 2 つの Fur のパラログ、Fur1 と Fur2 を有することを報告した。本研究では、青枯病菌 OE1-1 株の、鉄に応答した 2 つの Fur の遺伝子発現制御における使い分けの機序の解明を目的とした。二価鉄 (Fe²⁺) 存在下と非存在下それぞれで培養した fur1 遺伝子 (*fur1*) 欠損株と fur2 遺伝子 (*fur2*) 欠損株のトランスクリプトームを解析したところ、シデロフォア産生関連遺伝子の発現に関して、Fur1 が Fe²⁺ 存在下における抑制に必要であった。一方、いずれの培養でも Fur2 の影響は小さかった。シデロフォア産生を含む一部の鉄獲得に関連する遺伝子の発現には、大腸菌において Fur が結合すると報告されている Fur box 配列が存在した。また、Fe²⁺ 存在下で上昇する、主要な菌体外多糖 EPS I や植物細胞壁分解酵素の産生に関わる一部の病原性関連遺伝子の発現には Fur box 配列は認められなかったが、それらの発現は、Fe²⁺ 存在下において *fur1* 欠損によって有意に低下する一方、Fe²⁺ 非存在下で *fur2* 欠損によって有意に上昇した。これらの結果から、OE1-1 株において 2 つの Fur は鉄に応答して異なる作用機序を示すことが明らかとなった。すなわち、Fe²⁺ 存在下の Fur box 配列を介した Fur1 による抑制に加えて、Fe²⁺ 存在下で Fur1 が誘導し、Fe²⁺ 非存在下で Fur2 が抑制に関与する Fe²⁺ に応答した発現制御が存在した。

DP1-08-05/P2-057

コレラ菌タウリン走化性受容体遺伝子の高温による発現誘導メカニズム

○佐藤 沙知香¹, 山内 那津¹, 小野木 汐里¹, 田島 寛隆^{2,3}, 川岸 郁朗^{1,2,3} (1法政大・院理工・生命機能, 2法政大・生命科学・生命機能, 3法政大・ナノテクセンター)Induction of the *Vibrio cholerae* taurine chemoreceptor gene in higher temperature○Sachika Sato¹, Natsy Yamauchi¹, Shiori Onogi¹, Hirota Tajima^{2,3}, Ikuro Kawagishi^{1,2,3} (1Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., 2Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., 3Res. 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に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、胆汁の構成成分であるタウリンおよび多くのアミノ酸を認識する。Mlp37 をコードする遺伝子 (*mcp37*) 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。本研究では、まず、*mcp37* の転写に対する病原性遺伝子転写制御因子 ToxR, TepP 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 *mcp37* プロモーター活性が 37°C で培養したときと同じレベルまで上昇したことから、*mcp37* の転写は病原性と関連した制御を受けることが示唆された。つぎに、テトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子 *tetA* をレポーターとした菌株 (30°C で Tc 感受性, 37°C で Tc 耐性) を構築し、30°C で Tc 耐性となる変異体を単離した。得られた変異体を解析した結果、コーディング領域上流の縦列・逆位反復配列 (DR, IR) の一部が失われると 30°C での転写量が増加したことから、これらの配列が温度依存性に関与すると示唆された。さらに、RNA シャペロン Hfq の遺伝子を欠失させると培養温度に関わらず *mcp37* プロモーター活性が著しく低下した。以上の結果から、Mlp37 が感染過程で働くこと、*mcp37* の転写には RNA シャペロン Hfq が関与すること、DR, IR に作用し 30°C で転写を抑制する ToxR 依存的機構が存在することが示唆された。

DP1-08-06/P2-058

青枯病菌 OE1-1 株におけるクオラムセンシングから独立した病原
力制御経路

○植山 竜弥¹, 館田 宇宙¹, 木場 章範¹, 大西 浩平¹, 井上 加奈子², 曳地 康
史¹, 都筑 正行¹ (¹高知大・農林海洋, ²奈良先端大・バイオ)

Quorum sensing-independent virulence regulation pathway in Ralstonia pseudosolanacearum strain OE1-1

○Tatsuya Ueyama¹, Sora Tateda¹, Akinori Kiba¹, Kouhei Ohnishi¹, Kanako
Inoue², Yasufumi Hikichi¹, Masayuki Tsuzuki¹ (¹Fac. Agric. Marine Sci.,
Kochi Univ., ²Div. Bio. Sci., NAIST)

土壌生息性グラム陰性細菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* OE1-1 株
は、宿主植物の根の成長帯の皮層上で、クオラムセンシング (QS) を
起動し、皮層細胞内に感染してマッシュルーム型バイオフィーム
(mBF) を形成する。その後、OE1-1 株は導管へ感染し、感染植物は
萎凋症状を引き起こす。この mBF 形成は、皮層上での QS 起動ととも
に OE1-1 株の病原性に不可欠な感染過程である。mBF 形成は、QS に
より産生・分泌が誘導されるラルフラノン (Ral) を必要とするが、
QS により抑制される。すなわち、QS とは独立して、Ral は病原性制
御に関与する。本研究では、QS とは独立した、Ral による病原性制御
機構の解明を目的に、まず、QS 能喪失株と Ral 産生能喪失株のトラ
ンスクリプトームを RNA-seq 法による解析し、Ral 依存的に産生が誘
導される、新奇の AcrR 型転写制御因子 RSp0599 を見出した。
RSp0599 遺伝子欠損株 (Δ RSp0599) 接種トマト植物では根の皮層細
胞内で正常な mBF とは異なる凝集体が認められ、成長帯の導管への
感染は認められなかった。しかし、トマト植物の地際部の導管での
 Δ RSp0599 感染が認められ、 Δ RSp0599 接種トマトの萎凋症状の進行
は、OE1-1 株接種トマト植物と比較して早まった。さらに、病原性因
子である主要な菌体外多糖 EPS I の産生に関連する *eps* 遺伝子群の発
現が OE1-1 株と比較して有意に低下したが、EPS I 産生能は有意に増
加した。これらの結果から、 Δ RSp0599 の病原性の上昇は、mBF の秩
序性の喪失による感染経路の変更と EPS I の過剰産生によると考えら
れた。そして、RSp0599 は、QS と独立して、根の皮層細胞内で形成
される mBF 構造の秩序性と EPS I 産生の制御に関与すると考えられ
た。

DP1-08-07/P2-059

大腸菌ヒスチジンキナーゼ BaeS は細胞質ドメインでインドール
を感知する

○山田 寛隆^{1,2}, 山本 健太郎³, 井芹 友香¹, 武井 陸⁴, 川岸 郁朗^{1,2,4} (¹法政
大・生命科学・生命機能, ²法政大・ナノテクセンター, ³国立感染症研・
感染制御, ⁴法政大・院理工・生命機能)

The histidine kinase BaeS senses indole in its cytoplasmic domain

○Hirota Tajima^{1,2}, Kentaro Yamamoto³, Tomoka Iseri¹, Riku Takei⁴, Ikuro
Kawagishi^{1,2,4} (¹Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., ²Res. Cen. Micro-Nano
Tech., Hosei Univ., ³Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, ⁴Grad. Sch.
Sci. Eng., Hosei Univ.)

大腸菌二成分制御系ヒスチジンキナーゼ BaeS はインドールを感知
し、ペリプラズムシャペロン、異物排出トランスポーターなどの遺伝
子の発現を調節する。しかし、BaeS の活性化には 2 mM 以上ものイ
ンドールが必要なことから、実際には高濃度インドールによって引き
起こされた膜ストレスを BaeS が感知すると提唱されている。ところ
が、当研究室では、インドールの細胞外排出に関わる *tolC* を欠失させ
ると、異物排出トランスポーター遺伝子 *acrD* が構成的に発現するこ
とを見出した。さらに、*baeS* やインドール合成酵素遺伝子 *tnaA* を欠
失させるとこの発現が失われることから、BaeS は細胞内に蓄積された
インドールを感知することが示唆された。そこで、ペリプラズムドメ
インを欠失させた BaeS を発現させたところ、大腸菌野生株では *acrD*
が発現し、*tolC* 欠失株では発現が抑制された。この応答は全長 BaeS
によるものと正反対であるが、BaeS の細胞質ドメインもしくは膜貫通
ドメインがインドール感知に関わっていることを示唆している。そこ
で次に、膜貫通ドメインがインドール感知に必須かどうか調べるため、
BaeS の HAMP ドメイン直後に Gly₇ 残基を挿入し、外部シグナルを遮
断した変異体 BaeS を構築した。その結果、Gly₇ 挿入 BaeS を発現し
た菌は *tolC* を欠失させると *acrD* プロモーター活性が低下した。す
なわち、ペリプラズム欠失 BaeS と同じく、野生型 BaeS 発現菌と比較
して逆転した応答を示した。したがって、Gly₇ 挿入 BaeS はインドール
感知機能を保持していると推定され、BaeS の細胞質ドメインがイン
ドール感知に関わると考えられた。

DP1-08-08/P2-060

南極大陸で分離した微生物からのバイオフィーム阻害剤のスクリー
ニング

○阿座上 弘行^{1,2}, 木下 颯², Ayesha Siddiqa², 林 昌平³ (¹山口大・中高温
微生, ²山口大・農・生物機能, ³島根大・生物資源・環境共生)

Screening for biofilm inhibitors from microorganisms isolated in Antarctica

○Hiroyuki Azakami^{1,2}, Hayato Kinoshita², Ayesha Siddiqa², Shohei
Hayashi³ (¹Res. Cent. Thermotolerant Microb. Resources, Yamaguchi
Univ., ²Dept. Biol. Chem., Fac. Agr., Yamaguchi Univ., ³Dept. Env. Sustain.
Sci., Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

19 地点の南極土砂サンプルから 7 綱 40 属に分類される細菌約 1500
株を単離・同定し、それらは南極微生物ライブラリーとして凍結保管
した。その中のユキドリ営巣跡から単離された約 200 株について、病
原菌のバイオフィーム形成への影響をスクリーニングした。ライブラ
リーの菌株を 15°C, 10 日間または 25°C, 7 日間培養した後、培養上
清を調整した。これらの培養液を緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*
PAO1 及び腐蝕性細菌 *Streptococcus mutans* UA159 の培養液に添
加し、バイオフィーム形成量を定量した。スクリーニングの結果、192
株中 10 株の培養液が *P. aeruginosa* に対して、6 株の培養液が *S.*
mutans に対してバイオフィーム形成を 60% 以上阻害した。強い活
性を示した株の半数以上が *Bacillus* 属に分類されるものであり、同じ
営巣跡から分離されたものであった。*P. aeruginosa* に対して強い阻
害を示した 10 株のうち 5 株を再培養してそれらの培養上清のバイオ
フィルム阻害を調べたところ、4 株において高い阻害活性が確認でき
た。その 4 株全てが 4% 濃度でも阻害が見られ、うち 1 株は 1% 濃度
でも阻害が見られた。また、*S. mutans* に対して強い阻害活性を示し
た 6 株のうち 5 株を再培養してそれらの培養上清のバイオフィーム
阻害を調べたところ、1 株において高い阻害活性が確認できた。その
株は 4% 濃度でも阻害が見られた。さらに、この株の培養上清は *S.*
mutans の増殖を阻害したことから、増殖阻害によるバイオフィーム
阻害効果であることが示唆された。

DP1-08-09/P2-061

PTS と TCS 間で保存的に新規糖刺激を伝えるコネクター RcsG

○山口 和宣, 保山 菜穂子, 萩原 慧, 深見 知可, 川畑 海翔, 加藤 明宣 (近
畿大・農・バイオ)

RcsG, conserved connector transmitting a novel sugar stimulus from PTS to TCS

○Kazunobu Yamaguchi, Naoko Hozan, Kei Hagihara, Tomoka Fukami,
Kaito Kawabata, Akinori Kato (Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai
Univ.)

細菌は情報伝達機構の Two-component system (TCS) を複数備えて
いる。一般的な TCS では、ヒスチジンキナーゼ (HK) が環境変化を
シグナルとして感知しレスポンスレギュレーター (RR) へのリン酸リ
レーを介し標的遺伝子の発現が制御される。*Salmonella*
typhimurium の病原調節ネットワークでは、小タンパク質のコネク
ターが複数の TCS 間を繋ぐ重要な役割を担うことが近年明らかと
なった。一方、糖取り込み系の一つの Phosphotransferase system
(PTS) は、解糖系のホスホエノールピルビン酸由来のリン酸が PTS
タンパク質を経由して糖の取り込みと同時にそれをリン酸化する。加
えて、リン酸リレーは情報伝達の役割も担う。本研究では、*S.typhimurium*
とその近縁種において PTS と TCS の間で糖刺激を伝
える新規コネクター RcsG について報告する。
変則的な TCS の RcsBCD 系は、細胞表面のストレスを感知すること
で HK の RcsC から HPT ドメインを含む RcsD を介し RR である RcsB
へのリン酸リレーにより莢膜多糖合成遺伝子群 (*cps*) を活性化する。
これまでに、*cps* 発現を活性化し、RcsD と相互作用する因子として
rscG 遺伝子を含むクローンを単離された。本研究では、*rscG* を含む
遺伝子クラスターの推定から、N-アセチル-D-グルコサミン酸
(GlcNAc) が PTS の転写因子をコードする *rscH* 依存的に RcsG の発
現を誘導し、*cps* を活性化することを見出し、この糖刺激の受容から
始まる一連のネットワークが明らかとなった。更に、エンテロバク
ター (*Enterobacter asburiae*) においては、通常の培養条件下 (LB)
で RcsH, RcsG, RcsB 依存的に *cps* 発現が活性化されることから、こ
の細菌の環境中での GlcNAc 生産者としての役割が示唆された。

DP1-08-10/P1-063

Phase variable regulation of surface structures by promoter inversions in *Bacteroides vulgatus*

○Emmanuel Munyeshyaka¹, 今大路 治之¹, Nafisa Tabassum¹, 多田 彩乃¹, 山崎 尚², 桑原 知巳¹ (¹香大・医・分子微生物, ²兵庫医大・生物)

○Emmanuel Munyeshyaka¹, Haruyuki Imaohji¹, Nafisa Tabassum¹, Ayano Tada¹, Hisashi Yamasaki², Tomomi Kuwahara¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., ²Dept. Biology., Hyogo Med. Univ.)

Bacteroides is one of the predominant groups among human intestinal microbiota. Distinctively, this group characterized by phase variable regulation of various surface structures, such as capsular polysaccharides and outer membrane proteins. We identified the genetic loci in *B. vulgatus*, where tyrosine recombinases (Tsr) encoded by BVU2677 and BVU2684 regulate promoter inversions (ON/OFF switch) of the gene clusters that are predicted to involve in the synthesis of extracellular polysaccharides (EPS) and pili-like structures (Mfa family), respectively. The genetic deletion of either one *tsr* gene had no effect on both promoter inversions. However, simultaneous deletion of two *tsr* genes ameliorated the promoter inversions in both regions, indicating the cross-reactivity of these Tsr to the distantly located promoters. Immunostaining of the *tsr*-mutant strains with antibody against Mfa1 family of outer membrane fimbrial anchor protein encoded by BVU2679 showed that the expression of BVU2679 exclusively controlled by promoter inversions located upstream of this gene. Mutant strain expressing the fimbrial proteins promoted aggregative adhesion and proinflammatory phenotype to colonic epithelial cell. These results indicate that the phase variation of these loci associate with symbiotic/dysbiotic phenotype of *B. vulgatus*.

DP1-08-11/P1-064

ペプチドグリカン合成に関わる乳酸菌 *murE* の大腸菌へのクローニングと形質転換体の性状

○野口 翔, 尾之上 さくら, 川原 一芳 (関東学院大・理工・生命科学)

Cloning of *murE* of PG synthesis from lactic acid bacteria to *E. coli* and characters of transformants

○Sho Noguchi, Sakura Onoue, Kazuyoshi Kawahara (Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

【目的】乳酸菌ペプチドグリカン (PG) のペプチド鎖第3位には、菌種によりジアミノピメリン酸 (DAP) あるいはリシン (Lys) が含まれている。また、一部の菌種にはオルニチンが含まれることも知られている。これらのジアミノ酸はPGのペプチド鎖架橋に重要であるが、なぜ近縁の菌種でこのような違いがあるのか不明である。本研究では、それぞれのジアミノ酸が各菌種に必須なのか、あるいは相互に変更が可能なかを検討するための最初の段階として、ペプチド鎖合成時にジアミノ酸を転移する酵素の遺伝子 *murE* を乳酸菌からクローニングして、大腸菌へ導入し、生育速度などへの影響を調べた。【方法と結果】*Lactiplantibacillus plantarum* (PG: DAP型), *Levilactobacillus brevis* (PG: Lys型), *Fructibacillus fructivorans* (PG: Lys型) から抽出したDNAをもとに、PCR法により各菌株の *murE* のプロモータを含めた領域を増幅し、pUC118に組み込み、*E. coli* DH5α株へ導入し、形質転換体を得た。インサートDNAについては塩基配列を調べ目的の遺伝子であることを確認した。これら形質転換体の生育速度を調べた結果、*L. brevis* あるいは *F. fructivorans* 由来 *murE* を導入した菌株では、生育速度に変化は見られなかったが、*L. plantarum* 由来 *murE* を導入した菌株では生育速度の減少が確認された。次に、形質転換体の細胞膜画分をSDS処理し不溶性画分を粗PGとし、含まれるアミノ酸をN-トリフルオロアセチルブチルエステル誘導体としてGC-MSで分析したところ、元株と比較してアミノ酸組成に顕著な変化は見られなかった。今後プラスミドを改良して *murE* の発現量を増やし、生育速度やPGの変化を再度調べる予定である。

DP1-08-12/P1-066

腸内細菌共通抗原フリッパーゼ *wzxE* は植物環境における大腸菌の増殖に必要である

○山口 咲季, 石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡大院・医歯薬・分子生物学)

Enterobacterial common antigen flippase *wzxE* is required for *E. coli* survival in plant environment

○Saki Yamaguchi, Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

大腸菌は糞尿を用いた有機肥料で育てられた野菜に付着し、ヒトに摂取された際に食中毒を引き起こす。大腸菌は植物へ定着できることは知られているが、植物上での生存に必要な大腸菌の遺伝子は明らかになっていない。そこで本研究では植物環境での増殖・生存に必要な大腸菌遺伝子を同定することを目的とし、野菜ジュースを原料とした植物環境を模倣した培地 (V8培地) を用いて、増殖能が低下した大腸菌遺伝子欠損株の探索を行った。その結果、野生株と比較してV8培地での増殖能が低下する遺伝子欠損株として $\Delta wzxE$ 株が得られた。V8培地の主成分であるトマト果実においても、 $\Delta wzxE$ 株は野生株に比べて生菌数が低下した。次に、トマト果実とV8培地が弱酸性であることに着目し、 $\Delta wzxE$ 株のpH感受性の検討を行った。pH5.5に調整したLB培地で $\Delta wzxE$ 株の増殖能低下がみられたこと、ならびに、pH7.0に調整したV8培地では $\Delta wzxE$ 株の増殖能低下がみられなかったことから、 $\Delta wzxE$ 株は低pHへ感受性を示すことが明らかとなった。*wzxE* は腸内細菌共通抗原 (ECA) である多糖類を内膜の細胞質側からペリプラズム側へ転換させるフリッパーゼをコードする。ECAフリッパーゼ欠損株ではECA中間体の蓄積が細胞死を引き起こす。そこで、*wzxE* に加えてECA中間体の合成酵素をコードする *wecF* を欠損させた二重欠損株を作製したところ、 $\Delta wzxE$ 株の低pHへの感受性が失われた。以上の結果は、*wzxE* が低pH条件でのECA中間体による毒性を抑えることにより、トマトなどの植物環境での大腸菌の増殖を促進していることを示唆している。

DP1-08-13/P1-067

Characterization of novel actin-like protein Mad28 involved in magnetosome positioning

○下茂 梨乃¹, 田岡 東^{2,3} (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)

○Rino Shimoshige¹, Azuma Taoka^{2,3} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ³NanoLSI, Kanazawa Univ.)

Magnetotactic bacteria (MTB) synthesizes membrane-enclosed magnetic organelles called magnetosomes. Interestingly, actin-like cytoskeletal filaments associate with the magnetosome and organize magnetosome positioning in MTB cells. MamK is a well-characterized magnetosome-associated actin-like protein conserved in genomes of all known MTB. On the other hand, MTB belonging to phyla *Nitrospirota* and *Thermodesulfobacteriota* have another putative actin-like protein, Mad28, in addition to MamK. Mad28 has conserved motifs in the actin superfamily. However, at present, no biochemical characterization has been reported to understand the cytoskeletal properties of Mad28. In this study, we expressed *Solidesulfobacillus magneticus* RS-1 Mad28 in *Escherichia coli* and purified depolymerized Mad28 using ammonium sulfate precipitation and gel filtration. According to the pelleting assay, the purified Mad28 showed polymerization activity in an ATP-dependent manner. Furthermore, we analyzed the Mad28 polymerization process using light scattering assay and high-speed atomic force microscopy. We will discuss the biochemical properties of this novel actin-like protein from MTB.

DP1-08-14/P1-068

Analysis of subcellular localization of FtsZ in bacteria with the minimum genome

○清水 大輝, 林 匡史, 塩見 大輔 (立教大・理・生命理)

○Daiki Shimizu, Masafumi Hayashi, Daisuke Shiomi (Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ.)

JCVI-syn3.0 is an artificially synthesized bacterium with a minimum genome at Craig Venter Institute. Adding 19 genes including *ftsZ* and *sepF* to JCVI-syn3.0 genome reduced the cell size to some extent uniformly and increased the growth rate. This strain was named JCVI-syn3B. Since FtsZ is involved in cell division and a main component of the Z ring formed at the division site and SepF assists the localization of FtsZ, these two genes may be involved in cell morphological change and increasing the growth rate of JCVI-syn3B. However, the role of FtsZ and SepF in JCVI-syn3B has not been clarified. In this study, FtsZ-GFP was expressed in syn3.0. However, the protein was diffused throughout the cells. Then, *ftsZ*, *sepF*, and 5 other genes of JCVI-syn3B were transferred to JCVI-syn3.0. We confirmed that the localization of FtsZ was observed as foci in this strain as same as JCVI-syn3B, meaning any of these 7 genes is involved in the localization of FtsZ. Next, to identify which of these 6 genes is important for the localization of FtsZ, we introduced the constructs in which each gene was not expressed into JCVI-syn3.0 and the subcellular localization of FtsZ was observed in each strain. Only when *sepF* was not expressed, the localization of FtsZ was diffused throughout the cells. This suggests that the minimum component for the localization of FtsZ is SepF in JCVI-syn3B.

DP1-08-15/P2-062

MamJ regulates MamK polymerization to form a dynamic cytoskeleton for magnetosome positioning

○潘 遠媛¹, 奥田 喜弘², 齋藤 拓海¹, 田岡 東^{3,4} (¹金沢大・院・自然科学,²金沢大・理工・生命理工,³国立遺伝学研究所・生命情報・DDBJセンター,⁴金沢大・ナノ生命)

○Yuanyuan Pan¹, Yoshihiro Okuda², Takumi Saito¹, Azuma Taoka^{3,4} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ³Bioinf. DDBJ Ctr. Natl. Inst. Genet., ⁴NanoLSI, Kanazawa Univ.)

MamK is one of the bacterial actin-like proteins known for its distinctive feature, which can be utilized to position a magnetic organelle called a magnetosome within magnetotactic bacterial cells. While it has been reported that MamJ plays a role in regulating MamK filament dynamics in vivo, contributing to the maintenance of dynamic filaments, the molecular role of MamJ in the MamK cytoskeleton remains inadequately elucidated. In this study, our focus is directed toward unraveling the molecular role of MamJ in MamK polymerization in vitro. We analyzed MamJ activity on MamK polymerization using purified *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 MamJ and MamK proteins. We performed a light scattering assay to investigate the effects of MamJ on MamK polymerization in vitro. Adding MamJ caused decreasing light scattering intensities in a MamJ concentration-dependent manner, indicating that MamJ affects the structure of MamK polymer. Then, we observed the dynamic MamK polymerization process in the presence of MamJ using high-speed AFM. As a result, MamK formed short filaments with uniform length distribution in the presence of MamJ. This result indicated that MamJ regulates its polymerization property to form short and dynamic networks of MamK filaments. We are currently analyzing MamJ amino acid sequences essential in regulation for MamK polymerization using a series of MamJ mutants.

DP1-08-16/P2-063

Biochemical Analysis of Cell Division Protein FtsZ of *Haloplasma contractile*

○藤田 寛興, 笠井 大司, 塩見 大輔 (立教大・理)

○Hiroomi Fujita, Taishi Kasai, Daisuke Shiomi (Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ.)

Most bacteria are surrounded by a cell wall and their division relies on the formation of a Z-ring at the division site. The Z ring is mainly composed of FtsZ and serves as a scaffold for enzymes required for cell wall synthesis and hydrolysis at the division site. Bacteria such as *Mycoplasma* have lost their cell wall during evolution. However, it still encodes the *ftsZ* gene on its genome. As mentioned earlier, FtsZ is thought to regulate cell wall synthesis at the division site, but how was the function of FtsZ changed or kept when the cell wall was lost during evolution? *Haloplasma contractile* is an anaerobic bacterium belonging to the class *Mollicutes*, and like *Mycoplasma*, it encodes *ftsZ* in its genome. While it is controversial whether *H. contractile* is surrounded by a cell wall, it is in the phylum *Mollicutes* that is closest in lineage to *Bacillus subtilis* which is surrounded by a cell wall. Therefore, elucidating the function and biochemical characterization of FtsZ in *H. contractile* and comparison with those of FtsZ of *B. subtilis* and *Mycoplasma* would help to understand how the function of FtsZ has evolved during the evolutionary process. In this study, we report the purification of FtsZ from *H. contractile* and its biochemical characteristics.

DP1-08-17/P2-064

凍結割断/SEM 法による歯周病原細菌とその外膜小胞の微細構造の可視化

○高橋 葵^{1,2}, 小林 宏尚³, 長田 勝英^{1,4}, 安部 公博¹, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹, 中村 知世^{1,2,4}, 西野 智彦^{2,4}, 中尾 龍馬¹ (¹感染研・細菌1, ²工科大・バイオニクス, ³感染研・感染病理, ⁴工科大・応生)

Visualization of periodontopathic bacteria and the outer membrane vesicles by freeze fracture/SEM

○Aoi Takahashi^{1,2}, Hirotaka Kobayashi³, Katsutoshi Osada^{1,4}, Kimihiro Abe¹, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiro Akeda¹, Tomoyo Nakamura^{1,2,4}, Tomohiko Nishino^{2,4}, Ryoma Nakao¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Grad. Sch. Bionics, Tokyo Univ. Technol., ³Dept. Pathology. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

【目的】歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) はジンジパイン, アニオン性リポ多糖 (A-LPS), 線毛等の病原因子を保有する。これらの病原因子は外膜小胞 (OMVs) と呼ばれる微粒子に濃縮されて菌体外に放出される。本研究では、Pg 菌体及び OMVs の微細構造と病原因子の局在を可視化できる凍結割断/走査型顕微鏡 (SEM) 法の確立を目指した。【方法】Pg 野生株と IX 型分泌機構 (T9SS) 欠損株の培養液の沈渣と上清から、それぞれ菌体と OMVs を回収した。菌体を更に分画し、外膜・ペリプラズム・内膜・細胞質の各画分を得た。OMVs は、ナノフローサイトメーター, SEM, SDS-PAGE により、その形状と組成の解析を行った。凍結割断/SEM では、菌体や OMVs を包埋剤に封入後、液体窒素中で割断して内部構造を観察した。【結果と考察】各種病原因子の抗体を用いた免疫 SEM 等の結果から、T9SS 欠損株は野生株と比べて、菌体や OMVs の表面構造が滑沢で、線毛、ジンジパイン、A-LPS の発現量が著しく低下または欠損することが明らかとなった。また野生株の菌体の割断面と非割断面に対する A-LPS 抗体と金コロイド二次抗体による免疫 SEM では、割断面の菌体外周と非割断面の菌体表面層にシグナルを得たことから、菌体内外の分子局在を可視化する凍結割断/SEM 法が確立された。尚、菌体内部には充実性の構造物が観察される一方で、現時点では OMVs 内部に充実性の構造物は観察されていない。今後、凍結割断/SEM 法による OMVs 内外の微細構造および分子局在の可視化を目指している。

DP1-08-18/P1-070

The route of intrabacterial nanotransportation system for VacA in *Helicobacter pylori*

○呉 紅¹, 藤岡 良彦¹, 岩井 伯隆², 坂口 翔一¹, 鈴木 陽一¹, 中野 隆史¹
(¹大阪医薬大・医・微生物学・感染制御学, ²東工大・生命理工・生命理工)

○Hong Wu¹, Yoshihiko Fujioka¹, Noritaka Iwai², Shoichi Sakaguchi¹, Youichi Suzuki¹, Takashi Nakano¹ (¹Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ., ²Grad. Sch. Biosci. & Biotechnol, Tokyo Inst. of Tech.)

Helicobacter pylori possesses an intrabacterial nanotransportation system (*ibNoTS*) responsible for transporting VacA, CagA, and urease within the bacterial cytoplasm. This system is regulated by the extrabacterial environment. Although the transport routes of the system for VacA have not been extensively studied, our immunoelectron microscopy demonstrated that VacA closely localizes with MreB in the bacterium. However, in *H. pylori* treated with the MreB polymerization inhibitor A22, VacA did not localize closely to MreB compared with non-A22-treated *H. pylori*. Furthermore, A22 obstructs the transport of VacA by *ibNoTS*. Using the freezing and thawing method, we found that VacA closely localizes with the MreB filament by immunoelectron microscopy. These findings suggest a close association between the route of *ibNoTS* for VacA and the MreB filament. No such phenomena were observed in the urease transport by *ibNoTS*, whose route was found to be associated with another filament (FtsZ) as previously suggested. These results indicate that the route of *ibNoTS* for VacA differs from that for urease which previously suggested. We propose that the route of *ibNoTS* for VacA is associated with the MreB filament in *H. pylori*.

DP1-09-01/P1-043

Characterization of the sensitive skin microbiome of Japanese women

○柴垣 奈佳子¹, 山本 まこ², 藤本 康介^{3,4}, 井元 清哉², 植松 智^{3,4} (¹(株)資生堂・みらい開発研究所, ²東京大・医科学研究所・ヒトゲノム解析センター・シーケンスデータ情報処理, ³東京大・医科学研究所・ヒトゲノム解析センター・メタゲノム医学, ⁴大阪公立大・院・医・ゲノム免疫学/メタゲノム解析研究センター)

○Nakako Shibagaki¹, Mako Yamamoto², Kosuke Fujimoto^{3,4}, Seiya Imoto², Satoshi Uematsu^{3,4} (¹Mirai Inst., Shiseido Co., Ltd., ²Div. Health Medical Intelligence, The Inst. Medical Science, The Univ. of Tokyo, ³Div. Metagenome Medicine, Human Genome Center, The Inst. Medical Science, The Univ. of Tokyo, ⁴Dept. Immunology and Genomics, Grad. Sch. Medicine, Osaka Met. Univ.)

Sensitive skin has recently become recognized as a dermatological condition defined by sensory perception of some stimuli that normally should not cause sensations. Among the mechanisms that possibly result in sensitive skin occurrence, increased permeability of stimulants due to impaired skin barrier function is most likely. Since the skin microbiome contributes to the skin's barrier function, we decided to examine the skin microbiome in sensitive skin (SS) and non-sensitive skin (NS). Lactic acid sting test was employed to group 44 healthy Japanese women participated into the SS and NS groups. 16S rRNA gene amplicon sequencing revealed that the skin microbiomes in the forehead (FH) samples of the SS group have unique features compared to those of the NS group, while no significant difference was observed in skin physiological measurements. Relative abundance of Cutibacterium in the FH microbiomes was significantly higher in SS than NS. We further conducted metagenome analysis with the samples collected from the cheek (CK), which did not show a significant difference in relative abundance of each genus between SS and NS. Genes in several metabolic pathways were, however, found enriched in either NS or SS than the other. The results indicate that there may be a functional difference in the skin microbiome between NS and SS, which may contribute to skin sensitivity.

DP1-09-02/P2-037

Lactobacillus play an important role in maintaining a healthy vaginal environment

○相澤 志保子¹, 高田 和秀¹, 林田 真吾², 早川 智¹ (¹日本大・医・微生物学, ²日本大・医・小児科学)

○Shihoko Aizawa¹, Kazuhide Takada¹, Shingo Hayashida², Satoshi Hayakawa¹ (¹Div. Microbiol., Dept. Pathol. and Microbiol., Nihon Univ. Sch. Med., ²Div. Pediatrics, Nihon Univ. Sch. Med.)

Background: Dodelrein bacilli, which include one or two species of lactobacilli (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. glasseri*, *L. iners*), comprise the vaginal flora of healthy adult women. Dysbiosis of the vaginal flora cause bacterial vaginosis (BV) and obstetric complications, such as preterm delivery. In this study, we investigated the impact of lactobacilli on pathogenic bacteria.

Methods: The biomass concentration of each bacterium was evaluated by measuring the turbidity of the culture medium at OD600. The effect of each *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. glasseri*, *L. paragasseri*, *L. vaginalis*, *L. acidophilus*, and *L. rhamnosus*) supernatant on the biomass concentration of pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, and *Gardnerella vaginalis*) were evaluated, and vice versa.

Results: The culture supernatant from *Lactobacillus* significantly reduced the biomass concentration of pathogenic bacteria. In contrast, the culture supernatant from pathogenic bacteria did not affect the biomass concentrations of *Lactobacillus*. The biomass concentrations of *Lactobacillus* were not significantly affected by the culture supernatant from other vaginal *Lactobacillus* species.

Discussion: The present result suggested that lactobacilli as vaginal commensal bacteria play an important role in maintaining a healthy vaginal environment.

DP1-09-03/P2-038

Identification of symbiote candidates for ileoanal pouch in ulcerative colitis in Japan

○孫 安生¹, 加藤 完², 松尾 禎之³, 塙 莊太郎⁴, 中西 由美子², 大野 博司², 小椋 英樹¹, 石戸 聡¹, 池内 浩基⁵, 内野 基⁵ (¹兵庫医大・医・病原微生物, ²理研・IMS, ³関西医大・医・侵襲反応制御, ⁴兵庫医大・医・歯科口腔外科学, ⁵兵庫医大・医・炎症性腸疾患外科)

○Aoi Son¹, Tamotsu Kato², Yoshiyuki Matsuo³, Soutaro Hanawa⁴, Yumiko Nakanishi², Hiroshi Ohno², Hideki Ogura¹, Satoshi Ishido¹, Hiroki Ikeuchi⁵, Motoi Uchino⁵ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Hyogo Med. Univ., ²IMS, Riken, ³Dept. Human Stress Response Science, Inst. Bionical Science, Kansai Med. Univ., ⁴Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Hyogo Med. Univ., ⁵Dept. IBD Surgery, Hyogo Med. Univ.)

At present, since the number of ulcerative colitis (UC) patient is remarkably increasing, the Japanese government has categorized the disease as designated intractable disease. UC has been recognized as a life-long inflammatory disease; it's challenging to achieve the remission even through the state-of the art medication. Therefore, medication-uncontrollable UC patients require the surgical operation: total proctocolectomy and Ileal pouch anal anastomosis (IPPA). The surgical operation could improve the quality of life of the patients, but yet requires intensive medical following, because more than 40% develop the inflammation of Ileal pouch diagnosed as pouchitis. We have explored the symbiote candidates for ileoanal pouch through comprehensive microbiome and metabolome analysis. 16S rRNA amplicon meta-analysis and metabolome analysis for 170 patients were performed. Several bacterial genera were statistically reduced in correlation with inflammatory clinical score and were shown having significant relation with protective metabolites. In addition, the extent of decrease in these candidates was strikingly prominent in medication-refractory pouchitis. Thus, our data show these bacterial taxa as symbiote candidates and could be attractive targets for maintenance of Ileal pouch in UC.

DP1-09-04/P2-039

Streptococcus sobrinus が放出する膜小胞 (MV) がバイオフィーム形成に及ぼす影響についての研究

○吉田 浩子¹, 袴田 社², 根岸 慎一¹, 泉福 英信² (¹日本大・歯・矯正, ²日本大・歯・微生物免疫)

Biofilm formation by membrane vesicles released from *Streptococcus sobrinus*

○Hiroko Yoshida¹, Morito Hakamada², Shinichi Negishi¹, Hidenobu Senpuku² (¹Dept. Orthodontics., Sch. Dent., Nihon Univ., ²Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Nihon Univ.)

口腔内のバイオフィーム (BF) 形成に関与する *Streptococcus sobrinus* は, *Streptococcus mutans* とともに砂糖を基質とする多糖類であるグルカンを合成する。近年 *S. mutans* は, 膜小胞 (MV) を放出し, 他の菌の BF 形成を誘導することが明らかとなった。*S. sobrinus* も MV を放出する可能性やその機能は明らかとなっていない。そこで本研究では, *S. sobrinus* の MV の放出と機能を明らかにするために, *S. sobrinus* の MV による BF 形成実験を行った。BF 形成実験: 96 穴マイクロタイタープレートにフィルター滅菌したヒト唾液をコートした後, 0.25% スクロースを添加した Tryptic Soy Broth (TSBs) で様々な濃度に希釈された *S. sobrinus* の MV を加えた。そこに, *S. mutans* UA159.gtfBC- (BF 形成能力を失った株), *S. aureus* cowan I, *Actinomyces naeslundii* x600, *Actinomyces oris* MG1 をそれぞれ加えて 37°C で 16 時間の培養を行った。培養後, 蒸留水にて 2 回 BF を洗浄した。染色はサフラニン溶液にて行い, 洗浄・乾燥後, 70% エタノールで脱色し着色された溶液を吸光度計にて 492nm の吸収値で測定し, その値を BF 形成量とした。*S. sobrinus* の MV は, 濃度依存的に *S. mutans* UA159.gtfBC-, *S. aureus* cowan I および *A. oris* MG1 の BF 形成を誘導した。共焦点レーザー顕微鏡による Live-Dead 染色の観察において, *S. sobrinus* の MV は, 口腔バイオフィーム形成に関与する *S. mutans* や *A. oris*, 口腔内の日和見菌である *S. aureus* の死菌依存的 BF 形成を誘導した。よって, *S. sobrinus* の MV も新たな病原因子と考えられた。

DP1-09-05/P2-040

米ぬか摂取マウスからの大腸炎抑制性腸内細菌の単離

○沖梨咲子¹, 田中一己², 野村 暢彦³, 尾花 望⁴, 福田 真嗣^{2,4,5} (¹筑波大・生物資源, ²慶大・先端生命研, ³筑波大・生命環境系, ⁴筑波大・医・TMRC, ⁵(株)メタジェン)

Isolation of colitis-suppressing bacteria from gut microbiota of rice bran-fed mice

○Risako Oki¹, Kazuki Tanaka², Nobuhiko Nomura³, Nozomu Obana⁴, Shinji Fukuda^{2,4,5} (¹Biol. Resource Sci., Univ. Tsukuba, ²Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ³Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ⁴TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, ⁵Metabologenomics, Inc.)

腸内細菌叢は炎症性腸疾患などの宿主の病態形成に密接に関与している。ある種のプレバイオティクスは, 特定の有益な腸内細菌の増殖を誘導し, 宿主に有益な効果をもたらす。本研究ではその一つである大腸炎抑制効果をもつ米ぬかに着目した。先行研究において, 米ぬか摂取によりマウスの大腸炎症状が緩和すること, および米ぬか摂取マウスの腸内細菌叢が大腸炎抑制活性を有することが明らかになった。そのため, 本研究では, 米ぬか摂取マウスの腸内細菌叢より, 大腸炎抑制活性を有する腸内細菌の単離および同定することを目的とした。複数の腸内細菌単離用培地で米ぬか摂取マウス由来の腸内細菌を培養し, 各培地で増殖する細菌群を 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスによって同定した。その結果, 各種培地で増殖する細菌群が大きく異なることが示唆された。そこで, 各培地で出現したコロニーを回収し, 無菌マウスに投与することにより, ノトバイオオートマウスを作出した。Dextran Sodium Sulfate (DSS) 誘発大腸炎モデルを用いて, 各培地で増殖した細菌群の大腸炎抑制活性を評価した。その結果, 特定の培地を用いた場合, DSS 投与によるノトバイオオートマウスの体重減少および DAI (disease activity index) スコアが有意に改善し, 大腸炎抑制活性を有する腸内細菌が定着していることが示唆された。以上の結果より, 腸内細菌の多くは難培養性であるが, 特定の培地を用いることで米ぬか摂取マウス腸内細菌中の大腸炎抑制活性性腸内細菌を単離可能であることが示唆された。今後, 大腸炎抑制活性を有する細菌種を単離および同定することで, 新規プロバイオティクスの開発などに繋がることを期待される。

DP1-09-06/P2-041

塩分排泄量と血圧レベルによる腸内細菌由来ポリアミン代謝経路の遺伝子発現に関する研究

○五十川 泰雄¹, 唐島 成宙², 溝口 蓮³, 越田 葵¹, 辻口 博聖⁴, 原 章規⁴, 中村 裕之⁴, 岡本 成史⁵ (¹金沢大・新学術創成研究科, ²金沢大・国際基幹教育院, ³金沢大・医薬保健学総合研究科未来型健康増進医学, ⁴金沢大・医薬保健・医・環境生態医学・公衆衛生学, ⁵大阪大・院・医・保健学)

Gene expression of gut bacterial polyamine metabolism based on salt excretion and blood pressure

○Yasuo Ikagawa¹, Shigehiro Karashima², Ren Mizoguchi³, Aoi Koshida¹, Hiromasa Tsujiguchi⁴, Akinori Hara⁴, Hiroyuki Nakamura⁴, Shigefumi Okamoto⁵ (ILAS, Kanazawa Univ., ²FSI, Kanazawa Univ., ³Dept. Health Prom. & Med. Fut., Kanazawa Univ., ⁴Dept. Hygiene & Pub. Health, Grad. Sch. Adv. Prev. Med. Sci., Kanazawa Univ., ⁵Div. Health Sci., Sch. Med., Osaka Univ.)

高血圧の要因として食塩の過剰摂取が挙げられるが, 一部は食塩の適正ないし過少な摂取量であるにも関わらず高血圧となる。また, 血圧抑制作用を持つスペルミジン (Spd) や原料となるアルギニン (Arg) は一部の腸内細菌により産生される。食塩摂取量による高血圧発症の機序に関して, 腸内細菌由来 Spd の関与を検討した報告はない。本研究では, 一般住民の腸内細菌叢の構成と機能解析を行い, 腸内細菌由来 Spd 代謝が食塩摂取量と血圧との関係に与える影響について検討した。対象者を推定 1 日食塩排泄量と平均血圧の 2 つの指標により 4 群化し, それぞれ低食塩血圧正常群, 低食塩血圧高値群, 高食塩血圧正常群, 高食塩血圧高値群とし, 低食塩血圧正常群と他の群の 2 群間比較を行った。菌叢構成解析において, β 多様性では低食塩血圧正常群と高食塩血圧高値群の間に有意差が認められた。細菌叢構成細菌種はどの群間にも複数種に有意差が認められた。Arg から Spd までの合成経路を構成する各酵素遺伝子存在量を群間比較したところ, 低食塩血圧正常群において, プトレンシンから Spd を合成する EC 2.5.1.16 遺伝子量は低食塩血圧高値群及び高食塩血圧高値群よりも有意に高値であることを見いだした。生体内での合成活性を示す血清中の代謝産物比には有意差は認められなかった。ヒトにおいて, EC 4.1.1.17 によるオルニチンからプトレシンの合成は Spd 合成の律速段階であり, Spd は EC 4.1.1.17 のフィードバック阻害剤として作用する。腸内細菌由来 Spd は, ヒトの EC 4.1.1.17 活性に影響も与えて Spd 自体の合成量に影響を与えている可能性がある。

DP1-09-07/P2-042

幼若期のアンピシリン暴露が食餌誘導性 NASH モデルマウスに及ぼす影響

石川 隆司¹, 大西 光莉¹, 清水 真祐子², 櫻井 明子¹, 〇片岡 佳子¹ (¹徳島大・医・微生物遺伝子解析, ²徳島大・医・疾患病理)

Effect of ampicillin exposure in weaning period in diet-induced NASH model mice

Ryuji Ishikawa¹, Hikari Ohnishi¹, Mayuko Shimizu², Akiko Sakurai¹, 〇Keiko Kataoka¹ (¹Dept. Microbiol. Gen. Anal., Sch. Med., Tokushima Univ., ²Dept. Pathol. Lab. Med., Sch. Med., Tokushima Univ.)

【目的】ウェスタンダイエットの摂取により発症する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) のモデルマウスを用いて, 幼若期の抗菌薬暴露が脂肪性肝炎の発症と腸内細菌叢に及ぼす影響を検討した。【方法】C57BL/6J マウスを交配後, 出産 1~2 日前から出産後の仔マウスが離乳する 3 週齢までの間, 母仔同ケージで, 1g/L アンピシリン水溶液または水道水を飲料水として自由摂取させた。離乳後 8 週齢までは通常食を与え, 8~28 週齢の間は通常食の継続またはウェスタンダイエット (D12079B, Research Diet 社) の自由摂取に切替えた。28 週齢 (実験終了時) に, 全仔マウスの採血と肝臓を採取した。NASH の評価には肝臓組織の HE 染色標本上での脂肪化, 小葉内炎症等のスコアおよび血清 ALT 値を用いた。仔マウス各個体の 4, 8, 28 週齢での自然排便を採取し, Miseq (Illumina 社) による菌叢の 16S メタゲノム解析を行った。【結果・考察】雄マウスでは, 陰性対照群 (抗菌薬なし+通常食の継続) に比べて, 陽性対照群 (抗菌薬なし+ D12079B 摂取へ切替え) で NASH スコアと血清 ALT 値が有意に高値であり, NASH が誘導されていたが, 抗菌薬暴露群 (アンピシリン暴露+ D12079B 摂取へ切替え) では有意な影響はみられなかった。糞便中の菌叢構成は, 抗菌薬暴露群において 4 週齢時に菌叢の多様性が著しく低下し *Firmicutes* が 98% 以上を占めていた。今後, 肝臓組織の線維化の程度を NASH の評価に加え, NASH と幼若期のアンピシリン暴露や食餌切替えによる菌叢の経時的な変動との関連を検討する必要がある。

DP1-09-08/P2-043

宿主の加齢と相関するメンブレンベシクル産生腸内細菌の同定

○松下 未来¹, 菊池 薫¹, 野原 正勝², 尾花 望^{3,4}, 野村 暢彦^{4,5} (筑波大・理工情報生命・生命地球科学, ²岡山理科大・獣医, ³筑波大・医学医療系・TMRC, ⁴筑波大・MiCS, ⁵筑波大・生命環境系)

Identification of membrane vesicle-producing gut bacteria correlated with host aging

○Miku Matsushita¹, Kaoru Kikuchi¹, Masakatsu Nohara², Nozomu Obana^{3,4}, Nobuhiko Nomura^{4,5} (Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci. Univ. Tsukuba, ²Fac. Vet., Okayama Univ. Science, ³TMRC, Inst. Med., Univ. Tsukuba, ⁴MiCS, Univ. Tsukuba, ⁵Inst. 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やメンブレンベシクル (MV) が寄与すると考えられている。MV とは直径 20 から 400 nm の球状膜構造体であり、内包する菌体成分を周囲の細胞に輸送している。これまでに腸内細菌由来 MV が様々な宿主生理機能の調節に関与することが示唆されているが、実際の腸管内における MV 産生菌種とその機能については不明な点が多い。本研究では、マウス腸管中における MV 産生菌種を特定するため、異なる週齢のマウスの便より細菌由来 MV を単離し、その DNA を用いた 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を行った。その結果、高齢マウスから単離した MV 画分に含まれる DNA より Turicibacter 属細菌が高頻度に検出された。本属細菌の腸管中の存在量は、腸管炎症と正に相関することが報告されていることから、本属菌の産生する MV は炎症性に関与すると予想した。そこで、Turicibacter 属細菌より MV を精製し、培養細胞に対する炎症性サイトカイン誘導量を測定したところ、常在細菌である Bacteroides fragilis および B. thetaiotaomicron 由来の MV と比較して、高い TNF- α および IL-6 誘導能を有することが明らかとなった。さらに、大腸炎モデルマウス系を用いて、Turicibacter 属細菌の腸管炎症に対する影響を解析したところ、Turicibacter 投与マウスでは大腸炎の症状が有意に悪化した。以上の結果から、Turicibacter 属細菌が高齢マウスの腸管内で MV を豊富に産生し、その MV が宿主の腸管炎症を誘発する可能性が示された。

DP1-09-09/P1-045

長期継代培養が及ぼす Fusobacterium nucleatum のバイオフィルム形成能への影響

○多田 彩乃, 今大路 治之, Emmanuel Munyeshyaka, Nafisa Tabassum, 桑原 知巳 (香川大・医・分子微生物)

Effect of long-term passage on the biofilm formation of Fusobacterium nucleatum

○Ayano Tada, Haruyuki Imaohji, Emmanuel Munyeshyaka, Nafisa Tabassum, Tomomi Kuwahara (Dept. Microbiol., Med., Kagawa Univ.)

【目的】口腔内では多種多様な細菌が共凝集して複雑なバイオフィルムを形成する。Fusobacterium nucleatum (FN) は初期定着菌と後期定着菌の橋渡しをする歯周病関連細菌であり、口腔バイオフィルム形成において重要な役割を担っている。口腔内で FN は分裂により継代を繰り返していると推測されるが、継代が FN のバイオフィルム形成能に与える影響を評価した報告はない。本研究では、F. nucleatum を長期間にわたって継代培養し、バイオフィルム形成能に与える影響を調べた。【方法】-80°C で凍結保存された F. nucleatum ATCC25586 株を BHIS 寒天培地に播種し、48 時間嫌気培養した。さらに、コロニーを BHIS 培地へ播種し、24 時間嫌気培養した。菌液の濁度 (OD₆₀₀) が 0.1 となるよう調整し、24 ウェルプレートで 24 時間嫌気培養して形成させたバイオフィルム量をクリスタルバイオレット染色法により定量した。また、BHIS 寒天培地上のコロニーを新しい寒天培地へ 160 回継代し、同様の操作を 3 度繰り返した。【結果および考察】Fusobacterium nucleatum ATCC25586 株は自己凝集能が高く、バイオフィルム形成量に周期的な変化が認められた。寒天培地へ播種して約 20 回継代するとバイオフィルム形成量が減少し、その後安定した。継代数 40 回以降はバイオフィルム形成量の変動が大きくなり不安定化した。以上の結果から、継代培養により FN のバイオフィルム形成能が変動することが明らかになった。慢性歯周炎組織において、FN がどのように病態形成に関与するのかを理解するため、各継代時期の FN について RNA-Seq 解析を行い、バイオフィルム形成に関与する遺伝子群の検索を進めている。

DP1-09-10/P1-046

芽胞形成細菌の発芽誘導法の検討

○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)

Investigation of methods for inducing germination of spore-forming bacteria

○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、芽胞の発芽を誘導する様々な手法を用いて単離した菌株を整理することで、その発芽誘導法の有効性を検証した。【材料および方法】健康成人のヒト糞便材料をエタノールに浸漬することで、栄養細胞を滅菌し芽胞細胞を残す処理をした。発芽誘導物質として報告されているアミノ酸類や有機酸類、胆汁酸を添加し芽胞細胞の発芽を試みた。また、糞便材料の液体培養液を滅菌して添加する新たな発芽誘導法も同時に行った。発芽誘導後の各サンプルを種々の寒天培地を用いて嫌気条件下で培養し、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。【結果】発芽を誘導する各条件によって、計 444 株を単離した。そのうち、63 株の新種候補株を検出した。既知種では Clostridium 属が大多数を占め、次いで Bacillus 属、Intestinibacter 属、“Pseudoruminococcus”属が続いた。また、難培養かつ酪酸産生の有用菌として知られる Roseburia 属や Anaerobutyricum 属の細菌種も分離された。新種候補株のうち 37 株が糞便材料の液体培養液を添加した条件において分離された。このことから、本手法は新規である芽胞形成細菌の分離に有効であることが示唆された。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。

DP1-09-11/P2-044

Adaptive Laboratory Evolution of Minimal Genome Bacterium to Low Temperature

○水谷 雅希¹, 森山 実¹, 古賀 隆一¹, 深津 武馬^{1,2,3}, 柿澤 茂行¹ (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)

○Masaki Mizutani¹, Minoru Moriyama¹, Ryuichi Koga¹, Takema Fukatsu^{1,2,3}, Shigeyuki Kakizawa¹ (1Bioproduct. Res. Inst., AIST, ²Dept. Bio. Sci., Univ. Tokyo, ³Grad. Sch. Life. Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

JCVI-syn3B is an artificial bacterium whose genome consists of chemically synthesized-essential genes based on the information of Mycoplasma genome. The genome size is 545 kbp which is the smallest in isolated and culturable bacteria. JCVI-syn3B is useful for functional analyses of introduced genes and contributed to reveal the minimal gene set for swimming motility in Spiroplasma. To precisely reconstitute the function of introduced genes, similarity of optimal growth temperature between gene donor and recipient cells is important, because temperature strongly affect to protein folding. Especially, higher temperature than optimal temperature sometimes causes protein misfolding. The optimal growth temperature of JCVI-syn3B is 37°C which is higher than that of many environmental bacteria. In the present study, we continuously cultivated JCVI-syn3B at lower temperature than 37°C. Growth speed of cells increased with passages and finally the evolved strains could be culturable at 25°C which is unculturable temperature for original cell. The results of proteomics analysis in evolved strains indicated several important functions for low temperature adaptation: RNA degradation, Stabilization of single-stranded DNA in replication, cell division, and glycerol metabolism. Some of them are probably fundamental functions for low temperature adaptation in bacteria.

DP1-09-12/P2-045

人肌加温効果による乾燥面に付着した病原性細菌の生存性制御：加温便座の有効性の検討

○栗城 琴華^{1,2}, 大久保 彦彦¹, 山口 博之¹ (¹北大・院・保健科学, ²北大・院・医学)

Controlling the viability of bacteria on dry surfaces: the effectiveness of warmed toilet seats

○Kotoka Kuriki^{1,2}, Torahiko Okubo¹, Hiroyuki Yamaguchi¹ (¹Fac. Health Sci., Hokkaido Univ., ²Fac. Med., Hokkaido Univ.)

手すり等の高頻度接触面に付着した細菌は接触感染の原因になると懸念されている。本研究では接触面の菌数の低減策を検討し、手すりを人肌程度に加温すると無加温と比べて菌数が減少することを報告した (Konno et al., PLoS ONE 2023)。一方、手すりの付着菌は手指由来と予想されるのに対し、トイレの便座は糞便細菌が付着しやすく、菌数も手すりより多いと考えられる。本研究では便座の生菌数が表面温度の違いで変化するかを比較し、便座の加温が付着菌数の低減に有効か検討した。便座はアイソレーター内に設置した市販の暖房便座 (TOTO TCF116 #NW1) で、低温・中温・高温のいずれかに設定し使用した。表面温度はサーモグラフィ (FLIR ONE) で便座上 10 点で確認し、低温時 22±3.5°C, 中温時 31±2.6°C, 高温時 37±5.5°C だった。供試菌は大腸菌 (DH5α) と黄色ブドウ球菌 (ATCC29213) で、培養後に菌液調製して便座に滴下した (10 μL/spot, 1.0×10⁸CFU/spot)。乾燥直後, 24h, 48h, 72h に PBS で洗浄回収し, LB 寒天培地に塗布して集落数から生菌数を算出した。大腸菌生菌数 (CFU/spot) は、低温時は 72h で乾燥直後に対して 1/100 に減少したのに対し、高温時は 72h で 1/10,000 に減少した。黄色ブドウ球菌生菌数 (CFU/spot) は、低温時は 72h までほぼ横這いだったのに対し、高温時は 72h で乾燥直後に対して 1/10,000 まで激減した。両菌種とも生菌数と表面温度の間に負の相関があった (大腸菌 72h: r=-0.53, p<0.05; 黄色ブドウ球菌 72h: r=-0.73, p<0.01)。便座の加温は使用時に快適性をもたらすだけでなく、付着菌数の低減にも効果があると考えられる。現在、実際の糞便 (牛糞) を用いて実証中である。会員外協力者：滝川瑞季

DP1-09-13/P2-046

模擬微小重力環境におけるミュータンス菌の抗菌剤に対する感受性変化

○東海林 知佳, 本田 みちよ (明大院・理工研・応用化学)

Changes of Sensitivity to antibiotics against *Streptococcus mutans* under simulated microgravity

○Chika Tokairin, Michiyo Honda (Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech., Meiji Univ.)

【緒言】齲蝕は一般的な口腔疾患の一つであり、微小重力環境である宇宙空間ではその発生リスクが上昇することが確認されている。これは、齲蝕の主要な病原性細菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) をはじめとする種々の細菌の特徴が、宇宙空間で変化することに起因すると推察されているが、詳細は不明である。宇宙空間における口腔衛生の維持を目的とし、本研究では、抗生物質や抗菌ペプチドを用いて、地上重力環境 (1G) と模擬微小重力環境 (SMG) で培養した *S. mutans* に対する薬剤感受性について評価した。【実験・結果】はじめに、1G と SMG での *S. mutans* の増殖性を調べたところ、増殖性に変化は認められなかった。次に、1G と SMG において抗生物質と抗菌ペプチドを *S. mutans* に処理し、薬剤感受性について調査した。その結果、抗生物質を処理した場合には、いずれの薬剤においても感受性が変化しなかった。一方、抗菌ペプチドを処理した場合には、SMG において調査したいずれの薬剤に対しても感受性が低下した。【考察】1G と SMG において増殖性に変化が見られなかったことから、感受性の変化は細菌の増殖性に起因するものではないと考えられる。一方、今回調査した抗菌ペプチドの共通の特徴として、カチオン性であること、分子量が 1000 以上であることが挙げられるが、作用機序はそれぞれ異なる。多くの抗菌ペプチドは細胞膜に孔を形成し細胞内に入り込むが、本研究で使用した抗生物質は膜を透過して細菌内部へ侵入した後に抗菌性を発現する。このことから、*S. mutans* は SMG で培養すると細胞膜の構造や組成に変化が生じ、その結果、カチオン性抗菌ペプチドに対して感受性が低下した可能性が考えられる。

DP1-09-14/P2-047

Effects of *Campylobacter jejuni* infection in the VBNC state on the mouse intestinal tract

土田 瑞季¹, 平田 暁大¹, 猪島 康雄^{1,2}, ○岡田 彩加^{1,2} (¹岐阜大・獣医, ²岐阜大・GeFAH)

Mizuki Tsuchida¹, Akihiro Hirata¹, Yasuo Inoshima^{1,2}, ○Ayaka Okada^{1,2} (¹Dept. Vet. Med., Gifu Univ., ²GeFAH., Gifu Univ.)

【背景・目的】*Campylobacter jejuni* は日本における細菌性の食中毒事件発生数第一位の原因菌である。*C. jejuni* の一部は、温度や浸透圧などの環境ストレスにより、生きてはいるが培養ができない、viable but non-culturable (VBNC) 状態となる。一般的に *C. jejuni* は培養法によって分離・検出が行われるため、VBNC 状態の菌は検出されず見逃されている可能性がある。しかし、VBNC 菌がヒトの腸管で増殖し、食中毒の原因となるかは不明である。本研究は、食中毒対応策に VBNC 菌を含めるべきかを検討するため、モデルマウスを用いて VBNC 菌の腸管での定着性、増殖性および病原性を評価することを目的とした。【材料・方法】マウス (C57BL/6, 3 週齢, 雄) に *C. jejuni* 投与 2 週間前から亜鉛欠乏食を与え、投与 4 日~1 日前まで複数種類の抗生物質を飲水投与した。*C. jejuni* NCTC11168 株の培養可能菌または VBNC 菌を各 5 匹に 10⁷CFU/匹となるように経口投与し、投与後 1 日おきに臨床症状の観察、経時的な糞便回収および体重測定を行った。回収した糞便は 10% 糞便乳剤とし、mCCDA 培地を用いた直接分離培養またはプレストン培地を用いた増菌培養とともに、リアルタイム PCR により総菌数を定量した。*C. jejuni* 投与後 8 日目に安楽殺し、腸管の病理組織学的解析を実施した。【結果・考察】臨床症状、下痢や血便、体重の変化は培養可能菌、VBNC 菌ともに認められず、腸管の顕著な炎症を示す組織学的変化は認められなかった。培養可能菌投与では、糞便中の菌の増殖が培養およびリアルタイム PCR の両方において認められた。一方 VBNC 菌投与では投与 1 日後以外では菌が検出されず、VBNC 菌はマウス腸管内に定着できないことが示唆された。

DP1-10-01/P1-108

Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の N 末端側ドメインの機能解析

○佐々木 舞¹, 竹内 祥子¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹ (¹大阪医薬大・薬・感染制御, ²大阪医薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of N-terminal side domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Mai Sasaki¹, Shoko Takeuchi¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (¹Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., ²Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。肝臓などに基礎疾患を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り死亡する。我々は本菌の臨床分離株は実験動物においても重篤な全身症状を示し死に至らしめるが、環境分離株の致死活性は非常に低いことを明らかにしてきた。ビブリオ属細菌の Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素は複数のドメインを有しており、本毒素が細胞内に侵入した後にシステインプロテアーゼドメインが各ドメインに自己切断することにより機能的に働いていると考えられているが、各ドメインの機能や本毒素の細胞内への侵入経路は明らかとなっていない。そこで、本毒素の機能を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて MARTX 毒素自身が自己切断する N 末端側の 2 つのドメインの欠損株を作製するために、N 末端側の 2 つのドメインの上流域と下流域の塩基配列を pDM4 に挿入し、組換えプラスミドを作製し、大腸菌 SM10λpir 株を形質転換した。大腸菌 SM10λpir 形質転換株から M2799 株に接合伝達し、セレクトションを行い、欠損株を作製した。各種細胞に対する本菌および N 末端側の 2 つの機能的ドメインの欠損株の細胞傷害活性を測定し、比較検討した。

【結果と考察】本菌の N 末端側の 2 つのドメインの欠損株を作製した。得られた欠損株の DNA 配列を解析し、インフレームで目的遺伝子が欠損していることが確認された。現在、欠損株を野生株の各種細胞に対する細胞傷害活性を測定し N 末端側の 2 つのドメインの機能を解析している。

DP1-10-02/P1-109

***Vibrio vulnificus* の致死性毒素 MARTX 毒素の機能的ドメインの解析**

○能祖 由梨奈¹, 杉村 陽菜¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹ (1大阪医薬大・薬・感染制御, 2大阪医薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of functional domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Yurina Noso¹, Hina Sugimura¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (1Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., 2Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は魚介類の摂取や海水の創傷部暴露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。アルコール中毒者、糖尿病患者、肝機能に重篤な障害を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り、敗血症に陥るとその致死率は70%以上報告されている。我々は、本菌の臨床分離株は、実験動物の感染実験においても重篤な全身症状を示し死に至らしめるが、環境分離株の致死活性は非常に低いことを見出した。また、本菌の病原性には Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素が重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。そこで、本菌の細胞死誘導における MARTX 毒素の各機能的ドメインの役割を明らかにするために実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて実験を行った。各種細胞に対する本菌および毒素の欠損株の細胞傷害活性を測定した。また、MARTX 毒素の遺伝子をクローニングし、大腸菌により発現させ、MARTX 毒素のシステインプロテアーゼドメインによる自己切断後、SDS-PAGE を行い、アミノ酸シーケンサーを用いて自己切断部位の同定を行った。同定された2つの自己切断ドメインを各種培養細胞に発現させ、MARTX 毒素の各ドメインの機能を解析した。

【結果と考察】本菌の MARTX 毒素の機能的ドメインの一つであるシステインプロテアーゼドメインが自己切断する部位を *in vitro* で確認したところ MARTX 毒素に存在する5つのドメインドメインすべてを切断するのではなく、2か所で切断しN末端側2つのドメインとC末端側3つのドメインになることが明らかとなった。現在は、HeLa 細胞や 293FT 細胞に自己切断される2つのドメインを発現させ、両ドメインの機能解析を行っている。

DP1-10-03/P1-110

Negative transcriptional regulator of *V. parahaemolyticus* type III secretion system 2

○Sarunporn Tandhavanant^{1,2}, Hiroyuki Terashima¹, Dhira Saraswati Anggramukti³, Hirotsuka Hiroyoshi¹, Narisara Chantratita², Tetsuya Iida³, Shigeaki Matsuda³, Toshio Kodama¹ (1Dept. Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki Univ., 2Dept. Microbiology and Immunology, Fac. Tropical Medicine, Mahidol Univ., 3Dept. Bacterial Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

○Sarunporn Tandhavanant^{1,2}, Hiroyuki Terashima¹, Dhira Saraswati Anggramukti³, Hirotsuka Hiroyoshi¹, Narisara Chantratita², Tetsuya Iida³, Shigeaki Matsuda³, Toshio Kodama¹ (1Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ., 2Dept. Microbiology and Immunology, Fac. Tropical Medicine, Mahidol Univ., 3Dept. Bacterial Infections, Research Inst. Microbial Diseases, Osaka Univ.)

Many pathogenic bacteria have mechanisms to regulate gene expression in response to host cell contact to establish infection. Here, we show that *Vibrio parahaemolyticus*, a causative agent of foodborne gastroenteritis, has a host cell contact-dependent regulatory mechanism for virulence gene expression. T3SS2, an essential virulence for acute gastroenteritis encoded by Vp-PAI, recognizes host cell contact by sensing intracellular K⁺ levels and switches its own secretory substrates by gatekeepers. Mutant deficient in the gatekeeper is unable to switch substrates and lock the secretory state into host cell contact. Transcriptome of T3SS2 gatekeeper mutants showed that the genes encoded by Vp-PAI were upregulated in a T3SS2 secretory activity-dependent manner, implying the presence of a negative regulator secreted by T3SS2. Comparative proteomic analyses identified a T3SS2 secretory substrate, VtrN, which negatively regulates Vp-PAI transcription. VtrN secretion was promoted under conditions that mimic host cell contact. *vtrN* gene deletion upregulated Vp-PAI expression independently of T3SS2 secretory activity. Furthermore, VtrN interacted with VtrB, a transcription factor of Vp-PAI, and repressed its activity. Thus, *V. parahaemolyticus* has a mechanism to upregulate virulence gene expression in response to host-cell contact by utilizing the host-cell recognition mechanism of T3SS2.

DP1-10-04/P1-111

***Porphyromonas gingivalis* 感染における PLC を介した細胞内カルシウム流入による歯周組織炎症への影響**

○中山 真彰^{1,2}, 内藤 真理子³, 中山 浩次³, 大原 直也^{1,2} (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)

The influence of PLC-mediated intracellular calcium influx in periodontitis during *Pg* infection

○Masaaki Nakayama^{1,2}, Mariko Naito³, Koji Nakayama³, Naoya Ohara^{1,2} (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* の病原因子ジンジパインが細胞外カルシウムを導入させ、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、ジンジパインによる 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、ジンジパインによる COX2 発現と PGE2 産生に対する PLC の関与を調べた。またジンジパインによる 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パインによる 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。

DP1-10-05/P1-112

Gingipain from *Porphyromonas gingivalis* promotes inflammation in human microglia cells

○藤井 望加¹, 山崎 裕¹, 長谷部 晃², 李 智媛² (1北大・院・歯・口腔健康科学・高齢者歯科学, 2北大・院・歯・口腔病態学・口腔分子微生物学)

○Mika Fujii¹, Yutaka Yamazaki¹, Akira Hasebe², Ji-Won Lee² (1Gerodontology, Dept. Oral Health Science, Fac. Dental Medicine, Hokkaido Univ., 2Microbiology, Dept. Oral Pathobiological Science, Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ.)

Evidence of a correlation between chronic periodontitis and an increased risk of dementia has been growing, with inflammation response associated with *Porphyromonas gingivalis* recognized as a potential risk factor for transitioning to Alzheimer's disease (AD). While gingipains produced by *P. gingivalis* have been identified in the brains of AD patients, a direct causal relationship has not been conclusively proven. In our study, we investigated the impact of gingipain on brain cell function by conducting *in vitro* experiments with brain-resident microglia. Treatment of HMC3 cells with recombinant Arg-gingipain (Rgp) resulted in a significant increase in the gene expression of inflammatory responses, including IL-1b, IL-6 and TNF-α, as well as observed elevated cytokine levels measured by ELISA. Employing pH sensing probe (pHrodo Red) and fluorescence-conjugated β-amyloid for phagocytosis analysis revealed that gingipain induced notable changes in membrane ruffling and morphological alterations in microglia cells. Our findings affirm the significant role of Rgp as a mediator in the inflammatory cascade of human microglia cells.

DP1-10-06

【発表取り下げ】

【Withdrawn】

DP1-10-08/P2-104

Bordetella bronchiseptica produces pertussis toxin

○Shymaa Ali¹, 平松 征洋¹, 西田 隆司¹, Dendi Krisna Nugraha¹, 堀口 安彦^{1,2} (¹阪大・微研・分子細菌学, ²阪大・感染症総合教育研究拠)

○Shymaa Ali¹, Yukihiko Hiramatsu¹, Takashi Nishida¹, Dendi Krisna Nugraha¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (¹Dept. Mol. Bact., RIMD., Osaka Univ., ²CiDER., Osaka Univ.)

Bordetella pertussis (Bp), *B. bronchiseptica* (Bb), and *B. parapertussis* (Bpp), which cause respiratory diseases in mammals including humans, are genetically closely related and share many virulence factors except pertussis toxin (Ptx), a major virulence factor of Bp. Bb and Bpp have long been considered not to produce Ptx because of the dysfunctional promoter of the *ptx* operon. In this study, however, we found that bacterial lysates of Bb but not Bpp caused ADP-ribosylation of the α subunits of heterotrimeric G_i GTPases, the enzyme action of Ptx, in T98G human glioblastoma cells. Consistently, the lysates caused CHO-K1 cell clustering, indicating the presence of active Ptx. The ADP-ribosylating and cell clustering activities were not detected from the lysate of a Bb mutant defective in the *ptx-ptl* operon encoding Ptx and its secretion apparatus. The ADP-ribosylating activity of the Bb lysate was about 100 times lower than that of the Bp lysate. The culture supernatant of Bb exhibited the ADP-ribosylating activity on the cells only after at least 10-fold concentration. Immunoblotting with anti-Ptx antibody failed to detect Ptx from the lysates and culture supernatants from Bb. These results indicate that Bb produces about 1/100 of active Ptx as *B. pertussis*. We are currently investigating whether Bb Ptx is involved in inducing cough in host animals.

DP1-10-07/P1-114

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¹, 長宗 秀明^{1,2}, 友安 俊文^{1,2}, 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大院・創成科学・生物資源学, ²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 Yamamori¹, Hideaki Nagamune^{1,2}, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】 アンギノーサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒトの口腔内常在性の日和見レンサ球菌である。この AGS の構成菌種の中で、*S. anginosus* と *S. constellatus* の β 溶血株がペプチド溶血毒素 Streptolysin S (SLS) を産生するが、この SLS に対する宿主細胞の応答反応は明らかにされていない。また、近年では臨床現場において口腔以外の感染症や疾患から AGS が分離されており、本菌群と異所性感染との関連が注目されている。そこで本研究では、AGS の血中移行を想定して、ヒト由来免疫細胞における SLS に対する宿主応答メカニズムについて検討した。

【方法】 *S. anginosus* subsp. *anginosus* NCTC 10713^T (基準株) と基準株由来 SLS 遺伝子欠失株 (Δ sagAs) を被検菌とし、ヒト血清アルブミン存在条件下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ヒト単球系細胞株 THP-1 における細胞障害性の検討や、炎症性サイトカインに着目した遺伝子及びタンパク質発現変動の解析を行った。

【結果・考察】 SLS を含む培養上清を作用させた THP-1 細胞では、細胞膜障害に伴う細胞内 Ca²⁺の上昇と複数の炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇が確認された。この SLS 依存的なサイトカイン遺伝子の発現上昇は、Ca²⁺のキレートにより有意に抑制された。また、SLS 依存的なサイトカインの発現には、ERK などの MAPK シグナル伝達経路が関与していた。以上の結果から、SLS の作用に伴うシグナル伝達は、Ca²⁺の細胞内流入を起点として、MAPK 経路の活性化により免疫応答が誘導されることが明らかになった。現在、異所性感染の原因菌として注目されている AGS、特に SLS を産生する β 溶血性菌種の病原性を理解するため、さらに検討を進めている。

DP1-10-09/P2-105

Analysis of the transcription of serine protease gene by *Aeromonas sobria*

○高橋 栄造¹, 越智 定幸¹, 田中 大晴¹, 油井 利想¹, 小林 秀文², 清家 総史², 山中 浩泰², 岡本 敬の介³ (¹横浜薬大・薬, ²広島国際大・薬, ³岡山大院・医歯薬)

○Eizo Takahashi¹, Sadayuki Ochi¹, Masaharu Tanaka¹, Toshiyuki Yui¹, Hidetomo Kobayashi², Soshi Seike², Hiroyasu Yamanaka², Keinosuke Okamoto³ (¹Fac. Pharm. Sci., Yokohama Univ. Pharm., ²Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., ³Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.)

Aeromonas species, which inhabit in various aquatic environments, cause diarrhea in both adults and children. *A. sobria* secretes two types of extracellular proteases, serine protease (ASP) and metalloprotease (AMP). Previously, we carried out the random mutations in the upstream region of *asp* in *A. sobria* 288 and found that the mutation at two specific sites decrease the production of ASP. Two specific sites locate at -78 and -194, when the initial base of start codon of translation of *asp* is numbered as +1.

In this study, we examined the transcriptional level of *asp* in these mutants by quantitative RT-PCR. When the mutant were cultivated at 37°C and 25°C, the transcriptional level of *asp* in the mutant which has the mutation at -78 were decreased to the amount of 9.3% and 3.6% with those of parent strain, respectively. Similarly, the transcriptional level of *asp* in the mutant which has the mutation at -194 decreased to the amount of 77.4% and 12.1%, respectively. Next, we determined the transcription start site (TSS) of *asp* by 5'-RACE. From the analysis of the amplicon, TSS was indicated to be at position -43. However, RT-PCR using the primer which anneals from -206 to -183 presented the amplification products. These results suggested that there are multiple TSS of *asp*.

DP1-10-10/P2-106

細菌性コラゲナーゼの構造・動態と基質水解機構の解析

○松下 治¹, 美間 健彦², Adjoa Bonsu³, 沖 大也⁶, 増田 亮⁷, 小出 隆規⁸, 山下 隼人⁴, 河原 一樹⁵, Joshua Sakon³ (1岡山大・院医歯薬・病原細菌学, 2愛媛県立医療技術大・保健科学・臨床検査・微生物検査, 3Dept. Chem. Biochem., Univ. Arkansas, 4大阪大・院基礎工・極限科学センター, 5大阪大・院薬・高分子化学, 6大阪大・微研・感染症メタゲノム研究, 7早稲田大・理工総研, 8早稲田大・先進理工・化学生命化学)

Structure and dynamics analysis of a clostridial collagenase

○Osamu Matsushita¹, Takehiko Mima², Adjoa Bonsu³, Hiroya Ok⁶, Ryo Masuda⁷, Takaki Koide⁸, Hayato Yamashita⁴, Kazuki Kawahara⁵, Joshua Sakon³ (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., 2Dept. Med. Tech., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., 3Dept. Chem. Biochem., Univ. Arkansas, 4Ctr. Sci. Tech. Extr. Cond, Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., 5Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., 6Dept. Infect. Metagenomics., Res. Inst. Micro. Dis., Osaka Univ., 7Waseda Res. Inst. Sci. Engineer., Waseda Univ., 8Dept. Chem. Biochem., Sch. Adv. Sci Eng., Waseda Univ.)

ガス壊疽菌群は、交通事故等による血流途絶を伴う深い創傷部位に感染し、組織を破壊しつつ、急速に感染巣を拡大する。感染巣では、種々の細胞毒素による細胞死に加え、細胞外マトリックス (ECM) の破壊が認められる。中でも、ECM の主要な構成要素である膠原線維は、細菌性コラゲナーゼによって水解される。本酵素は、触媒モジュールと基質結合モジュールからなり、それぞれが複数のドメインにより構成されている。

Hathewayia histolytica (旧名: *Clostridium histolyticum*) が産生するクラス II コラゲナーゼ (ColH) の基質結合モジュールのうち、C 末端にあるコラーゲン結合ドメイン (CBD) は β サンドイッチ構造をとり、片側のシートによって三重らせん構造をとる基質に結合した。CBD の N 末端側にある PKD ドメイン 2 は、CBD の基質結合を強化した。PKD ドメイン 2 も β サンドイッチ構造をとり、疎水性残基が露出していた。また、これらのドメインを用いて生理活性物質をコラーゲン基材にアンカリングすることで組織再生を促進する複合剤を作製することができた。

今回の研究は、ColH の触媒モジュールの構造・動態と三重らせん構造をとる基質の巻き戻し・水解機構の関係を明らかにすることを目的としている。触媒モジュールの X 線結晶学的な構造解析、ならびに全長酵素のクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を試みている。また高速原子間力顕微鏡を用いた触媒モジュールの分子動態の観察を試みている。さらに、基質への結合と巻き戻しについて、ブルダウンアッセイおよび NMR による検討を進めている。

DP1-10-11/P2-107

S. mitis Nm-76 株が産生する Discoidinolyisin のヒト由来細胞に対する傷害メカニズムの検討

○塚崎 清香¹, 大倉 一人², 友安 俊文^{1,3}, 長宗 秀明³, 田端 厚之^{1,3} (1徳島大・院創成科学研究科・生物資源学, 2鈴鹿医療科学大院・薬・医療薬学, 3徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学)

Investigation of the cytotoxic mechanism of Discoidinolyisin produced by *S. mitis* strain Nm-76

○Sayaka Tsukasaki¹, Kazuto Ohkura², Toshifumi Tomoyasu^{1,3}, Hideaki Nagamune³, Atsushi Tabata^{1,3} (1Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. Innov., Tokushima Univ., 2Div. Pharm. Sci., Suzuka Univ. Med. Sci. Grad. Sch., 3Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】*Streptococcus mitis* (SM) は Mitis 群レンサ球菌に属し、一般的には日和見病原菌と認識されているが、近年ではヒトに対する病原性が注目されつつある。我々は、川崎病患児由来の SM 株である Nm-76 株が産生するコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) であり、分子 N 末に追加ドメインを有す非典型 CDC である Discoidinolyisin (DLY) の細胞傷害性についてこれまでに報告したが、その病原性との関連については不明である。そこで本研究では、DLY に特徴的な N 末追加ドメインに注目し、DLY 依存的な Nm-76 株の細胞傷害メカニズムについて検討を行った。

【方法】Nm-76 株を親株として、受容能促進ペプチドを用いた形質転換法により、N 末追加ドメインを欠失させた DLY 変異体産生株や、DLY コード遺伝子欠失株を作製した。得られた被検株の増殖特性や CDC 産生性を確認すると共に、ヒト赤血球に対する溶血活性測定やヒト由来株化細胞に対する細胞傷害性および細胞付着性等について検討した。

【結果および考察】作製した DLY 変異体産生株や DLY コード遺伝子欠失株の増殖性は親株である Nm-76 株と同様であり、親株同様に培養に伴う溶菌現象も確認された。抗 DLY 抗血清を用いた免疫化学的な検討により、DLY 変異体産生株の CDC 産生量は親株と同様であり、ヒト赤血球に対する溶血活性やヒト由来株化細胞に対する傷害性が確認された。興味深いことに、細胞に対する付着性については、親株と比較して DLY 変異体産生株で低下していた。以上の結果から、Nm-76 株が産生する 5 ドメイン構造を有す DLY は菌体の細胞付着にも関与し、Nm-76 株の DLY 依存的な細胞傷害性に寄与していることが考えられた。

DP1-10-12/P2-108

Elucidation of mechanism of vacuolation induced by *Escherichia coli*-derived Outer Membrane Vesicles

○Teresia Kimeu, 村瀬 一典, 野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大・医・微生物感染症)

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

Bacterial extracellular vesicles are spherical blebs naturally released from both Gram-negative and Gram-positive bacteria. They average in diameter from 20 to 300 nm and are often called outer membrane vesicles (OMVs), especially in Gram-negative bacteria. Recent studies showed that OMVs carry many bacteria-derived biomolecules, including toxin proteins as cargo and that OMVs and their cargo induce diverse biological effects in host cells. We previously reported that *Escherichia coli*-derived OMVs (eOMVs) induce cytoplasmic vacuoles in HeLa cells. The vacuoles appear at 8 hours post infection (hpi) and progressively enlarge up to 24 hpi. While eOMVs have been reported to inhibit the autophagic flux by impairing autophagosome-lysosome fusion, the detailed mechanism by which eOMVs cause vacuoles formation and enlargement remains unclear. Our study aims to elucidate the molecular mechanism underlying eOMVs-induced vacuoles and processes leading to the vacuolar enlargement. Immunostaining with early endosome marker EEA1 and late endosome marker Rab9a revealed that both markers localized to the vacuoles. TGN46, a trans-Golgi network (TGN) marker, also localized to the vacuoles, and dispersion of TGN without effect on cis-Golgi was observed in eOMV-treated cells. These results suggest that eOMVs disrupt endosomal trafficking, potentially contributing to the observed vacuole formation.

DP1-10-13/P2-109

Bordetella 属細菌が産生するタンパク質 BteA と BopN の相互作用領域の解析

○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*

○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と考えられるが、BteA と BopN の相互作用領域や相互作用の意義は不明である。そこで本研究では、BteA の部分欠失変異体及び点変異体を作製し、BteA の BopN との相互作用領域の解析を行った。

Bordetella 属細菌の一種である気管支敗血症菌に BteA 部分欠失変異体産生用プラスミドを導入し、それらの菌株をラット肺上皮由来の L2 細胞に感染させ、BteA の移行量を調べた。その結果、BteA の N 末端側 448 アミノ酸領域と 249 から 448 番目のアミノ酸領域を欠失させた BteA は BopN 依存的に宿主細胞内へ移行したが、BteA の N 末端側 248 アミノ酸領域は BopN 依存的な移行は見られなかった。更に BteA 点変異体産生用プラスミドを導入した菌株を L2 細胞に感染させ、BteA の移行量を調べることでより詳細な解析を行った。その結果、263 番目のアスパラギン酸と 340 番目のフェニルアラニンが BopN に変化させた BteA は BopN 存在下であっても宿主細胞内へ移行しなかった。

以上の結果から、BteA の 249 から 448 番目のアミノ酸領域と 449 から 658 番目のアミノ酸領域において BopN による宿主細胞移行制御を受けることが示唆された。また、263 番目のアスパラギン酸と 340 番目のフェニルアラニンが BopN の制御を受けるのに重要なアミノ酸である事が示唆された。

DP1-10-14/P2-110

Bordetella 属細菌が産生するタンパク質 BcrH2 の機能解析

○宮村 真帆, 阿部 章夫, 桑江 朝臣 (北里大院・感染制御科学・分子細菌)

Functional analysis of Bordetella BcrH2

○Maho Miyasugi, Akio Abe, Asaomi Kuwae (Grad. Sch. Infect. Contr. Sci., Kitasato Univ.)

Bordetella 属細菌はグラム陰性の偏性好気性桿菌であり、多くの病原性グラム陰性菌と同様にニードル状の構造を持つ III 型分泌装置を産生する。*Bordetella* 属細菌が宿主細胞と接触した後、III 型分泌装置の先端でこの装置から分泌される BopD と BopB というタンパク質の複合体が宿主細胞膜上にトランスロコンと呼ばれる孔を形成し、宿主細胞へエフェクターと呼ばれる病原因子を注入する。一般的に、III 型分泌装置から分泌されるタンパク質は菌体内において安定性を維持するためにシャペロンと呼ばれるタンパク質と結合することが知られている。BopD と BopB をコードする遺伝子の近傍に BcrH2 と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子が存在しており、BcrH2 を欠損させた *Bordetella* 属細菌では BopD の分泌量が低下することがわかっていた。

本研究では BcrH2 の機能を明らかにするために、BopD および BcrH2 を精製し、BopD と BcrH2 が直接相互作用するか否かを解析した。*B. bronchiseptica* S798 の DNA を鋳型とした PCR により *bopD*, *bcrH2* 遺伝子を含む DNA 断片を増幅後、発現ベクター pColdII に挿入した。このプラスミドを保有する大腸菌より精製した BopD と BcrH2 で結合試験を行ったところ、BcrH2 と BopD の相互作用が認められた。また、BopD の N 末端側および C 末端側の部分欠変異体を作製し、結合試験を行った結果、BcrH2 との結合は BopD の N 末端側を介していることが示唆された。

DP1-10-15/P2-111

Streptococcus intermedius が保有する細胞壁アンカー蛋白質 Endo D の機能解析

○友安 俊文¹, 田端 厚之¹, 高尾 亜由子², 長宗 秀明¹ (徳島大院・社会産業理工学・生物資源産業, ²鶴見大・歯・口腔微生物学)

Functional analysis of the cell wall-anchored surface protein "Endo D" of *Streptococcus intermedius*

○Toshifumi Tomoyasu¹, Atsushi Tabata¹, Ayuko Takao², Hideaki Nagamune¹ (¹Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ²Dept. Oral Bacteriol., Tsurumi Univ.)

【序論】*Streptococcus intermedius* (SI) は、アングリーノサス群連鎖球菌 (AGS) に属し、日和見的に深部臓器に重篤な膿瘍を形成する。SI はシアリダーゼ活性を保有する NanA と β -ガラクトシダーゼ活性および N-アセチルグルコサミンダーゼ活性を持つ Mga を保有しており AGS の中で唯一糖蛋白質の糖鎖を切断して資化することが可能である。さらに SI は、糖鎖の根本にあるキトビオースの切断に関わる細胞壁アンカー蛋白質 (Endo D) と相同性を持つ蛋白質を保存していた。そこで、Endo D の機能を解析する目的で本研究をおこなった。

【結果と考察】SI ゲノム配列を解析した結果、*endo D* コード領域にはマンノシダーゼ、トランスporter など糖鎖の切断や代謝に関わると可能性がある蛋白質をコードする遺伝子群が約 20kbp の領域にわたって存在していることがわかった。さらに、この領域は AGS の中で SI のみに保存されていることも確認した。次に、精製 Endo D を用いて、フェチンなどが保有する糖鎖を切断するか否かについて解析を行った。その結果、Endo D は無傷の糖鎖を切断せず、NanA と Mga によってシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンが除去されたコア糖鎖を切断することがわかった。さらに、グリコシダーゼ処理によりコア糖鎖だけにしたフェチンを基質に用いて SI の臨床分離株 20 株と歯垢分離株 10 株の培養上清中の Endo D 活性を比較した。その結果、2 株の Endo D 活性は弱かったものの、他の株は活性のある Endo D を分泌していることを確認した。今後、Endo D が SI 感染部位における増殖や病原性に果たす役割について解析を進めていく計画である。【会員外共同研究者：清水 桐也 (徳島大院)】

DP1-10-16/P2-112

血清成分存在下での *Gemella bergeri* 臨床分離株の増殖性および病原性に関する検討

○田端 厚之¹, 友安 俊文¹, 菊池 賢², 長宗 秀明¹ (徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, ²東京女子医・感染症)

Investigation for growth and pathogenicity of *G. bergeri* isolate in the presence of serum components

○Atsushi Tabata¹, Toshifumi Tomoyasu¹, Ken Kikuchi², Hideaki Nagamune¹ (¹Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ²Dept. Infect. Dis., Tokyo Women's Med. Univ.)

【目的】*Gemella* 属細菌は、ヒト咽頭口腔内や上気道、消化管、および泌尿生殖器などに常在するグラム陽性球菌である。*Gemella* 属は 9 菌種で構成されているが、このうち、*G. bergeri* を含む 3 菌種ではコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) のコード遺伝子を染色体上に保有することが確認されている。本研究では、レミエール症候群と電撃性紫斑病を伴った敗血症患者から分離された *G. bergeri* 臨床分離株について、血清成分存在下での本菌の増殖性や CDC に依存的な病原性に関して基準株と比較検討することにより、*G. bergeri* 臨床分離株の病原性の要因を明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】被検菌の培養は BHI 培地を基本培地とし、添加成分として非働化ウシ胎児血清 (FBS) や血清アルブミンを対象として、37°C, 5% CO₂ 存在条件下で検討を行った。被検菌の増殖性は菌液濁度で評価すると共に、ヒト赤血球溶血活性やヒト由来株化細胞の傷害性を指標として被検菌の病原性も検討した。

【結果および考察】本研究の被検菌である *G. bergeri* は、栄養要求性が高い細菌の培養に使用される BHI 培地を用いても十分に増殖せず、FBS や血清アルブミンの添加が必須であった。*G. bergeri* が増殖可能な条件下で基準株と臨床分離株の増殖性を比較すると、臨床分離株において高い増殖性が確認され、この特性は *G. bergeri* 臨床分離株の実臨床像との関連で興味深い知見である。なお、*G. bergeri* はグラム陽性病原細菌の代表的な病原因子の一つである CDC のコード遺伝子を染色体上に保有することより、本菌の病原性における CDC の関与について現在検討を行っている。

【会員外研究協力者】大橋 歩果 (徳島大・生物資源産業)

DP1-11-01/P1-144

Fungal UV sensitivity is characteristically wavelength dependent due to melanin accumulation

○斧田 優志^{1,3}, 石田 快¹, 長橋 美晴^{1,2}, 山下 路代^{1,2}, 相澤 俊彦³, 山内 繁晴³, 藤川 康夫³, 田中 智毅³, 馬渡 一論^{1,2}, 高橋 章^{1,2} (徳大院・医歯薬学・微生物防除, ²徳大院・医歯薬学・予防環境栄養, ³日亜化学工業 (株))

○Yushi Onoda^{1,3}, Kai Ishida¹, Miharuru Nagahashi^{1,2}, Michiyo Yamashita^{1,2}, Toshihiko Aizawa³, Shigeharu Yamauchi³, Yasuo Fujikawa³, Tomotake Tanaka³, Kazuaki Mawatari^{1,2}, Akira Takahashi^{1,2} (¹Dept. Microbiol. Cont., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ., ²Dept. Prev Environ Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ., ³Nichia Corp.)

Fungi pose a serious threat to public health and can grow under stress conditions by accumulating melanin. Although UV irradiation is effective in pathogen inactivation, there are still few reports about the fungal UV sensitivity and wavelength dependence of inactivation. In this study, we used a LED device that can irradiate highly uniform and collimated light to accurately evaluate the UV sensitivity and the wavelength of UV with the highest effect in fungi. An irradiation device considering LED optical characteristics was developed and 13 LEDs with different peak wavelengths from 250 to 365 nm were used to evaluate wavelength dependence of the inactivation effect. Fungi of 6 species were used. Spores with low melanin accumulation was created by a melanin biosynthesis inhibitor to evaluate the effect of melanin accumulation on UV sensitivity. Inactivation effect showed strong wavelength dependence peaking at 270 nm. UV sensitivity was enhanced in fungi with low melanin accumulation, suggesting a UV protection effect of melanin. The absorption spectrum of the extracted melanin showed greater absorption at shorter wavelengths, and the inactivation effect actually decreased. In general, the wavelength dependence of the inactivation effect is expected to be similar to the absorption spectrum of DNA, but the fungi showed different tendency due to the protection by melanin.

DP1-11-02/P1-145**Clostridioides difficile** 由来メンブレンベシクルを用いた宿主免疫調節

○勇 陽太郎¹, 奥田 真由¹, 尾花 望^{2,4}, 野村 暢彦^{3,4} (筑波大・理工情報生命科学・生命地球科学, ²筑波大・医学医療系・TMRC, ³筑波大・生命環境系, ⁴筑波大・MiCS)

Host immunomodulation using membrane vesicles derived from Clostridioides difficile

○Yotaro Isamu¹, Mayu Okuda¹, Nozomu Obana^{2,4}, Nobuhiko Nomura^{3,4} (¹Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci, Univ. Tsukuba, ²TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, ³Fac. Life Environ., Sci. Univ. Tsukuba, ⁴MiCS, Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞を能動的に産生し、細胞外に放出する。MV は多様な菌体由来成分を積載し、宿主免疫調節能を有することが知られている。当研究室の先行研究より、MV の鼻腔接種によって、MV 由来菌特異的な腸管分泌型 IgA 抗体の産生が誘導されることが明らかになった。本研究では、*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) に着目して、*C. difficile* 由来の MV を用いた宿主免疫調節系を確立し、MV の免疫が CDI の予防効果を有するかどうかを検証することを目的とした。いくつかのグラム陽性菌ではホリンエンドリシン (HE) 遺伝子の発現が MV 産生を誘導することが知られている。そこで、*C. difficile* の HE 誘導発現株を構築し、様々な培地条件において HE 発現が MV 産生に与える影響を検証した。その結果、HE が *C. difficile* においても MV 産生を促進する因子であること、培養条件や HE 発現誘導によって MV の構成物や粒径が変化することが明らかになった。次に、MV の接種による宿主免疫誘導能と *C. difficile* に対する宿主保護効果を評価するため、各培養条件由来 MV をマウスの鼻腔に接種し、*C. difficile* を感染させた。感染試験の結果、特定の MV 接種群において体重減少および下痢症状が改善し、腸管中の *C. difficile* 芽胞量の速やかな減少が確認された。これより MV 鼻腔接種が *C. difficile* の腸管定着を抑制することが示唆された。これまでに *C. difficile* が MV 産生能を有することは示されているものの、その生産機構については報告例がない。本研究によって *C. difficile* の MV 産生機構の一端が明らかになるとともに、MV の鼻腔免疫が CDI の重篤化を予防する可能性が示された。

DP1-11-03/P1-146**Designing New-Age Peptide Vaccines Using Bacteriophages**

○Srivani Veeranarayanan, 菅野 貴史, 怡 劉, トゥミヤツ, ティティアナンパコーン カネート, 相羽 由詞, タン シンイー, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Srivani Veeranarayanan, Takashi Sugano, Liu Yi, Myat Thu, Kanate Thitiananpakorn, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Bacteriophage, apart from conventional phage therapy, have been in use as tailored scaffolds to suit applications such as drug delivery, gene delivery, vaccine vectors, diagnostics etc. via genetic, physical and chemical modifications. One such technique is to use well-established phage display technique to display antigens derived from pathogens in order to develop vaccine platforms. Here, as a proof-of-concept study, we designed & evaluated the immune-cell targeted phage particles displaying short epitope from ovalbumin in terms of their ability to induce antigen-specific immune response *in vitro* with positive outcome. In addition, we also designed multi-epitope phage vaccine candidates using *in silico* reverse vaccinology tools. This multi-epitope design is very useful to bring in a synergistic immune response against any complex pathogen. Given the distinctive aspects of phages, such as stability, easy-amenability to engineering, cost-effective bulk scaling, etc. the phage-based vaccine modality is an attractive and apt platform to meet global vaccine expectancies.

DP1-11-04/P1-147**Phage Capsid Vaccines for Mycobacterium tuberculosis (Mtb): Purification & Concentration Strategies**

○Myat Thu, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitiananpakorn, 相羽 由詞, XinEe Tan, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Myat Thu, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitiananpakorn, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Tuberculosis (TB), declared a public health emergency by World Health Organization (WHO), remains a lethal concern extending beyond infectious disease. It is imperative to urgently develop a TB vaccine to safeguard both adolescents and adults. Phage capsid vaccines surpass traditional methods, offering flexibility in presenting antigens for enhanced immunogenicity against diverse pathogens. In our study, we developed *M.tb* antigen-displaying phage, testing its effectiveness in conferring preventive immunity against *M.tb* infection by displaying six highly antigenic peptides from *M.tb* on the capsid of an engineered phage. This study focuses on achieving stable, pure, and high phage titers using simple purification and concentration strategies. Using the broth propagation, we achieved peak titers of 10^9 to 10^{11} PFU/ml for our engineered phage. Phage lysates were purified with 0.2 μ m filters and Amicon 100kDa units to remove bacterial impurities and toxins. Subsequently, purified phages were concentrated using ultracentrifugation, resulting in stable, concentrated samples without compromising titers. In the next step, we assessed the *in vitro* immunological response to our peptide-displayed phage particles. Current results suggest ongoing research is poised to further elucidate the efficacy and practical applications of phage capsid-based vaccine against *M.tb* in an animal model.

DP1-11-05/P1-148**Nasal Staphylococcus aureus membrane vesicles induces mucosal IgA responses without adjuvant**

○瀧澤 智美, 齋藤 真規, 桑原 紀子, 小林 良喜, 泉福 英信 (日大・松戸歯・感染免疫)

○Tomomi Hashizume-Takizawa, Masanori Saito, Noriko Shinozaki-Kuwahara, Ryoki Kobayashi, Hidenobu Senpuku (Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

Membrane vesicles (MVs) released from *Staphylococcus aureus* contain various molecules including pathogenic factors. Previous study showed that *S. aureus* MVs had antigenicity and induced MV-specific antibody responses in systemic compartment. Further, *S. aureus* MVs exhibited self-adjunctivity since *S. aureus* MVs include various molecules that stimulate innate immunity. Thus, in this study, we explored the potential of *S. aureus* MVs applicable to mucosal vaccine. BALB/c mice were nasally immunized with *S. aureus* MVs or *S. aureus* MVs plus hydroxyapatite as adjuvant or *S. aureus* MVs plus poly I:C 0, 3, 5 weeks after the first immunization. Saliva and serum samples were taken at 3, 5, 7 weeks after the first immunization. As a result, nasal immunization of mice with *S. aureus* MVs induced *S. aureus* MV-specific secretory IgA antibody responses in saliva. In contrast, co-administration of *S. aureus* MVs and hydroxyapatite or poly I:C failed to induce *S. aureus* MV-specific salivary SIgA responses. Similarly, *S. aureus* MV-specific serum IgG responses were induced only in mice given *S. aureus* MV alone. Thus, our results showed that the antigenicity of *S. aureus* MVs were reduced by co-administration of adjuvants. These results suggested that various molecules contained in *S. aureus* MV help each other to exert antigenicity.

DP1-11-06/P2-139

細菌由来膜小胞のがん治療効果増強に向けた磁性ナノ粒子封入

○長坂 有志¹, 鈴木 千博², 二又 裕之^{1,3}, 大多 哲史¹, 田代 陽介¹ (1静大院・総合科技, 2静大工, 3静大・グリーン研)

Magnetic Nanoparticle Encapsulation of Membrane Vesicles to Enhance Cancer Therapy Effectiveness

○Yushi Nagasaka¹, Chihiro Suzuki², Hiroyuki Futamata^{1,3}, Satoshi Ota¹, Yosuke Tashiro¹ (1Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Shizuoka Univ., 3Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

グラム陰性菌が放出する膜小胞は、直径約 100 nm の脂質二重膜から構成される生体微粒子であり、長期的な抗腫瘍免疫反応を効果的に誘導する。しかし、効率の向上が必須であり、実用化には至っていない。本研究では、細菌由来膜小胞内に磁性ナノ粒子を封入することで、ハイブリッド微粒子「磁性膜小胞」を作製し、膜小胞の免疫誘導と磁性ナノ粒子の発熱という 2 つのプロセスの相乗効果によるがん治療効果増強を目的とした。膜小胞の免疫活性能がより高いことで知られるプロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) ベン毛欠損株を培養した。培養上清から抽出した膜小胞と磁性ナノ粒子 synomag (Micromod) を混合し、エクストルーダー (Avanti) による押し出し後、磁気分離を行った。その後、各微粒子のタンパク質定量を Bradford 法で行ったところ、磁性微粒子に十分量のタンパク質が検出され、膜小胞との複合微粒子形成が示唆された。また、ナノトラック解析 (NTA) と SEM 観察から、膜小胞コーティング後の粒子径増大が確認された。以上により、膜小胞内への磁性ナノ粒子封入が示された。次に、各微粒子の免疫細胞への影響を調べた。その結果、磁性ナノ粒子と比べ、磁性膜小胞添加時のマクロファージによる貪食能が向上した。また、磁性膜小胞のマクロファージへの細胞障害性は低いものの、がん治療に重要な炎症性サイトカインである IL-6 を産生することが示された。本研究ではがん治療に有効な磁性膜小胞の作製法を確立した。今後は、培養細胞、モデルマウスを用いてがん腫瘍に対する免疫誘導能および安全性について評価する。

DP1-11-07/P2-140

Strategic Construction of DNA Vaccine Candidates with Bacteriophages for TB

○劉 怡, ヴィーラナラヤナン スリワニ, ティティアナンパコーン カネート, 相羽 由詞, タン シンイー, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Yi Liu, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitianapakorn, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, stands as the world's most lethal infection from a single infectious agent. Despite the pivotal role of vaccines in tuberculosis prevention, the current TB vaccine, BCG, falls short in preventing TB in adults, highlighting the urgent need for an alternative. Bacteriophages (phages), viruses with the ability to infect and kill bacteria, pose no threat to humans. The repetitive architecture of their capsids serves as natural self-adjuvant, rendering them as promising vaccine vehicles. This study delves into the design and development of a DNA vaccine vector employing bacteriophages to combat TB. For this purpose, we utilized *Staphylococcus aureus* phage and strategically deleted the integrase-encoding gene to preclude phage integration and ensure safety. Subsequently, an immune-cell targeting peptide was engineered to be displayed on the structural protein, and its targeting efficacy was successfully evaluated. Next, a mammalian expression system was incorporated into the phage genome to enable efficient expression of antigen-encoding DNA cargo in humans, thereby inducing robust immune response. We propose that this phage-based DNA vaccine candidate has the potential to effectively deliver antigen-encoding DNA, leading to the production of antigenic proteins and eliciting an efficient immune response against TB.

DP1-11-08/P2-142

人参養栄湯の *Klebsiella pneumoniae* 感染症予防効果の分子機構

○田中 里佳¹, 椿 翔吾², 津川 仁² (1東海大・医・生体防衛学領域・免疫学, 2東海大・医・生体防衛学領域・生物界間シグナル解析)

Molecular mechanism of the preventive effect of Ninjinyoito on *Klebsiella pneumoniae* infection

○Rika Tanaka¹, Shogo Tsubaki², Hitoshi Tsugawa² (1Dept. Immunology, Div. Infect. Host Def., Sch. Med., Tokai Univ., 2Transkingdom Signaling Research Unit, Div. Infect. Host Def., Sch. Med., Tokai Univ.)

腸内細菌の一種である *Klebsiella pneumoniae* は高齢者を中心に肺炎や肝膿瘍を引き起こす。本菌感染症の特徴は、消化管内に共生する菌株が肺や肝臓の遠隔臓器で感染巣を確立する点にある。本研究では、体力低下を補う効能を持つ漢方処方に *K. pneumoniae* 感染症に対する予防効果があるか検証した。トランスウェルインサートを介した RAW264.7 マクロファージ様細胞と Caco2 上皮細胞の共培養システムを用いた *K. pneumoniae* の感染モデルでは、大建中湯、十全大補湯、補中益気湯に比べ人参養栄湯のみ *K. pneumoniae* の Caco2 細胞内への侵入抑制効果が認められた。RAW264.7 マクロファージ様細胞への人参養栄湯の刺激により顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の分泌が促進されることが RNA sequence 解析並びに ELISA 試験により明らかになり、Caco2 細胞への G-CSF 刺激は *K. pneumoniae* の Caco2 細胞内への侵入を有意に抑制した。また、老齢マウス (56 週齢) から構築した Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) への *K. pneumoniae* 感染モデルでは、人参養栄湯は BMDMs 内での本菌の生存性を有意に抑制した。そこで、人参養栄湯含有飼料を与えた老齢マウスへ *K. pneumoniae* を経口感染させると、人参養栄湯非投与群に比べ老齢マウスの生存性が亢進した。これらの結果から、人参養栄湯はマクロファージへの作用を基点に、G-CSF の分泌誘導を介した上皮細胞バリアの亢進とマクロファージ内での *K. pneumoniae* の排除応答の促進活性を発揮することで、*K. pneumoniae* 感染症に対する予防効果を発揮すると考えられた。

DP1-11-09/P2-143

Different prime-boost regimens via systemic or mucosal routes with a novel membrane vesicle vaccine

○内山 大樹^{1,2}, 山口 雄大¹, 尾花 望³, 安部 公博¹, 豊福 雅典⁴, 野村 暢彦⁴, 明田 幸宏¹, 中尾 龍馬¹ (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筑波大・医学医療系, 4筑波大・生命環境)

○Hiroki Uchiyama^{1,2}, Takehiro Yamaguchi¹, Nozomu Obana³, Kimihiro Abe¹, Masanori Toyofuku⁴, Nobuhiko Nomura⁴, Yukihiko Akeda¹, Ryoma Nakao¹ (1Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dept. Surg., Tokyo Med. Dent. Univ. Grad Sch. Med., 3Tsukuba Transborder Medical Research Center, Fac. Medicine, Univ. of Tsukuba, 4Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS), Univ. Tsukuba)

Novel vaccines that elicit both systemic and mucosal immune responses may offer a solution for reducing the burden of mucosal infections. We have recently characterized a probiotic *Escherichia coli* membrane vesicle (MV) chimera displaying pneumococcal capsular polysaccharide at high density, which elicited potent IgG-dominant immune response in mice after a subcutaneous (SC) vaccine regimen. Here we assess immune responses and protection from pneumococci following all different combinations in a three-dose regimen via SC or intranasal (IN) route with a novel detoxified bacterial MV-based vaccine against pneumococcal disease. IN prime elicited stronger IgG response as compared to SC prime, whatever the second or third administration route was chosen. Both systemic and mucosal IgA levels increased as the number of IN administration increased. An upper respiratory infection model study revealed that a significant bacterial clearance was observed only when administrated via IN route not less than twice in three-dose regimen. The number of pneumococci detected was inversely correlated to the SIgA levels in oral and nasal cavity. The present findings suggest the MV-based vaccine administered via heterologous routes, e.g., IN-IN-SC, IN-SC-IN, could be beneficial for building both systemic and mucosal protective immunity accompanied with robust class-switch recombination to IgG/A.

DP1-11-10/P2-144

活動性結核マウスモデルを用いた肺内結核菌数を反映する肺および血液 RNA シグネチャーの探索

○中村 創, 瀬戸 真太郎, 土方 美奈子, 慶長 直人 (結核研究所・生体防御部)

Exploration of RNA signatures reflecting mycobacterial load in the lungs using active TB mouse model

○Hajime Nakamura, Shintaro Seto, Minako Hijikata, Naoto Keicho (Dept. Pathophysiol. Host Defense, Research Inst. Tuberculosis)

結核は現在でも全世界で1,000万人以上の新規患者と130万人の死亡者が発生している。また、世界人口の4分の1が結核菌に感染しているといわれている。結核の感染制御において重要な、発症・重症化を予測するバイオマーカーが探索されているが、未だ確立されていない。私たちの研究グループは活動性結核マウスモデルとして利用されている C3HeB/FeJ マウスを用いた結核菌感染モデルの構築に成功している。C3HeB/FeJ マウスは、ヒト結核と同様に感染肺に乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する、ヒト結核病態を反映するマウスである。これまでに、高病原性の結核菌臨床分離株を感染させた C3HeB/FeJ マウスでは、ヒト結核患者と類似の血液 RNA 発現プロファイルを示すことが報告されている。本研究では、本マウスモデルを用いて肺内菌数を反映する肺および血液での RNA シグネチャーを探索した。C3HeB/FeJ マウスに結核菌 Erdman 株を噴霧吸入感染させて、感染12週後に肺と血液を採取した。それぞれの試料から RNA を抽出して RNA シークエンシングを行った。その結果、血液 RNA 発現プロファイルは肺 RNA 発現プロファイルと同様に I 型インターフェロン応答を含む炎症反応に関わる遺伝子群の発現が亢進していた。また、肺と血液において共通して発現量が変化する遺伝子群を抽出した結果、I 型および II 型インターフェロン応答に関連する遺伝子群を見出した。今後、発現量変動遺伝子から肺内菌数と連動する遺伝子群を weighted correlation network analysis (WGCNA) によって明らかにする。

DP1-11-11/P2-145

百日咳菌の外膜小胞を用いた経鼻ワクチンによる感染防御効果と免疫応答評価

○石川 青空^{1,3}, 相内 章¹, 坂本 玲奈¹, 中尾 龍馬², 鈴木 忠樹¹, 田村 浩二³ (1)感染研・病理, (2)感染研・細菌一部, (3)東理大・先進工・生命工)

Evaluation of protective effect induced by intranasal vaccination of *Bordetella pertussis*

○Sora Ishikawa^{1,3}, Akira Ainai¹, Rena Sakamoto¹, Ryoma Nakao², Tadaki Suzuki¹, Koji Tamura³ (1)Dept. Pathology, NIID, (2)Dept. Bacteria 1, NIID, (3)Dept. Bio Sci. and Tech., Grad. Sch. Indu. Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci.)

【背景と目的】百日咳は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染で引き起こされる急性呼吸器感染症である。現行の無細胞百日咳ワクチン (Acellular pertussis vaccine; aP) は発症予防効果が認められる一方で、感染そのものに対する防御効果が不十分であることが指摘されている。また、現行のワクチンでは Th2 主体の免疫応答が誘導されるのに対し、百日咳菌感染では Th1 ならびに Th17 応答が誘導され上気道における再感染の防御には Siglec-F 陽性の好中球が寄与している可能性が報告されている。より効果の高いワクチンとして、現行のワクチンに不足している多様な抗原を百日咳菌から放出される外膜小胞 (outer membrane vesicle; OMV) を添加し補うことが考えられる。さらに、接種経路を経鼻接種に変更することで、百日咳菌の感染成立の場である気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体の誘導が可能になり、発症予防のみならず感染防御効果が期待できる。以上のことから、本研究では、aP+OMV の経鼻接種により誘導される抗体ならびに好中球をはじめとする免疫応答と感染防御効果について検討した。【結果】aP 接種群では、血清中の IgG 抗体は誘導されたものの IgA 抗体については全く誘導されなかった。対して、aP+OMV の経鼻接種では気道粘膜上に Fim に対する IgA 抗体が誘導された。また aP+OMV の経鼻接種では鼻腔において Siglec-F 陽性の好中球の割合が aP の皮下接種に比べて高いことが明らかとなった。aP+OMV の経鼻接種群では百日咳菌感染後の生菌数が大きく抑えられたことから、aP 皮下接種と比較して感染防御効果が高いことが示唆された。

DP1-11-12/P2-147

Enhanced immunity to pulmonary tuberculosis by vaccination with Zinc metalloprotease 1-deficient BCG

○梅村 正幸^{1,2,3}, 高江洲 義一^{1,2,3}, 松崎 吾朗^{1,2,3} (1)琉球大・熱生研・感染防御, (2)琉球大・院・医・生体防御, (3)琉球大・院・先端医学・動物実験)

○Masayuki Umemura^{1,2,3}, Giichi Takaesu^{1,2,3}, Goro Matsuzaki^{1,2,3} (1)Trop. Biosphere Res. Cent., Univ. Ryukyus, (2)Drpt. Host Defense, Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, (3)Adv. Med. Res. Cent., Fac. Med., Univ. Ryukyus)

Interleukin (IL)-1 β is crucial in defense against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection and induction of IL-17A production. Mtb secretes Zinc metalloprotease 1 (Zmp1) to dampen IL-1 β production by infected macrophages. This study scrutinized the anti-Mtb immune response elicited by vaccination with a Zmp1-deficient (Δ Zmp1) BCG strain. B6 mice were vaccinated with either wild-type (WT) or Δ Zmp1-BCG, then intratracheally infected with Mtb 8 weeks later. A non-vaccinated control group (gr) was included. Four weeks post-infection, the mice were assessed. Δ Zmp1-BCG vaccinated gr exhibited higher level of production of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-17A) compared to the control and WT-BCG vaccinated grs. IL-17A-producing TCR $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ T17) cells in the infected lungs significantly increased in Δ Zmp1-BCG vaccinated gr, surpassing both control and WT-BCG vaccinated grs. Although the Mtb CFU in the lungs of WT- and Δ Zmp1-BCG vaccinated grs did not significantly differ, it was lower than that in the control gr. Interestingly, Δ Zmp1-BCG vaccinated gr exhibited a marked reduction in bacterial burden in the spleen. These findings suggest that a robust IL-17A response by $\gamma\delta$ T17 cells in the lungs restrains Mtb dissemination to other organs in Δ Zmp1-BCG vaccinated mice, indicating superior efficacy of Δ Zmp1-BCG vaccine in preventing Mtb infection compared to WT-BCG.

DP1-11-13/P2-148

MPB70 とそのプロモーターを利用した遺伝子組換えは、BCG 東京株での効率的な遺伝子発現と分泌を可能とする

○竹石 惲樹, Amina Kaboso Shaban, 尾関 百合子, 吉田 豊, 西山 晃史, 立石 善隆, 松本 壮吉 (新潟大・院・細菌学)

Genetic engineering employing MPB70 enables efficient expression of foreign antigen in BCG Tokyo

○Atsuki Takeishi, Amina Kaboso Shaban, Yuriko Ozeki, Yutaka Yoshida, Akihito Nishiyama, Yoshitaka Tateishi, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med, Niigata Univ.)

【背景と目的】*Mycobacterium tuberculosis* variant BCG (以下、BCG) を用いて任意の外来抗原を発現する組換え BCG を作成し、任意の感染症のワクチンとすることができる。我々は BCG 東京株を元株として、既報を凌駕しうる新規遺伝子組換え手法を探索した。【方法と結果】1) 対数増殖期と定常期にある BCG 東京株から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。いずれの増殖フェーズにおいても、最も転写されていた遺伝子は *mpb70* であった。2) *mpb70* 遺伝子プロモーター支配下で、オリゴペプチド (タグペプチド)、または新型コロナウイルスの S タンパク受容体結合ドメイン (RBD) を発現する組換え BCG を作出し、発現したタンパク質をそれぞれに特異的な抗体を用いてウェスタンブロットにて評価した。タグペプチド、RBD ともに組換え BCG 培養産物中に検出された。3) RBD 発現組換え BCG をマウスに投与し、得られた血清の中和活性を評価した。RBD 発現組換え BCG を投与されたマウス血清は、陰性対照のマウス血清より高い中和活性を示す傾向にあった。4) RBD 発現組換え BCG を凍結乾燥し、マウスに投与して脾臓から回収した。凍結乾燥組換え BCG と脾臓から回収した菌体の培養産物を、抗 RBD 抗体を用いたウェスタンブロットにて評価したところ、RBD が検出された。【考察】*mpb70* 遺伝子が BCG 東京株で盛んに転写されることを利用し、既報のない組換え手法を確立することができた。この方法にて作成した組換え BCG は、オリゴペプチドから実用的なタンパク質までもを発現でき、凍結乾燥処理や生体内で安定であった。MPB70 の発現過程をさらに解明することで、十分な中和抗体を誘導可能で、さらに実用的な組換え手法の確立が期待できる。

DP1-11-14/P1-149

ボツリヌス菌感染防御を担う腸内細菌の同定

○小林 伸英¹, 鳥海 広暉², 込山 星河², 長谷 耕二², 藤永 由佳子¹ (1)金沢大・医・細菌学, 2)慶應大・薬・生化学)

Identification of the intestinal bacteria that protect against *Clostridium botulinum* infection

○Nobuhide Kobayashi¹, Hiroki Toriumi², Seiga Komiyama², Koji Hase², Yukako Fujinaga¹ (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Kanazawa Univ., 2)Divi. Biochem., Fac. Pharm., Keio Univ.)

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) はグラム陽性の偏性嫌気性細菌で、ボツリヌス神経毒素を産生する。乳児ボツリヌス症は、生後およそ1歳未満の乳児において、経口摂取された本菌芽胞が腸管に定着、毒素を産生することにより発症し、致死的な神経麻痺症状を呈する。本菌は芽胞の状態ですら環境中に広く存在するが、健康成人が本菌に感染することはない。抗菌薬を大量投与された成人において本菌が感染する事例があること、無菌マウスや抗菌薬処理マウスは成獣であっても感染感受性であることから、成人の持つ腸内細菌叢は本菌に対して定着抵抗性を有すると考えられている。しかしながら、感染防御に寄与する具体的な腸内細菌は明らかとなっていない。そこで本研究は、ボツリヌス菌感染防御を担う腸内細菌を同定することを目的とした。我々は、異なる日齢の新生仔 SPF マウスの腸内細菌叢を移植した成獣無菌マウスおよび種々の抗菌薬を投与した成獣 SPF マウスに対してボツリヌス菌 (A型 62A株) 芽胞の感染実験を行い、感染感受性および耐性マウスの腸内細菌叢の構成を明らかにした。その結果、ボツリヌス菌感染耐性となるマウスの腸内細菌叢に共通して存在する腸内細菌群を同定した。この腸内細菌群を成獣 SPF マウスまたは成人糞便から分離し、無菌マウスに移植したところ、ボツリヌス菌に対する完全な感染耐性が付与されたことから、当該菌群が感染防御効果を有することが明らかとなった。さらに、成人由来の当該菌群から感染防御効果を有するヒト腸内細菌の単離に成功した。以上の結果から、同定した細菌群が成長に伴い腸管に定着することによりボツリヌス菌感染耐性が得られることが示唆される。

DP1-11-15/P1-150

Neutralization mechanism of human monoclonal antibodies against type B botulinum neurotoxin

○松村 拓大, 北村 真悠, 阿松 翔, 山口 アキ, 小林 伸英, 藤永 由佳子 (金沢大・医・細菌)

○Takuhiro Matsumura, Mayu Kitamura, Sho Amatsu, Aki Yamaguchi, Nobuhide Kobayashi, Yukako Fujinaga (Dept. Bacteriol., Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

Botulism is a deadly neuroparalytic condition caused by botulinum neurotoxin (BoNT) produced by *Clostridium botulinum* and related species. Toxin-neutralizing antibodies are the most effective treatments for BoNT intoxication. We generated human monoclonal antibodies neutralizing type B botulinum neurotoxin (BoNT/B), designated M2 and M4. The combination of these antibodies exhibited a strong neutralizing effect against BoNT/B cells. In this study, we analyzed the mechanisms of action of these antibodies in vitro. M4 binds to the C terminal of the heavy chain (binding domain) and inhibits BoNT/B binding to neuronal PC12 cells. Although M2 recognizes the light (L) chain (metalloprotease domain), it did not inhibit substrate (VAMP2) cleavage in the cleavage assay. M2 also changed the localization of BoNT/B from the cytosol to the cell surface in PC12 cells, suggesting that M2 inhibits the translocation of the L chain from synaptic vesicles. These results indicate that M2 and M4 inhibit the different processes of BoNT/B individually, and that multistep inhibition is important for the synergistic effect of the combination of monoclonal antibodies. These findings may facilitate the development of effective therapeutic antibodies against BoNTs.

DP1-11-16/P1-151

RabGAP1L 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・医・微生物感染症学)

○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 RabGAP1L (RAB GTPase activating protein 1-like) as both a negative and a positive regulator of endocytosis and exocytosis via endocytic recycling, respectively. RabGAP1L inhibited endolysosomal trafficking and subsequent autophagy induction during GAS infection. Additionally, GAS that invaded into cells was trafficked to Rab11A-positive recycling endosomes, and released from infected cells. RabGAP1L facilitated this exocytic process via endocytic recycling, and GAS was expelled into the extracellular space. RabGAP1L is therefore a vital host factor that determines the fate of GAS in invaded cells.

DP1-11-17/P1-152

微生物感染症病態を反映するヒトオステオポン領域の解析

○松葉 隆司¹, 植原 結¹, 鋤崎 佳奈¹, 服部 俊夫² (1)九州医療科学大・薬・動物生命, 2)吉備国際大・健康福祉研)

Analysis of OPN fragments reflecting the pathology in microbiological infection

○Takashi Matsuba¹, Yui Uehara¹, Kana Sukizaki¹, Toshio Hattori² (1)Animal Pharm. Sc., Sch. Pharm., Univ. Kyushu Med. Sci., 2)Inst. Health Welf., Kibi Int. Univ)

結核などの感染症において、血漿中のオステオポンチン (OPN) 量の変動は、治療効果判定や重症化の指標となる可能性が示唆されている。血漿中には、生体内の分解酵素による OPN 切断断片も含まれ、断片依存性に抗体反応性が異なる可能性があると考えられる。しかしながら、どの部位で切断された OPN 断片が、感染症での病態を推し量る抗体反応性として重要なのか詳細は明らかでない。市販品のなかには、捕捉用抗体および検出用抗体の抗原認識部位が明らかとされていない OPN ELISA 測定キットがある。とくにポリクローナル抗体による検出系では、抗原認識部位依存性に反応性が異なる可能性を考慮すると測定結果の解釈が難しい。本研究では、N-末端側あるいはC-末端側の長さが異なる OPN 遺伝子を PCR 法により増幅、組換えタンパク発現ベクターに挿入後、形質転換した組換え大腸菌から発現させた OPN タンパクを、ELISA 測定し反応性の比較解析を行った。OPN 変異タンパクの反応性は、N-末端側からのアミノ酸 31 番目以降の欠損により著明な反応性が減少が認められ、捕捉用抗体の認識領域の特定ができた。一方、C-末端側からの欠損でも、欠損領域依存性の反応性減少が認められる領域が絞り込めてきた。現在、さらに詳細な解析を進めている。

DP1-12-01/P1-157

アゾール系抗真菌薬の皮膚糸状菌 *Cyp51* アイソザイム選択性

○石井 雅樹¹, 山田 剛², 大畑 慎也¹ (1武蔵野大・薬・分子細胞生物, ²帝京大学・医真菌研究センター)

Dermatophyte *Cyp51* isozyme selectivity of azole antifungal agents

○Masaki Ishii¹, Tsuyoshi Yamada², Shinya Ohata¹ (1Research Inst. Pharmaceutical Sciences, Fac. Pharmacy, Musashino Univ., ²Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ.)

アゾール系抗真菌薬は、最も主要な抗真菌薬クラスであり、最も存在量の多いステロールであるエルゴステロールの合成経路の律速酵素ステロール脱メチル化酵素 *Cyp51* を阻害する。 *Trichophyton rubrum* は最も高頻度に分離される皮膚糸状菌症の原因真菌で、ゲノム上に *Cyp51A* と *Cyp51B* という二つの *Cyp51* アイソザイムをコードしている。 *T. rubrum* の臨床的重要性に反して、その治療薬標的である *Cyp51* の菌糸成長や薬剤耐性への寄与はほとんど知られていない。本研究では、本菌の二つの *Cyp51* アイソザイムをそれぞれ欠損した株を作出した。 *Cyp51B* 欠損株は親株に比べ菌糸成長が顕著に抑制された一方、 *Cyp51A* 欠損株では菌糸成長の抑制は観察されなかった。野生株における *cyp51A* mRNA 量は、アゾール系薬処理により顕著に増加した一方、 *cyp51B* mRNA 量の増加は見られず、 *Cyp51A* がアゾール系薬誘導性 *Cyp51* アイソザイムであることが示唆された。 *Cyp51A* 欠損株は、アゾール系薬のほとんどに対して親株に比べ感受性が上昇した。一方、 *Cyp51B* 欠損株は、アゾール系薬の農薬プロコロラズに対して 8 倍高い感受性を示し、他の薬剤の MIC の変化は 2 倍以下であった。このことから、アゾール系抗真菌薬には、 *Cyp51* アイソザイムに対する選択性が存在すること、 *Cyp51A* が多くのアゾール薬に対する自然耐性に寄与度が大きいことが示唆された。

DP1-12-02/P1-158

Optimized synthesis of CRISPR-Cas13a antimicrobial capsid against MRSA

○島守 祐月¹, XinEe Tan¹, 李 峰宇¹, 西川 裕太郎^{1,2}, Batbold Anujin¹, Nayanjin Tergel¹, 氣 恒太郎^{1,3}, 渡邊 真弥¹, 下條 誉幸², 崔 龍洙¹ (1自治医大・医・感染免疫・細菌学, ²栄研化学(株)・研究開発・応用技術, ³感染研・ワクチン開発)

○Yuzuki Shimamori¹, XinEe Tan¹, Feng-Yu Li¹, Yutaro Nishikawa^{1,2}, Batbold Anujin¹, Nayanjin Tergel¹, Kotaro Kiga^{1,3}, Shinya Watanabe¹, Takayuki Shimojyo², Longzhu Cui¹ (1Div. Bacteriology, Dept. Inf. & Imm., Sch. Med., JMU., ²EIKEN CHEMICAL CO., LTD., ³RCDVD, NIID)

In response to the escalating global threat of antimicrobial resistance, our laboratory has previously engineered an unconventional antibacterial agent, termed antibacterial capsids (AB-Capsids), utilizing phage-based technology to target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). However, a notable challenge arose during the packaging process, as both AB-Capsids and wild-type phages were being produced. To address this issue, the phagemid packaging system was optimized by strategically incorporating silent mutations, effectively minimizing contamination risks without compromising packaging efficiency. The study identified the indispensable role of phage packaging genes, particularly *terL-terS*, in efficient phagemid packaging, and demonstrated that the elimination of homologous sequences curtailed wild-type phage contamination. The optimized phagemid-LSAB (mosaic) exhibited sequence-specific killing, efficiently eliminating MRSA strains carrying target antibiotic-resistant genes. While acknowledging the need for further exploration across bacterial species and in vivo validation, this refined phagemid packaging system represents a significant advancement in the development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials. It sheds light on potential solutions in the ongoing battle against bacterial infections.

DP1-12-03/P1-159

Development of chelator based novel MBL inhibitors to combat carbapenem resistance bacteria

○豊元 悠弥, 張 田力, 上釜 綾夏, 津々木 博康, 澤 智裕 (熊本大院・生命科学・微生物学)

○Touya Toyomoto, Tianli Zhang, Ayaka Uegama, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ)

Metallo- β -lactamase (MBL), such as an IMP-1, is a zinc dependent β -lactam hydrolyzing enzyme. Expression of MBL provides carbapenem resistance, and therefore, considered as promising drug targets. We previously found that polycarboxylation of amoxicillin remarkably enhanced their antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that express IMP-1. We hypothesized that metal chelating capability of multiple carboxyl groups might inhibit MBL activity. Here, we synthesized novel compounds by conjugating polycarboxylic diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) into amino groups of β -lactams and evaluated their antimicrobial activities against MBL-expressing bacteria. Among examined, DTPA conjugated 7-aminodescarboxycephalosporanic acid (DTPA-ADCA) treatment significantly reduced minimum inhibitory concentration of meropenem against IMP-1 expressing *K.pneumoniae*, *E.coli*, *C.amalonaticus* and *C.freundii*. In an in vivo models, co-treatment of meropenem and DTPA-ADCA treatment completely rescued mice from lethal infection of meropenem resistant *K.pneumoniae*. Furthermore, co-treatment of meropenem and DTPA-ADCA resulted in almost complete eradication of bacteria in blood, liver, and spleen. These observations warrant further investigation of chelate-conjugated β -lactams as new MBL inhibitors to treat carbapenem resistant bacterial infection.

DP1-12-04/P1-160

抗ブドウ球菌エンドライシンのリンカー領域が機能に与える影響

宗友 荘介¹, ○内山 淳平², 内山 伊代², Wanganuttara Thamonwan², 津久井 利広³, 萩谷 英大⁴, 山本 由弥子², 神田 秀幸¹, 松下 治² (1岡山大学・院医歯薬・公衆衛生, ²岡山大学・院医歯薬・病原細菌, ³日本全薬工業(株), ⁴岡山大学病院・感染症内科)

Functional impact by linker region of a staphylococcal endolysin

Sosuke Munetomo¹, ○Jumpei Uchiyama², Iyo Uchiyama², Wanganuttara Thamonwan², Toshihiro Tsukui³, Hideharu Hagiya⁴, Yumiko Yamamoto², Hideyuki Kanda¹, Osamu Matsushita² (1Dept. Pub. Heal., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ³Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., ⁴Dept. Infect. Dis., Okayama Univ. Hosp.)

【背景】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、実臨床において今なお重要な薬剤耐性菌である。エンドライシンは、ファージ由来のペプチドグリカン (PGN) 分解酵素であり、MRSA 感染症の新規治療薬として期待される。その構造は、PGN 分解ドメインがリンカーで PGN 結合ドメインと連結している。近年、複数のドメインから成るタンパク質の機能においてリンカーの重要性が注目されている。本研究では、高機能な抗ブドウ球菌エンドライシンの作出を目的に、新規エンドライシン ORF93 を使用して、リンカー短縮による機能への影響を検討した。

【方法】リンカー短縮変異体を設計し、AlphaFold2 で立体構造を予測した。大腸菌タンパク質発現系により、組換えタンパク質を製し、アフィニティー精製した。生産量、抗菌スペクトル、溶菌活性、冷所保存性を検討した。

【結果と考察】ORF93 および 4 種類のリンカー変異体 (リンカーを 5 アミノ酸ずつ削除: ORF93- Δ 05・10・15・20) を設計した。1) 予測立体構造は、ORF93- Δ 20 のみ、他のエンドライシンと比較して、ドメイン間の空隙が特に小さかった。2) 生産量は ORF93- Δ 15 が最も多く、ORF93 の約 2.3 倍多かった ($p < 0.05$)。ORF93- Δ 20 は発現できなかったため、以降の検討から除外した。3) 抗菌スペクトルは、ORF93 とリンカー変異体のいずれもブドウ球菌属に限定して抗菌作用を示し、スペクトルの差は認めなかった。4) 溶菌活性は ORF93- Δ 15 が最も高く、ORF93 の約 2.2 倍高かった ($p < 0.01$)。5) 冷所保存性は、現在検討中である。以上から、リンカーの長さを適切に選択することで、高機能な抗ブドウ球菌エンドライシンを作出できる可能性が示唆された。

DP1-12-05/P1-161

Antibacterial activity screening of Thai medicinal plant extracts using resazurin microtiter assay

○Nitchatorn Sungsirin^{1,2}, Tanit Boonsiri², Saengthip Ngoenprong³, Faesah Ayohsae³, Oraya Dokkham³, Siriwan Sriuan³, Busaba Matrakool³, Tassanee Saovana³, Sudaluck Thunyaharn³ (1Dept. Microbiology, Fac. Med., Shimane Univ., 2Dept. Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, 3Faculty of Allied Health Sciences, Nakhonratchasima College)

○Nitchatorn Sungsirin^{1,2}, Tanit Boonsiri², Saengthip Ngoenprong³, Faesah Ayohsae³, Oraya Dokkham³, Siriwan Sriuan³, Busaba Matrakool³, Tassanee Saovana³, Sudaluck Thunyaharn³ (1Dept. Microbiology, Fac. Medicine, Shimane Univ., 2Dept. Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, 3Fac. Allied Health Sciences, Nakhonratchasima College)

This study investigates the antibacterial activities of ethanolic extracts from 30 Thai medicinal plants, using the resazurin microtiter assay (REMA) to assess their effectiveness against 12 bacterial strains. Of the tested extracts, 21 demonstrated antibacterial activities against at least one strain. Interestingly, the pomegranate rind (*Punica granatum*) exhibited significant inhibitory effects on various antibiotic-resistant strains, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), multidrug-resistant (MDR) *Salmonella*, colistin-resistant organism (CoRo) *Klebsiella pneumoniae*, and pandrug-resistant (PDR) *Pseudomonas aeruginosa*. Additionally, the white lotus flower (*Nymphaea lotus*) and temple tree flower (*Plumeria obtusa*) showed promising results against ESBL Enterobacteriaceae, CRE, vancomycin-resistant Enterococci (VRE), MDR *Salmonella*, CoRo *K. pneumoniae*, and PDR *P. aeruginosa*. Remarkably, inhibitory effect of pomegranate rind on MRSA was significantly higher than that of gentamicin. Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the pomegranate rind against MRSA were less than 2 mg/mL. These findings indicated the potential of Thai medicinal plants as sources of novel antibacterial agents, particularly against drug-resistant bacteria.

DP1-12-06/P1-162

多剤耐性菌を標的とした新規抗菌ペプチドフォルダマーの開発

○三澤 隆史¹, 伊藤 貴仁^{1,2}, 倉島 恵愛¹, 山崎 聖司³, 西野 邦彦³, 出水 庸介^{1,2} (1国立衛研・有機化学部, 2横浜市大・生命医科, 3阪大産研)

Development of antimicrobial peptide foldamers as therapeutics for multi-drug resistant bacteria

○Takashi Misawa¹, Takahito Ito^{1,2}, Megumi Kurashima¹, Seiji Yamasaki³, Kunihiro Nishino³, Yosuke Demizu^{1,2} (1National Inst. Health Sciences, 2Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., 3SANKEN, Osaka Univ.)

既存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ける問題となっている。近年、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)ヘリカル構造の形成と2)カチオン性残基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、既知のAMPsであるMagainin 2 (Mag2)をリードとした構造展開を行い、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抗菌活性を示す1を見出ししている。また、抗菌ペプチドの抗菌活性発現に重要なヘリカル構造およびカチオン性アミノ酸に着目し、(1)ペプチド1にヘリカル構造を安定化する2-アミノイソ酪酸 (Aib)を導入した2が優れた抗菌活性を示すこと、(2)ペプチド2のLys残基を非天然アミノ酸のOrnやDabで置換しても活性が保持されることを明らかにした。さらに、非天然アミノ酸を導入したことで化学安定性が向上することを見出ししている。本研究ではこれまでの構造活性相関解析を基に、更なる活性向上、溶血性との分離、化学的安定性の向上を目指した。カチオン性官能基を有する置換アミノ酸であるApiを導入したペプチドをデザイン・合成し、二次構造解析、グラム陽性菌およびグラム陰性菌あるいは多剤耐性緑膿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。Apiを導入したペプチドはヘリカル構造を維持し、グラム陽性菌および陰性菌、さらには多剤耐性緑膿菌に対して抗菌活性を示した。また、非天然アミノ酸であるApiを含むペプチドは、分解酵素への抵抗性を示すことを明らかにした。

DP1-12-07/P1-163

Streptococcus mutans に対する抗菌ペプチドと抗菌剤の併用処理によるアプローチ

○中村 亮介, 本田 みちよ (明大院・理工研・応用化学)

Approaches for S. mutans by co-treatment with antimicrobial peptides and antimicrobial agents

○Ryosuke Nakamura, Michiyo Honda (Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech., Meiji Univ.)

【緒言】一般的なう蝕の治療には抗菌剤による単剤療法が適応されるが、薬剤に耐性を持つ菌株の出現が多数報告されている。そこで我々は、作用機序に富み、薬剤耐性を生み出しにくい抗菌ペプチド (AMP) と抗菌剤の併用に着目した。併用薬剤にε-ポリ-L-リジン (PLL) と 3-methyl-4-isopropylphenol (IPMP) を選択し、う蝕の主要病原菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に薬剤を単独または併用で処理した時の抗菌効果を調査した。【実験】はじめに、*S. mutans* に対する PLL と IPMP の抗菌感受性試験を行った。次に、*S. mutans* に 2つの薬剤を併用処理した時の抗菌効果を調査した。さらに、異なる薬剤処理条件下において、蛍光標識した PLL の局在を顕微鏡により観察した。【結果】PLL と IPMP はいずれも単独で *S. mutans* に対し濃度依存的に抗菌性を発現した。また、併用処理は、単独処理よりも高い抗菌効果を持つことを確認した。さらに、単独では十分な抗菌効果を発現しなかった低濃度の PLL でも、IPMP との併用により、高い抗菌性を示すことを明らかにした。また、顕微鏡による観察から、薬剤の併用により多くの PLL が細胞内に局在することを確認した。これらの結果は、IPMP が PLL の細菌内部への透過性を促進し、抗菌効果を亢進させた可能性を示した。【結論】PLL と IPMP の併用は、低濃度の PLL においても *S. mutans* に対する抗菌効果を大幅に向上させたことから、異なる作用機序をもつ薬剤の併用がう蝕予防において有効なアプローチとなると期待できる。

DP1-12-08/P1-164

Establishing phagemid packaging system to generate antimicrobials against MDR Staphylococcus aureus

Feng-Yu Li¹, ○XinEe Tan¹, 島守 祐月¹, 氣駕 恒太郎^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 相羽 由詞¹, 宮永 一彦¹, Kanate Thititanapakorn¹, 西川 裕太郎^{1,3}, Longzhu Cui¹ (1自治医大・医・感染免疫, 2国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター, 3栄研化学 (株))

Feng-Yu Li¹, ○XinEe Tan¹, Yuzuki Shimamori¹, Kotaro Kiga^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Yoshifumi Aiba¹, Kazuhiko Miyahara¹, Kanate Thititanapakorn¹, Yutaro Nishikawa^{1,3}, Longzhu Cui¹ (1Dept. Infect. Immun., Sch. Med., Jichi Med. Univ., 2Research Center for Drug and Vaccine Development, National Inst. Infectious Diseases, 3EIKEN CHEMICAL CO.,LTD.)

Alternative strategies to combat multidrug-resistant (MDR) pathogens has become imperative due to the increasing prevalence of antibiotic resistance. In response to this global health threat, we proposed a phagemid-based packaging system to generate CRISPR-Cas13a-loaded antibacterial capsids (AB-capsids) for targeted therapy against MDR *Staphylococcus aureus*. This system is optimized with regard to the yield and purity of generated AB-capsids. AB-capsids yield was found to positively correlate with phagemid copy number. A 7.65-fold increase in phagemid copy number resulted in 1.54-fold increase in generated AB-capsids. Phagemids carrying terL-terS-rinA-rinB (phage-encoded packaging site genes) consistently showed high packaging efficiency, and generation of AB-capsids using lysogenized hosts with terL-terS deletion bring about a comparatively lower level of wild-type phages contamination with minimal compromise on AB-capsids yield. Finally, specific bactericidal activity of 9 AB-capsids generated through the optimized packaging technology were evaluated against MDR *S. aureus* strains. The generated AB-capsids selectively eliminate *S. aureus* strains carrying target gene, while sparing non-target strains. We anticipated our phagemid-based packaging system a promising avenue for the development of sequence-specific bactericidal agents against antibiotic-resistant *S. aureus*.

DP1-12-09/P1-165

植物由来成分を含む新規培地を用いて分離した細菌による真菌感染症治療効果

○田淵 史晃¹, 三上 雄大², 石井 雅樹³, 宮下 惇嗣¹ (1帝京大・医真菌・抗真菌免疫生物, 2帝京大院・医療技術・臨床検査, 3武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Antifungal activity of bacteria isolated using a novel medium containing plant-derived components

○Fumiaki Tabuchi¹, Kazuhiro Mikami², Masaki Ishii³, Atsushi Miyashita¹ (1Lab. Antifungal Immunobiol., Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ., 2Dept. Med. Tech., Grad. Sch. Clinical Lab. Sci., Teikyo Univ., 3Lab. Mol. Cell Biol., Sch. Pharm., Musashino Univ.)

我々の周りの環境中には多様な微生物生態系が築かれている。これまで土壌中などの細菌は、主に汎用性の栄養培地を用いることにより分離されてきた。しかしながら、いまだ多くの環境細菌は人工培地を用いて培養できていないことから、新しい培地による培養方法が必要とされている。本研究では、植物由来成分を含む新規の培地を作製することで、環境サンプルからの細菌培養を試みた。

まず、環境中から採集した土壌サンプルを YME および植物成分寒天培地に塗抹し、培養したところ、両培地上に形態や大きさの異なるコロニーが多数生育した。

次に、YME および植物成分寒天培地上に生育した、それぞれ 57 株および 51 株のコロニーの 16S rRNA 遺伝子配列をシーケンズ解析した。その結果、YME 寒天培地から得られた株は、*Bacillus* 属 (もしくは *Priestia* 属) の細菌が多くを占めた。一方、植物成分寒天培地からは、*Streptomyces* 属の放線菌、*Rhizobium* 属の根粒細菌が多く得られた他、データベース上に記載の無い細菌も分離された。

さらに、本方法により培養した土壌細菌の培養液を有機溶媒抽出したサンプルに対し、*Rhizopus oryzae* 感染カイコに対する治療活性を指標としたスクリーニングを実施したところ、*R. oryzae* 感染カイコを延命させる株を見出した。

以上の結果は、土壌サンプル中の微生物を植物成分培地で培養することで、YME などの汎用性栄養培地とは異なる相の微生物群を得られることを示唆している。さらに、本法により、真菌感染症に対して有効な代謝産物を産生する株を取得できることを示唆している。

本研究は生研支援センター「オープンイノベーション研究・実用化推進事業 (JPJ011937)」の支援を受けて行った。

DP1-12-10/P2-166

Mobile linezolid resistance genes in enterococci derived from livestock compost at Japanese farms

○福田 昭¹, 中島 千絵², 鈴木 定彦², 白井 優^{1,2} (1酪農大・獣医・食品衛生学, 2北大・人獣研・バイオリソース)

○Akira Fukuda¹, Chie Nakajima², Yasuhiko Suzuki², Masaru Usui^{1,2} (1Dept. Food Microbiol. and Food Safe., Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., 2Div. Bioresources, Inter. Inst. Zoonosis Contr., Hokkaido Univ.)

Linezolid is a last-resort antimicrobial in human clinical settings. Mobile linezolid resistance genes (*optrA*, *poxxA*, and *cfr*) have been detected in various sources worldwide. We clarified the existence of linezolid-non-susceptible bacteria and mobile linezolid resistance genes in farm environments in Japan.

Enterococci isolates from feces compost collected from 10 pig and 11 cattle farms in Japan in 2021 were characterized. Whole-genome sequencing of *optrA* and/or *poxxA* genes positive-enterococci was performed.

Of 103 enterococci isolates, 12 from pig farm compost were non-susceptible to linezolid. These 12 various *Enterococcus* spp. isolates carried mobile linezolid resistance (*optrA* and/or *poxxA*) genes on plasmids or chromosomes. The genetic structures of *optrA*- and *poxxA*-carrying plasmids were almost identical to those reported in other countries. The *optrA*- and *poxxA*-positive *Enterococcus faecium* belonged to ST324 (clade A2), a high-risk multidrug-resistant clone.

Although linezolid is not used in livestock, linezolid-non-susceptible enterococci could be indirectly selected by frequently used antimicrobials, such as phenicols. Moreover, various enterococci species derived from livestock compost may serve as reservoirs of linezolid resistance genes carried on globally disseminated plasmids and multidrug-resistant high-risk clones.

DP1-12-11/P2-168

Genetic and phenotypic analyses of *mcr*-harboring ESBL-producing *E. coli* from dogs and cats in Japan

○安木 真世¹, 鳩谷 晋吾¹, 元岡 大祐², 近藤 大輔¹, 秋吉 秀保¹, 堀江 真行¹, 中村 昇太², 嶋田 照雅¹ (1大公大・獣医, 2阪大・微研)

○Mayo Yasugi¹, Shingo Hatoya¹, Daisuke Motooka², Daisuke Kondo¹, Hideo Akiyoshi¹, Masayuki Horie¹, Shota Nakamura², Terumasa Shimada¹ (1Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ., 2RIMD, Osaka Univ.)

The emergence of *mcr* plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Enterobacteriales* among companion dogs and cats poses a risk of the animals acting as reservoirs for cross-species transmission. However, current knowledge of the bacteria, e.g. the genetic and phenotypic characteristics of the bacterial isolates and plasmids, in dogs and cats is still limited. Here, we identified *mcr* gene-harboring ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from a dog and a cat in Osaka, Japan. Colistin-resistant MY732 isolate from a dog carried two plasmids: *mcr-1.1*-harboring IncI2 plasmid and *bla*_{CTX-M-14}-harboring IncFIB plasmid. Conjugation assays revealed that both plasmids can be co-transferred even though the IncFIB plasmid lacked a conjugal transfer gene cassette. The other isolate MY504 from a cat harbored two *bla* genes and *mcr-9* on the identical IncHI2 plasmid. This isolate was not resistant to colistin. To the best of our knowledge, this is the first report of a colistin-resistant ESBL-producing *E. coli* isolate harboring *mcr-1* from a companion dog in Japan. Given that the *mcr* gene-harboring IncI2 and IncHI2 plasmids in this study shared high homology with plasmids from human or animal-derived *Enterobacteriales*, companion dogs and cats may act as important reservoirs for cross-species transmission of the *mcr* gene in the community, in Japan.

DP1-12-12/P2-169

Resistance to Sulfamethoxazole-Trimethoprim and Its Horizontal Transfer in *Haemophilus influenzae*

○安藤 友一, 輪島 文明, 田中 愛海, 打矢 恵一 (名城大・薬・微生物学)

○Tomokazu Ando, Takeaki Wajima, Emi Tanaka, Kei-ichi Uchiya (Dept. Microbiol., Fac. Pharm., Meijo Univ.)

Objectives: *Haemophilus influenzae* is occasionally isolated from urogenital tracts. Empirically, sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX/TMP) is used for the treatment of urinary tract infections. However, information on the susceptibility of *H. influenzae* to SMX/TMP and resistant mechanisms is limited. Therefore, this study aims to investigate SMX/TMP susceptibility and explore the resistant mechanism.

Methods: A total of 81 *H. influenzae* isolates, obtained in 2018 and 2022, were included. MIC was measured using the broth dilution method. For SMX/TMP resistant strains, the resistant mechanisms were analyzed. Additionally, horizontal transfer experiments were performed using the genomic DNA of resistant strains.

Results: SMX/TMP resistant isolates accounted for 37.5% in 2018 and 47.1 % in 2022. The quinolone low susceptibility rate of SMX/TMP resistant isolates was significantly higher than that of susceptible isolates. In contrast, no significant association was found with β -lactam resistance. No known acquired resistant genes was found, suggesting that chromosomal mutation could be associated with the resistance. Further, horizontal transfer experiments revealed the transfer of SMX/TMP resistance to susceptible strains.

Conclusions: This study indicated an increase in SMX/TMP resistance and suggested that horizontal transfer could contribute to spread among *H. influenzae*.

DP1-12-13/P2-170

Mechanism of high-level quinolone resistance in *H. haemolyticus* revealed by gene transfer assay

○輪島 丈明, 田中 愛海, 打矢 恵一 (名城大・薬・微生物)

○Takeaki Wajima, Emi Tanaka, Kei-ichi Uchiya (Dept. Microbiol., Fac. Pharm., Meijo Univ.)

Objectives: High-level quinolone-resistant *H. haemolyticus* was isolated from a paediatric patient in 2019. However, underlying mechanism of the resistance remained unclear. In this study, we aimed to identify the mechanism by a resistance transfer assay with *H. influenzae*.

Methods: A resistance transfer assay to *H. influenzae* was performed using genomic DNA or PCR-amplified quinolone-targeting genes from high-level quinolone-resistant *H. haemolyticus* 2019-19 strain. The amino acids responsible for quinolone resistance were identified through site-directed mutagenesis.

Results and Discussion: Upon introducing genomic DNA from *H. haemolyticus* 2019-19, resistant colonies were generated, displaying an equivalent level of resistance to 2019-19. Sequencing analysis revealed that *gyrA*, *parC*, and *parE* in the resulting *H. influenzae* colonies were replaced by their counterparts from *H. haemolyticus*. Subsequent addition of quinolone-targeting gene fragments demonstrated that *parE*, along with *gyrA* and *parC*, significantly contributed to high-level resistance. Notably, amino acid substitutions at both the 439 th and 502 nd residues of ParE were associated with this elevated resistance. These findings suggest that these amino acid substitutions of ParE, in conjunction with substitutions in both GyrA and ParC, play a crucial role in conferring high-level quinolone resistance.

DP1-12-14/P2-172

培養時間の延長によって誘導されるバイオフィルムの非カノニカルな抗菌薬感受性化

○原 慧一郎^{1,2}, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (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, 3慈恵医大・アミロイド制御研究室)

Long-term cultivation triggers non-canonical susceptibilization of biofilm cells to antibiotics

○Keiichiro Hara^{1,2}, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Reg., Jikei Univ. Sch. Med.)

従来、バイオフィルムは時間経過と共に成熟し、その内部の菌は抗菌薬に対して抵抗性を増すと考えられてきた。最近我々は、黄色ブドウ球菌 Xen36 株で作製したバイオフィルムの培養期間を延長すると、バイオフィルム内細菌がゲンタマイシンに対し感受性化することを見出した。今回、この現象の普遍性とメカニズムを解析したので報告する。Xen36 株以外の複数の菌種・菌株を用い、培養期間の異なるバイオフィルムへ最小生育阻止濃度の 100 倍のゲンタマイシンを 24 時間作用させ、回収した菌のコロニー形成能を評価した。その結果、培養期間を延長してもその内部の菌の生存率 (コロニー形成数) は変化しないが、ゲンタマイシン添加後のコロニー形成数は著しく低下することが黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、腸球菌、肺炎桿菌において確認された。この培養期間の延長に伴う抗菌薬感受性化は、抗菌薬の濃度や種類、バイオフィルムの培養期間や培地を変更しても確認された。また、本現象はバイオフィルムの培養時の酸素の有無に関わらず認められた。さらに、培養 1 日および 3 日のバイオフィルムを iCBiofilm 法で透明化後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、その構造に大きな変化は認められなかった。

以上より、バイオフィルムの培養期間を延長すると、その内部の菌は抗菌薬に対して感受性化するという非カノニカルな現象を発見し、その普遍性を明らかにした。また、本現象は酸化ストレスやバイオフィルムの立体構造の変化によって引き起こされるものではないことが示された。現在、黄色ブドウ球菌トランスポゾン変異株ライブラリーを用いて本現象のメカニズムを解析中である。

DP1-12-15/P2-173

アラニントランスポーター *CycA* は黄色ブドウ球菌のカチオン性抗菌剤への耐性に関与する

○鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,2}, Nguyen Tra Mi Le^{1,2}, That Thuan Vy Ton¹, Hitoshi Komatsuzawa^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 2Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ.)

Alanine-transporter *CycA* supports cationic antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*

○Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,2}, Nguyen Tra Mi Le^{1,2}, That Thuan Vy Ton¹, Hitoshi Komatsuzawa^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 2Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ.)

【目的】黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、ヒトの鼻腔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。黄色ブドウ球菌が宿主に定着、侵襲する際には、宿主や環境中の競合細菌が産生するカチオン性抗菌ペプチド (CAMPs) に抵抗する能力が重要であることが知られている。CAMPs 抵抗システムの中でも、タイコ酸に D-アラニン修飾する Dlt システムは重要であるが、これをサポートするメカニズムについては知られていない。本研究では、アラニンの細胞内取り込みに関与するトランスポーターである *CycA* (AapA) に着目し、CAMPs 耐性における *CycA* の役割を解析した。

【方法】黄色ブドウ球菌 MW2 株および RN4220 株の *cycA* 不活化株 ($\Delta cycA$) を作成し、各種抗菌剤およびバクテリオシン、ディフェンシンの感受性を検証した。また、菌体表層荷電を解析する目的で、Cytochrome C binding assay を行った。

【結果】 $\Delta cycA$ 株において、陽性チャージの抗菌剤であるダプトマイシン、ゲンタマイシン、アルベカシンの感受性が高まっていることが判明した。また、nisin A や Pep5 などのカチオン性バクテリオシンに対する感受性も高まっていた。Cytochrome C を用いた菌体表層荷電解析の結果、MW2- $\Delta cycA$ 株は WT に比べ菌体表層の陰性荷電が強まっていることが確認できた。

【考察】 $\Delta cycA$ 株は、菌体表層の陰性荷電が強まることで、カチオン性抗菌剤や抗菌ペプチドに対する感受性が高まっていると考えられる。今後、*CycA* が Dlt によるタイコ酸への D-アラニン修飾に及ぼす影響や、黄色ブドウ球菌の侵襲性に及ぼす影響について検討していく予定である。

DP1-12-16/P2-174

Increased prevalence of Kanamycin-resistant *Salmonella* Schwarzengrund from broilers in Kagoshima

○George Sanga, 宮島 里佳, Vu Minh Duc, 中馬 猛久 (鹿大・共同獣医学部)

○George Sanga, Rika Miyajima, Vu Minh Duc, Takehisa Chuma (Joint Fac. Vet. Med. Kagoshima Univ.)

Salmonella is a notable foodborne pathogen affecting public health globally. The purpose of the current study was to survey the prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* recovered from broiler chickens in Kagoshima, Japan. A total of 181 *Salmonella* serovars were identified from 768 broiler chicken cecum samples in 2021. Among the serovars, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund (111/181, 61.3%) was the predominant serovar with high Kanamycin (KM) resistance (62/111, 55.9%) proportion observed. In addition, the overall prevalence of kanamycin-resistant *S. Schwarzengrund* has kept increasing from 0% to 34.3% between 2009 and 2021. Molecular analysis revealed that all (100%) KM-resistant *S. Schwarzengrund* isolates harbor the *aphA1* gene and belong to the IncP plasmid incompatibility group with one to two plasmids. Our findings provide important and updated information about the *Salmonella* status, especially the increased prevalence of *S. Schwarzengrund* and the associated kanamycin resistance in broiler chickens in Kagoshima Prefecture. The information generated contributes to the surveillance of *Salmonella* contamination trends in poultry in Kagoshima, hence ensuring food security.

DP1-12-17/P2-178

Metabolic Remodeling by *rpoBC* Mutations is Associated with β -Lactam Resistance in OS-MRSA

○渡邊 真弥, ソフォル チジオケ, ティティアナンパコーン カネート, タンシンイー, 相羽 由詞, 宮永 一彦, ヴィーラナラヤナン スリワニ, 崔龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Shinya Watanabe, Chijioke A Nsofor, Kanate Thitianapakorn, XinEe Tan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyagawa, Srivani Veerananayanan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The emergence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) has imposed further challenges to the clinical management of MRSA infections. When exposed to β -lactam antibiotics, these strains can easily acquire a phenotype of reduced β -lactam susceptibility through chromosomal mutations, including those in RNA polymerase (RNAP) genes such as *rpoBC*, which may then lead to treatment failure. Despite apparent challenges they pose for diagnosis and treatment, there is limited information on the actual mechanisms that underly the transition to reduced β -lactam susceptibility, as it does not directly associate with the expression of *mecA*. This study investigated the cellular physiology and metabolism of six missense mutants with reduced oxacillin susceptibility, using mass spectrometry-based metabolomics analysis. Our results showed that *rpoBC* mutations give rise to RNAP dysfunction, which in turn caused intracellular accumulation of ribonucleotides. These mutations also led to the accumulation of UDP-Glc/Gal and UDP-GlcNAc, the precursors of UTP-associated peptidoglycan and wall teichoic acid. Consequently, this accumulation of the precursors increased the cell wall thickness of the mutant strains as observed with transmission electron microscopy analysis, and this phenomenon eventually resulted in decreased susceptibility to β -lactam in OS-MRSA.

DP2-13-01/P1-021

大腸菌が保有する *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

○新井 沙倉¹, 大岡 唯祐², 池田 伸代³, 新免 香織⁴, 横山 孝治⁵, 有川 衣美⁶, 門口 真由美⁷, 溝腰 朗人⁸, 今野 貴之⁹, 小嶋 由香¹⁰, 貫洞 里美¹¹, 小西 典子¹², 廣瀬 昌平¹, 工藤 由起子¹ (1)国立衛研・衛微, (2)鹿児島大・医歯学・微生物, (3)広島市衛研, (4)姫路市衛研, (5)福井衛環研, (6)北九州市保環研, (7)熊本市環総セ, (8)大分衛環研, (9)秋田健環セ, (10)川崎健安, (11)埼玉衛研, (12)東京都健安研)

Development of real-time PCR assay specific for *astA* of *Escherichia coli*

○Sakura Arai¹, Tadasuke Ooka², Nobuyo Ikeda³, Kaori Shimmen⁴, Koji Yokoyama⁵, Emi Arikawa⁶, Mayumi Kadoguchi⁷, Akito Mizokoshi⁸, Takayuki Konno⁹, Yuka Kojima¹⁰, Satomi Kando¹¹, Noriko Konishi¹², Shouhei Hirose¹, Yukiko Kudo¹ (1)Div. Microbiol., Natl. Inst. Health Sci., (2)Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., (3)Hiroshima City Inst. Public Health, (4)Himeji Inst. Env. Health, (5)Fukui Inst. Health and Env. Sci., (6)Kitakyushu Inst. Health and Environ. Sci., (7)Kumamoto City Env. Res. Ctr., (8)Oita Pref. Inst. Health. Environ., (9)Akita Pref. Res. Ctr. Public Health and Env., (10)Kawasaki City Inst. for Public Health, (11)Saitama Inst. Public Health, (12)Tokyo Metropol. Inst. Public Health)

【背景】腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による集団食中毒事例が国内で発生している。しかし、原因食品不明の事例が多いため、食品における本菌の検査法が求められている。また、*astA* は多数の遺伝子多型 (バリエーション) が報告されているが、どのバリエーションが食中毒の発生に関与しているかは不明である。そこで、本菌を食品から特異的および高感度に検出することを目的に、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発を検討した。【方法】集団食中毒事例由来株 14 株について、保有する *astA* のバリエーションの種類、局在およびコピー数を特定するため、Illumina Miniseq および Nanopore PrometION による全ゲノム解析を実施した。登録のある *astA* 配列を精査し、特異的配列部分にリアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブを設計した。特異性試験では、集団食中毒事例由来株を含めた *astA* 保有細菌 219 株を含む多数の株をリアルタイム PCR 法に供試し、Ct 値が得られた場合を陽性と判定した。感度試験では、野菜、魚介類および食肉の代表食品の培養液に *astA* 保有大腸菌を接種し抽出した DNA を用いて検出限界を求めた。【結果と考察】全ゲノム解析の結果、集団食中毒事例由来株は多様なバリエーションを保有することが示された。また、特異性試験の結果、リアルタイム PCR 法は *astA* 保有大腸菌特異的に検出することが示された。感度試験では、いずれの食品でも検出限界は 3 log CFU/mL 未満であり、少ない菌数でも検出可能であった。以上から、開発したリアルタイム PCR 法は、*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出するため、食中毒事例発生時の汚染食品調査や分離株の特定等に有用であると考えられた。

DP2-13-02/P1-022

Diagnosis of *Helicobacter suis* infection as a potential contributor to gastric malignancies

○松井 英則^{1,2}, 林原 絵美子¹, 青木 沙恵¹, 柴山 恵吾², 鈴木 仁人³ (1)感染研・細菌二, (2)名古屋大・医・細菌, (3)感染研・薬剤耐性)

○Hidenori Matsui^{1,2}, Emiko Rimbara¹, Sae Aoki¹, Keigo Shibayama², Masato Suzuki³ (1)Dept. Bacteriol. II, NIID, (2)Dept. Bacteriol., Sch. Med., Nagoya Univ., (3)AMR Res. Cent., NIID)

Background: *Helicobacter suis*, hosted by hogs, wild boars, and macaques, is the most prevalent non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species (NHPH) in the human stomach. Infection with *H. suis*, which causes many cases of gastric disease such as mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, is not reliably diagnosed in clinical practice.

Objective: In this study, we develop a protocol for detecting *H. suis* infection.

Protocol: Step 1: Collect gastric biopsies and sera from patients. Step 2: Prepare DNA and perform PCR, targeting the *H. suis*-specific gene. Step 3: Conduct culture to detect NHPH and perform whole-genome sequencing of cultured bacteria. Step 4: Utilize ELISA to detect *H. suis* or *H. pylori* infection.

Results: Using PCR and ELISA alone, *H. suis* infection was detected with 100% sensitivity within a week after specimen collection. However, for NHPH infections other than *H. suis*, whole-genome sequencing (WGS) of cultured bacteria was required, which took a month after specimen collection.

Conclusion: This protocol enables accurate diagnosis of *H. suis* infection, marking a significant advancement in the field.

Non-member co-investigators: Kengo Tokunaga, Hidekazu Suzuki, Katsuhiko Mabe, and Tsuyoshi Kenri

DP2-13-03/P1-023

炭疽菌芽胞の迅速識別における MALDI Biotyper システムの評価

○藤浪 良仁, 中原 弘明, 武藤 淳二, 今村 章 (科警研・法一部・生五)

Evaluation of MALDI Biotyper system in rapid identification of *Bacillus anthracis* spores

○Yoshihito Fujinami, Hiroaki Nakahara, Junji Hosokawa-Muto, Akira Imamura (National Research Inst. Police Science)

【目的】米国炭疽菌郵送事件のような炭疽菌芽胞散布事件に迅速対応するため、分離培養なしで炭疽菌芽胞を迅速識別する時の MALDI Biotyper システムを評価した。【実験方法】*Bacillus* 属の芽胞および桿菌は、炭疽菌 PasteurII, セレウス菌 ATCC4342, チューリンゲンシス菌 NBRC13866 および枯草菌 IAM12118T の菌株を使用した。MALDI Biotyper に供する Small acid-soluble proteins の抽出法は、各精製芽胞の約 5x10⁷ CFU に対して Biotyper User Manual に従い実施し、抽出液を MALDI Biotyper システムで解析した。解析結果の類似度は Score 0.0-3.0 のうち 2.0 以上を高い確率で同種として、1.7 以上を高い確率で同属近縁種と同定するとして評価した。【結果と考察】作製した炭疽菌芽胞および桿菌の形態間の類似度は、その形態が異なるように Score 0.81-0.00 と類似度が低かった。得られた炭疽菌芽胞および桿菌のマスマスペクトルを MALDI Biotyper システムの既存ライブラリを用いて解析すると、炭疽菌芽胞のマスマスペクトルが Score 2.41-2.24, 桿菌型が Score 2.46-2.35 と全て Score ランキングで炭疽菌がトップ Score を示し、炭疽菌が芽胞型でも桿菌型でも高い確率で同種として検出できることが確認された。しかし、*Bacillus* 属の芽胞および桿菌のデータをライブラリにユーザーで追加登録し再解析すると、炭疽菌芽胞型は炭疽菌芽胞として Score 2.76-2.63 とより高い同定精度を示した。また炭疽菌芽胞と同属近縁種の芽胞との類似度 Score は、セレウス菌芽胞が 2.30-2.07, チューリンゲンシス芽胞が 1.63-0.90, 枯草菌芽胞が 0.82-0.00 であり、これら同属近縁種の芽胞間の類似度も炭疽菌芽胞の同定の確度を高めるものとなった。

DP2-13-04/P1-024

血清中 Ag85B 抗体価検出による結核診断法の有用性評価と最適化

○山崎 智也¹, Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi², 石川 智史^{1,3}, 吉田 豊¹, 尾関 百合子¹, 西山 晃史¹, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (新瀨大院・歯学総合・細菌学, ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., ³福山市立動物園)

Optimization of tuberculosis diagnostics by detection of Ag85B antibody titer

○Tomoya Yamazaki¹, Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi², Satoshi Ishikawa^{1,3}, Yutaka Yoshida¹, Yuriko Ozeki¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., ³Fukuyama Zoo)

膨大な数の結核菌の無症候感染者は結核の発生母体となっている。しかし、現行の結核菌感染診断法は感染の有無を判別できるが、無症候感染者の発症を検知できない。これに対し、結核菌に感染したヒトおよびゾウの一部抗原に対する抗体価は結核発症前より上昇することが報告された。よって、Ag85B 抗体価検出が、活動性結核の検出に加え、無症候感染者の結核発症予知に有用であると仮定し、その有用性の検証および最適化を行った。先行研究において、結核菌 Native 抗原を使った抗体価検出が、C 末端に His タグを付加した大腸菌組換え抗原よりも高い反応性を呈し、健常者と結核患者を区別できることが示された。したがって、余剰配列が、抗体反応を阻害していると考え、His タグをエンテロキナーゼによって除き、Native 抗原と同一の配列をもつ組換え抗原を得る構築を設計した。この組換え抗原と Native 抗原に対する抗体の反応性を比較した。また、両抗原に対する抗体の構造認識の差異を探るため、各抗原を用いた競合 ELISA と、変性剤処理抗原を用いた ELISA を行った。結果として、タグなしの組換え抗原は患者血清に対して Native 抗原と同等の反応性を示したが、健常者血清に対する非特異反応が見られた。また、各抗原に対する抗体反応は競合することが示された。一方で、変性剤処理後の抗体反応性は異なる。したがって、タグなしの組換え抗原は Native 抗原と同様に、結核患者の検出に利用できると考えられる。ただし、Native 抗原における特有の翻訳後修飾や、大腸菌組換え抗原における大腸菌成分の混入の可能性があり、これらが組換え抗原の非特異反応や、変性剤に対する影響の差異を生じる可能性がある。

DP2-13-05/P1-025

Improved Accurate Quantitative Analysis of Microbiome Using DNA Standard for 16S rRNA NGS analysis

○宮倉 穂奈美, 木村 剛隆 (タカラバイオ株式会社)

○Honami Miyakura, Yoshitaka Kimura (TAKARA BIO INC.)

Microbiome analysis commonly employs next-generation sequencing (NGS) targeting 16S rRNA to identify bacterial taxonomy and compare relative abundance. However, previous studies have primarily focused on relative comparisons of bacterial abundance, lacking information on absolute bacterial abundance. Quantifying bacterial abundance in NGS-based bacterial community analysis presents a challenge. This study addresses this issue by incorporating a nucleic acid standard for the 16S rRNA gene, which contains an artificial nucleotide sequence not found naturally. This reference material serves as a community standard, consisting of a mixture of multiple 16S sequences at varying abundance. Incorporating this standard into the sample prior to NGS analysis enables absolute quantitative 16S rRNA NGS analysis. This approach facilitates the comparison of bacterial abundance between samples and also allows for confirming the detection limit. We demonstrate practical examples showcasing the use of the DNA standards for 16S rRNA genes and their utility in quantitative 16S rRNA sequencing.

DP2-13-06/P1-026

白癬菌 *Trichophyton benhamiae* ケラチナーゼ変異株の MVOCs の検出

○水谷 透葉¹, 山田 剛^{2,3}, 榎村 浩一², 若口 伸一¹ (奈良女子大・理・生物科学, ²京大・真菌センター, ³京大・アジア国際感染症制御研)

Detection of MVOCs from Keratinase Mutant Strain of *Trichophyton benhamiae*

○Toha Mizutani¹, Tsuyoshi Yamada^{2,3}, Koichi Makimura², Shinichi Iwaguchi¹ (Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ., ²Inst. Med Mycol., Teikyo Univ., ³Asia Intl. Inst. Infect. Dis. Ctrl., Teikyo Univ.)

微生物からは増殖・代謝の過程で多様な二次代謝産物が放出され、分子量が 200 程度までのものは微生物由来揮発性有機化合物 (MVOCs) と呼ばれる。特定の病気には特定のニオイがあることが知られており、真菌感染症に特異的な MVOCs を同定することで、非侵襲性の新たな診断法の開発へと繋げられる可能性がある。白癬菌 *Trichophyton benhamiae* のモルモット感染時に発現する遺伝子を検出した研究では、感染時に SUB6 を含む 25 個の分泌型タンパク質をコードする遺伝子が高発現することが明らかになっている (Van et al., 2016)。本研究では感染に関与すると予想される 5 つの高発現プロテアーゼの有無に関連した MVOCs があるのかについて調べた。*T. benhamiae* の野生株とモルモット感染時に高発現する遺伝子に関する五重欠損株を作製し、培養時に放出される MVOCs を GC/MS で検出した。その結果、野生株と五重欠損株で検出される化合物種に違いはなく、ケトン類や高級アルコール類などの化合物種が検出された。また、培養日数条件を変えても検出される化合物種に変わりはなかった。検出された化合物種の中には菌特異的な MVOCs の可能性がある化合物種があり、これらの化合物種は白癬菌の存在をモニタリングする際の指標として利用できる可能性がある。(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)

DP2-13-07/P2-021

2023 年に富山県内で発生したウエルシュ菌食中毒事例における NGS を用いた SNP 解析

○齋藤 和輝¹, 木全 恵子¹, 磯部 順子¹, 金谷 潤一¹, 池田 佳歩¹, 前西 絵美¹, 竹内 崇², 松崎 千春³, 大石 和徳¹ (富山衛研・細菌部, ²富山県生活衛生課, ³富山県高岡厚生センター射水支所)

Analysis of the foodborne outbreak of *Clostridium perfringens* in Toyama prefecture, 2023

○Kazuki Saito¹, Keiko Kimata¹, Junko Isobe¹, Jun-ichi Kanatani¹, Kaho Ikeda¹, Emi Maenishi¹, Takashi Takeuchi², Chiharu Matsuzaki³, Kazunori Oishi¹ (Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health, ²Environmental Health Division in Toyama Prefecture, ³Public Health Center of Imizu, Toyama Prefecture)

【背景および目的】2023 年 1 月 12 日に富山県内の宿泊施設利用者が消化器症状を呈していることが判明した。病原体検索の結果、患者 12 名、カレーおよび無症状の従業員 1 名から *Clostridium perfringens* が分離された。感染源調査のため、これら分離株について解析を実施した。加えて、次世代シーケンサー (NGS) を用いた一塩基多型 (SNP) 解析がパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) に代わる手法として有用かを検討した。【方法】患者由来 56 株、従業員由来 5 株、カレー由来 24 株について、下痢原性エンテロトキシン遺伝子 (*cpe*) 有無の解析、主要毒素遺伝子による型別および遺伝子型別 (PFGE) を実施した。*cpe* 陰性株については新規エンテロトキシン遺伝子 (*becA/becB*) の有無を解析した。分離株のゲノム DNA を用いて SNP 解析を行った。【結果および考察】患者およびカレー分離株は *cpe* 陽性、毒素型 A 型であり、PFGE パターンが一致した。喫食状況と合わせてカレーが原因食品と特定された。従業員分離株は *cpe, bec* 陰性であり、患者およびカレー分離株とは PFGE パターンが異なった。SNP 解析の結果、患者およびカレー分離株間では 1 SNP、従業員分離株からは 1,427 SNPs が検出された。そのため、患者およびカレー分離株は同一であり、これらと従業員分離株の関連は低いと考えられた。PFGE および SNP 解析で同様の結果が得られたため、*C. perfringens* による食中毒事例において、SNP 解析は PFGE に代わる菌株の同一性を解析する手法として有用であることが考えられた。

DP2-13-08/P2-022

感染症における呼気オミックス解析法の確立

○緒方 星陵¹, 松永 哲郎¹, ジョン ミンキョン¹, 守田 匡伸¹, 魏 范研², 本橋 ぼづみ³, 赤池 孝章¹ (¹東北大院・医・環境医学, ²東北大・加齢医学・モドミクス医学, ³東北大・加齢医学・遺伝子発現制御)

Breath omics analysis for infectious diseases

○Seiryō Ogata¹, Tetsuro Matsunaga¹, Minkyung Jung¹, Masanobu Morita¹, Fan-Yan Wei², Hozumi Motohashi³, Takaaki Akaike¹ (¹Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., ²Dept. Modomics Biol. Med., IDAC, Tohoku Univ., ³Dept. Gene Exp. Regul., IDAC, Tohoku Univ.)

【背景】新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) はその感染経路として、エアロゾル感染が知られており、呼気エアロゾルを用いた高感度・高精度な検査法の確立は重要な課題である。呼気は、無接触・無侵襲に採取が可能であり、呼気凝縮液を対象とした「呼気オミックス」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、COVID-19 患者と新型コロナウイルス感染動物モデルの呼気凝縮液を用いて、ウイルス検出および感染に伴う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】COVID-19 患者を対象に呼気凝縮液を採取し、新型コロナウイルスの qPCR 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、患者から回収した呼気凝縮液の硫黄代謝物解析の結果、健康人と比較し、二硫化水素 (HSSH) や三硫化水素 (HSSSH) などの有意な増加が見られた。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、呼気凝縮液の回収法を新規に構築した。本手法を用いて、新型コロナウイルス感染ハムスターの呼気凝縮液の解析を行った結果、qPCR とプロテオーム解析の両方でウイルスが検出された。また、呼気中の硫黄代謝物解析において、HSSH や HSSSH などの濃度が、ウイルス増殖と肺炎進行の時間依存的に有意に上昇しその回復に伴って減少した。

【結論】本研究から、呼気オミックスは、COVID-19 の無侵襲なモニタリング法として有用であることが示された。本手法は、今後 COVID-19 のみならず、インフルエンザや結核、病原細菌などの様々な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。

DP2-13-09/P2-023

Mechanisms of excretion of bacterial-specific modified nucleosides in urine

○山村 遼介¹, 永芳 友^{1,2}, 西口 葉世^{1,2}, 富澤 一仁¹ (¹熊本大・医・分子生理, ²熊本大学病院・腎臓内科)

○Ryosuke Yamamura¹, Yu Nagayoshi^{1,2}, Kayo Nishiguchi^{1,2}, Kazuhito Tomizawa¹ (¹Dept. Mol. Physiol., Fac. Lif. Sci., Kumamoto Univ., ²Dept. Nephrol., Fac. Lif. Sci., Kumamoto Univ.)

RNAs are essential molecules for protein synthesis. Recently, various post-transcriptional chemical modifications are reported in RNA, especially transfer RNA. Interestingly, the types of these chemical modifications are different between mammals and bacteria. We have found that modified nucleosides, the metabolites of modified RNA, are not reused in cytosol and excreted to extracellular spaces, especially urine. From these backgrounds, we make the hypothesis that bacterial-specific modified nucleotides are excreted into urine of patients with bacterial infection. First, we analyzed bacteria-specific modified nucleotides by mass spectrometry using extracted RNA from 12 bacterial strains including gram-positive and negative bacteria. We found that 2-methyladenosine (m2A) was detected from all strains. Next, we performed co-culture experiment with bacteria and macrophages, and m2A was detected from phagosomes of macrophages. Finally, we analyzed modified nucleotides in urine samples from patients with bacterial or viral infections. As a result, urinary m2A was significantly elevated in patients with bacterial infections. These results suggest that m2A could be a novel diagnostic marker for bacterial infections.

DP2-13-10/P2-024

Clostridioides difficile 培養法の改良

○妹尾 充敏, 見理 剛 (感染研・細2)

Improvement of culture method for *Clostridioides difficile*

○Mitsutoshi Senoh, Tsuyoshi Kenri (Dept. Bacteriol. II, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【目的】*Clostridioides difficile* の引き起こす感染症 (CDI) の症状は、軽度の下痢から消化管穿孔まで多岐にわたる。また、死亡例の報告も稀ではないため、CDI 対策は急務であると考えられる。CDI の診断には細菌学的検査が必須であり、詳細に解析するためには菌分離が重要となる。本菌の分離には選択培地が用いられることが多いが、実際の菌数より少なく検出されている可能性がある。また、開発途上国では選択培地が入手困難な場合もある。本研究では、選択培地などの特殊な培地を使用しない分離法の開発を試みた。

【方法】本菌の分離にはアルコール処理が用いられることから、無処理、アルコール処理、本研究で開発した新たな方法の3種類の方法を比較した。培地は、BHI 寒天培地、変法 GAM 培地などを使用した。選択性の確認のため、*Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* などを用いた。形態の違いを確認するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。

【結果・考察】開発した新たな方法の特徴を調べるため、まず、本菌の純培養液を用いて、無処理、アルコール処理、新たな方法の3種類を比較した。その結果、栄養型菌では、無処理のコロニー数に比べ、アルコール処理は顕著に減少したが、新たな方法では著しく増加した。この増加現象は、芽胞化が進んだ培養液を用いても同様に観察された。次に、無処理、アルコール処理、新たな方法で処理した菌の形態を SEM および TEM を用いて観察したが、コロニー数の増加を裏付けられるような違いは観察されなかった。現在、遺伝子の発現に違いがあるか調べるため、解析を進めている。

DP2-13-11/P2-025

ボツリヌス神経毒素の新規 *in vitro* 検出法の開発

○油谷 雅広, 見理 剛, 妹尾 充敏 (感染研・細2)

Development of a novel *in vitro* detection method for botulinum neurotoxin

○Masahiro Yutani, Tsuyoshi Kenri, Mitsutoshi Senoh (Dept. Bacteriol. II, Natl. Inst. Infect. Dis.)

ボツリヌス症の検査において、ボツリヌス毒素の検出には、検体を投与されたマウスが弛緩性麻痺を呈するかを調べるマウス法が用いられている。マウス法は感度・特異性がともに高く、ボツリヌス毒素検出のゴールドスタンダードとなっている。しかし、検査に動物実験を伴うこと、マウスへの投与に一定の習熟度を要することから、検査そのものや検査機関内での技術継承が困難となることがある。また、動物実験に関する 3Rs への対応の観点からも、*in vitro* で実施できる代替試験法の開発が望まれる。本研究では、ボツリヌス毒素の基質である SNARE タンパク質を組み込んだ新規リコンビナントタンパク質を作製してボツリヌス毒素検出系の構築を進めており、その開発状況について報告する。

DP2-13-12/P2-026

PMA-PCRによるピロリ菌 VBNC の評価

○北条 史¹, 三戸部 治郎², 神谷 茂³, 大崎 敬子² (1)杏林大 院・医・実験動物施設, (2)杏林大・医・感染症学, (3)マヤリサン製薬(株)・中央研究所)

Evaluation of VBNC-Helicobacter pylori by PMA-PCR

○Fuhito Hojo¹, Jiro Mitobe², Shigeru Kamiya³, Takako Osaki² (1)Inst. Lab. Animals, Grad. Sch. Med, Kyorin Univ., (2)Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med., (3)Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd.)

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は胃・十二指腸潰瘍の起病菌とされる微好気性グラム陰性螺旋状菌である。本菌の感染経路は経口感染が主とされているが、糞便からの分離培養には至っておらず、全容は解明されていない。本菌のコッコイドは VBNC (Viable But Non-Culturable) 状態にあると考えられており、この生態が糞便からの分離培養ができない一因となっている可能性がある。コッコイドを含む VBNC-*H. pylori* の定量化のために、培養法によらないピロリ菌の生菌数算定法の確立が不可欠である本研究では *H. pylori* に対する PMA (Propidium monoazide) PCR を用いた生菌選択的定量 PCR 法を検討した。PMA は光反応性かつ細胞膜不透過性の DNA 修飾色素であり、死菌 DNA に作用して生菌 DNA のみ PCR を行うことができる。生菌における qPCR では PMA 処理・未処理に関わらず同じ Ct 値を示し、PMA は *H. pylori* 生菌 DNA の増幅を阻害しないことが分かった。一方で加熱処理死菌における PMA-qPCR では通常の qPCR と比較すると Ct 値にして 10 以上の差が認められ、1000 分の 1 程度しか増幅されなかった。これにより PMA-PCR によって死菌 DNA を増幅させず、生菌 DNA のみを選択的に増幅させることができることがわかった。PMA-qPCR による菌数算定の結果 3.34×10^6 CFU 相当であったが、生菌サンプルを培養法によって菌数算定したところ 2.88×10^6 CFU となり、培養法とほぼ同じ結果となった。本法によりピロリ菌を生菌選択的に定量化することができた。これにより糞便中の培養できないピロリ菌を検出できる可能性がある。

DP2-13-13/P1-027

屋久島のヤクシカから検出されるアナプラズマ科細菌

○安藤 匡子^{1,2}, 後藤 真優¹, 中村 紀晃¹ (1)鹿児島大・獣医・病態予防, (2)鹿児島大・島嶼研)

Anaplasma spp. in Yaku-deer of Yaku-shima Island, Kagoshima prefecture

○Masako Andoh^{1,2}, Mayu Goto¹, Takaki Nakamura¹ (1)Vet. Med., Kagoshima Univ., (2)Int. Ctr. Is. Stud., Kagoshima Univ.)

アナプラズマ科細菌は偏性細胞内寄生性であり、家畜牛では赤血球に感染する種が古くから知られ、人獣共通感染症を起こす種は 1994 年に人の好中球内にて発見された。日本においても様々な動物、マダニ、熱性疾患患者などから検出されている。しかし、分離が極めて困難であり、遺伝子情報は PCR による増幅断片に限られ、国内の菌種は不確定であることが多い。我々は国内の野生動物におけるコクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌の遺伝子検出による保有調査を行っている。本研究では、ニホンジカ (山口県のホンシュウジカ、鹿児島県のキュウシュウジカ、鹿児島県・屋久島のヤクシカ) からの結果を報告する。ヤクシカからのアナプラズマ科細菌の検出 (脾臓 17/19; 89.5%, 血液 6/8; 75.0%) は、ホンシュウジカ (脾臓 11/22; 50.0%) およびキュウシュウジカ (脾臓 1/21; 4.8%, 1/1; 血液 100%) と比較して高率であった。検出した *groEL* および *16SrRNA* 遺伝子の配列の解析では、ヤクシカ由来の配列は同一性が高く同一種のアナプラズマ科細菌を保有していることが示唆された。BLAST 検索においては同一性の高い配列は「未同定・培養されていないアナプラズマ科細菌」として登録されているものが多く、新興細菌であると考えられる。アナプラズマ科細菌陽性であったシカ個体については主要臓器の組織も観察したが、共通する病理所見は見いだされなかった。今後、我々が検出したアナプラズマ科細菌の分離を試み、種を同定し、性状を解析したい。また、シカ個体の新鮮サンプルから感染標的細胞を検索するなど、宿主動物での病原性も解析したい。

DP2-13-14/P1-028

オルソケラトロジーレンズ着用における口腔常在菌が眼感染症リスクに与える影響について

○木村 優那, 渡邊 愛, 角出 泰造 ((株) メニコン)

Effect of oral resident bacteria on risk of ocular infections when wearing orthokeratology lenses

○Yuna Kimura, Ai Watanabe, Taizo Sumide (Menicon Co., Ltd.)

オルソケラトロジー (OK) は内面形状が特殊なハードコンタクトレンズを就寝時着用し、角膜前面の平坦化により一時的に近視を軽減させる治療法である。日中 OK レンズは専用ケースで保管され、洗面台にて保管される割合が高い。先行研究において、実使用 OK レンズケースから検出された口腔常在菌 *Streptococcus salivarius* (*S.sal*) 共存下での、*Staphylococcus epidermidis* (*S.epi*) のバイオフィーム (BF) 形成量や、眼感染症の原因となる *Acanthamoeba castellanii* (*A.cas*) 増殖性が上昇したことが明らかとなっている。本研究では、口腔常在菌 *Streptococcus oralis* (*S.ora*) 共存下での *S.epi* の BF 形成能と主要な眼感染症原因である *A.cas* 及び *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aer*) 増殖性への影響を評価した。1. *S.epi* BF 定量評価: *S.epi* を播種後、培養用インサートを介して *S.ora* を共存させ、クリスタルバイオレット染色法により、*S.epi* の BF 形成量を定量した。2. *A.cas* 増殖性評価: *S.ora* と共存させた *A.cas* を培養後、カウントした。3. *P.aer* 増殖性評価: *P.aer* を播種後、培養用インサートを介した *S.sal*, *S.ora* それぞれの共存下で、*P.aer* の菌数をリアルタイム PCR にて定量した。*S.ora* 共存下において、*S.epi* の BF 形成量は増加したが、*A.cas* 増殖性は変化しなかった。また、いずれの口腔常在菌共存下においても *P.aer* 増殖性は変化しなかった。本結果より、*S.sal* と同様に、*S.ora* 共存下で *S.epi* の BF 形成量が上昇した。ケースの洗面台での保管は、飛沫による口腔常在菌混入での BF 産生増大の可能性があり、これを足場とした眼感染症のリスクが示唆される。

DP2-13-15/P1-030

日本国内実験用カニクイザルにおける *Corynebacterium ulcerans* 感染歴の遡及的解析

○木村 美幸¹, 米満 研三², 網 康至², 結城 明香², 妹尾 充敏¹, 見理 剛¹, 花木 賢一², 岩城 正昭² (1)国立感染研・細菌2, (2)国立感染研・安全実験管理部)

Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in cynomolgus monkeys in Japan: retrospective analysis

○Miyuki Kimura¹, Kenzo Yonemitsu², Yasushi Ami², Asuka Hirai-Yuki², Mitsutoshi Senoh¹, Tsuyoshi Kenri¹, Ken-Ichi Hanaki², Masaaki Iwaki² (1)Dept. Bacteriology II, NIID, (2)Management Dept. Biosafety, Lab. Animal, and Pathogen Bank, NIID)

【目的】ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) は、人獣共通感染症であるウルセランス感染症を引き起こす。種々の動物が保菌するが、実験用カニクイザルにおいても報告がある。本研究は、1961 年以降に感染研に入荷したカニクイザルの感染歴調査を目的とし、保存血清におけるジフテリア抗毒素価を調べた。また、ヒトからの感染との関連性を調べるため、抗麻疹抗体価についても評価した。

【方法】1961-2022 年入荷の 535 頭を対象とし、入荷時の検疫で採取された保存血清を使用した。ジフテリア抗毒素価は、ジフテリア毒素の Vero 細胞に対する毒性の中和活性により評価した。抗麻疹抗体価は EIA 法により測定した。

【結果・考察】今回ジフテリア抗毒素価を評価した 535 頭のうち、120 頭 (22.4%) が陽性であった。1985-1995 年入荷のサルで陽性率が高く、2000 年以降は減少した。1990 年で最も陽性率が高く、1990、95 年では、0.08 IU/ml 以上と比較的高い抗体価を示すサルが多かった。また、1985-95 年の抗毒素価陽性率は、ヒトとの接触の指標となる抗麻疹抗体陽性率と必ずしも一致しなかった。2020-22 年のサルから分離された *C. ulcerans* は、すべて毒素遺伝子陰性であったことから、毒素非産生性菌の感染が考えられた。2020 年以降では陽性率は低いものの、毒素産生性 *C. ulcerans* 感染歴を示すカニクイザルは存在し続けており、飼育群での感染拡大及びヒトへの感染が懸念される。従って、実験用カニクイザルにおける *C. ulcerans* 感染状況の監視が必要であると考えられる。

DP2-13-16/P2-027

Comparative analysis of *Leptotrichia* sp. isolated from human oral cavity

○桑原 紀子¹, 齋藤 真規², 瀧澤 智美², 泉福 英信², 平塚 浩一¹ (日大・松戸歯・生化学・分子生物学, ²日大・松戸歯・感染免疫学)

○Noriko Shinozaki-Kuwahara¹, Masanori Saito², Tomomi Hashizume-Takizawa², Hidenobu Senpuku², Koichi Hiratsuka¹ (Dept. Biochem. Mol. Biol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo., ²Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

A long filamentous-shaped and gram-negative bacilli and was isolated from saliva of healthy human. The isolate was tentatively identified as a *Leptotrichia* species based on the biochemical tests and 16S rRNA gene sequence analysis. In this study, complete genome sequence of *Leptotrichia* sp. named SK-5 has determined and analyzed. De novo assembly of the microbial genome data generated by the PacBio RSII sequencer was performed. Digital DNA-DNA hybridization (dDDH) and average nucleotide identity (ANI) between SK-5 and its related species were analyzed by calculator, respectively. Comparative 16S rRNA gene sequence analysis classified SK-5 into the genus *Leptotrichia* with *L. hofstadii* and *L. buccalis* as their closest relations with 98 and 97% similarity, respectively. The whole genome sequence of SK-5 consisted of 2,536,480 bp with a G+C content of 29.8% in a single circular chromosome. A total of 2,432 CDSs, 15 rRNAs, 46 tRNAs, and 9 CRISPRs included in SK-5 genome. The dDDH and ANI values between strain SK-5 and its most closely related *L. hofstadii* and *L. buccalis* were 48% and 36%, and 93% and 89%, respectively, which were below the threshold (dDDH; 70% and ANI; 95%, respectively) for species delineation. On the basis of differences, strain SK-5 would be suggested to be a novel species of the genus *Leptotrichia*.

[会員外共同演者: 田中陽子 (日大・松戸歯・有病者歯科検査医学)]

DP2-13-17/P2-028

口腔保湿ジェル成分のバイオフィーム抑制効果

○成 雪菲¹, 宮崎 貴文², 上川 善昭³, 泉福 英信¹ (日本大・松戸歯・感染免疫学, ²株式会社ピカッシュ, ³鹿児島大・歯学部)

Inhibition effect of oral moisturizing gel ingredients on the biofilm formation

○Setsuhi Sei¹, Takafumi Miyazaki², Yoshiaki Kamikawa³, Hidenobu Senpuku¹ (Dept. Microbiol. Immunol., Dent., Sch. at Matsudo, Nihon Univ., ²Pikasshu, ³Sch. Dent., Kagoshima Univ.)

700種類以上の口腔微生物によるバイオフィーム (BF) 形成を制御することは、口腔の健康を維持するために重要である。高齢者において、口腔 BF 形成が歯周病のみならず誤嚥性肺炎の発症に関与することが危惧されており、口腔清掃を含む口腔ケアの重要性が高まっている。特に高齢者は口腔が乾燥するケースが見られ、その乾燥が口腔 BF 形成を増加させることが問題となる。口腔乾燥を防止するために口腔保湿ジェルが使用されている。この保湿ジェルに BF 形成阻害効果があれば、保湿ジェルの効果に加えて BF 形成を阻害し、口腔の健康維持に大きく貢献すると考えられる。そこで、市販の口腔保湿ジェル (スッキリン) を使用し、口腔微生物 BF 形成に対する阻害効果を検討した。スッキリンには、水、グリセリン、アルギン酸、セルロースガム、キシリトール、炭、カラギーナン、クエン酸、クエン酸ナトリウム、銀、ポリビニルピロリドン、フェノキシエタノール、香料が含まれている。BF 形成実験は、マイクロタイプレートを使用し、0.25% スクロースが含まれた Tryptic Soy Broth を用いて菌を加え、そこにスッキリン溶液も加えた。形成された BF を洗浄し、0.5% サフランで染色、洗浄後 70% アルコールで色素を抽出し、492nm の吸収値で BF 量を測定した。その結果、*Actinomyces oris* MG1, *Actinomyces oris* MG1, *Streptococcus mutans* MT8148 と UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715 の BF 形成は、スッキリンにより有意に抑制された。口腔保湿のために使用されているスッキリンは、口腔 BF 形成に関与する *A. oris*, *S. mutans*, *S. sobrinus* の BF 形成を阻害する効果も有することが明らかとなった。

DP2-13-18/P2-029

高齢者施設居住者の腸管内における溶血性レンサ球菌の保菌状況調査

○池田 佳歩¹, 磯部 順子¹, 前西 絵美¹, 木全 恵子¹, 金谷 潤一¹, 齋藤 和輝¹, 池辺 忠義², 明田 幸宏², 大石 和徳¹ (富山衛研・細菌, ²感染研・細菌1)

Prevalence of intestinal carriage of hemolytic streptococci in the nursing home residents

○Kaho Ikeda¹, Junko Isobe¹, Emi Maenishi¹, Keiko Kimata¹, Jun-ichi Kanatani¹, Kazuki Saito¹, Tadayoshi Ikebe², Yukihiko Akeda², Kazunori Oishi¹ (Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health, ²Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【背景】劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) の致死率は高く、その公衆衛生上のインパクトは大きい。我々は 2023 年に侵入門戸不明で高齢者にみられた STSS の 1 致死的例を経験し、発症時の血液と便から *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) を分離した。また、NGS 解析から両菌株が同一株であることを報告した (日本感染症学会西日本地方会, 2023 年)。本症例は腸管内 SDSE が bacterial translocation (BT) により STSS を発症した可能性を示唆している。今回、我々は高齢者施設居住者における腸管内の溶レン菌の保菌状況を調査した。

【対象・方法】2 高齢者施設の居住者 64 名を対象とし、2023 年 10 月と 12 月に計 2 回採便を実施し、各 64 検体、58 検体を採取した。コロニー血液寒天培地に便を塗抹し、溶血を認めるコロニーを鈎菌し、群別・菌種同定を行った。

【結果・考察】溶レン菌の分離は 1 回目 25/64 (39%)、2 回目 22/58 (38%) で、菌分離率は 1 回目、2 回目で SDSE が (23%, 24%)、*S. agalactiae* (SA) が (6%, 2%) であった。今回、高齢者施設の居住者の便から SDSE が 23~24%、SA は 2~6% 分離されたが、*S. pyogenes* は分離されなかった。1 回目、2 回目に共通して 11 名 (17%) から SDSE が分離された。この結果は、本菌が BT を介して STSS を発症するポテンシャルを示唆している。(共同研究者: 厚生連高岡病院 伊藤宏保, 狩野恵彦, 東慶之介, 脇田明宏, 浦田孝之)

DP2-13-19/P2-030

Bacillus cereus foodborne outbreaks in Tokyo, 1977-2023

○門間 千枝, 岡田 若葉, 古田 菜摘, 浅山 睦子, 上原 さとみ, 小池 裕, 神田 真軌, 尾畑 浩魅, 横山 敬子, 貞升 健志 (東京都健康安全研究センター)

○Chie Monma, Wakaba Okada, Natsumi Furuta, Chikako Asayama, Satomi Uehara, Hiroshi Koike, Maki Kanda, Hiromi Obata, Keiko Yokoyama, Kenji Sadamasu (Dept. Microbiol., Tokyo Metropolitan Inst.)

Several foodborne outbreaks caused by *Bacillus cereus* have been reported every year. We studied the isolates and emetic toxin in causative food of those outbreaks in Tokyo from 1977 to 2023. A total of 236 strains were examined, including 152 isolates (90 emetic foodborne outbreaks), 56 isolates (6 outbreaks of nosocomial infections), and 28 other strains (environmental origin etc.). Serotyping, cereulide gene (*crs*), emetic toxin production of the isolates using MALDI-TOF MS, and MLST analysis were performed. In addition, the productions of cereulide in 13 causative foods were quantified by LC-MS/MS. The causative foods were all cooked cereal foods except for unknown outbreak incidents. Cereulide was quantified in 13 causative foods (0.11 - 30 µg/g). These amounts were considered sufficient to cause the emetic disease. The serotypes of the foodborne outbreaks' isolates were Taylor & Gilbert type 1 (97.4%). In the isolates from the other origins, serotypes were varied. Most of the foodborne outbreaks' isolates carried *crs* but all nosocomial isolates didn't have carry. The results of the MLST analysis showed that the foodborne outbreaks isolates (88.5%) were ST26, unlike the other isolates. ST26 was found in high numbers in rice isolates, which was consistent with the high number of cooked cereal foods in causative foods of *B. cereus* foodborne outbreaks.

DP2-14-01/P2-078

Diversity of the Japanese Gut Microbiome Analysis: Relative Approach Using Compositional Analysis

○板垣 竜樹, 中村 圭佑, 中野 晋太郎, 笠井 満知子, Ji-Won Lee, 長谷部 晃 (北大・院・歯・口腔病態学・口腔分子微生物学)

○Tatsuki Itagaki, Keisuke Nakamura, Shintaro Nakano, Machiko Kasai, Ji-Won Lee, Akira Hasebe (Oral Molecular Microbiology, Fac. Dental Medicine, Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ.)

A compositional data vector is a special type of multivariate observation in which the elements of the vector are non-negative and sum to a constant, usually taken to be unity. A compositional data only retains relative information. Furthermore, comparisons can only be made between compositional data of the same component. The relevant sample space is the standard simplex. A simplex space is a space that is a generalized form of a triangle. For compositional data, many of the operations defined in Euclidean space are meaningless. Microbiome analyzes have become popular in recent years. Operational Taxonomic Units (OTUs) used in microbiome analysis are one type of compositional data. The OTUs data were compositional, with information only about relative abundance. Firmicutes and Bacteroidetes, the major phyla in the colon, have been observed in humans worldwide. Gut microbiome analyses often use the Firmicutes/Bacteroidetes ratio and principal coordinates analysis (PCoA). However, misinformation is pervasive in the human microbiome literature and analysis. An attempt was made to demonstrate how to analyze using the “National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN JMD) (Public Data).” The results showed that PCoA did not work, and principal component analysis (PCA) might be useful for analyzing the gut microbiome relative diversity.

DP2-14-02/P2-079

Genomic Analysis of *Salmonella* Isolated from Canal Water in Bangkok, Thailand

○Jirachaya Toying¹, Narong Nuanmuang², Fuangfa Utrarachkij³, Pimlapas Leekitcharoenphon², Frank Aarestrup², 佐藤 豊孝⁴, Jeewan Thapa¹, 中島 千絵¹, 鈴木 定彦¹ (1北大・人獣共通感染症国際共同研究所・バイオリソース部門, 2Res. Gr. for Genom. Epi., Nat. Food Int., Tech. Univ. of Denmark, 3Dept. Microbiol., Fac. Publ. Health. Mahidol Univ., 4北海道大・院・獣医・衛生学・獣医衛生学)

○Jirachaya Toying¹, Narong Nuanmuang², Fuangfa Utrarachkij³, Pimlapas Leekitcharoenphon², Frank Aarestrup², Toyotaka Sato⁴, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima¹, Yasuhiko Suzuki¹ (1Div. Biores., Hokkaido Univ. Int. Inst. Zoonosi. Contr., 2Res. Gr. for Genom. Epi., Nat. Food Int., Tech. Univ. of Denmark, 3Dept. Microbiol., Fac. Publ. Health. Mahidol Univ., 4Lab. Vet. Hyg., Fac. Vet. Med., Hokkaido Univ.)

Introduction: Antimicrobial resistance (AMR) poses a growing global public health threat. Canals are essential in Thailand, including the capital city, Bangkok, as agricultural and daily water sources. **Objective:** To elucidate the characteristic and antimicrobial-resistance properties of the bacteria in the urban canals. **Materials & Methods:** Whole genome sequencing was used to characterize 30 genomes of *Salmonella enterica* isolated from Bangkok canal water from 2016 to 2020. **Results:** The dominant serotype was *Salmonella* Agona. In total, 35 antimicrobial resistance genes and 30 chromosomal-mediated gene mutations were identified, in which 21 strains carried both acquired genes and mutations associated with fluoroquinolone resistance. 75.9% of the study strains were multidrug-resistant and all the strains harbored the necessary virulence factors associated with causing salmonellosis. Col(pHAD28) was the most common plasmid replicon type. Comparative analysis of nine *S. Agona* from Bangkok and 167 from public databases revealed that specific clonal lineages of *S. Agona* might have been circulating between canal water and food sources in Thailand and globally. **Conclusion:** These findings provide insight into potential pathogens in the aquatic ecosystem and support the inclusion of environmental sampling into comprehensive AMR surveillance initiatives as part of a One Health approach.

DP2-14-03/P2-080

Quantification and visualization of the *Escherichia coli* genome based on phylogenetic trees

○鈴木 匡弘 (藤田医大・医・微生物)

○Masahiro Suzuki (Dept. Microbiology, Sch. Med., Fujita Health Univ.)

Recent genome analysis advances have significantly reduced time and cost for whole-genome bacterial studies. However, the full potential of genomic data in bacterial analysis remains underexplored. In this study, we've introduced an innovative approach: converting cgMLST allele numbers into a new PhyloCode with numerical values based on phylogenetic relationships. This method transforms the bacterial genome into a numeric sequence for intuitive and visual data interpretation.

Our methodology applied to *Escherichia coli* cgMLST data from PubMLST, focusing on 2513 loci. We created the PhyloCode by constructing phylogenetic trees for each locus, quantifying alleles based on their position along a semicircle's circumference. PhyloCodes were established by considering circular order and distance within the phylogenetic tree using the *lphnet* R package, assigning angles to each allele. A dedicated database streamlines allele number to PhyloCode conversion.

The resulting PhyloCode can be further translated into color parameters, forming a comprehensive color map of the cgMLST genome on a 51x50 square plane. This study anticipates enhancing genome diversity understanding through visual representation and improving genomic data utilization in fields like machine learning by systematically assigning meaningful numerical values to genomic information. (Nonmember author: Chihiro Hayazaki)

DP2-14-04/P2-081

侵襲性肺炎球菌感染症の発症因子の遺伝統計学的探索

○大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也^{1,2,3,4}, 川端 重忠^{1,4} (1大阪大・歯・微生物, 2大阪大・歯・バイオインフォ, 3大阪大・微研・バイオインフォ, 4大阪大・CiDER)

Statistical-genetic investigation of the pathogenic factors in invasive pneumococcal diseases

○Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Shigetada Kawabata^{1,4} (1Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 2Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 3Bioinform. Center, Res. Inst. Microbial Dis., Osaka Univ., 4CiDER, Osaka Univ.)

肺炎球菌は肺炎や中耳炎に加え、致死的な侵襲性肺炎球菌感染症を引き起こす。侵襲性感染症は複数の因子により複数の機序で発症することが示唆されている。本研究では遺伝統計学的解析により、病態と相関する肺炎球菌の因子の探索を行った。

1978年から2018年にかけて世界20カ国で分離された12,599株の肺炎球菌の全ゲノム情報を収集した。プログラム *Roary* を用いたパンゲノム解析により99%以上の株が保有するコア遺伝子を687遺伝子同定し、プログラム *snp-sites* によりコア遺伝子から274,786箇所の一塩基多型 (SNP) を抽出した。またパンゲノムから42,473遺伝子を検出した。続いて、プログラム *pyseer* を用いたゲノムワイド関連解析により侵襲性感染症の病態と相関するSNPの探索を行ったところ、14,778箇所の変異が病態と有意に関連した。次に、遺伝子の分布と病態の関連を解析した結果、3,102遺伝子の存在が検出され、分布パターンから45クラスターに分類された。さらに、*SignalP* を用いて細胞外に局在する分子をコードする遺伝子をスクリーニングし、遺伝子欠失株を作製してマウス敗血症モデルにおける病原性を比較した。その結果、TIGR4野生株と比較して、菌体表層分子をコードする *group_3907* 遺伝子の欠失株を感染させたマウスの生存率が有意に高いことが示された。

侵襲性肺炎球菌感染症の発症に関連する遺伝因子の分布パターンが複数存在することから、特定の遺伝因子の集積した集団ごとに異なる発症機序が存在する可能性が示された。また、遺伝統計学的解析より病態との相関関係が示された *group_3907* が、マウス敗血症モデルにて病原性に寄与することが示唆された。

DP2-14-05/P2-082

astA 保有大腸菌 O166:H15 の系統解析と細胞付着性の解析

窪村 亜希子¹, 李 謙一¹, 新免 香織², 鹿島 かおり³, 榊田 希³, 門口 真由美⁴, 工藤 由起子⁵, 明田 幸宏¹, ○伊豫田 淳¹ (¹感染研, ²姫路市衛研, ³埼玉県衛研, ⁴熊本市衛研, ⁵国衛研)

Phylogenetic analysis and cell adhesion of astA-positive *Escherichia coli* O166:H15

Akiko Kubomura¹, Ken-ichi Lee¹, Kaori Shimmen², Kaori Kashima³, Nozomi Sakakida³, Mayumi Kadoguchi⁴, Yukiko Kudo⁵, Yukihiko Akeda¹, ○Sunao Iyoda¹ (¹National Inst. Infectious Diseases, ²Himeji Inst. Env. Health, ³Saitama Pref., ⁴Kumamoto City, ⁵National Inst. Health Sciences)

【目的】EAEC heat stable toxin (EAST1) をコードする遺伝子 (*astA*) を保有する大腸菌は、既存の下痢原性大腸菌分類には属さないが、集団下痢症事例の起原菌として複数回報告されていることから病原性が示唆される大腸菌である。しかし、*astA* 保有大腸菌は健康者からも検出され、食中毒由来株との特徴的な違いは明らかとなっていない。本研究では *astA* 保有大腸菌のうち食中毒起原菌として複数回報告される O166:H15 株に着目し、全ゲノム配列 (WGS) 解析や培養細胞を使用した解析により病原性等究明を試みる。

【方法】過去 3 件の食中毒事例から分離された 8 株を含む合計 14 株の *astA* 保有大腸菌 O166:H15 株を対象とし、WGS 解析と培養細胞を使用した細胞付着性試験を実施した。WGS 解析では保有する病原性関連遺伝子の網羅的な検出、さらに公共のデータベースから取得したゲノムデータも使用して系統解析を行った。付着性試験では HEp-2 細胞、CHO 細胞、INT407 細胞について感染実験を行った後、鏡検により付着性の解析を行った。

【結果・考察】付着性試験のうち HEp-2 細胞は全株で非付着性となったが、CHO 細胞と INT407 細胞においては食中毒由来株で付着性が認められた。しかし、WGS 解析では食中毒由来株にのみ共通して検出される病原性遺伝子や付着遺伝子は確認されなかった。系統解析では O166:H15 株は MLST により 4 つの系統に分類され、解析を行った多くの株は ST349 に分類されたが、食中毒由来株は共通して ST2914 であったことから、ST2914 が本菌の病原性系統である可能性が示唆された。食中毒由来株が示す細胞付着性は本菌の病原性に関与している可能性があるため、今後付着因子を特定することが重要である。

DP2-14-06/P2-083

健康保菌者から分離された志賀毒素産生性大腸菌のゲノム特性の解明

○今井 有未¹, 金子 寛², 奥野 未来¹, 星子 裕貴¹, 山本 武司¹, 李 謙一³, 野口 秋雄², 伊豫田 淳³, 佐藤 寿夫², 小椋 義俊¹ (¹久留米大・医・感染医学, ²株式会社 日本微生物研究所, ³感染研・細菌第一)

Genomic characterization of STEC strains isolated from asymptomatic carriers

○Yumi Imai¹, Hiroshi Kaneko², Miki Okuno¹, Yuki Hoshiko¹, Takeshi Yamamoto¹, Ken-ichi Lee³, Akio Noguchi², Sunao Iyoda³, Toshio Sato², Yoshitoshi Ogura¹ (¹Div. Microbiol. Dept. Infect. Med. Kurume Univ. Sch. Med., ²Japan Microbiological Laboratory Co., Ltd., ³Dept. Bacteriology I, National Inst. Infectious Diseases)

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、下痢や出血性大腸炎、溶血性尿毒症候群 (HUS) や脳症などの重篤な合併症の原因となる。様々な血清型の株が問題となるが、国内では O157:H7, O26:H11, O111:H8 が多い。主な病原因子は志賀毒素 (Stx) である。Stx には抗原性の異なる Stx1 と Stx2 が存在し、さらにそれぞれが少なくとも 3 種類 (Stx1a, Stx1c, Stx1d) と 15 種類 (Stx2a-Stx2o) のサブタイプに分類されている。STEC はこれらのサブタイプを単独もしくは複数保持する。Stx は出血性大腸炎や重篤な合併症の発症に深く関与するが、特に Stx2a 産生性は重症化リスク因子の一つとして知られている。また、STEC には LEE 領域にコードされた 3 型分泌装置を保持する株が存在し、LEE 陽性株は LEE 陰性株に比べて重症化率が高い。一方、食品取扱従事者の検便検査では、被験者の約 0.03% が STEC を健康保菌していることが判明している。しかし、健康保菌者由来と有症者由来株のゲノムや病原因子の違いは未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、健康保菌者由来 STEC のゲノム特性の解明を目的として、STEC 検便分離株の大規模ゲノム解析を実施した。2021 年に分離された STEC 計 495 株のゲノム配列を決定した。in silico 血清型別の結果、O156:H25 (67 株)、次いで O174:H21 (38 株) と O105:H7 (30 株) の血清型の株が多く、O157:H7 は 2% のみであった。stx サブタイプは、stx1a が 195 株と最も多く、次いで stx2f (73 株)、stx2c (62 株)、stx2e (53 株) が多かった。stx2e 陽性株はブタの浮腫病の原因となるが、ヒト患者から分離されることは稀である。また、LEE 陽性株は 36.77% であった。現在、系統解析やその他病原因子と薬剤耐性遺伝子の解析などを進めている。

DP2-14-07/P2-084

浴室環境から分離された非結核性抗酸菌株のマルチゲノミック解析

○猪飼 まりえ¹, 西内 由紀子², 藤吉 奏², 丸山 史人², 港 雄介¹ (¹藤田医科大学・医・微生物学, ²広島大・環境遺伝生体学)

Functional Genomic Characterization of Nontuberculous Mycobacteria from Bathroom Environments

○Marie Ikai¹, Yukiko Nishiuchi², So Fujiyoshi², Fumito Maruyama², Yusuke Minato¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., ²Dept. Microbial Genomics and Ecology, Hiroshima Univ.)

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は近年、先進諸国を中心に患者数が急増している。NTM 感染症の中でも *Mycobacterium avium* complex (MAC) に起因する肺 MAC 症の感染者が約 8 割を占めている。我が国で MAC は、浴室環境から高頻度に検出される。しかし浴室に定着した MAC がどの程度、人の呼吸器に感染し、肺 MAC 感染症を引き起こすのかは明らかにされていない。

そこで本研究は、浴室環境から分離された MAC のゲノム特性を調べる目的で、機能ゲノム解析および既知臨床分離株との比較解析を実施した。

まず浴室から採取した 16 種類の *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* (MAH) 株から、トランスポゾンシーケンス (Tn-seq) 法で必須遺伝子解析を行うために、トランスポゾン (Tn) ライブラリを高効率に作製できる MAH 株のスクリーニングを行った。一般的にマイコプラズマ属の Tn 変異株の作製は、マイコプラズマファージ phAE180 を用いてマリナートランスポゾンを導入する方法が用いられるが、MAC では本法による Tn 変異株の作製効率性が結核菌に比べ、低いと報告されている。スクリーニングの結果、高効率に Tn ライブラリ作製ができる株としてシャワーヘッドから単離した OCU683 株を選定した。本株の完全ゲノム配列決定を PacBio Revio の HiFi リードにて行い、その結果 5,355,563bp と 18,943bp の環状 DNA を得た。次に本株にマリナートランスポゾンを導入し、約 40 万個の Tn 変異株コロニーを得た。得られたコロニーからまとめてゲノム DNA を抽出し、Tn 隣接部位を PCR で増幅したのち、Illumina NextSeq 2000 を用いてシーケンスを行った。本発表では OCU683 株の Tn-seq 解析を用いた必須遺伝子解析と、臨床分離株との比較解析の結果を報告する。

DP2-14-08/P2-085

比較ゲノム解析による ESBL 産生 *Aeromonas hydrophila* の耐性遺伝子伝播機構の解明

○奥野 未来¹, 杉山 美千代², 星子 裕貴¹, 山本 武司¹, 浅井 鉄夫², 小椋 義俊¹ (¹久留米大・医・感染医学, ²岐阜大・連合獣医)

Genome analysis reveals mechanisms of resistance gene transfer in ESBL-producing *Aeromonas*

○Miki Okuno¹, Michiyo Sugiyama², Yuki Hoshiko¹, Takeshi Yamamoto¹, Tetsuo Asai², Yoshitoshi Ogura¹ (¹Dept. Infectious Med., Kurume Univ. Sch. Med., ²United Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

河川などの環境から分離される細菌の薬剤耐性化に関わる遺伝的・環境的因子の理解は多剤耐性菌の制御に繋がると期待される。*Aeromonas* 属は淡水域およびその周辺の土壌や魚介類などに広く分布する環境菌であり、ヒトに対して腸管感染症、創傷感染症などを引き起こす。また、基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (Extended Spectrum beta (β)-Lactamase, ESBL) を獲得し、耐性化することが知られている。本研究では岐阜県の伊自良川において 2018 年 4 月-2019 年 11 月の間に分離された ESBL 産生 *A. hydrophila* のゲノムの特性および耐性遺伝子の獲得・維持に関わる機構を明らかにすることを目的として、11 株の全ゲノムシーケンスデータを取得し、比較ゲノム解析を実施した。

Oxford nanopore および Illumina シークエンサーにより得られたデータを用いて完全長ゲノムを決定したところ、全ての株で染色体上の同一の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子を含む外来由来のカセットが挿入されていることが確認された。各株の挿入カセットの配列長は 24-75 kbp と株間で差異が見られたが、*bla*_{VEB-3} を含む 13-15kbp の配列は分離時期や系統関係が離れた株においても高度に保存されていた。岐阜県の河川由来株で見られた挿入位置は公共データベース上のゲノム配列においても外来配列の挿入が確認され、挿入のホットスポットであると考えられた。耐性遺伝子をコードする外来配列が染色体に挿入することで菌体内で安定的に維持され、河川環境から継続的に ESBL 産生菌が分離されるようになったことが示唆された。

DP2-14-09/P1-078

Acceptability of *Escherichia coli* for IncF plasmids encoding antimicrobial-resistance genes

○林 謙吾¹, 鈴木 匡弘¹, 土井 洋平^{1,2,3} (¹藤田医科大・医・微生物, ²藤田医科大・医・感染症, ³ピッツバーグ大・医・感染症)

○Kengo Hayashi¹, Masahiro Suzuki¹, Yohei Doi^{1,2,3} (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., ²Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Fujita Health Univ., ³Div. Infect. Dis., Sch. Med., Pittsburgh Univ.)

Antimicrobial-susceptible (AMS) *Escherichia coli* is popular bacteria isolated from urinary tract infections and bloodstream infections. These bacteria will become antimicrobial-resistance (AMR) organisms via plasmids encoding AMR genes (R-plasmid). A major replicon type of R-plasmid in *E. coli* is IncF, and IncF plasmids containing extended-spectrum β -lactamase gene are frequently detected worldwide. In contrast, there are some *E. coli* sequence types (STs) have few AMR strains, however the mechanism for this and prevalence in clinical isolates are unclear. Investigating these processes is key to gaining insight into the acceptability and defense system associated with IncF R-plasmids in *E. coli*. As a first step, we identified *E. coli* strains defensive against the IncF R-plasmids from clinical isolates of AMS *E. coli*. Forty-eight cephem-susceptible *E. coli* strains were collected as “AMS *E. coli*”, and conjugation experiments were performed using these strains as recipients and β 3914, diaminopimelic acid requiring mutant, as a donor. Calculating conjugation rates revealed 14 isolates with low rates, additionally a tendency for the inclusion of a certain ST among these isolates. These results suggest that this ST may impede IncF R-plasmids acquisition. In further study, we will analyze what causes this *E. coli* ST to reject IncF R-plasmids by transposon random mutagenesis.

DP2-14-10/P1-079

緑膿菌による Pf4 プロファージの膜小胞を用いた DNA 伝達

○奥村 春樹¹, 武縄 聡², 高野 壮太郎², 菅野 美月³, 二又 裕之^{1,3,4}, 岡本章玄², 田代 陽介^{1,3} (¹静大院・総合科技, ²NIMS.MANA., ³静大院・創造, ⁴静大・グリーン研)

DNA transfer by *Pseudomonas aeruginosa* using membrane vesicles of Pf4 prophage

○Haruki Okumura¹, Satoshi Takenawa², Soutaro Takano², Mizuki Kanno³, Hiroyuki Futamata^{1,3,4}, Akihiro Okamoto², Yosuke Tashiro^{1,3} (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ²NIMS.MANA., ³Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ⁴Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

細菌は脂質膜で構成された 20-400 nm の微粒子である膜小胞を放出する。膜小胞は、バイオフィーム形成、細胞間コミュニケーションなど、様々な生物学的機能を有している。近年、膜小胞内に内包される DNA が注目されており、遺伝子水平伝播への寄与が示唆されているものの、その詳細は不明である。我々はこれまでに緑膿菌 PAO1 株の膜小胞内に着目し一粒子解析を行ったところ、線状プロファージの一種である Pf4 ファージの DNA が膜小胞内に存在することを見出した。そこで、Pf4 ファージが進化の過程で膜小胞を用いて宿主域を拡張したと仮説し、本研究では膜小胞を介した Pf4 ファージの遺伝子水平伝播の検証と機構解明を目的とした。PAO1 野生株から膜小胞を抽出しリアルタイム PCR を行ったところ、膜小胞内部に Pf4 DNA が検出された。Pf4 ファージは PAO1 株にプロファージとして存在し、外皮タンパク質を用いて環境中に放出され、PAO1 の内膜から伸長する繊毛 (Pili) の先端に Pf4 ファージが結合し、細菌への感染を開始する。本研究では、PAO1 株から Pf4 領域と繊毛の主要タンパク質 (PiliA) を欠損した変異株 (Δ pilA Δ Pf4) を作製し、Pf4 ファージの感染を阻害することをブラックアッセイ法により証明した上で、Pf4 ファージが膜小胞を介して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、 Δ pilA Δ Pf4 に PAO1 野生株から抽出した膜小胞を添加して培養した結果、Pf4 DNA が受容菌内で検出された。以上の結果から、Pf4 はファージ外殻だけではなく膜小胞を媒体としても遺伝子水平伝播を行うことが示された。

DP2-14-11/P1-080

細胞膜状態変化が促進する膜小胞を介した遺伝子水平伝播

○江里 聡一郎¹, 菅野 美月², 二又 裕之^{1,2,3}, 田代 陽介^{1,2} (¹静大院・総合科技, ²静大院・創造, ³静大・グリーン研)

Horizontal gene transfer through membrane vesicles facilitated by changes in cellular membrane state

○Soichiro Eri¹, Mizuki Kanno², Hiroyuki Futamata^{1,2,3}, Yosuke Tashiro^{1,2} (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ³Res. Inst. Green. Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

遺伝子水平伝播 (Horizontal gene transfer: HGT) は細菌の環境に対する適応や進化において重要な役割を担っている。現在 HGT の種類としては形質転換、形質導入、接合伝達が多く認識されているが、上記 3 種に次ぐ第 4 の機構として、細菌が放出する細胞外微粒子である膜小胞を介した HGT が注目されている。膜小胞を介した伝達は特に実環境中での HGT の理解に重要であると考えられているが、細菌が膜小胞を取り込むメカニズムやそれに関わる重要な因子は未だに解明されていない。そこで、受容菌の膜の状態が膜小胞の取り込みに大きく寄与していると仮説を立て、膜の状態と膜小胞の取り込みの関係性から小胞伝達の機構解明を目的とした。本研究では、抗生物質の耐性遺伝子または *gfp* 遺伝子をマーカーとし、膜小胞を介した HGT の検証を行った。大腸菌 BW25113 株においては、二重膜小胞を形成し膜小胞内のプラスミドのコピー数が増加すると言われている *nlpI* 欠損株を用いた。BW25113 Δ *nlpI*/pEGFP (アンピシリン:Amp 耐性) から得た膜小胞を外膜 (OM)・ペプチドグリカン (PG)・内膜 (IM) の架橋に関わる TolA をコードする遺伝子を欠損させた BW25113 Δ *tolA::Km* (カナマイシン:Km 耐性) に添加し、CaCl₂ を含む液体培地で静置培養を行い、Amp,Km 添加培地で選択したところ蛍光のコロニーが得られ HGT が示された。以上の結果から CaCl₂ による細胞膜の透過性の向上や OM・PG・IM の架橋欠損による膜の湾曲性の増加が膜小胞を介した HGT に関与することが示唆された。

DP2-14-12/P1-081

Evolutionary process of *Streptococcus dysgalactiae* genome, with host switching

○村瀬 一典, 柘植 亮佑, 野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大・医・微生物)

○Kazunori Murase, Ryosuke Tsuge, Atsuko Minowa-Nozawa, Takashi Nozawa, 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 further classified into the two subspecies; equisimilis (SDSE), and dysgalactiae (SDSD). Especially in the SDSE, this subspecies often causes necrotizing fasciitis and bacteremia, 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 729 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* intra-specific evolutionary processes with host switching.

DP2-14-13/P1-082

プラスミドが接合伝達する細菌を塩基配列の特徴から予測する

○徳田 真穂¹, 敦賀 俊太², 前田 壮³, 山崎 凜³, 水口 千穂⁴, 野尻 秀昭⁴, 金原 和秀^{1,2,3}, 新谷 政己^{1,2,3,5} (1)静大院・創造, (2)静大院・総合科技, (3)静大・工, (4)東大院・農生科, (5)静大・グリーン研)

Predicting the bacteria acquired the plasmid by conjugative transfer based on nucleotide sequences

○Maho Tokuda¹, Shunta Tsuruga², So Maeda³, Rin Yamazaki³, Chiho Minakuchi⁴, Hideaki Nojiri⁴, Kazuhide Kimbara^{1,2,3}, Masaki Shintani^{1,2,3,5} (1)Grad. Sch. Shizuoka Univ., (2)Grad. Sch. Shizuoka Univ., (3)Fac. Eng. Shizuoka Univ., (4)Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, (5)Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは、接合伝達による水平伝播を介して、遺伝子の伝播に伴う急速な細菌の進化や、環境への適応を可能にする。そのため、環境中でのプラスミドの接合伝達現象は重要である。しかし、どの細菌がどのプラスミドを受け取るのか、という情報を網羅的に得ることは困難である。そこで、本研究ではまず、接合実験によって、全塩基配列が既知のプラスミド・細菌間での接合伝達の可否の情報を収集した。その後、プラスミドと染色体のゲノム配列から、プラスミドを受け取ることのできる細菌を予測できるかどうか検証した。接合実験には、塩基配列解読済みの異なる14種類のプラスミドをそれぞれ保持する供与菌と、5門10綱42科に分類される、染色体配列が解読済みかつ培養可能な125株の細菌を1種類ずつ受容菌として用いた。1750通りの接合実験により、プラスミドを受け取った767の「接合完了体」と受け取らなかった983の「非接合完了体」に分別した。次に、プラスミドと受容菌染色体の塩基配列を用いて、k-mer組成(k連続塩基の出現頻度, k=2,3,4)の類似度を算出したところ、プラスミドと染色体の類似度は、「接合完了体」の方が「非接合完了体」よりも有意に高かった。さらに、宿主域未知のプラスミドpYKAS102について、14種類のプラスミドの接合実験の結果と、塩基組成の情報の双方を用いたランダムフォレストによる予測を行った。並行して、125株との接合実験によって接合伝達の可否を同定した。その結果、79% (99/125株)の受容菌に対する接合伝達の可否と予測結果が一致した。以上の結果より、プラスミドと細菌染色体の塩基配列情報を用いて、プラスミドを受け取る細菌を予測可能であると示唆された。

DP2-14-14/P1-083

Upstream genetic structures of AMR genes and its utilization for presuming AMR plasmids

○平井 到¹, 屋宜 宣慶² (1)琉球大・医・保・病原体検査学, (2)琉球大・医・保・生理機能検査学)

○Itaru Hirai¹, Nobuyoshi Yagi² (1)Lab. Microbiol., Sch. Health Sci., Fac. Med., Univ. of the Ryukyus, (2)Lab. Clin. Physiol., Sch. Health Sci., Fac. Med., Univ. of the Ryukyus)

There are many modifications on plasmids during their transportation. Especially, region(s) where AMR genes are crowded and in row(s) could often be altered by insertions, deletions, recombinations, etc. These make it difficult to presume plasmid(s) by using ORF of AMR genes. Previously, we established upstream genetic structure (UGS) analysis to classify *bla*_{CTX-M} based on their locations. In this study, we evaluated whether the UGS analysis could be applicable to presume plasmid(s) harboring AMR genes. Total of 9,048 plasmid sequences were subjected to in silico UGS analysis to characterize UGSs of the top 30 detected AMR genes. Our in silico UGS analysis indicated that there were many insertions by Insertion Sequence (IS) species and other AMR gene(s), and that UGSs could be used for classification of AMR genes other than *bla*_{CTX-M}. We selected four plasmid sequences and extracted UGSs and ORFs of all AMR genes in the four plasmid sequences and run the BLAST search using ORFs or UGSs of the AMR genes. Consequently, the BLAST search indicated that utilization of the UGSs of the AMR genes were advantageous to presume AMR plasmid sequences than the BLAST search using ORFs as search keys. Taken together, our results suggested the UGSs of AMR genes can be used as search keys to presume AMR plasmid sequences in addition to classification of AMR genes based on their locations.

DP2-14-15/P1-084

Neisseria gonorrhoeae の分子型別解析推移と耐性遺伝子の動向

○大濱 侑季¹, 志牟田 健¹, 森田 昌知¹, 吉田 愛¹, 高橋 英之¹, 安田 満², 大西 真³, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細1, (2)礼医大・医・感制・臨檢, (3)沖縄衛研)

The Temporal Trends of Molecular Typing and Resistance Gene Dynamics in *Neisseria gonorrhoeae*

○Yuki Ohama¹, Ken Shimuta¹, Masatomo Morita¹, Ai Yoshida¹, Hideyuki Takahashi¹, Mitsuru Yasuda², Makoto Ohnishi³, Yukihiko Akeda¹ (1)Dept. Bact. 1., NIID, (2)SMU Med, Dept. Infection Control & Clinical Lab Med., (3)OPHE-IDRC)

淋菌感染症は *Neisseria gonorrhoeae* を原因菌として尿道炎や子宮頸管炎を主徴とする。Ceftriaxone (CTRX) が第一選択薬として使用されているが、2009年に国内で初めてCTRX耐性淋菌(*penA*-60, ST1903)が分離されたことから、臨床サンプルから分離された淋菌を用いた動向調査を行っている。今回、2016年から2023年に分離された淋菌における遺伝子型と薬剤耐性因子の変遷を明らかにすることを目的として全ゲノム解析を実施した。日本国内から収集した淋菌感染症が疑われる臨床検体から、セアーマーチン寒天培地で培養後、淋菌1,711株を分離し、MiSeqを用いて全ゲノム解読を実施した。得られた全ゲノム情報を用いてCTRX耐性に関する*penA*遺伝子のモザイク変異を明らかにするとともに、分子タイピングとしてMLSTを実施した。また、全ての株で寒天平板希釈法にて4薬剤(Cefixime, Ciprofloxacin, Azithromycin, CTRX)の薬剤感受性試験を実施した。結果、4薬剤全てに感受性である390株中246株(64%)は、2019年まで最も分離頻度が高かったST9362であった。PBP2をコードする*penA*の遺伝子タイプは、全てのST9362でβラクタム剤感受性の非モザイク型*penA*-2であった。一方、2019年以降はST1588が増加傾向であり、91%がβラクタム剤耐性のモザイク型*penA*-10を保有していた。同様に近年増加傾向にあるST13841は全株モザイク型*penA*-101を保有し、また、ST13142においても全株モザイク型*penA*-34を保有していた。本研究では、国内で分離された淋菌株の新たな耐性クローンの出現は認められなかったが、モザイク型*penA*が増加傾向であるため、今後、全ゲノム情報を基盤とした系統解析や伝播経路の解析を行う予定である。

DP2-14-16/P1-085

腸管出血性大腸菌の病原性調節遺伝子の発現を制御する小分子RNAの網羅的解析

○須藤 直樹¹, 岡田 信彦², 三戸部 治郎¹ (1)杏林大・医・感染症学, (2)北里大・薬・微生物学)

Comprehensive analysis of small RNAs that control the expression of the virulence regulator in EHEC

○Naoki Sudo¹, Nobuhiko Okada², Jiro Mitobe¹ (1)Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ., (2)Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Kitasato Univ.)

腸管出血性大腸菌(EHEC)の多くは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三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によって一括的に制御され、*ler*の発現は多くの転写因子により制御されることが知られているが、*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)が知られており、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。これらの結果は、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を示唆する。

DP2-14-17/P1-086

病原性真菌 *Candida albicans* の核相変換関連遺伝子(*SPS1*)の適切な転写量は正常な増殖に必要である

○菅野 雅美, 岩口 伸一 (奈良女子大・理・生物学)

Appropriate transcription of *SPS1* of *Candida albicans* are necessary to normal growth

○Miyabi Sugano, Shinichi Iwaguchi (Dept. Biol. Sci, Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

ヒトの日見感染症の起原菌である *Candida albicans* は、通常は2倍体で存在しているが多倍体化する株の存在も確認されており、多倍体化を引き起こす原因として *SPS* (Suppressor of ploidy-shift) 遺伝子の変異の可能性が考えられている。多倍体化した表現型 (*Sps⁻*) を示す *STN21* 株と核相が一定である表現型 (*Sps⁺*) を示す *STN22* 株を比較すると、*STN21* 株では ORF6813 の転写量が上方制御されていた。この ORF6813 を *SPS1* 遺伝子と名付けた。*STN21* 株 (*Sps⁻*) 由来の *SPS1* をもつプラスミドを *STN22* 株 (*Sps⁺*) に形質転換すると表現型が *Sps⁺* から *Sps⁻* に変化し、形態異常、生育異常を引き起こした。そのため *SPS1* の転写量増加は多倍体化の原因の一つであり、細胞機能に影響する遺伝子であると考えられた。

本研究では *SPS1* の転写が細胞機能に及ぼす影響を調べるため、*SPS1* 遺伝子破壊株 (KO)、プロモーター (MAL) 置換株の作製をおこなった。KO 株は野生型に比べ、増殖速度の遅延、細胞の巨大化、細胞塊形成、多核化、偽菌糸様細胞などが観察された。そのため細胞増殖と酵母型細胞の形成に必要な遺伝子であることが示唆された。プロモーターを MAL2p に置換した株では、*SPS1* の発現を抑制・促進どちらの場合でも増殖速度の遅延や多極出芽した細胞塊が見られた。そのため、*SPS1* の発現量は過剰であっても抑制されても生育異常が生じ、細胞恒常性に関与する遺伝子であることが示唆された。

DP2-14-18/P1-087

国内流行型の溶血性レンサ球菌 SDSE が有する病原因子の探索

○小倉 康平^{1,2}, 木ノ嶋 航司³, 北村 仁美³, 岡本 成史^{2,3}, 秋山 徹⁴ (1)京都大・農・食品生物, (2)金沢大・新学術, (3)金沢大・医薬保・保健学, (4)国立国際医療研究センター・研究所)

Virulence factors of hemolytic streptococci SDSE strains prevalent in Japan

○Kohei Ogura^{1,2}, Koji Kinoshima³, Hitomi Kitamura³, Shigefumi Okamoto^{2,3}, Toru Akiyama⁴ (1)Div. Food Sci. Biotech., Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., (2)Inst. Front. Sci. Init., Kanazawa Univ., (3)Fac. Health Sci., Inst. Med. Pham. Health Sci., Kanazawa Univ., (4)Res. Insit., NCGM)

【背景と目的】β 溶血性レンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) 感染症は、*S. pyogenes* と同様に発症後死亡あるいは予後不良となる感染例が非常に多い一方で、糖尿病等の基礎疾患保持患者ならびに高齢者での症例が *S. pyogenes* と比較して顕著に多い。SDSE は、*S. pyogenes pyogenes* とは異なる固有の病原性発現機構を發揮すること、すなわち未知のものを含めた病原因子群の発現制御機構が存在することが示されている。本研究では、本邦で分離頻度が高い2つのグループ Clonal Complex (CC) 17 型ならびに 25 型の SDSE を対象として、各グループの病原発現機構を明らかにすることを目的とした。【結果と考察】CC17 型は、ヒト血清含有培地で高い接着性を示し、また一部のグラム陰性細菌に対して増殖抑制能を有していた。トランスクリプトーム解析の結果、CC17 型は他の型に見られないリプレッサーを保持していることが示された。次に CC25 型には、全ゲノムの Average Nucleotide Identity が 99.8% と高い同一性を示す一方で溶血活性が大きく異なる SDSE ベアが存在した。トランスクリプトーム解析の結果、2 ベア間で発現量が異なる機能未知タンパク質が病原性レギュレーターとして機能する可能性が考えられた。*本研究課題は、2022 年度科研費先進ゲノム支援のサポートにより実施しました。ご担当いただいた九州大学 林哲也先生、前野慎太郎先生 (当時) に感謝申し上げます。*

DP2-14-19/P1-088

New regulatory network via ArcAB and quorum sensing system of *Vibrio cholerae* biofilm formation

○JantCres Caigoy¹, 成谷 宏文², 島本 敏¹, 智群^{3,4}, 島本 整¹ (1)広島大・院・統合生命科学, (2)十文字学園女子大・人間生活・食品開発, (3)広島大・院・生物圏科学, (4)丸善製薬株式会社)

○JantCres Caigoy¹, Hirofumi Nariya², Toshi Shimamoto¹, Zhiqun Yan^{3,4}, Tadashi Shimamoto¹ (1)Grad. Sch. Int. Sci. Life, Hiroshima Univ., (2)Grad. Sch. Human Life Sci. Jumonji Univ., (3)Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ., (4)Res. Cent. Maruzen Pharm. Co. Ltd)

Vibrio cholerae utilizes the ArcAB system in response to shifts in respiratory conditions. Previously, we found that HapR mutations have significant effect on its biofilm formation under different oxygen conditions. This led us to speculate that ArcAB and quorum sensing system are playing a role in anoxic biofilm formation. We selected strains that produce robust biofilms under anoxia, constructed their respective isogenic *arcA* and *arcB* deletion mutants, and then performed the biofilm assay. Regulon analysis of putative ArcA-binding sites in the *hapR* promoter, followed by gel shift assay between phosphorylated ArcA (P-ArcA) and *hapR* promoter was also done. Then, gene expression of *hapR* and *hapA*, along with other biofilm-associated genes were evaluated. Results revealed that deletion of either *arcA* or *arcB* led to a significant decrease in the biofilms of intact HapR strains. Whereas variable biofilm formation was observed in HapR-deficient strains. Gel shift assay then showed direct binding of P-ArcA to the *hapR* promoter. Significant increase in *hapR* and *hapA* expression and significant reduction in biofilm-associated genes expression were observed in the *arcA* mutants of intact HapR strains. In this study, we have shown that P-ArcA promotes anoxic biofilm formation by repressing *hapR* transcription, a new regulatory network in the biofilm formation of the pathogenic *V. cholerae*.

DP2-15-01/P2-179

国産鶏肉から分離された薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の解析

○中島 瑠南¹, 桑野 玲奈¹, 松尾 朋香¹, 近藤 百香¹, 脇本 麗², 川野 光興¹ (1)中村学園大・栄養科学, (2)中村学園大・食物栄養)

Analysis of antimicrobial-resistant bacteria and drug-resistance genes from domestic chicken meat

○Runa Nakashima¹, Reina Kuwano¹, Tomoka Matsuo¹, Momoka Kondo¹, Rei Wakimoto², Mitsuoki Kawano¹ (1)Dept. Nutritional Sciences., Nakamura Gakuen Univ., (2)Div. Food and Nutrition., Nakamura Gakuen Univ. JC.)

【目的】近年、抗菌薬の汎用により薬剤耐性菌が増加し、臨床現場などで感染症の治療が困難になるケースが増えている。抗菌薬は動物への使用も多いことから、薬剤耐性菌は食品中からも多く検出されることが報告されている。本研究では福岡市の小売店で販売されている鶏肉から分離した薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の解析を行った。【方法】購入した鶏肉 20 検体、各 10 g を 90 ml の緩衝ペプトン水と混合し 1 分間ストマッキング処理を行った後、37°C で 24 時間静置培養した。その後 2 μg/ml セフトキシム (CTX) 含有クロモアガー ECC 寒天培地に培養液を 10 μl 塗布し、37°C で 24 時間静置培養後に現れたコロニーを 1 検体につき各 2 個解析した。その後、懸濁したコロニーを用いて、シカジーニマス マルチプレックス PCR キットを使用して ESBL 遺伝子と AmpC 遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動にて遺伝子型を決定した。また、複数の鑑別ディスクを用いて ESBL と AmpC 産生菌の薬剤感受性を調べた。【結果】ESBL 遺伝子型の決定では鶏肉 20 検体の内 10 検体から ESBL 産生遺伝子 (*bla* CTX-M, *bla* TEM) を保持する菌が計 12 株検出された。この内、11 株が大腸菌、1 株が肺炎桿菌であった。また、この 12 株において、IncFII と IncFIB が 7 検体、IncN が 1 検体検出された。AmpC 遺伝子型の決定では鶏肉 20 検体の内 14 検体から 22 株検出された。【考察】今回の結果から、国産鶏肉には高率に薬剤耐性菌が存在していた。食事を介して薬剤耐性菌が体内に入り定着し、抗菌薬の効果が減弱するなどヒトの健康への影響もあると考えられる。

DP2-15-02/P2-180

腸疾患患者から採取した腸粘液を用いた ESBL 産生遺伝子の探索

○脇本 麗¹, 鹿志毛 里帆², 鳥居 桃子², 手島 架², 塩谷 昭子³, Tingting Gu³, 中島 瑠南², 川野 光興² (1中村学園大短大・食物栄養, 2中村学園大・栄養科学, 3川崎医科大・消化器内科)

Identification of ESBL genes using intestinal mucus samples from intestinal disease patients

○Rei Wakimoto¹, Riho Kashige², Momoko Shimai², Kakeru Teshima², Akiko Shiotani³, Tingting Gu³, Runa Nakashima², Mitsuki Kawano² (1Div. Food and Nutrition, Nakamura Gakuen Univ. Junior College, 2Dept. Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen Univ., 3Dept. Gastroenterology and Hepatology, Sch. Med., Kawasaki Univ.)

近年, 基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌などによる院内感染が問題となっている。本研究では, 腸疾患患者由来の腸粘液から ESBL 産生遺伝子の検出を行い, 患者が腸管内に保菌している細菌由来の ESBL 遺伝子の遺伝子型の判定およびその保有率を調査することを目的とした。川崎医科大学にて 2021 年に採取された腸疾患 (CD: クロウン病, UC: 潰瘍性大腸炎, IBS-C: 過敏性腸症候群・便秘型, IBS-D: 過敏性腸症候群・下痢型) 患者の回腸および S 状結腸由来の腸粘液 DNA サンプル 42 名 (男性 18 名, 女性 24 名) の検体 (グループ 1) と, 2015 年~2016 年に採取された腸疾患 (CD, UC, IBS-D, IBS-M: 過敏性腸症候群・混合型, EGID: 好酸球性消化管疾患, Control, その他の疾患) 患者の回腸由来の腸粘液 DNA サンプル 41 名 (男性 21 名, 女性 20 名) の検体 (グループ 2) を対象とし, シカジーニクス ESBL 遺伝子検出キットを用いて PCR により遺伝子の検出を行った。グループ 1 では, 検査対象 42 名のうち 7 名 (16.7%), グループ 2 では, 検査対象 41 名のうち 31 名 (75.6%) の検体で ESBL 産生遺伝子が検出された。グループ 1 では, 回腸と S 状結腸で検出された遺伝子型は必ずしも一致しておらず, 部位によって薬剤耐性菌の定着状況に差異がみられた。また, 疾患別の ESBL 産生遺伝子保有率は, グループ 1 で IBS-C が最も高かった (75%)。これは, 感染性腸炎治療での抗菌剤使用による薬剤耐性菌の獲得によるものと示唆される。現在, 腸疾患患者の便検体から ESBL 遺伝子の検出を進めている。

DP2-15-03/P2-181

Analysis of the amikacin resistance factor of carbapenem-resistant *Escherichia coli* AUH-256

○横山 雛子¹, 森下 愛月¹, 坂口 翔一², 中野 隆史², 中田 裕二¹ (1藍野大・医療保健, 2大阪医科薬科大・医・微生物学・感染制御学)

○Hinako Yokoyama¹, Azuki Morishita¹, Shoichi Sakaguchi², Takashi Nakano², Yuji Nakada¹ (1Fac. Healthcare Sci., Aino Univ., 2Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ.)

Background: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) are known to exhibit resistance even to non-carbapenem antibacterial drugs. In general, the use of single antibiotics is limited to certain drugs, such as colistin and tigecycline. In addition, most of the CRE currently detected in Japan are characterized by their sensitivity to amikacin, an aminoglycoside antibacterial drug.

We previously conducted a molecular epidemiological analysis of carbapenem-resistant *E. coli* detected in medical facilities in northern Osaka Prefecture, among which we identified a strain that had developed resistance to multiple drugs, including amikacin.

Methods: We examined *E. coli* AUH-256, which exhibited resistance to different classes of antibacterial drugs, including meropenem, amikacin, levofloxacin, and minocycline. Aminoglycoside resistance genes were predicted by de novo analysis using NGS, and the amikacin resistance factor of this strain was determined by cloning the target genes.

Results: Whole-genome sequence analysis showed that strain AUH-256 was carbapenem-resistant *E. coli* carrying *bla*_{IMP-6} on its plasmid. Furthermore, the strain possessed multiple aminoglycoside resistance genes, and the cloning of each gene revealed that *aac6'-Iae*, which was previously reported only in *Pseudomonas aeruginosa*, was the main factor contributing to amikacin resistance.

DP2-15-04/P2-182

Antimicrobial resistance of *emm89 Streptococcus pyogenes* isolates from patients throughout Japan

○Weichen Gong¹, 大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也^{1,2}, 元岡 大祐³, 広瀬 雄二郎¹, 奥野 ルミ⁴, 池辺 忠義⁵, 川端 重志¹ (1阪大・歯・微生物, 2阪大・歯・バイオインフォ, 3阪大・微研・ゲノム解析, 4東京健安研セ・微生物, 5感染研・細菌一部)

○Weichen Gong¹, Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi^{1,2}, Daisuke Motooka³, Yujiro Hirose¹, Rumi Okuno⁴, Tadayoshi Ikebe⁵, Shigetada Kawabata¹ (1Dept. Microbiol. Sch. Dent., Osaka Univ., 2Dept. Info., Sch. Dent., Osaka Univ., 3NGS Core Facility, RIMD, Osaka Univ., 4Dept. Microbiol., Tokyo Metropolitan Inst. of Public Health, 5Dept. Bacteriol. I., NIID)

Streptococcus pyogenes is involved in a wide range of diseases including pharyngitis and life-threatening invasive infections. Increasing antimicrobial resistance (AMR) has been reported worldwide for various bacteria, which limits antibiotics use for infection cases. The present study investigated the AMR of *S. pyogenes emm89* strains, which have recently shown an increasing trend in Japan. Examined were 311 *emm89* strains previously isolated from patients with invasive and non-invasive infections throughout Japan. Following the Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, the minimum concentrations of six antibiotics, including penicillin-G, azithromycin (AZM), and clindamycin (CLI), for inhibition of the isolates were determined. In addition, genomes for AMR-associated genes were screened using the ARIBA software tool. Thirty-two AMR strains were identified, of which 84.38% showed resistance to AZM and/or CLI. Furthermore, there was a significantly higher correlation of non-invasive as compared to invasive infections showing AMR. Genomic analysis revealed a wide distribution of three genes related to AMR, *ermT*, *folP*, and *lmrP*, in the *emm89* strains. The high prevalence of *S. pyogenes* bacteria resistant to AZM and/or CLI poses a threat to public health in Japan, thus development of next-generation antimicrobial therapy is urgently needed.

DP2-15-05/P2-183

腸炎ビブリオにおける RND 型多剤排出ポンプ VmeJK の Mg²⁺要求性の解析

○村上 梨乃¹, 國光 綾美¹, 森田 大地², 熊谷 孝則², 黒田 照夫² (1広島大・薬, 2広島大・医系科学・微生物薬品)

Mg²⁺ requirement in VmeJK, an RND multidrug efflux pump, in *Vibrio parahaemolyticus*

○Rino Murakami¹, Ayami Kunimitsu¹, Daichi Morita², Takanori Kumagai², Teruo Kuroda² (1Sch. Pharm., Hiroshima Univ., 2Dept. Microbiol. Med., Sch. Med. Sci., Hiroshima Univ.)

腸炎ビブリオは海洋性細菌であり, 本菌の持つ RND 型多剤排出ポンプ VmeJK がその活性に Mg²⁺を必要とすることを私たちはこれまでに明らかにしている。排出活性に Mg²⁺を必要とする RND ポンプはこれまでに報告されておらず, その機構の解明は, 本菌の薬剤耐性機構および RND ポンプの理解に役立つと考えられる。本研究では, VmeJK の Mg²⁺非要求性変異体を取得し, Mg²⁺要求性の機構について解析を行った。腸炎ビブリオ AQ3334 から 12 個の RND ポンプ遺伝子を破壊した株にプラスミドを用いて *vmeJK* を導入し, Ethidium Bromide (EtBr) および低濃度 Mg²⁺含有培地で継代培養を行い, Mg²⁺非要求的に EtBr 耐性を示す株を分離した。分離された 7 株のプラスミドのシーケンス解析を行い, 遺伝子変異 (VmeJ V213A, VmeK D189E, VmeK E754K, *vmeJ* 開始コドン上流 10 bp での A 挿入) を見出した。*vmeJK* 上に遺伝子変異が確認された 4 株の Mg²⁺非存在下での最小生育阻止濃度 (MIC) は, 野生型 VmeJK を持つ株と比較して, EtBr では上昇しなかったが他の基質であるエリスロマイシンでは 4~8 倍上昇し, 変異により VmeJK の Mg²⁺要求性が低下した可能性が示唆された。さらに, *vmeJ* 開始コドン上流への 1 塩基挿入が確認された 3 株では, 高濃度 Mg²⁺で EtBr を含む合計 5 つの基質に対して野生型 VmeJK 株より 4~8 倍大きい MIC が測定された。また, これら 3 株では Mg²⁺要求濃度未満である 0~3 mM Mg²⁺存在下で ethidium 排出活性が確認され, *vmeJ* 開始コドン上流での 1 塩基挿入により Mg²⁺が活性に不要になることが示唆された。

DP2-15-06/P2-184

薬剤耐性アシネトバクター属菌に感染するバクテリオファージの単離と解析

○田村 あずみ^{1,2,3}, 中村 暢宏¹, Aa Haeruman Azam¹, 千原 康太郎¹, 小島 新二郎¹, 崔 龍洙⁴, 渡士 幸一¹, 高橋 宜聖¹, 四柳 宏^{2,3}, 氣賀 恒太郎^{1,4} (1国立感染症研・治フク, 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, 4自治医科大・医・細菌学)

Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting Drug-Resistant *Acinetobacter* Species

○Azumi Tamura^{1,2,3}, Tomohiro Nakamura¹, Aa Haeruman Azam¹, Kotaro Chihara¹, Shinjiro Ojima¹, Longzhu Cui⁴, Koichi Watashi¹, Yoshimasa Takahashi¹, Hiroshi Yotsuyanagi^{2,3}, Kotaro Kiga^{1,4} (1Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dept. Comp. Biol. Med. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Univ. of Tokyo, 3Div. Infect. Dis., Inst. Med. Sci., Univ. of Tokyo, 4Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

アシネトバクター属細菌は、自然環境中に広く存在するグラム陰性桿菌である。薬剤耐性を獲得しやすく、乾燥した表面でも長期間生存できることから、院内感染の原因菌となっている。抗菌薬の代替としてバクテリオファージを利用した治療法（ファージ療法）が期待されており、多剤耐性アシネトバクター感染症に対する成功例も報告されている。一方で、アシネトバクター属細菌に感染するファージは、大腸菌など他のグラム陰性細菌と比べて単離数が少ない。また、*A. baumannii*（アシネトバクター・パウマニ）はヒトの感染症を引き起こすことが知られているが、*A. calcoaceticus*（アシネトバクター・カルコアセチカス）や *A. nosocomialis*（アシネトバクター・ノソコミアリス）等と生化学的性状が似ているため菌株同定が難しく、アシネトバクター・コンプレックスとして報告されている。ファージ療法に向けて、*A. baumannii* だけでなく他の菌株に対するファージも単離することが重要である。そこで本研究では、臨床分離株を用いてアシネトバクターに感染できるファージの単離と解析を進めた。これまでに、東京都の下水からアシネトバクターに感染するファージを 100 個以上単離した。中には *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* に広く感染できるファージが見つかった。また、360 kb ほどのゲノムを持つジャンボファージが採取でき、莢膜ではなく線毛を認識する特徴的なファージであることが分かった。他にもゲノム解析や宿主域の調査等、基礎的な解析の結果を報告する。

DP2-15-07/P2-186

Evaluation of the bactericidal effect of bacteriophages on food products

○川野 光興¹, 一野 暁穂¹, 河路 英里¹, 吉田 夏乃葉¹, 中島 瑠南¹, 脇本 麗² (1中村学園大・栄養科学・食品微生物, 2中村学園大学・短大・食物栄養)

○Mitsuoki Kawano¹, Akiho Ichino¹, Eri Kawaji¹, Nanoha Yoshida¹, Runa Nakashima¹, Rei Wakimoto² (1Dept. Nutritional Sci., Nakamura Gakuen Univ., 2Div. Food and Nutrition, Junior College, Nakamura Gakuen Univ.)

Purpose: Our group isolated 12 ESBL-producing bacteria from chicken meat, and searched for bacteriophages that infect and lyse these ESBL-producing bacteria, and verified their bactericidal effect on food products.

Methods: Sewage sample and ESBL-producing bacteria culture were mixed, and plaque formation experiments were carried out using the double layered agar method. In the liquid culture experiment, MOI 100~0.0001 and no phage conditions were used and OD₆₁₀ were taken every 30 minutes to generate a growth curve. Chicken meat, rice, and processed cheese were used as foods. Host bacteria were applied to the foods and coated with phage solution and incubated overnight at 28°C. The diluted bacterial solution was applied to LB plates containing cefotaxime (2 µg/ml) and incubated at 37°C overnight.

Results: Phage infecting 10 out of 12 ESBL-producing bacteria were isolated. Since the plaques of φ13-1 were large and highly transparent, we prepared a high-titer phage solution of φ13-1 and performed the infection experiment in liquid culture. MOI=1 and MOI=0.01 showed low cell density after 24 h incubation. On cheese, the culture medium with phage showed 6.0×10^5 cfu/ml, while the medium without phage showed 2.3×10^7 cfu/ml, indicating a 97.3% reduction of ESBL-producing bacteria. Chicken and rice did not prove the bactericidal effect of phage in this condition.

DP2-15-08/P2-187

Isolation and application of *Klebsiella pneumoniae* prophage with a broad host range

李 俊杰, ○宮永 一彦, ティティアナンバコン カネート, グエン ミン フォン, タン シンイー, ヴィーラナラヤナン スリワニ, 相羽 由詞, 笹原 鉄平, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

Junjie Li, ○Kazuhiko Miyanaga, Kanate Thitianapakorn, Minh Huong Nguyen, XinEe Tan, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, Teppei Sasahara, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is one of the threats because of its multidrug resistance and it makes chemotherapy difficult. Bacteriophage (phage) therapy is an alternative method against antibiotic-resistant pathogens. In this study, our focus was on applying phage with a broader host range to *K. pneumoniae*.

To obtain effective phages, 344 *K. pneumoniae* clinical strains were used for prophage induction by adding mitomycin C and 94 phages were isolated. Among them, 4 types of isolated prophage showed more than 20% of the host range by using 132 *K. pneumoniae* clinical strains. These phages were similar, and the genome size was ca. 54 kbp. To specifically target carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, phiKP77 with the broadest host range (ca. 33%) was selected for genetic engineering. Next, vector loading CRISPR-Cas13a system with the resistant-gene (*bla_{IMP}*) specific spacer was confirmed to kill the recombinant strain expressing the resistant gene. Then, the packaging site in the phiKP77 genome was inserted into this vector. This phagemid was transformed into *K. pneumoniae* strain integrated phiKP77. After induction by mitomycin C, the mixture of antibiotic capsid with the constructed phagemid and wildtype phiKP77 was obtained. To increase the efficiency of antibiotic-capsid production, the knockout of the packaging site in wild-type phage is needed for further study.

DP2-15-09/P2-188

Tailoring induce conditions for CRISPR-Cas13a loaded AB-Capsid and targeted killing of *S. aureus*

○Anujin Batbold, タン シンイー, ナヤンジン テレゲル, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 宮永 一彦, 笹原 鉄平, ヴィーラナラヤナン スリワニ, ティティア ナンバコン カネート, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Anujin Batbold, XinEe Tan, Tergel Nayanjin, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Teppei Sasahara, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitianapakorn, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The global rise in multi-drug resistant bacteria poses a significant challenge, concurrently there is a resurgence of interest in using bacteriophages as therapeutic and diagnostic applications. Our laboratory has previously pioneered the development of an antimicrobial capsid loaded with CRISPR-Cas13a (AB-capsid), which sequence-specifically kills target bacteria. However, achieving clinically relevant AB-capsids titers with therapeutic effectiveness remains a bottleneck. In this study, we identified the optimum concentration of mitomycin C (Mit C), a genotoxic agent used for the AB-capsid induction. Our results reveal that 0.4 µg/mL of Mit C is optimal, surpassing the conventionally used high concentration of 2 µg/mL, as it is less toxic and yields higher titers. This optimized strategy was applied for generating of AB-capsids targeting *S. aureus* accessory gene regulator (SA-CapsidCas13a-*agr*), resulting in an impressive yield of approximately 10^8 TFU/mL of SA-CapsidCas13a-*agr*, which were 10-100 times higher than previous methods. Furthermore, we confirmed the sequence-specific killing activity of SA-CapsidCas13a-*agr* against RN4220 carrying target *agr* genes. This study not only established the optimal Mit C concentration for generating high titer of AB-capsids but also demonstrated the sequence-specific killing capability of resultant AB-capsids against the target host.

DP2-15-10/P1-166

多剤耐性大腸菌に対するファージセラピーの検討

○遠山 茉奈¹, 大橋 春香¹, 中村 暢宏^{1,2}, 藤木 純平¹, 岩野 英知¹ (1)酪農学園大・獣医・生化学, (2)国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

Investigation of phage therapy against multidrug-resistant *Escherichia coli*

○Mana Tohyama¹, Haruka Ohashi¹, Tomohiro Nakamura^{1,2}, Jumpei Fujiki¹, Hidetomo Iwano¹ (1)Dept. Biochemistry, Sch. Veterinary, Rakuno Gakuen Univ., (2)Reserach Center for Drug and Vaccine Development, National Inst. Infectious Diseases)

抗生物質の不適切な使用により薬剤耐性菌が世界的に増加しており、効果的な対策を講じなければ 2050 年には年間死亡者数が 1000 万人を超える予測され、深刻な状況となっている。また、このような薬剤耐性菌の現状は獣医療においても同様であり、抗生物質だけに頼らない新たな治療法が求められており、バクテリオファージを利用したファージ療法が注目されている。そこで本研究では、再発を繰り返す難治性の大腸菌膀胱炎の猫に対して有効なファージを分離しファージカクテルの検討を行った。犬、猫の膀胱炎から分離された大腸菌臨床分離株と約 100 種類の下水を用い、23 株のファージを分離した。分離されたファージを用い、大腸菌臨床分離株 45 株に対して EOP, killing assay を行い、ファージの感染・溶菌性を比較した。宿主域が広い有用なファージのファージ耐性菌株を作成し、そのゲノム解析よりファージの受容体を特定し、ファージカクテルの設計を行った。

OmpA や LPS などファージ認識部位が異なる株を組み合わせたカクテルはそれぞれ単体で用いるより溶菌効果が高く、細菌のファージ耐性化に再増殖を抑制していた。大腸菌では LPS 認識ファージがファージカクテルの設計においては主軸となるが、LPS 合成酵素の変異を引き起こしやすく耐性化しやすい。そのため LPS 認識ファージだけではなく、膜タンパク認識ファージなどとカクテル化することでファージ耐性化を防ぐ効果が高いと考えられた。今後は認識部位や溶菌機序の異なるファージをさらに分離し、よりファージ耐性化に対応でき、溶菌効果の高いファージカクテルを構築していきたい。

DP2-15-11/P1-167

Isolation and characterization of broad host range bacteriophages infecting *Acinetobacter baumannii*

○Maniruzzaman, Adeline Yeo SyinLian, 相羽 由詞, Minh Huong Nguyen, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, XinEe Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Maniruzzaman, Adeline Yeo SyinLian, Yoshifumi Aiba, Minh Huong Nguyen, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyayama, XinEe Tan, Tepei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Multidrug-resistant *Acinetobacter* (MDRA) poses significant challenges in healthcare settings, contributing to the global public health concern of antimicrobial resistance (AMR). Our laboratory initiated a project to develop antimicrobial capsid (AB-Capsid) against *A. baumannii* by incorporating the CRISPR-Cas13a system into *A. baumannii* phage. To achieve this goal, a broad host range phage is required. The aim of this study is to isolate broad host range phages and characterize them both morphologically and genetically. A total of 144 *A. baumannii* strains were used for phage induction using Mitomycin C. By screening various concentration of Mitomycin C ranging from 0.5 to 12 µg/mL, we optimized the induction conditions. Then, 864 crude phage solutions were obtained. The host range of the crude phage solutions was evaluated using 144 *A. baumannii* clinical and MDRA strains. Eight broad-host-range phages were identified, exhibiting infection rates ranging from 23.5% to 35.2%. These phages were morphologically and genetically characterized by TEM and whole genome sequencing respectively. Isolated phage has the morphology of siphovirus family and the genome sequence revealed that one of the phages is a prophage carrying an integrase gene within its 28,091 bp long genome. The isolated prophage is intended to serve as a candidate CRISPR-Cas13a vector in future to develop AB-Capsid.

DP2-15-12/P1-168

岐阜県伊自良川上流域における基質拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分布

○中坪 知輝¹, 杉山 美千代², 浅井 鉄夫^{1,2} (1)岐阜大・院・共同獣医・応用獣医科学, (2)岐阜大・院・連合獣医・応用獣医科学)

Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the Ijira River

○Tomoki Nakatsubo¹, Michiyo Sugiyama², Tetsuo Asai^{1,2} (1)Dept. Appl. Vet. Sci., Jnt. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ., (2)Dept. Appl. Vet. Sci., Unit. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌による環境汚染の低減は重要な課題である。本研究では岐阜県を流れる伊自良川の上流域における河川内での ESBL 産生大腸菌汚染の実態を明らかにすることを目的として、ESBL 産生大腸菌の分布調査を実施した。伊自良川横にある食鳥処理施設の排水路が本流に合流する地点を 0m とし、上流 100m から下流 7000m にかけての 13 地点で 1 回、同区間の 13 ヶ所の流入口で 3 回採水をおこなった。水サンプルからセフォタキシム含有の DHL・TBX 培地を用いて大腸菌を分離し、ダブルディスク法によりスクリーニングした。ESBL 産生疑い株は同定後、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による系統解析に基づき選定した株について全ゲノムシーケンスにより血清型、ST 型および耐性遺伝子を特定した。本流由来 ESBL 産生大腸菌は 13 地点中下流 500m ~2500m 間の 5 地点で分離され、13 PFGE 型に分類された。流入口由来 ESBL 産生大腸菌は 13 ヶ所中 4 ヶ所の流入口から分離され、9 PFGE 型に分類された。流入口 3 では全 3 回の採水で ESBL 産生大腸菌が分離され、下流 500m 地点より上流に位置する流入口のうち ESBL 産生大腸菌が分離されたのは流入口 1 と 3 であった。流入口 3 で分離された 6 PFGE 型の ESBL 産生大腸菌のうち 2 PFGE 型は本流で分離され、O1:H15-ST2003-*bla*_{CTX-M-14} は耐性遺伝子型が一致したが、O25:H4-ST131-*bla*_{CTX-M-27} は一致しなかった。また、5 PFGE 型の ESBL 産生大腸菌が本流内の複数地点で分離され、そのうち O25:H4-ST131-*bla*_{CTX-M-27}, O9a:H25-ST58-*bla*_{CTX-M-27}, O174:H7-ST9479-*bla*_{CTX-M-55} は河川中を 2000m に渡って汚染していることが示唆された。

DP2-15-13/P1-169

Achromobacter xylosoxidans 基準株の薬剤耐性における RND 型多剤排出ポンプの役割

○菅野 瑞軌, 水澤 笑子, 目崎 彩実, 鴨志田 剛, 森田 雄二 (明治薬大・薬・感染制御)

Roles of RND multidrug efflux pumps on drug resistance of *Achromobacter xylosoxidans* type strain

○Mizuki Sugano, Emiko Mizusawa, Ayami Mezaki, Go Kamoshida, Yuji Morita (Dept. Infection Control Science., Sch. Pharm. Sci., Meiji Pharmaceutical Univ.)

【目的】ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌群 (NFGNRs) は、多くの抗菌薬に自然耐性を示すが、一部の菌種を除き薬剤耐性機構の詳細は、依然として不明である。そこで *Achromobacter xylosoxidans* 基準株の薬剤耐性における resistance nodulation cell division (RND) 型多剤排出ポンプの役割を分子遺伝学的に評価した。

【方法】*A. xylosoxidans* 基準株から、緑膿菌 PAO1 の抗菌薬耐性に関与する RND 型多剤排出系遺伝子に関する一連の遺伝子破壊株を相同組換え法により構築した。薬剤感受性は微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) により評価した。

【結果】*A. xylosoxidans* 基準株は、緑膿菌 PAO1 と比較して、ペニシリン系やカルバペネム系以外の、多くの系統の抗菌薬に低い感受性を示した。2 つの RND 遺伝子 (*axyB* と *axyY*) のいずれかの遺伝子または両遺伝子の欠失した変異株は、基準株と比較して、調べたすべての抗菌薬に高い感受性を示した。RND 型多剤排出ポンプ阻害剤 PAβN (Phenylalanyl arginyl β-naphthylamide) の併用による *A. xylosoxidans* 基準株の薬剤感受性上昇は、一部の薬剤に限定的であったが、イソキノリンアルカロイドの Berberine 併用時は、多くの抗菌薬 (特にアミノグリコシド) で感受性上昇が観察された。しかしながらその活性は、*axyY* 欠失株では消失した。更に、*axyY* の推定リプレッサー遺伝子 (*axyZ*) に、*axyY* 発現上昇に関与するミスセンス変異が観察された。

【考察】*A. xylosoxidans* 基準株の薬剤耐性に、RND 型多剤排出ポンプが関与することが示された。薬剤耐性機構の解析の進んでいる、緑膿菌などの NFGNRs と比較することで、NFGNRs の薬剤耐性機構の共通性と多様性の一端が明らかになった。

DP2-15-14/P1-170

Emergence of ciprofloxacin and penicillin resistant meningococcal isolates in Japan

○高橋 英之¹, 森田 昌知¹, 神谷 元², 福住 宗久³, 安田 満⁴, 大濱 侑季¹, 志牟田 健^{1,2}, 大西 真¹, 齋藤 良一⁵, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細菌1, (2)感染研・感染症疫学センター, (3)感染研・実地疫学研究センター, (4)札幌医大・感染制御・臨床検査医学, (5)東京医科歯科大・医歯学・分子病原体検査学)

○Hideyuki Takahashi¹, Masatomo Morita¹, Hajime Kamiya², Munehisa Fukusumi³, Mitsuru Yasuda⁴, Yuki Ohama¹, Ken Shimuta^{1,2}, Makoto Ohnishi¹, Ryoichi Saitoh⁵, Yukihiko Akeda¹ (1)Dept. Bacteriol 1, Nat. Inst. Infect. Dis., (2)Infect. Dis. Survei. Center, Nat. Inst. Infect. Dis., (3)Center Field Epi. Intel. Res. Pro. Develop., Nat. Inst. Infect. Dis., (4)Dept. Infect. Cont. Lab. Med., Sch. Med., Sapporo Univ., (5)Dept. Mol. Microbiol., Sch. Med. & Dent. Sci., Tokyo Med. & Dent. Univ.)

Since the antibiotic susceptibilities of *Neisseria meningitidis* isolates obtained in Japan remained unclear, 290 *N. meningitidis* isolates in Japan between 2003 and 2020 were examined for the sensitivities to eight antibiotics (azithromycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, chloramphenicol, meropenem and minocycline, penicillin and rifampicin). All isolates were susceptible to chloramphenicol, ceftriaxone, meropenem, minocycline and rifampicin while two were resistant to azithromycin. Penicillin- and ciprofloxacin-resistant and -intermediate isolates (PCG^R, CIP^R, PCG^I and CIP^I, respectively) were also identified. Based on our previous findings from whole genome sequence analysis, approximately 40% of PCG^I were associated with ST-11026 and cc2057 meningococci, both of which were unique to Japan. Moreover, the majority of ST-11026 meningococci were CIP^R or CIP^I. Sensitivities to PCG and CIP were closely associated with genetic features, which indicated that, at least for Japanese meningococcal isolates, PCG^{R/I} or CIP^{R/I} would be less likely to be horizontally conferred from other neisserial genomes by transferring of the genes responsible (*penA* and *gyrA* genes, respectively), but rather that ancestral *N. meningitidis* strains conferring PCG^{R/I} or CIP^{R/I} phenotypes clonally disseminated in Japan.

DP2-15-15/P1-171

IMP-6 保有菌の細菌学的・遺伝学的特徴の解析

○山口 晃一^{1,2}, 中野 竜一¹, 中野 章代¹, 鈴木 由希¹, 小川 美保², 坂田 竜二², 矢野 寿一¹ (1)奈良県立医科大・微生物感染症学, (2)株式会社ビー・エム・エル 細菌検査部)

Phenotypic and genetic characteristics of *bla*_{IMP-6} harbouring Enterobacteriaceae

○Koichi Yamaguchi^{1,2}, Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Miho Ogawa², Ryuji Sakata², Hisakazu Yano¹ (1)Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., (2)Dept. Bacteriol., BML Inc.)

【目的】カルバペネマーゼ産生腸内細菌目は、本邦では分離頻度が低いものの IMP 型が多くを占める。西日本では特に IMP-6 保有株が多く、そのほとんどが CTX-M-2 β-ラクタマーゼを同時保有して広域に耐性を示す。その特徴として接合伝達能が高く、菌種菌株を越えて拡散している。本研究では本邦で分離された IMP-6 保有株の細菌学的・遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】対象は本邦の 76 医療機関より分離された IMP-6 保有株 220 株とした。菌種同定は MALDI TOF-MS にて行った。薬剤感受性は CLSI に準拠した寒天平板希釈法にて測定した。耐性遺伝子の型別は PCR 法と DNA シーケンシングにて決定した。Inc グループは PCR 法にて決定した。耐性遺伝子の伝達性は大腸菌 J53 株を受容株として接合伝達実験にて評価した。遺伝子構造は Miseq (イルミナ), MinION (ナノポア) による次世代シーケンシング解析とサンガー法にて決定した。

【結果】CTX-M-2 グループ保有株が 203 株あり、IncN プラスミド上に IMP-6 と CTX-M-2 とを同時保有し、その多くが接合伝達した。CTX-M-2 グループ非保有株は 17 株あり、保有するプラスミドの Inc グループが多様であった。このうち接合伝達しなかった株が 11 株あり、10 株がプラスミド上に IMP-6 のみ保有していたが、他 1 株が IMP-6 と CTX-M-27 とを同時保有していた。接合伝達した株が 6 株あり、いずれも IncN プラスミド上に IMP-6 のみ保有しており、CTX-M-2 グループ保有株のプラスミド構造に類似していた。

【結論】これまで IMP-6 保有株は CTX-M-2 グループ同時保有株が多く報告されてきたが、本研究では CTX-M-2 グループ非保有株が少数ながら含まれ、異なる特徴を持つことが明らかになった。

DP2-15-16/P1-172

Genomic insights into an Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O4:H12 co-carrying *mcr-5* and *bla*_{SHV-12}

○Christian Xedzro¹, Toshi Shimamoto¹, Liansheng Yu², Yo Sugawara², Motoyuki Sugai², Tadashi Shimamoto¹ (1)Lab. Food Microbiol. Hyg., Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., (2)Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis.)

○Christian Xedzro¹, Toshi Shimamoto¹, Liansheng Yu², Yo Sugawara², Motoyuki Sugai², Tadashi Shimamoto¹ (1)Lab. Food Microbiol. Hyg., Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., (2)Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis.)

Escherichia coli, a predominant facultative anaerobe of the human gut flora, includes both commensal and pathogenic strains. A multidrug-resistant extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* (160-11H1) was isolated from chicken meat in 2009 in Japan. The entire genome was sequenced using Illumina MiSeq and Nanopore platforms and *de novo* assembled using unicycler. Bioinformatic analyses were carried out using tools from the Center for Genomic Epidemiology. The genome size was calculated at 5,031,330 bp, with 5,140 features. Mobile colistin resistance gene, *mcr-5*, and an ESBL gene, *bla*_{SHV-12}, encoding resistance to clinically important antimicrobials including colistin (MIC, 8 μg/mL) and extended-spectrum cephalosporins (MIC, >32 μg/mL) were detected. The *mcr-5* was in an operon with Tn3 family transposase adjacent to ChrB domain protein and uncharacterized MFS-type transporter on a conjugatively transferable plasmid of IncFII backbone. The *bla*_{SHV-12} gene was inserted downstream of TniA putative transposon located on IncFIA:FIB:FIC plasmid. The strain was of Sequence Type ST10, CH type *fumC11/fimH54*, serotype O4:H12, and phylogroup A, and carried several virulence genes associated with heat survival, colonization, fitness, and conjugation. A One Health surveillance program is necessary to examine the impact of drug-resistant microbial contamination on human health.

DP2-15-17/P1-173

グラム陽性乳房炎原因菌の薬剤耐性化機構の解析

○横尾 和¹, 島本 敏¹, 鈴木 直樹², 島本 整¹ (1)広島大・統合生命科学・食品衛生微生物, (2)広島大・統合生命科学・陸域フィールド科学)

Analysis of the antimicrobial resistance mechanism in Gram-positive mastitis-causing bacteria

○Kazumi Yokoo¹, Toshi Shimamoto¹, Naoki Suzuki², Tadashi Shimamoto¹ (1)Dept. Microbiology for Food Safety., Sch. Integrated Sciences for Life., Hiroshima Univ., (2)Dept. Terrestrial Field Science., Sch. Integrated Sciences for Life, Hiroshima Univ.)

【目的】牛乳房炎は乳牛に最も頻発する疾患であり、経済的な損失をもたらすとともに公衆衛生上の問題となっている。牛乳房炎には伝染性乳房炎と環境性乳房炎があり、伝染性乳房炎の原因菌の一つとして黄色ブドウ球菌があげられる。また、環境性乳房炎の原因菌にコグラーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS)、バチルス属菌、腸球菌などのグラム陽性菌があり、食中毒原因菌も含まれるため、継続的な監視が必要である。牛乳房炎の予防および治療に抗生物質を使用するが、不適切な抗生物質の使用は薬剤耐性菌の発生を促す恐れがある。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含む多剤耐性菌の増加が世界的に問題となっている。本研究では、ワンヘルスの概念に基づき、酪農場における乳房炎原因菌の病原性因子および薬剤耐性化機構の解析を目的とした。【方法】広島県内のフリーバーン牛舎の酪農場から 2 か月に 1 回サンプリングを実施し、ブドウ球菌、バチルス属菌、腸球菌選択培地を用いて乳房炎原因菌を分離した。そして、PCR 法を利用して種の同定および薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子の検出を行った。【結果と考察】これまでに 505 株を分離し、*Staphylococcus* 分離株の 8.7% (14/161) が *mecA* を持っていた。また、乳房炎を発症した乳牛から CNS が 5 株分離され、そのうち 2 株は *mecA* および *blaZ* を保有していることが分かった。薬剤耐性菌がサンプリングポイント全体で分離され、特に堆肥、子牛の餌、水路で頻りに検出された。一方で 5 月および 7 月では薬剤耐性遺伝子が非常に多く検出されたが、それ以降は減少傾向であった。

DP2-16-01/P2-113

赤血球由来成分存在下における *S. infantis* の増殖性と毒素産生性に関する検討

○伊藤 理貴¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明^{1,2}, 高尾 亜由子³, 田端 厚之^{1,2} (徳島大・院創成科学研究科・生物資源学, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, ³鶴見大・歯・口腔微生物学)

The growth and toxin-production property of *S. infantis* in the presence of erythrocyte components

○Yoshiki Itoh¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune^{1,2}, Ayuko Takao³, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci & Tech. Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ³Dept. Oral Bacteriol., Tsurumi Univ.)

【目的】*S. infantis* は、ヒト咽頭口腔常在性の日和見レンサ球菌である。我々は、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) を産生する *S. infantis* 株を対象とし、その株が産生する CDC を Infantilysin (InLY) と名付け、本菌の病原性との関連を検討している。本研究では、InLY 産生性の *S. infantis* 株の血中移行を想定し、赤血球成分存在下での増殖性や InLY 産生性について検討を行った。

【方法】被検菌の培養は BHI 培地を基本培地とし、37°C, 5%CO₂ 条件で行った。培地添加成分として、ヒト赤血球溶血液やヘモグロビンなどの赤血球由来成分について検討した。被検菌の増殖性は菌液濁度を指標として評価し、InLY 産生量は抗 InLY 抗血清を用いて免疫化学的に評価した。また、InLY コード遺伝子上流の配列情報から示唆された InLY 産生におけるカタボライト抑制についても検討した。

【結果及び考察】まず、赤血球由来成分存在下で被検菌を培養した結果、被検菌の増殖性は溶血液及びヘモグロビンの添加で亢進した。各成分存在下における一定菌量あたりの InLY 産生量は、基本培地と比較して同等以上の産生が確認された。現在、血清成分存在下での検討を行っている。また、基本培地への高濃度グルコース添加で InLY 産生量が顕著に低下したことから、被検菌の InLY 産生はカタボライト抑制制御下にあることが強く示唆された。以上の結果から、本菌が血中に移行する場合、InLY 産生はカタボライト抑制を受けるものの通常の血糖濃度では InLY の産生抑制は生じず、産生された InLY による溶血作用で得られる赤血球成分が被検菌の増殖性の亢進と持続的な InLY の産生に寄与していることが想定され、本菌の病原性と InLY の関連性が注目される。

DP2-16-02/P2-114

***Listeria monocytogenes* promotes inflammasome activation through Btk phosphorylation**

○山内 肇, 松田 泰幸, 原 英樹 (旭川医大・医・感染症学微生物学)

○Hajime Yamauchi, Yasuyuki Matsuda, Hideki Hara (Dept. Infect. Dis., Div. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ.)

Listeria monocytogenes, known as a food poisoning bacterium, causes listeriosis, which can be serious for pregnant women, older adults and people with compromised immune systems. The immune responses to such as bacterial invasion and cellular damage induce inflammatory responses including formation of cytoplasmic protein complex inflammasomes. Inflammasome regulates caspase-1 activation that induces secretion of inflammatory cytokines, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18, and cell death known as pyroptosis. Previously, it has been shown that the inflammasome responses exacerbates infectious diseases caused by *L. monocytogenes*, and listeriolysin O (LLO) promotes the inflammasome activation. LLO accelerates a phosphorylation of the inflammasome adaptor ASC through Lyn-Syk signaling pathway. However, a molecule downstream of Lyn-Syk pathway remains unknown.

Bruton's tyrosine kinase (Btk) is known to be modulated by Syk. In this study, we investigated a contribution of Btk in the inflammasome activation upon *L. monocytogenes* infection. *L. monocytogenes* induced Btk activation, which was reduced by a treatment with Syk inhibitor. By inhibition of Btk, inflammasome-dependent IL-1 β secretion and cell death were suppressed in macrophages infected with *L. monocytogenes*. These results suggest that *L. monocytogenes* promotes inflammasome activation through Btk downstream of Lyn-Syk pathway.

DP2-16-03/P1-115

肺炎球菌に対して誘導される階層性オートファジーから明らかになったユニークな Atg8 パラログの機能解析

○佐久間 智理^{1,2}, 小川 道永¹, 栗石 早矢佳¹, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細, ²農研機構・生物研)

Functional analysis of Atg8 paralogs in pneumococci-induced hierarchical autophagy

○Chisato Sakuma^{1,2}, Michinaga Ogawa¹, Sayaka Shizukuishi¹, Yukihiro Akeda¹ (¹Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., ²Nat. Inst. Agrobiol. Sci, NARO)

肺炎球菌は鼻咽頭に常在し、ときとして急性中耳炎や副鼻腔炎などの上気道感染症を引き起こす。さらに、小児や高齢者ではしばしば肺炎や菌血症・髄膜炎といった侵襲性肺炎球菌感染症の起因菌となり、その侵入門戸は小児では鼻咽頭上皮、高齢者では肺胞上皮であると考えられている。これらの上皮細胞は物理的な一次バリアとして機能していると考えられているが、上皮細胞に侵入した肺炎球菌と宿主細胞との相互作用については不明な点が多く残されている。現在までに我々は、肺炎球菌を感染させて1時間後の細胞で、肺炎球菌を包む非典型的な一重膜オートファジーである conjugation of Atg8s to single membranes (CASM) が誘導されること、CASM は殺菌力を持たずに終息すること、そして感染2時間後に典型的な殺菌性のオートファジーであるゼノファジーが誘導されることを報告してきた。今回我々は、肺炎球菌感染特有の階層的オートファジー誘導メカニズムを明らかにするため、Atg8 パラログ (LC3A/B/GBRP/GBRPL1/GATE16) に着目した。Atg8 パラログは典型的なオートファジーにおいて機能することが知られているが、ファミリー分子間で相補的に働くため、個別の機能については不明な点が多く残されている。各 Atg8 パラログの局在の経時変化やノックダウンによる階層的オートファジーへの影響を解析した結果、興味深い知見を得たので報告する。

DP2-16-04/P1-116

承認薬ライブラリーのスクリーニングによる *Chlamydia trachomatis* が細胞内で利用する新たな標的分子の探索

○Saicheng Zhang, Ruiyu Li, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学研究院)

Search for new target molecules used by *Chlamydia trachomatis* by screening approved drug libraries

○Saicheng Zhang, Ruiyu Li, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci. Hokkaido Univ.)

【目的】*Chlamydia trachomatis* (Ct) は、不妊や子宮頸癌の危険因子である。私達は Ct が PI3K-AKT や p38MAPK を使い、癌細胞と同様に低酸素に適応していることを発見した。利用する伝達経路に共通性があるのであれば Ct の標的分子は癌創薬に結びつく。そこで Ct 増殖の阻害効果を指標に既存薬ライブラリーをスクリーニングし KEGG 情報から標的経路と分子を絞り込みその妥当性について検証した。【方法】既存薬: LTT バイオ (1,241 医薬品) と北大創薬研 (3,200 医薬品) から提供された。菌株と細胞: GFP 発現 Ct (L2/434/Bu 株) と HEp-2 を用いた。スクリーニング: 既存薬存在下で感染細胞を通常酸素 (21%O₂) と低酸素 (2%O₂) で 48 時間培養し封入体数を指標に薬効を評価した。KEGG: ヒット既存薬が作用するホモ・サビエンス (hsa) の全ての経路に関わる遺伝子を出現頻度を考慮し 'Weighting value' として表し 26 種類の has シグナル情報伝達経路で、その総計 'Annotation density' を比較した。標的分子の検証: Ct を HEp-2 細胞に感染させ H-89 (PKA 阻害剤), メチレンブルー (MB) (PKG 阻害剤) 及び 666-15 (CREB 阻害剤) の存在下で通常酸素と低酸素で 48 時間培養し封入体数を算定した。【結果と考察】既存薬スクリーニングで 7 種類の薬がヒットし 22 の経路と 3,623 個の遺伝子が同定された。また hsa04024 cAMP-PKA と hsa04022 cGMP-PKG 経路が新規に同定された。阻害剤が酸素依存的に Ct の増殖を抑制した。これらの結果より、CtL2 の細胞内増殖は、酸素分圧依存的に PKA, PKG 及び CREB を要求することが示唆された。

DP2-16-05/P2-117

Analysis of protective function of mycobacterial biofilms for bacilli

○鳥越 祥太^{1,2}, 山本 健太郎¹, 阿戸 学¹ (¹国立感染症研・感染制御, ²国立感染症研・安管)

○Shota Torigoe^{1,2}, Kentaro Yamamoto¹, Manabu Ato¹ (¹Dept. Mycobacteriol. Lepr. Res. Ctr., NIID, ²Mgmt. Dept. Biosafety, Lab. Anim., and Pathog. Bank, NIID)

Mycobacteria form cellulose-based biofilms contributing to drug resistance in infection sites, however, its function against host defense is still unknown. Mycobacterial biofilms are produced around the bacilli following infection; thus, it is possible that the biofilms play a role in a resistance against nitric oxide (NO) stress and capture by phagocytic cells, which is a bactericidal effector and mechanism. To elucidate the resistance of mycobacterial biofilms, we analyzed the burden of NO stress to bacilli using GFP-expressing *Mycobacterium bovis* (M. bovis) BCG in response to NO (NO-BCG) and capture of bacteria by phagocytes using constitutively GFP-expressing M. bovis BCG (Cons-BCG). GFP expression of NO-BCG was increased under NO stress, while its expression was suppressed under biofilms formation, indicating that mycobacterial biofilms prevented NO from reaching the bacteria. Furthermore, in the presence of biofilms, phagocytic cells were less able to capture Cons-BCG than in the absence of biofilms. Interestingly, cellulase attenuated these protective functions of mycobacterial biofilm. These results showed that mycobacterial biofilms inhibit NO stress and phagocytic trapping of the bacteria, suggesting the possibility of mycobacterial biofilms as novel therapeutic targets.

DP2-16-06/P2-120

Immunomodulatory Effect of Heat Shock Protein SSA1 Enriched in Hypoxic Secretome of *Candida albicans*

○Wei Teng¹, Phawinee Subsomwong¹, 成田 浩司², 中根 明夫³, 浅野 クリスナ^{1,3} (¹弘前大・院医・感染生体防御学, ²弘前大・院医・動物実験施設, ³弘前大・院医・生体高分子健康科学)

○Wei Teng¹, Phawinee Subsomwong¹, Kouji Narita², Akio Nakane³, Krisana Asano^{1,3} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ³Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

Candida albicans is an opportunistic pathogenic fungus that can survive in both normoxic and hypoxic environments. It has been demonstrated that *C. albicans* secretome is involved in host biological processes. However, the immunological effect of *C. albicans* secretome released under hypoxic condition remains unclear. This study demonstrated the differences in cytokine responses and protein profiles between secretomes prepared under normoxic and hypoxic conditions. Furthermore, the immunoregulatory effects of heat shock protein SSA1 (Ssa1), a protein enriched in the hypoxic secretome, were investigated. Stimulation of mouse bone marrow-derived macrophages (BMMs) with Ssa1 resulted in the significant production of interleukin (IL)-10, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α as well as the significant expression of M2b macrophage markers (CD86, CD274 and tumor necrosis factor superfamily member 14). These results suggest that *C. albicans* Ssa1 may promote polarization of macrophages towards an M2b-like phenotype. Based on these results, we also investigated the effect of Ssa1 on *C. albicans* infection and showed that Ssa1 inhibited the uptake of *C. albicans* by BMMs. Taken together, our findings demonstrate that *C. albicans* is able to alter its secretome, particularly by promoting the release of Ssa1, to modulate host immune response and survive under hypoxic conditions.

DP2-16-07/P2-121

サルモネラにおける過剰なカチオンの毒性とその耐性メカニズム

○岩館 佑未, James Slauch (イリノイ大・分子細胞生物・微生物)

Excess cation stress and tolerance mechanisms in *Salmonella*

○Yumi Iwadate, James Slauch (Dept. Microbiol, Sch. Mol. Cell Biol., Univ. Illinois.)

サルモネラは、食中毒の原因菌のひとつであり、重篤な全身性感染症を引き起こす際、マクロファージ内で増殖する過程で、マグネシウム飢餓にさらされる。この際、二成分制御系 PhoPQ を介した遺伝子発現の制御が生存および病原性に重要であることが知られる。我々のこれまでの研究より、マグネシウム飢餓に反応して、Mg の取り込み系だけでなく、ポリアミン合成系も誘導され、細胞質の Mg レベルが回復するまで、ポリアミンが Mg の役割を一部補うことを示した。また、増殖が停止し定常期に移行すると、マグネシウムの需要が減少し、カチオンレベルのオーバーシュート、過剰なカチオンの毒性が発生すること、この毒性を抑制するために PaeA を介したポリアミンの排出が必要であることが分かった。しかし、過剰なカチオンの毒性の根本的な生理学的理解や他の耐性メカニズムについては未解明である。本研究では、過剰なカチオンの毒性に対する新しい耐性メカニズムの同定を目的とし、PaeA と同様に CorC ドメインを含むタンパク質、CorC および YoaE に焦点を当てた。corC 遺伝子の欠損により、マグネシウム飢餓の定常期における生存率が低下し、加えて yoaE 遺伝子欠損させると生存率がさらに低下した。生理学的・遺伝学的解析により、CorC と YoaE はポリアミン排出トランスポーターの PaeA とは異なるメカニズムで過剰なカチオンの毒性への耐性に作用することが示唆された。現在、これらの遺伝子が過剰なカチオンの毒性を軽減するメカニズムと、サルモネラの病原性における役割を解明することに焦点を当て、研究を行なっている。

DP2-16-08/P1-117

Functional analysis of ribD involved in immune escape of *Francisella tularensis*

○柴田 健輔^{1,2,3}, 高木 啓司¹, 清水 隆⁴, 度会 雅久⁴ (¹山口大・医・ゲノム機能分子解析学, ²九州大・医・眼病態イメージング, ³大阪大・微研・分子免疫制御, ⁴山口大・獣医)

○Kensuke Shibata^{1,2,3}, Keishi Takagi¹, Takashi Shimizu⁴, Masahisa Watarai⁴ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Yamaguchi Univ., ²Dept. Ocular Pathology and Imaging Science, Sch. Med., Kyushu Univ., ³Dept. Mol. Immunol., Sch. Med., Research Inst. Microbial Diseases, Osaka Univ., ⁴Joint Fac. Veterinary Medicine, Yamaguchi Univ.)

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells play protective roles against infection with an intracellular pathogen *Francisella tularensis* through recognition of a bacterial metabolite 5-OP-RU derived from vitamin B2 synthetic pathway. Recently, we have shown that, compared with a free-living strain *Francisella tularensis* subsp. *novicida* (FN), an intracellular pathogen *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (FT) escapes from MAIT cell-mediated acquired immunity by five amino acid mutations (I59T, V61A, G62V, H80C, and Q254R) in ribD, which is an enzyme essential for 5-OP-RU synthesis. In this study, we aimed to identify the amino acids involved in escaping from MAIT cell-mediated acquired immunity. First, we compared 23573 sequences of bacterial ribD deposited in NCBI and found that H80C alteration was unique in the FT strain. To predict the impact of the mutation in 3D structure of ribD, analysis was performed by applications of Artificial Intelligence techniques. H80C mutation was located at the zinc-binding site of ribD. Crude metabolites from the FN strain with H80C mutation lowered agonist activity to MAIT cells as compared with those from the FN strain. These results suggest that H80C mutation in FT is involved in escaping from MAIT cell-mediated acquired immunity. This finding provides us useful information for vaccine development targeting bacterial metabolites.

DP2-16-09/P1-118

硬ダニ媒介性回帰熱群ボレリア菌の感染初期における表面抗原変換メカニズムの検索

○竹内友陽¹, 佐藤 梢², 川端 寛樹², 高野 愛¹ (1山口大・獣・獣疫医学, 2感染研・細菌第一)

Surface antigen conversion at the early stages of infection in relapsing fever borreliosis

○Tomohi Takeuchi¹, Kozue Sato², Hiroki Kawabata², Ai Takano¹ (1Dept. Vet. Med., Joint Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ., 2Dept. Bac-I, NIID)

回帰熱は、ボレリア菌が引き起こす再発性の発熱を特徴とした急性の感染症であり、軟ダニであるヒメダニが媒介する古典的回帰熱の他、硬ダニであるマダニによって媒介される新興回帰熱が近年報告されている。*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。本菌による新興回帰熱では、明確な回帰性の発熱を伴わないことが多いが、その原因は不明である。古典的回帰熱では、抗体からの攻撃を回避するために菌の表面抗原遺伝子 *vlp/vsp* が組換えを起こすことで菌表面の抗原性が変化した結果、再発性の菌血症を生じ患者は発熱する。我々のこれまでの解析により、*B. miyamotoi* でも *vlp/vsp* が発現しており、組換えが生じていることがマウスを用いた感染実験で明らかとなってきた。しかしながら、この組換えはマウスで抗体産生が始まる7日前後よりも早い5日の段階で起こっていた他、抗体産生が見られない SCID マウスでも感染後10日以降で遺伝子組換えが起こることが明らかとなった。血液中からの菌体の排除は免疫正常マウスでは10日前後で見られる一方、SCID マウスでは30日以降も血液中から菌が検出され、菌の排除が行われないことも明らかとなった。以上の結果から、*B. miyamotoi* で見られる表面抗原遺伝子 *vlp/vsp* の組換えのトリガーは、これまで古典的回帰熱で報告されてきた抗体産生による体内からの排除とは異なる可能性も考えられた。今後、免疫不全マウスの系統を検討し、組換えメカニズムの解明を目指す。

DP2-16-10/P1-119

Pathogenic *Leptospira* induces lipolysis in the murine adipocytes in vitro and in vivo

○尾鶴 亮, 吉村 芳修, 藤木 正太郎, 石井 一成, 清水 章文, 栗原 悠介, 桑原 俊太郎, 廣松 賢治 (福岡大・医・微生物免疫)

○Ryo Ozuru, Michinobu Yoshimura, Shotaro Fujiki, Kazunari Ishii, Akinori Shimizu, Yusuke Kurihara, Shuntaro Kuwahara, Kenji Hiromatsu (Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Fukuoka Univ.)

We previously reported that pathogenic *Leptospira* colonizes the subcutaneous adipose tissue neighboring the injection sites (Ozuru et al. PLOS ONE. 2017). Because the primary carbon sources of leptospire are fatty acids and glycerol, which are the components of triglycerides, this seems a reasonable strategy. In this study, we investigated the interaction between pathogenic *Leptospira* and adipocytes in vitro and in vivo.

Differentiated 3T3-L1 adipocytes (the murine-derived adipose progenitor cell line and ten days after adipogenesis induction) cocultured with *L. interrogans* serovar Manilae strain L495 showed a significant decrease in triglycerides (an increase in lipolysis) without cell damages. Surprisingly, no glycerol was detected with lipolysis at all time points. Similar lipolysis occurred in a mouse infection model, indicating that percutaneously infected *Leptospira* affects lipid metabolism in mice. *Leptospira* enumeration showed a delayed proliferation with adipocytes compared to without. This suggests that, although adipocytes were inhibiting *Leptospira* proliferation as a defense mechanism initially, *Leptospira* finally seems to proliferate by obtaining their carbon sources. Future studies will focus on

1. identifying the causative factors of pathogenic *Leptospira* that promote lipolysis and
2. the detailed immune response and changes in lipid metabolism in the host.

DP2-16-11/P1-120

Co-infection of *C. pneumoniae* and *P. gingivalis* exacerbates aspiration pneumonia

○内記 良一¹, 中西 祥吾², 加藤 綾香³, 荒井 領¹, 岩瀬 智彦¹, 梅村 正幸⁴, 三谷 章雄², 長谷川 義明¹ (1愛知学院大・歯・徹, 2愛知学院大・歯・歯周, 3愛知学院大・歯・小児歯, 4琉球大・熱生研・感染防御)

○Yoshikazu Naiki¹, Shogo Nakanishi², Ayaka Kato³, Ryo Arai¹, Tomohiko Iwase¹, Masayuki Umemura⁴, Akio Mitani², Yoshiaki Hasegawa¹ (1Dept. Microbiol. Sch. Dent. Aichi Gakuin Univ., 2Dept. Periodont. Sch. Dent. Aichi Gakuin Univ., 3Dept. Pediatric. Sch. Dent. Aichi Gakuin Univ., 4Trop. Biosphere Res. Cent., Univ. Ryukyus)

Background: *C. pneumoniae* (C.p.) is a major causative agent of pneumonia and has recently been linked to the progression of atherosclerosis. *P. gingivalis* (P.g.) is known for its contribution to periodontal disease but has also emerged as a potential risk factor for aspiration pneumonia. This study investigated their combined impact on aspiration pneumonia and its potential role in exacerbating the disease. **Methods:** We examined C.p. and P.g. effects on xenophagy (a cellular process eliminating pathogens) in HEp-2 cells. We assessed inflammatory markers and the expression of proteins involved in xenophagy regulation. To investigate the effects of co-infection on lung inflammation and disease progression, we created a mouse model of aspiration pneumonia to investigate the in vivo effects of co-infection with C.p. and P.g. **Results:** C.p. initially induced xenophagy, but later suppressed it via TRAF6-Beclin1 interaction and Beclin1 ubiquitination. P.g. potentially inhibited xenophagosome formation and facilitated the growth of C.p. infection. Co-infection significantly increased GAPR1 protein expression and TNF- α production compared to single infections, suggesting a heightened inflammatory response. **Conclusion:** Our findings suggest that co-infection with C.p. and P.g. may exacerbate aspiration pneumonia by manipulating xenophagy and promoting inflammation.

DP2-16-12/P1-121

Inflammatory responses in the intestinal mucosa of mice infected with *Helicobacter mastomyrinus*

○保木 陸¹, 宮内 綾乃¹, 吉沢 隆浩², 嶋田 新², 大沢 一貴³, 増山 律子¹, 山中 仁木² (1立命館大院・食マネ, 2信州大・基礎研セ, 3長崎大院・医歯薬)

○Riku Yasuki¹, Ayano Miyauchi¹, Takahiro Yoshizawa², Shin Shimada², Kazutaka Ohsawa³, Ritsuko Masuyama¹, Hitoki Yamanaka² (1Grad. Sch. Gastron. Manag., Ritsumeikan Univ., 2Res. Ctr. Adv. Sci. Technol., Shinshu Univ., 3Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

Helicobacter mastomyrinus is frequently detected in laboratory mice kept in Japan, though, only few informations on the pathogenicity are reported. We have demonstrated the pathogenic responses of the liver caused by the infection of the isolates in the last annual meeting. In the next step, we investigated the immune responses in cecum and colon of infected mice. *H. mastomyrinus* isolates were orally infected to BALB/c mice (male, 5-6 weeks old). At 24 weeks post infection, the RNAs were extracted from the splenocytes and the lamina propria mononuclear cells of both cecum and colon, and the real time PCR were performed to quantify the expressions of cytokine mRNAs. Moreover, the pathological changes of cecum and colon were examined by histologically. The expression levels of cytokine mRNAs such as inflammatory, Th1, Th2, Th17, and Treg cytokines were significantly higher in the colon of infected mice than control mice, whereas the expressions in the spleen and cecum of infected mice were detected as the comparable or the lower levels than control mice. In infected mice, the infiltration of many granulocytes and lymphocytes and epithelial hyperplasia were observed in the mucosa of cecum and colon. These results indicate that *H. mastomyrinus* translocate to the liver via the invasion into the mucosa of cecum and colon in mice, resulting in the inflammatory responses in those tissues.

DP2-16-13/P1-122

感染時に発現している肺炎球菌プラスミノゲン結合タンパク質の解析

○平山 悟¹, 日吉 巧^{1,2,3}, 安井 惟人^{1,3}, 土門 久哲^{1,2}, 寺尾 豊^{1,2} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・高口研セ, 3新潟大・院医歯・歯周)

Plasminogen-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* expressed during infection

○Satoru Hirayama¹, Takumi Hiyoshi^{1,2,3}, Yoshihito Yasui^{1,3}, Hisanori Domon^{1,2}, Yutaka Terao^{1,2} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Div. Periodontol., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

Streptococcus pneumoniae による細菌性肺炎の発症メカニズム解析のため、同菌感染マウスの肺胞洗浄液のプロテオーム解析を行い、*in vivo* で感染時に発現しているタンパク質を15種同定した。この中で感染関連の機能が未解明な TpiA, ClpC, UvrC について組換え体を作製し、機能解析を推進した。

宿主分子との相互作用を解析したところ、これら3種はプラスミノゲン (Plg) と結合した。TpiA, ClpC, UvrC それぞれの添加により、活性化因子による Plg からプラスミンへの変換を有意に促進した。*S. pneumoniae* の培養上清および菌体表面層画分を解析すると、自己溶菌酵素欠失株では野生株と比較して TpiA, ClpC, UvrC の発現量が少なかった。TpiA と Plg の結合はリジンアナログの添加により阻害されたため、リジン残基の関与が示唆された。そこで、TpiA に含まれる全リジン残基をそれぞれアラニンへ置換したところ、C末端リジン残基の置換体では Plg 結合性およびプラスミンへの変換促進性が有意に小さかった。

以上の結果より、細胞内タンパク質 TpiA, ClpC, UvrC は自己溶菌により菌体外へ放出され、菌体表面層において宿主 Plg と結合しプラスミンへの変換を促進することが示唆された。このメカニズムにより宿主プロテアーゼを菌体に結合させ、宿主組織侵入に寄与すると推察される。*S. pneumoniae* の Plg 結合タンパク質は、TpiA, ClpC, UvrC および我々が別に解析した SufC の他に9種が報告されている。その中で α -エノラーゼ、伸長因子 Tu, GAPDH は上述のプロテオーム解析でも検出できている。そこで、全13種の Plg 結合タンパク質について、*S. pneumoniae* の増殖フェーズや Plg の有無による mRNA 転写量の変化を解析している。

DP2-16-14/P1-123

肺炎球菌 SufC は自己溶菌によって菌体外へ放出され宿主プラスミノゲンと結合する

○安井 惟人^{1,2}, 平山 悟¹, 磯野 俊仁¹, 日吉 巧^{1,2,3}, 土門 久哲^{1,3}, 寺尾 豊^{1,3} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・歯周, 3新潟大・院医歯・高口研セ)

Pneumococcal protein SufC is released extracellularly by autolysis and binds to host plasminogen

○Yoshihito Yasui^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Toshihito Isono¹, Takumi Hiyoshi^{1,2,3}, Hisanori Domon^{1,3}, Yutaka Terao^{1,3} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2Div. Periodontol., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

【背景と目的】*Streptococcus pneumoniae* の病原因子は、主に *in vitro* で同定されてきた。本研究では、*S. pneumoniae* 感染モデルマウスの *in vivo* サンプルを対象とし、感染時に生体内で発現する同菌の分子を質量分析法にて同定し機能解析を行った。

【方法と結果】*S. pneumoniae* 感染マウスの気管支肺胞洗浄液をプロテオーム解析し、*in vivo* で発現している *S. pneumoniae* のタンパク質群を同定した。その中から、菌体内で Fe-S クラスターの生合成に関与する ATPase である SufC を選択し、*Brevibacillus* 発現系を用いて SufC の組換え体を作製した。ELISA 解析において、SufC はヒトプラスミノゲンと有意に結合した。Biacore 解析によって、SufC とプラスミノゲンの結合は濃度依存的であることが示された。プラスミノゲンは組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) によってプラスミンに変換されるが、この変換が SufC の添加量依存的に促進された。*S. pneumoniae* の自己溶菌酵素オートリシンの遺伝子欠失株を用いて菌体表面層画分の SufC を Western blot 法で検出すると、野生株と比較して欠失株では SufC 量が少なかった。

【考察】*S. pneumoniae* の菌体内で ATPase として機能する SufC は、マウス感染時に肺胞内で発現する。次いで、オートリシン依存的な自己溶菌により菌体外へ放出され、菌体表面層にも局在することが明らかになった。さらに、SufC はプラスミノゲンと結合し、tPA によるプラスミンへの変換を促進することが示された。以上より、*S. pneumoniae* は宿主への感染や宿主内での生存のため、宿主プロテアーゼのプラスミンを SufC 介在的に活用する可能性が推察された。

DP2-16-15/P1-124

胃癌患者の胃内より分離した硝酸塩還元菌のピロリ菌共感染マウスへの影響

○小松原 万里奈¹, 山本 由弥子², 内山 淳平², 松下 治², 後藤 和義¹, 渡辺 朱理³, 横田 憲治¹ (1岡山大・保健学研究科, 2岡山大・医歯薬研究科・病原細菌, 3徳島大・医歯薬学・口腔機能管理学)

Effects of nitrate-reducing bacteria from the gastric cancer patients in *H. pylori* co-infected mice

○Marina Komatsubara¹, Yumiko Yamamoto², Jumpei Uchiyama², Osamu Matsushita², Kazuyoshi Gotoh¹, Akari Watanabe³, Kenji Yokota¹ (1Grad. Sch. Health Science, Okayama Univ., 2Dept. Path. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., 3Oral Health Care and Rehabilitation, Inst. Biomed. Sci. Tokushima Univ.)

【目的】*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は胃癌の重要なリスク因子である一方、感染者に占める胃癌患者の割合は1~3%と少ないため、近年、発癌には他のリスク因子が必要であると考えられている。我々はその因子の一つとして、胃内で増殖する硝酸塩還元菌に着目して研究を進めており、これまでに、胃の病態の進展に伴って胃から検出される菌に占める硝酸塩還元菌の割合が高くなること、胃癌患者由来の硝酸塩還元菌が胃癌患者由来のものより高い還元能を有することを明らかにしてきた。また、ピロリ菌感染宿主の細胞性免疫低下は胃癌発症リスクの指標として有用であることも判明した。これより、本研究ではピロリ菌と胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の共感染が胃癌のリスク因子となり得るか検討した。【方法】ピロリ菌と IL-10 を投与したマウスをピロリ菌単独投与群と *E. coli* 投与群、*K. pneumoniae* 投与群、*S. paratyphi* 投与群に分けた。血清のピロリ菌抗体価 (総 IgG, IgG1, IgG2) および脾臓リンパ球の培養上清サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-4) を ELISA 法、脾臓リンパ球の mRNA (IL-4, IL-12, IFN- γ) を RT-PCR 法、転写因子 (STAT4, T-bet, STAT6, GATA3) をウエスタンブロット法で測定し、胃粘膜の HE 染色像を観察した。【結果と考察】硝酸塩還元菌投与群はピロリ菌単独投与群と比較して総 IgG および IgG1/IgG2 比が高い値を示した。また、*K. pneumoniae* 投与群において IL-12, IFN- γ の低下および STAT6 の発現が認められた。このことから、ピロリ菌と硝酸塩還元菌の共感染は免疫を液性免疫に傾け、特に *K. pneumoniae* の共感染においてその傾向が強く現れることが示唆された。

DP2-16-16/P1-125

Analysis of Vi capsular polysaccharide on an alternative *Salmonella* Typhi mouse infection model

○T. Hoan Pham^{1,2}, 日吉 大貴², 児玉 年央² (1Grad. Sch. Biomedical Sciences, Nagasaki Univ., 2Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ.)

○T. Hoan Pham^{1,2}, Hirotsuka Hiyoshi², Toshio Kodama² (1Grad. Sch. Biomedical Sciences, Nagasaki Univ., 2Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ.)

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) is a causal agent of typhoid fever, concerned a global health issue. Due to *S. Typhi* is strictly human pathogen, the lack of animal models hampers research into pathogenesis and vaccine. Vi capsular polysaccharide (Vi-antigen) produced by *viaB* locus is a virulence and protective factor of *S. Typhi*. To better understand a functional role of Vi-antigen in disease progression, we attempted to make an alternative *S. Typhi* mouse infection model using *S. Paratyphi C*, another typhoidal *Salmonella* serovar, which carrying 99.9% identical Vi-antigen of *S. Typhi*. First, we deleted *S. Paratyphi C* *fepE* gene to imitate wild type *S. Typhi* outer membrane structure, and the *fepE* mutant strain was infected with mice that showed systemic infection with substantial bacterial burdens in spleen and liver up to 14 days post-infection (p.i.). Next, a *viaB* locus-knockout strain (*fepE* *tvIB-vexE*) was generated to analyse a function of Vi-antigen in the pathogenesis, leading to a significant decrease in bacterial numbers in the organs compared to the parental strain (*fepE*). The capacity of Vi-antigen to evade host defences was diminished by 2 days p.i., highlighting its role in the early stage of systemic dissemination of *S. Typhi*. Continual research employing this model aims to reveal *S. Typhi* pathogenic mechanisms and vaccine assessment.

DP2-17-01/P1-089

ArcB/ArcA 二成分制御系による *Vibrio alginolyticus* 遊走制御機構の解析

○藤井 萌¹, 横田 憲治², 美間 健彦¹ (愛媛県立医療技術大・保健科学・臨床検査・微生物検査, ²岡山大・院保健)

Regulation of motility by ArcB/ArcA two-component regulatory system in *Vibrio alginolyticus*

○Moe Fujii¹, Kenji Yokota², Takehiko Mima¹ (¹Microbiol., Dept. Med. Techn., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., ²Okayama Univ. Grad. Sch. Health Sci.)

VarS/VarA 二成分制御系は, small RNA (sRNA) の転写調節を介して標的遺伝子の翻訳を制御する。細菌は VarS/VarA 系が調節する sRNA を複数コピー保有するが, それらは冗長なコピーと考えられている。我々は, *Vibrio alginolyticus* の VarS/VarA 系が調節する 4 つの sRNA のうちの 1 つ (sRNA1) の転写が, ArcB/ArcA 二成分制御系によって調節されることを明らかにした。ArcB/ArcA 系は嫌気環境での遺伝子の発現をグローバルに調節するが, その一つに遊走能がある。本研究では, *V. alginolyticus* の ArcB/ArcA 系の遊走制御機構を解析した。野生株と比較し, arcA 欠失株および arcB 欠失株は遊走能が低下した。また, arcA 相補株は野生株と同程度の遊走能を示した。以上より, ArcB/ArcA 系が遊走能を制御することが明らかとなった。鞭毛を構成するタンパク質である FlgB 遺伝子の発現量を qRT-PCR により調べた結果, 野生株と比較し, arcA 欠失株および arcB 欠失株で低下した。ArcA の flgB プロモーター領域の DNA 断片への結合を Electrophoretic mobility shift assay により確認した結果, バンドのシフトが観察された。これより, ArcA は flgB プロモーター領域に結合し, その転写を直接制御すると考えられる。これまでに, sRNA を欠失させると遊走能が低下することが明らかとなっている。今後は ArcB/ArcA 系の遊走能の制御における, sRNA の関与について検討したい。

DP2-17-02/P1-090

トランスクリプトーム解析データを基にした肺炎球菌のモジュロンの同定

広瀬 雄二郎¹, 田淵 敏生¹, 池田 恵莉¹, 大野 誠之¹, 山口 雅也^{1,2,3,4}, 川端 重忠^{1,3} (阪大・院歯・微生物, ²阪大・院歯・バイオインフォ, ³阪大・CiDER, ⁴阪大・微研・バイオインフォ)

Identification of pneumococcal modulons based on transcriptome datasets

Yujiro Hirose¹, Toshiki Tabuchi¹, Eri Ikeda¹, Masayuki Ono¹, Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Shigetada Kawabata^{1,3} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³CiDER, Osaka Univ., ⁴OUBIC, RIMD, Osaka Univ.)

肺炎球菌は肺炎や中耳炎の主たる起炎菌であり, 髄膜炎や敗血症などの致死性が高い疾患を引き起こすこともある。肺炎球菌はさまざまな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, 肺炎球菌における転写制御因子は 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, 肺炎球菌における 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, 肺炎球菌のモジュロン (複数の転写制御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) を同定した。さらに, 得られた 47 個のモジュロン情報と, データベースのレギュロン情報または過去のトランスクリプトーム解析で報告されているレギュロン情報とを照合し, モジュロンの制御に寄与する転写制御因子を統計的に算出した。47 個のモジュロンのうち 28 個に属する遺伝子群が, 既知のレギュロンが有する遺伝子群と有意に重複した。47 個のモジュロンがそれぞれ有する遺伝子の clusters of orthologous groups 情報に基づき, 各モジュロンの有する主要な機能を評価したところ, 代謝に関連するモジュロンが 55% を占めた。興味深いことに, 脂質の合成遺伝子群と pneumolysin をコードする遺伝子がともに挙動することを示すモジュロンや, 糖鎖の取り込みおよび利用とバクテリオシンが連動することを示唆するモジュロンが確認された。このように, 本研究において同定した肺炎球菌における 47 個のモジュロン情報を精査すれば, これまでに報告されなかった組み合わせの遺伝子が共発現する可能性を見出せる。

DP2-17-03/P2-086

The role of responses against environmental stress on the pathogenicity of *Treponema denticola*

○石原 和幸¹, 北村 友里恵², 菊池 有一郎¹, 国分 栄仁¹, 山下 慶子², 齋藤 淳² (東歯大・微生物, ²東歯大・歯周病)

○Kazuyuki Ishihara¹, Yurie Kitamura², Yuichiro Kikuchi¹, Eitoyo Kokubu¹, Keiko Yamashita², Atsushi Saito² (¹Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Coll., ²Dept. Periodontol., Tokyo Dent. Coll.)

In periodontal milieu, subgingival bacteria face environmental stresses. Responses to these stresses are necessary for their survival. In particular, oxygen is a fatal stress for periodontopathic bacteria. In dental plaque, some resident bacteria produce H₂O₂. *Treponema denticola*, which is a major pathogen of periodontitis, overcomes the stresses to increase in dental plaque. However, the mechanism of the responses remains unclear. TDE_0127 has DNA binding motif and its expression was upregulated under oxygen exposure and in the dentilisin mutant. It is possible that this gene is associated with response to the stress. To investigate the role of the gene in the response and the virulence of *T. denticola*, TDE_0127 mutant was constructed. In the mutant, 152 genes were downregulated, which included peroxiredoxin. 44 genes including internalin related protein were upregulated. Under aerobic conditions, the viable cells in the mutant strain was reduced by approximately 40% as compared to wild type strain (p<0.05), indicating that TDE_0127 is involved in resistance to oxygen via peroxiredoxin. In addition, dentilisin activity in the mutant strain decreased by approximately 27% compared to the wild type. These results suggest that *T. denticola* TDE_0127 is involved in the resistance to oxygen stress, and affects the expression of genes associated with pathogenicity such as dentilisin.

DP2-17-04/P2-089

Effect of phased A-tracts on α -toxin gene expression in *Clostridium perfringens*

○片山 誠一¹, 松井 佐弥², 橋川 直也¹, 佐藤 日向太², 相原 一欽², 田中 千晴², 成谷 宏文³, 松永 望¹ (岡山理科大・理・臨床生命科学, ²岡山理科大・理・臨床生命科学, ³十文字学園女子大・人間生活学部・食品開発)

○Seiichi Katayama¹, Saya Matsui², Naoya Hashikawa¹, Hinata Sato², Kazuyoshi Aibara², Chiharu Tanaka², Hirofumi Nariya³, Nozomu Matsunaga¹ (¹Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ²Dept. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., ³Dept. Food Sci., Fac. Human Life, Jumonji Univ.)

Clostridium perfringens is a Gram-positive anaerobe, causing gas gangrene and food poisoning for humans. α -toxin is one of primary causative toxins of gas gangrene. There are three phased A-tracts (3A) upstream of the promoter of *plc* gene coding α -toxin. We previously reported that the phased A-tracts enhance the *plc* gene expression in a low temperature-dependent manner, *in vitro*. The other hand, Shimizu reported that VR-RNA, a small RNA molecule, also enhanced the *plc* gene expression and the RNA expression was regulated by VirR/S, a two-component system. We constructed VR-RNA-deficient and phased A-tracts-deficient strains (OA), as well as strains lacking both. The α -toxin productions and the *plc* gene expressions of these mutants were examined by western blotting analyses and real-time PCRs. The deletion of the phased A-tracts sequence (OA) significantly decreased both the α -toxin production (1/14 to 1/5) and the level of *plc* transcription (1/46 to 1/7). The deletion of VR-RNA (*vrn*) gene decreased the α -toxin production (1/5 to 1/2) and the level of *plc* transcription (1/2). In VR-RNA-deficient mutants, the *plc* gene expression significantly enhanced in a low temperature-dependent manner, *in vivo*. These results suggest that the phased A-tracts might contribute to *plc* gene expression independently of the VR-RNA-mediated VirR/S two-component regulatory system.

DP2-17-05/P2-090

Salmonella adIA mRNA encoding acid resistance core releases sRNA in acidic and anaerobic environment

○神田 健¹, Fang Liu², Sarah Reichardt³, Hoda Kooshapour³, Alexander Westermann³, Yanjie Chao², 宮腰 昌利¹ (筑波大・医, ²Shanghai Institute of Immunity and Infection, CAS, ³Univ. Würzburg)

○Takeshi Kanda¹, Fang Liu², Sarah Reichardt³, Hoda Kooshapour³, Alexander Westermann³, Yanjie Chao², Masatoshi Miyakoshi¹ (Inst. Med., Univ. Tsukuba, ²Shanghai Institute of Immunity and Infection, CAS, ³Univ. Würzburg)

Acid resistance (AR) is one of the most important properties of many enterobacteria since they encounter a variety of acidic environments in their lifecycle, such as stomach, colon, and phagosomes within macrophages. In *Salmonella*, the arginine decarboxylase system (Adi system) is the most effective AR system that catalyzes H⁺-consuming reaction to increase the intracellular pH and is specifically induced under acidic and anaerobic conditions. Interestingly, a ~90-nt stable small RNA (sRNA) was previously detected in the 3' untranslated region (3'UTR) of the *adiA* mRNA encoding the arginine decarboxylase (STnc1180, Kroger *et al.*, *PNAS*, 2012). However, its expression mechanism and its potential function were not known. Here, we report that the 3'UTR of the *adiA* mRNA releases the sRNA renamed as AdiZ via RNase E cleavage, which functions as an Hfq chaperone-dependent sRNA. Through the base-pairing mechanism, AdiZ represses the expression of two mRNA targets, *pykF* encoding pyruvate kinase, a key enzyme of glycolysis, and *dmsA* encoding dimethyl sulfoxide (DMSO) reductase, a key component of anaerobic respiration. We suggest that the *adiA* mRNA expresses the H⁺-consuming protein and the sRNA regulator to facilitate AR by coordinating central metabolism and organic acid fermentation under acidic and anaerobic conditions in *Salmonella*.

DP2-17-06/P2-091

アルテロモナス属細菌における翻訳アレスト因子の解析

○辻 奈緒子, 藤原 圭吾, 高田 啓, 千葉 志信 (京産大・生命科学)

Analysis of translation arrest peptides in *Alteromonas* species

○Naoko Tsuji, Keigo Fujiwara, Hiraku Takada, Shionobu Chiba (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo Univ.)

近年、制御された翻訳の一時停止を利用して、生理機能を発揮するタンパク質がいくつも見つかってきている。例えば、大腸菌で見つかった SecM は、翻訳の一時停止（翻訳アレスト）を利用して細胞のタンパク質局在能をモニターし、タンパク質局在化装置である SecA の発現量をフィードバック調節している。本研究では、新たなアレスト因子の発見を目的に、アルテロモナス属のプロテオーム上で RGPP や RAPP といった、最近当研究室で見出された翻訳アレストを起こしやすいアミノ酸モチーフの探索を行なった。さらに、探索に用いた生物のリボソームを精製して大腸菌の精製再構成の翻訳系と組み合わせた Hybrid PURE system を用いて探索した因子が翻訳アレストを起こすかどうかを検証した。その結果、RAPP を持つ翻訳アレストペプチドを新たに 2 つ、RGPP を持つ翻訳アレストペプチドを新たに 3 つ見出すことができた。興味深いことに、その多くは、アレストモチーフを C 末端付近に持っており、アレストを介して下流遺伝子の発現制御を担っている可能性が考えられた。実際、アルテロモナス属由来のアレスト因子について、大腸菌を用いたレポーターアッセイで解析したところ、5 つの因子全てが、翻訳アレスト依存的にそれぞれの下流遺伝子の発現量を上昇させた。また、そのうちのひとつについて、*in vivo*, *in vitro* での変異解析を行ったところ、アレスト依存的に mRNA の二次構造をアンフォールディングし、下流遺伝子の SD 配列を露出させることで、下流遺伝子の発現を誘導していることも示唆された。これらの結果は、下流遺伝子の発現量を制御する翻訳アレスト因子の普遍性と、その機能の多様性を示唆している。

DP2-17-07/P2-092

Exploring Cold Shock Protein Variants Across Bacterial Lineages and Analyzing Genome Characteristics

○長谷川 智^{1,2}, 猪瀬 礼璃菜¹, 森田 鉄兵^{1,3} (慶大・先端生命研, ²慶大・環境情報, ³慶大・政策メディア)

○Satoshi Hasegawa^{1,2}, Rerina Inose¹, Teppei Morita^{1,3} (Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²Fac. Env. Info. Studies, Keio Univ., ³Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.)

Cold Shock Proteins (CSPs) constitute a subset of bacterial RNA-binding proteins that are crucial for various cellular processes. CSP is conserved across a wide range of bacteria, and certain model bacteria exhibit multiple CSP genes. Recently, we identified a distinctive role of *Escherichia coli* CspD (*EcCspD*) in RNA production, involving the attenuation of transcription termination and stabilization of transcripts. Moreover, specific amino acid residues in the loop region were found to define the recognition of target RNA by *EcCspD*. In this work, we present a categorization scheme for CSD proteins based on these residues and explore their phylogenetic distribution. Additionally, the study further investigates how genome characteristics vary in bacterial strains with different CSD protein counts. Our results provide insights into broader trends among bacteria containing CSD proteins.

DP2-17-08/P2-094

Development of Bacteriophage Vectors for Targeted Gene Delivery to Cancer Cells

○菅野 貴史, Srivani Veeranarayanan, 相羽 由詞, 宮永 一彦, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Takashi Sugano, Srivani Veeranarayanan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Viral vectors are generally employed for therapeutic gene delivery with positive outcomes. However, there are limitations in terms of toxicity, costs, and cargo capacity. **In this study, we explored the potential of bacteriophages (phages) as an alternative vector system.** While phages naturally infect bacteria and lack specificity for mammalian cells, we sought to impart cancer cell tropism to phage through genome engineering. Our approach involved engineering phages to display various cancer cell-targeting peptides on their structural proteins, resulting in the successful generation of diverse engineered phages. Confocal microscopy and flow cytometric analysis confirmed the increased uptake of these engineered phages by cancer cells compared to wild-types. However, our assessment using an optimized plaque assay revealed varying outcomes, potentially attributed to the limitation of the plaque assay, which accounts only for viable phages. The endolysosomal pathway could lead to the degradation of internalized phages, justifying the diverse results observed with the plaque assay. In conclusion, our study demonstrates the successful synthesis of engineered phages displaying cancer cell-targeting peptides, achieved through a synthetic approach to confer cancer cell tropism. These findings pave the way for the development of efficient and targeted gene delivery systems using phages.

DP2-17-09/P2-095

高曲率性膜認識プローブを用いた膜小胞産生細菌の検出・分離

○大野 一騎¹, 佐藤 雄介², 徳田 真穂³, 新谷 政己^{1,3,4,5}, 大熊 盛也⁴, 二又 裕之^{1,3,5}, 田代 陽介^{1,3} (1静大院・総合科技, 2東北大院・理, 3静大院・創造, 4理研・BRC-JCM, 5静大・グリーン研)

Isolation of membrane vesicle-producing bacteria using probes sensing highly curved membranes

○Itsuki Oono¹, Yusuke Sato², Maho Tokuda³, Masaki Shintani^{1,3,4,5}, Moriya Ohkuma⁴, Hiroyuki Futamata^{1,3,5}, Yosuke Tashiro^{1,3} (1Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2Grad. Sch. Sci. Tohoku Univ., 3Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 4BRC-JCM, RIKEN, 5Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

【目的・背景】細菌が細胞外に放出する膜小胞は細胞間情報伝達の媒介としての役割を有している。そのため、病原菌から宿主細胞への毒素運搬や腸内環境における微生物間相互作用を理解する上で膜小胞産生細菌の実態を明らかにすることが重要である。これまで培養可能な微生物の培養上清から膜小胞形成量を評価する手法が主流であり、膜小胞を活発に産生する細菌を迅速・簡便に検出することが困難であった。そこで本研究では、膜小胞形成部位で細胞膜表面が湾曲する点に着目し、高曲率性膜を認識するペプチドプローブ ApoC-NR を用いた膜小胞産生細菌の迅速検出法の確立を目的とした。【方法・結果と考察】緑膿菌 PAO1 野生株 (WT) およびその膜小胞低産生株, *Buttiauxella agrestis* JCM 1090^T WT およびその膜小胞過剰産生株を用いて膜小胞産生能と ApoC-NR による蛍光標識との関係を検証したところ、膜小胞および膜小胞産生能の高い細菌が標識された。また、ApoC-NR 標識後、菌体を経時的に観察したところ、菌体周囲に膜小胞が観察された時間帯において標識による蛍光強度が強くなる様子が確認された。*B. agrestis* にて ApoC-NR を結合させた金ナノ粒子で標識したところ、過剰産生株表面の湾曲部位において金ナノ粒子の結合が確認された。さらに、ApoC-NR 標識細菌をフローサイトメトリーで解析した結果、膜小胞を活発に産生する細菌の分離可能性が示された。今後は、純粋培養系における標識細菌の分離より膜小胞産生因子の探索、また、複合微生物系を構成する環境からの膜小胞産生細菌の分離を目指す。

DP2-17-10/P1-091

Engineering a safety-enhanced synthetic phage capable of efficiently eliminating MRSA

○Minh Huong Nguyen¹, 氣 恒太郎^{1,2}, Veerananarayanan Srivani¹, XinEe Tan¹, Justin Edrian Cocuangco Revilla¹, 渡邊 真弥¹, 宮永 一彦¹, 相羽 由詞¹, 笹原 鉄平¹, 崔 龍洙¹ (1自治医科大・医・細菌学, 2国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Minh Huong Nguyen¹, Kotaro Kiga^{1,2}, Veerananarayanan Srivani¹, XinEe Tan¹, Justin Edrian Cocuangco Revilla¹, Shinya Watanabe¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Yoshifumi Aiba¹, Tepei Sasahara¹, Longzhu Cui¹ (1Div. Bacteriology, Dept. Infection and Immunity, Jichi Medical Univ., 2Research Center for Drug and Vaccine Development, National Inst. Infectious Diseases)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) stands as the most prevalent drug-resistant bacteria in clinical setting. However, new antibiotic development is stagnant, necessitating innovations to fight drug-resistant bacteria. With limited antibacterial agents against MRSA, the exploration of engineered phages as therapeutic agents emerges as a promising avenue for treating MRSA infections. Phage engineering offers the potential to create synthetic phages with distinct bactericidal mechanisms, fostering effective bacterial control and advancing antimicrobial therapy. However, ensuring biocontainment is imperative for safe application of phage therapy. Here, using synthetic and non-proliferative phage construction methods, we developed a phage formulation with potent bactericidal activity while remaining biologically contained as an alternative approach to combat MRSA. We first created a genome-reduced phage, allowing the loading of large therapeutic cargoes. By unlinking essential parts of the synthetic genome, we established a biocontainment mechanism to prevent engineered phage proliferation. The release of bactericidal agent enabled killing of infected and neighboring cells, leading to mass elimination of MRSA. This engineering strategy provides a platform to synthesize phages with improved bactericidal activity and biological safety compared to existing preparations.

DP2-17-11/P1-092

接合伝達を利用した納豆菌遺伝子組換え系の確立と利用

○須田 和奏¹, 板谷 光泰², 朝井 計¹ (1東京農大・バイオ, 2信州大・物質化学)

Gene recombination system for *Bacillus subtilis natto* by conjugation

○Wakana Suda¹, Mitsuhiro Itaya², Kei Asai¹ (1Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agricul., 2Dept. Materials Chem., Shinshu Univ.)

【背景・目的】納豆菌は、研究・産業面で有用な細菌だが、形質転換効率が低いこと、トランスポゾンによるランダムな遺伝子破壊が生じることが育種や研究の障壁である。当研究室では、ヘルパープラスミド pLS20 依存的な接合伝達性プラスミド pCJ を作製し、納豆菌と同属亜種でグラム陽性モデル細菌である枯草菌を供与体とし、pCJ を移送する接合伝達系である“pCJ 移送系”を開発し、納豆菌の実験室株である BEST195 株に pCJ を導入した。(昨年度大会にて報告) これらの背景から、納豆菌の育種や研究のさらなる促進を目指し、pCJ 移送系を利用した納豆菌の遺伝子組換え系の確立とその利用を目的とした。【方法・結果】当研究室により納豆菌のトランスポゾンの転移抑制能を有することが示唆されている遺伝子 BSNT10618 を、相同組み換えによるテトラサイクリン (tet) 耐性遺伝子の挿入により破壊するカセットを pCJ にクローニングし、接合伝達により納豆菌へ導入することで接合伝達体を得た。pCJ は複製タンパク質が温度感受性であり、高温ではプラスミドとして維持できないため、tet を添加し高温で接合伝達体を培養することで、ゲノムへの組換え体を取得した。【結果・考察】接合伝達を利用した納豆菌の遺伝子組換え系を構築した。接合伝達体には、プラスミドの完全長が移送されたクローンと、部分的な欠落が生じたクローンが混在していた。この欠落は納豆菌ゲノムとの相同領域を含む領域に生じているため、宿主ゲノムとの相同配列の有無が接合伝達プラスミドの安定性に寄与していると考えられる。現在、遺伝子破壊株を用いたトランスポゾンの転移抑制能評価に取り組んでおり、その結果についても合わせて報告したい。

DP2-17-12/P1-093

枯草菌細胞中でのセグメント細菌の運動性・走化性系の完全再構築

○朝井 計¹, 田中 規起¹, 小椋 義俊², 桑原 知巳³ (1東農大・バイオ, 2久留米大・医・感染症, 3香川大・医・分子微生物)

Reconstitution of flagella biosynthesis of Segmented filamentous bacteria in *Bacillus subtilis*

○Kei Asai¹, Kouki Tanaka¹, Yoshitoshi Ogura², Tomomi Kuwahara³ (1Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agricul., 2Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med., 3Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ.)

Segmented filamentous bacteria (SFB) は哺乳類の腸管内に存在し、免疫活性化への関与が示唆される有用腸内細菌である。数種の SFB の全ゲノム塩基配列が解読されているが、難培養性のため遺伝子機能の解析が困難である。我々は SFB に近縁の、DNA 組み込みの許容力が高く、遺伝学的解析が容易なモデル土壌細菌 *Bacillus subtilis* (枯草菌) を土台として、枯草菌のゲノムへマウス SFB ゲノムを導入し、その機能解析を試みている。鞭毛のフラジェリンは宿主の自然免疫系を活性化することが知られていて、マウス SFB は 4 つのフラジェリン遺伝子をもつ。また、SFB は腸管定着の際に遊走することが想定されるが、無菌マウスの腸内において SFB の鞭毛は観察されていない。そこで、これらを腸管外で観察するために、走化性、運動性に関わる全遺伝子クラスターを枯草菌に導入、再構築し、解析することを目的とした。SFB の鞭毛形成遺伝子群は総全長約 60kb, 50 以上の遺伝子が含まれる、5 つの遺伝子クラスターからなっている。これらのクラスターを大規模 DNA 導入法を用いて枯草菌ゲノムに連結しながら一括導入した。一括導入株で枯草菌の運動性に顕著な変化はなかった。枯草菌の鞭毛遺伝子群は SigD シグマ因子で一括制御されていて、その相同遺伝子として SFB には FliA がある。SFB の全遺伝子クラスターを持つ株で FliA を過剰発現すると、枯草菌の運動性は部分的に阻害された。枯草菌の鞭毛形成遺伝子が、SFB の遺伝子の発現や機能に影響を及ぼしていると考え、枯草菌鞭毛遺伝子の一括破壊を試みている。

DP2-17-13/P1-094

Campylobacter jejuni の phase variation によって生じるバリエーションを安定化したライブラリーの作成と評価

○山本章治¹, 李謙一¹, 窪村 亜希子¹, 伊豫田 淳¹, 明田 幸宏¹, 相川 知宏², 岡村 雅史², 北条 史³, 大崎 敬子⁴, 三戸部 治郎⁴ (¹感染研・細菌第一, ²帯畜大・基礎獣医・応用獣医, ³杏林大院・医・実験動物施設, ⁴杏林大・医・感染症学)

Constructions and evaluations of *Campylobacter jejuni* phase-locked variant libraries

○Shouji Yamamoto¹, Ken-ichi Lee¹, Akiko Kubomura¹, Sunao Iyoda¹, Yukihiko Akeda¹, Chihiro Aikawa², Masashi Okamura², Fuhito Hojo³, Takako Osaki⁴, Jiro Mitobe⁴ (¹Dept. Bac. I., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Dep. Vet. Med., Div. Vet. Sci., Obihiro Univ. Agr. Vet. Med., ³Inst. Laboratory Animals, Graduate Sch. Med., Kyorin Univ., ⁴Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med.)

細菌性食中毒とギラン・バレー症候群の主要な起因菌であるカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) のゲノムは高変異性のリピート配列 polyG/C が挿入された遺伝子を多数コードしており, polyG/C のリピート数の変動に伴ってフレームシフト変異が可逆的に生じる。その結果, 野生型の蛋白質が発現する phase (ON) と発現しない phase (OFF) がランダムに切り替わる phase variation (PV) が起こり, 一つの個体から組合せ論的に無数のバリエーションがつけられる。例えばゲノムあたり 30 個の polyG/C 遺伝子を有する株の場合, 理論的に最大 $2^{30}=10$ 億種類のバリエーションを生じる。それらの PV バリエーションは潜在的に疾病のリスクをはらんでいるものの, 著しい多様性と不安定性が研究を困難にしている。そこで我々は *C. jejuni* の PV を安定化するためのゲノム編集法を確立し, 第 95 回日本細菌学会総会シンポジウムで報告した。リピート数の変動は連続した塩基における DNA 複製のエラーによって生じるため, 自然形質転換能を利用したゲノム編集を行い, リピート配列を中断させることによりその変動をロックする。その結果, 遺伝子の発現が ON もしくは OFF のどちらかの phase にロックされ, 表現型が安定化する。本研究ではマルチサイクル型のゲノム編集法を用いて *C. jejuni* (81-176 株と NCTC11168 株) のゲノムにコードされた全 polyG/C 遺伝子をランダムに異なる phase にロックし, 安定かつ多様な PV バリエーションからなるライブラリーを作成したので, その概要とともに活用例についても紹介させて頂きたい。*本研究は食品安全委員会食品健康影響評価技術研究 (課題番号 JPCAFSC20222205) および AMED (課題番号 JP21fk010861j0201) の支援を受けた。

DP2-17-14/P1-095

Zombie cells produced from the minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B

○小田 七星¹, 木山 花¹, 宮田 真人^{1,2} (¹大阪公大・院理, ²大阪公大・複合先端)

○Nanase Oda¹, Hana Kiyama¹, Makoto Miyata^{1,2} (¹Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

The goal of this study is to elucidate the role of the genome in maintaining cell life. Thus, we produce zombie cells by removing their genome and analyze changes during the process of cell recovery caused by transplanting another genome. We focused on the minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B (syn3B), capable of genome transplantation. Syn3B is a life form that has a chemically synthesized minimal genome composed only of essential genes for survival. As current genome transplantation into syn3B is done with keeping the original genome, we attempted to produce zombie cells by inducing restriction enzymes. When we tried three restriction enzymes derived from closely related species in syn3B, the number of reproducible cells decreased to 0.02% by one restriction enzyme. Then, most cells decreased their size and DNA content to 48% and 2%, respectively. Furthermore, we observed no significant changes in cell membranes and protein profiles. These results suggest that zombie cells were successfully produced from syn3B. The surviving cells showed mutations in the inducible restriction enzyme system. Next, we will achieve 100% zombification, by expressing additional restriction enzymes, and then resurrection from them.

DP2-17-15/P1-096

大腸菌トキシン-アンチトキシン系がファージ増殖に与える影響

○劉可, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Effect of *Escherichia coli* toxin-antitoxin systems on phage propagation

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

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, 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の毒性を阻害する。TA は, トキシンとアンチトキシンの性状や作用により 8 種類 (Type I-VIII) に分類されるが, Type I と Type II の TA がファージ防御に関わることはすでに報告されている。ファージが感染すると, アンチトキシンが分解されることでトキシンが活性化し, 感染菌の増殖が阻害される。その結果, 感染菌内で産生される子孫ファージ数が減少し, 不稔感染を引き起こされる。昨年の大会では, 大腸菌 O157:H7 株がもつ ECs3274-ECs3275 が type II の TA に属し, ECs3275 トキシンが生存に必須な遺伝子の発現を抑制することを報告した。今回, ECs3274-ECs3275 がファージ増殖に与える影響を検討した。ECs3274-ECs3275 の過剰発現により, O157 株に感染する PP01 ファージのブランク形成効率が約 2 分の 1 に減少した。また, ファージ感染後, ECs3275 は安定に存在したが ECs3274 は速やかに分解され消失した。以上の結果より, 既知の Type II の TA と同様に, ファージ感染後に ECs3274 アンチトキシンが消失することで ECs3275 トキシンが活性化し, 感染菌の増殖を阻害して不稔感染を引き起こす可能性が示唆された。現在, 大腸菌 K12 株にコードされる Type IV と Type V, Type VIII の TA がファージ防御に関与する可能性について検討している。本大会では, ECs3274-ECs3275 の結果と併せて報告する。

DP2-17-16/P1-097

大腸菌の抗ファージ因子群 AbpA-AbpB の活性化機構

○滝田 彩耶, 佐々木 隆臣, 新谷 優之介, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Activation of the AbpA-AbpB phage defense system in *Escherichia coli*

○Saya Takita, Takaomi Sasaki, Yunosuke Shintani, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Science and Engineering, Saitama Univ.)

細菌はファージ感染から逃れるために, 制限修飾系や CRISPR-Cas 系, トキシン-アンチトキシン系など, さまざまな防御機構を発達させてきた。我々は, 大腸菌の機能未知遺伝子群 *abpA-abpB* が広範な DNA ファージの増殖を抑えることを見出した。両遺伝子はオペロンを形成し, 抗ファージ作用には DNA スクレアーゼドメインをもつ AbpA と RNA ヘリケースドメインを持つ AbpB の両者が必要である。最近, AbpA と AbpB (以下, AbpAB) がファージ感染により活性化して, 感染菌の増殖を阻害することで, 菌内で産生される子ファージ数を減少させ, 不稔感染を引き起こすことが明らかになった。本研究では, AbpAB の活性化機構の解明を目的とした。ファージの単鎖 DNA 結合タンパク質 Gp32 と AbpAB を共発現させると, 大腸菌の増殖が速やかに停止した。また, DNA 結合能を失った Gp32 では増殖停止は見られなかった。さらに, Gp32 欠損ファージは AbpAB の抗ファージ作用を回避して増殖した。これらの結果は, 単鎖 DNA に結合した Gp32 が AbpAB を活性化することを示している。興味深いことに, AbpAB 発現菌に対して DNA 損傷剤を処理した場合や DNA 修復酵素 RecBCD を欠損させた場合, ファージが感染していないにもかかわらず, AbpAB は活性化して菌の増殖を停止させた。我々は, ファージ感染後に形成される DNA-Gp32 複合体や, DNA 複製や修復の中断により形成される DNA-タンパク質複合体が AbpAB を活性化するのではないかと考えている。現在, この可能性を検証するために, Gp32 と AbpAB の相互作用の必要性や大腸菌の DNA 修復に関わる DNA ポリメラーゼ I の関与などを調べている。

DP2-17-17/P2-096**Development of an antimicrobial phage-capsid targeting Colorectal cancer (CRC)-associated *E. coli***

○Ola Alessa¹, Kanate Thitiananpakorn¹, 日高 侑也¹, 相羽 由詞¹, 渡邊 真弥¹, 宮永 一彦¹, Srivani Veeranarayanan¹, XinEe Tan¹, 氣賀 恒太郎, 崔 龍洙¹ (自治医科大・医・細菌学, ²国立感染症研究所・創薬・ワクチン開発研究センター)

○Ola Alessa¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Yuya Hidaka¹, Yoshifumi Aiba¹, Shinya Watanabe¹, Kazuhiko Miyana¹, Srivani Veeranarayanan¹, XinEe Tan¹, Kotaro Kiga², Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Research Center for Drug and Vaccine Development, NIID)

Colorectal cancer (CRC) ranks among the leading causes of global death. The composition of human intestinal flora, particularly the abundance of certain pathogenic bacteria, has been associated with CRC development. Notably, a subgroup of *E. coli*, referred to as toxin X-producing *E. coli*, is implicated in CRC carcinogenesis. Eliminating this bacterial group could serve as an initial defense against CRC progression but preserving natural balance of gut flora through sequence-specific targeting is essential. This study aims to develop a CRISPR-Cas13a-loaded antimicrobial phage capsid (AB-capsid) to specifically eradicate toxin X-producing *E. coli*. Three types of identical Ca13a phagemids were constructed, each with a small variation in the spacer region. Two served as controls: one without spacer sequence Cas-NS and one carrying a non-targeted spacer Cas-NT. For targeted spacer construction, 21 spacers sequence along the key gene encoding toxin X were screened and the best spacer Cas-TS was chosen. These phagemids were later loaded into a helper phage capsid and the killing activity of the resulted AB-capsids was evaluated using target bacteria and a heterologous expression strain carrying the target gene. AB-capsid Cas-TS demonstrates promising results in specifically killing target bacteria in vitro and we are currently focusing on its further development for in vivo studies.

DP2-17-18/P2-097**Functional genomics reveals the mechanism of hypoxic adaptation in nontuberculous mycobacteria**

○立石 善隆, 尾関 百合子, 西山 晃史, 松本 壮吉 (新潟大・医・細菌)

○Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Akihito Nishiyama, Sohkichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

Mycobacterium intracellulare is a major etiological agent of the recently expanding Mycobacterium avium-intracellulare complex pulmonary disease (MAC-PD). To identify novel targets for drug development that accommodate the genomic diversity of M. avium-intracellulare, we subjected eight clinical MAC-PD isolates and the type strain ATCC13950 to genome-wide profiling to comprehensively identify universally essential functions. Among these strains, we identified 131 shared essential or growth-defect-associated genes. Unlike the type strain, the clinical strains showed an increased requirement for genes involved in gluconeogenesis and the type VII secretion system under standard growth conditions, the same genes required for hypoxic pellicle-type biofilm formation in ATCC13950. Consistent with the central role of hypoxia in the evolution of M. intracellulare, the clinical MAC-PD strains showed more rapid adaptation to hypoxic growth than the type strain. Importantly, the increased essentiality of hypoxic fitness genes was confirmed in a mouse lung infection model. These findings confirm the concordant gene essentiality under hypoxic conditions in vitro and hypoxia-related conditions in vivo, and highlight the importance of using clinical strains and host-relevant growth conditions to identify high-value targets for drug development.

DP2-17-19/P2-098**Novel chromosomal markers for detecting *Bacillus anthracis***

○Tuvshinzaya Zorig¹, 東 秀明¹, 古田 芳一¹, Atmika Paudel¹, Harvey Kamboyi¹, Misheck Shawa¹, Mungunsar Chuluun¹, 菅原 未紗¹, Musso Munyeme², Bernard Hang'ombe³ (¹北大・人獣共通感染症国際共同研究所・感染・免疫部門, ²Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, ³Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

○Tuvshinzaya Zorig¹, Hideaki Higashi¹, Yoshikazu Furuta¹, Atmika Paudel¹, Harvey Kamboyi¹, Misheck Shawa¹, Mungunsar Chuluun¹, Misa Sugawara¹, Musso Munyeme², Bernard Hang'ombe³ (¹Div. Infection and Immunity, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., ²Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, ³Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

Bacillus anthracis, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* are highly similar bacterial species in terms of genetic background yet exhibit distinct phenotypic characteristics. It's challenging to identify species-specific marker genes for each of these species. Among these three, *B. anthracis* causes acute infections in animals and humans, making it a significant concern as a pathogen and biological agent. Accordingly, accurate diagnosis of *B. anthracis* is essential for public safety. Here, we identified eleven *B. anthracis* chromosome-encoded specific genes by performing pan-genome comparison analyses among 151 whole-genome sequences consisting of *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, and *B. weihenstephanensis* strains. The distribution of genes among the sampled genomes exhibits a distinct pattern depending on bacterial species and strains. Further, comparative analyses identified genes exclusively present in *B. anthracis*. Based on the identified genes, we established multiplex polymerase chain reactions for an accurate and reliable alternative method for detecting *B. anthracis*. Furthermore, the identified genetic markers have importance in anthrax vaccine development and understanding the pathogenicity of *B. anthracis*.

DP2-18-01/P1-174**イミペネム中等度耐性 *Bacteroides thetaiotaomicron* のドラフトゲノム解析**

○後藤 隆次, 林 将大, 田中 香お里 (岐阜大・糖鎖生命コア研・嫌気性菌)

Draft genome sequencing of the imipenem-intermediate resistant *Bacteroides thetaiotaomicron*

○Takatsugu Goto, Masahiro Hayashi, Kaori Tanaka (Div. Anaerobe Res., Inst. for Glyco-core Res., Gifu Univ.)

【目的】 *Bacteroides* 属 (特に *B. fragilis*) のカルバペネム高度耐性機構は盛んに研究されているが、本属のカルバペネム中等度耐性を呈する菌種 (non-fragilis 含む) も 2~3% 存在し、時に臨床的に問題となる。本研究で我々は、*Bacteroides thetaiotaomicron* GAI 02073 株のドラフトゲノム解析を行い、過去に我々が報告した中等度耐性 *B. fragilis* GAI 92214 株の全ゲノム配列間との比較ゲノム解析を行い、中等度耐性株に共通する遺伝子領域や耐性責任因子の推定を目指す。

【方法】 *B. thetaiotaomicron* GAI 02073 株の薬剤感受性試験を行ったところ、imipenem, meropenem の MIC 値は順に、4~4.8, 1 (μg/mL) であり、本株は imipenem に中等度耐性を示した。本株のゲノム DNA ライブラリーを調製後、PacBio Sequel IIe にて塩基配列決定を行った。アセンブル、遺伝子予測には、順に Flye 2.8.3, Prokka 1.14.5 を使用した。

【結果・考察】 ゲノム解析により、リード数 41,500 reads, 平均長 6,445 bp, 総塩基数 267,474,543 bp, ≥Q30 値 98.7% の配列データを得た。アセンブルにより 7 本の contig が得られ、N50 値, GC 含量, Genome coverage は、順に 4,793,208 bp, 43.1%, 38 であった。これらの contig 内における CDS, rRNA, tRNA の合計は、順に 5,887, 15, 76 であった。本解析で得られた contig の合計長 (計 7,112,075 bp) が本菌種で既報の全ゲノム株の染色体長より長く、今後、contig の重複や位置確認を要する。現在、GAI 92214 株等との比較ゲノム解析を行い、中等度耐性株に特有の領域や耐性因子の推定を試みている。

DP2-18-02/P1-175

細菌のシステインによるストレプトマイシンの付加体形成

○小野 勝彦¹, 新留 琢郎², 赤池 孝章³, 澤 智裕¹ (1熊本大・生命科学・微生物, 2熊本大・自然科学・生命材料, 3東北大・医・環境保健医)

Adduct formation between cysteine and streptomycin in bacteria

○Katsuhiko Ono¹, Takuro Niidome², Takaaki Akaike³, Tomohiro Sawa¹ (1Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., 2Facul. Adv. Sci. Tech., Kumamoto Univ., 3Dept. Envir. Health Sci. Mol. Toxicol., Grad. Sch. Med., Tohoku Univ.)

【目的】細菌の産生するシステインやシステインパーサルフィドは、βラクタム系抗菌剤と反応することで、抗菌活性を失った反応産物を形成することが報告されている。このことからシステインやシステインパーサルフィドは薬剤耐性に寄与していることが考えられる。しかしながら、βラクタム系以外の抗菌剤に対する反応性や耐性機構への関与について不明な点が多く残されている。そこで本研究では、アミノグリコシド系抗菌剤に対するシステインやシステインパーサルフィドの反応性や薬剤耐性への関与を検討した。【方法】システイン、システインパーサルフィドとアミノグリコシド系抗菌剤の反応生成物の解析には、高速液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いた。さらにそれら反応産物の抗菌活性はディスク法で検定した。細菌や細菌培養上清からの反応産物の解析には質量分析計を用いて定量した。【結果】システイン、システインパーサルフィドのアミノグリコシド系抗菌剤であるストレプトマイシンとカナマイシンに対する効果を検討したところ、ストレプトマイシンはシステインにより抗菌活性を失うことを見出した。一方、カナマイシンに対して不活性化反応は見られなかった。さらにシステインとストレプトマイシンの反応産物の同定を試みたところ、1:1で反応したシステイン-ストレプトマイシン付加体が産生していることがわかった。ストレプトマイシンを処理した細菌からの付加体産物の検出を試みたところ、細菌内のみならず培養上清からも付加体産物を検出した。【考察】細菌の産生するシステインは、βラクタム系抗菌剤のみならず、ストレプトマイシンに対する薬剤耐性にも寄与していることが考えられる。

DP2-18-03/P1-176

臨床分離細菌由来メタロ-β-ラクタマーゼの菌体外排出

○上釜 綾夏, 豊元 悠弥, 津々木 博康, 澤 智裕 (熊本大院・生命科学・微生物学)

Extracellular release of metallo-beta-lactamases from clinically isolated gram-negative bacteria

○Ayaka Uegama, Touya Toyomoto, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ.)

【背景】メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、カルバペネム耐性を強力に誘導する酵素であり、ペリプラズムに局在する。MBLの1つであるNDM-1は膜親和性ドメインを持つことで外膜小胞を介して菌体外に分泌され、薬剤耐性に寄与する。しかしながら、IMP-1やVIM-2等の可溶性 MBL の機構については不明な点が多い。そこで本研究では、可溶性 MBL の菌体外排出について検討を進めた。

【方法】IMP-1およびVIM-2の組換えタンパク質を作製し、ウサギへの免疫により抗血清を得た。得られた抗血清を用いたウェスタンブロット法にて、IMP-1またはVIM-2産生が確認されている臨床分離細菌(緑膿菌、肺炎桿菌、大腸菌)の菌体内および培養上清中のこれら酵素を検出した。また、培養上清中のIMP-1およびVIM-2が野生株大腸菌のβ-ラクタム感受性に影響を与えるかを検討した。

【結果】ウェスタンブロットの結果から、緑膿菌由来のIMP-1およびVIM-2が菌体外に大量に分泌されていること、それが外膜小胞を介さない機構であることが示唆された。また、IMP-1を含む培養上清を野生株大腸菌と共培養すると、野生株大腸菌のβ-ラクタム感受性が顕著に低下した。

【今後の展望】これらの結果から、IMP-1およびVIM-2産生菌は、自身のカルバペネム耐性のみならず、共存する感受性菌に対して、カルバペネムへの感受性を低下させる可能性が示唆された。今後、これら酵素の菌体外排出機構を明らかにするとともに、感染宿主でのIMP-1やVIM-2の検出法や、これを標的とした治療法の構築を進めていきたい。

DP2-18-04/P1-177

呉医療センターから分離されたバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の細菌学的特性

○小林 秀丈¹, 首藤 毅², 嶋田 徳光², 新開 美香², 吉野 弘絵², 前田 龍人², 高田 正弘², 清家 総史¹, 佐和 章弘³, 山中 浩泰¹ (1広島国際大・薬・分子微生物科学, 2呉医療センター中国がんセンター, 3広島国際大・薬・医療薬学研究中心)

Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) Isolated from Kure Medical Center

○Hidetomo Kobayashi¹, Takeshi Sudo², Norimitsu Shimada², Mika Shingai², Hiroe Yoshino², Ryuto Maeda², Masahiro Takada², Soshi Seike¹, Akihiro Sawa³, Hiroyasu Yamanaka¹ (1Lab. Mol. Microbiol. Sci., Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., 2Nat. Hosp. Org. Kure Med. Cent. and Chugoku Cancer Cent., 3Res. Cent. for Pharm. Health Care and Sci., Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ.)

薬剤耐性菌の増加は全世界的に大きな課題となっており、特にバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の出現は、抗生物質治療の選択肢を限定し、感染管理の難易度を一層高めている。これら耐性菌は、治療不可能な感染症を引き起こすリスクを増大させ、医療提供体制に重大な影響を及ぼす。そこで、本研究では、広島県呉市に位置する病床数700床の大規模病院である呉医療センターから分離されたVREの細菌学的特性、分布、耐性メカニズム、および遺伝的多様性を明らかにし、院内でのその拡散パターンを解明することを目的とした。

2021年から3年間に分離されたVREについて、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を実施した。その結果、30株 (76.9%) が高い遺伝的類似性を示し、これらは近縁株であると推測された。さらに、*van* 遺伝子型について決定した結果、全ての分離株が *vanA* 遺伝子を保有しており、バンコマイシンに加え他の複数の抗生物質に対する耐性を示すことが確認された。また、Multilocus sequence typing (MLST) による型別も実施した結果、これら近縁株は広島県内で流行している ST80 系統と同型であることが判明した。

今後、ST80 系統が呉医療センターに持ち込まれた経路を推定し、地域内でのVREの監視と管理に重要な情報を提供することを旨とする。特に、遺伝的分析を通じて得られた知見は、感染症対策の立案において貢献することが期待される。本研究は、医療施設内だけでなく、将来的に地域社会全体での薬剤耐性菌の監視や制御に向けた取り組みに貢献するものと考えている。

DP2-18-05/P1-178

環境性乳房炎の原因となる大腸菌群の薬剤耐性機構の解析

○島本 敏¹, 鈴木 直樹², 島本 整¹ (1広島大・院・統合生命・食品衛生微生物学, 2広島大・院・統合生命・陸域フィールド科学)

Analysis of the antimicrobial resistance mechanism of coliform bacteria causing mastitis

○Toshi Shimamoto¹, Naoki Suzuki², Tadashi Shimamoto¹ (1Dept. Microbiol. Food Safety, Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ., 2Dept. Terrestrial Field Sci., Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ.)

【目的】乳房炎は乳牛の疾病の中で最も多く発生し、酪農業に経済的な損失をもたらすとともに公衆衛生上の問題となっている。特に大腸菌群を原因菌とする環境性乳房炎は他の細菌による乳房炎と比較して重症化しやすく、制御が必要である。乳房炎の予防および治療のために抗菌薬を使用するが、不適切な抗菌薬の使用は薬剤耐性菌の発生を促し乳房炎の治療を困難にする恐れがある。本研究では、ワンヘルスの概念に基づき、酪農場における乳房炎原因菌の薬剤耐性機構の解析を目的とした。

【方法】広島県内の戻し堆肥フリーバーン牛舎の酪農場から定期的にサンプリングを実施し、大腸菌群を分離した。そして、分離菌株について multiplex PCR 法を利用した種の同定および薬剤耐性遺伝子の検出を行った。

【結果と考察】大腸菌およびアンピシリン耐性大腸菌は、いずれも夏場に多く、気温の低下にともなって減少したが、大腸菌以外の大腸菌群には、大きな季節変動は認められなかった。4回のサンプリングで大腸菌658株、肺炎桿菌179株を含む計1,444株を分離し、乳房炎を発症した乳牛から大腸菌2株、肺炎桿菌1株を分離した。薬剤耐性菌は水路、飲水、堆肥、牛床、餌などを含むサンプリングポイント全体で分離された。薬剤耐性遺伝子として、大腸菌では *bla*_{TEM}、肺炎桿菌では *bla*_{SHV} が高頻度に検出され、*bla*_{CITX-M} やテトラサイクリン耐性遺伝子も両者から高頻度に検出された。この結果は、本酪農場で用いられる抗菌薬の選択圧による影響であることが示唆された。

【謝辞】本研究は、公益財団法人全国競馬・畜産振興会 畜産振興事業の助成を受けた。

DP2-18-06/P1-179

観光地に生息する野生のシカから分離された薬剤耐性大腸菌の分子遺伝学的解析

○中野 章代¹, 中野 竜一¹, 鈴木 由希¹, 堀内 沙央里¹, 山口 晃一¹, 坂田 竜二², 小川 美保², 矢野 寿一¹ (1)奈良医大・医・微生物感染症, (2)BML・細菌検査)

Genetic characteristics of drug-resistant *Escherichia coli* isolated from wild deer

○Akiyo Nakano¹, Ryuichi Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Saori Horiuchi¹, Koichi Yamaguchi¹, Ryuji Sakata², Miho Ogawa², Hisakazu Yano¹ (1)Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., (2)Dept. Bacteriol., BML, Inc.)

【目的】野生動物がヒトと密接に関わりを持つことで、人獣共通感染症や薬剤耐性菌の授受が懸念される。ワンヘルスの概念からも野生動物が保有する薬剤耐性菌を把握することは重要である。本研究では、ヒトと接する機会がある観光地に生息する野生のシカから分離した大腸菌の薬剤耐性状況と分子遺伝学的特徴を解析した。

【方法】2018年10月～2024年1月に北海道湖畔（阿寒湖、屈斜路湖、支笏湖）、奈良公園、広島県宮島、鹿児島県阿久根島に生息する野生のシカ糞便284検体を採取した。DHL寒天培地に塗抹しMALDI-TOF MSで大腸菌と同定された1検体1株を対象とした。CLSIに準拠した薬剤感受性試験による耐性率算出、シーケンズ解析による耐性遺伝子とゲノム型の決定、PFGE解析とゲノム解析（MiSeq, MinION）による同源性検索を行った。

【結果】分離した大腸菌はどの地域もアンピシリンに高い耐性を示し、カルバペネムやキノロン系薬には全て感性であった。耐性率に地域差はあるが全ての地域から第3世代セファロスポリン系薬（3GC）耐性株が分離され、その多くがCTX-M型遺伝子を保有していた。ゲノム型は地域により異なる傾向であった。特に奈良公園ではCTX-M-15保有大腸菌ST3580が69株（50%）と優位で、PFGEのバンドは全て同じであった。いずれも接合伝達能はなくCTX-M-15遺伝子は染色体上にコードされていた。次いでCTX-M-14保有大腸菌が12株あり、STは多岐に分かれたがいずれも接合伝達可能でCTX-M-14遺伝子はプラスミドInc11-Ia上にコードされていた。

【結論】観光地に生息する野生のシカは、3GC耐性大腸菌を保有していた。耐性率やゲノム型は生息地により異なり、独自のクローンの拡がりが見られた。

DP2-18-07/P1-180

Serratia marcescens における2成分制御系 SarRS を介した消毒薬耐性機構の解析

○百留 孝士郎^{1,2}, 谷重 萌¹, 安岡 帆帆¹, 近藤 有馬², 森田 大地², 小川 和加野³, 熊谷 孝則², 黒田 照夫² (1)広島大・薬, (2)広島大・医系科学・微生物医薬品, (3)第一薬科大・薬・免疫薬品)

Analysis of disinfectant resistance mechanism via two-component system SarRS in *Serratia marcescens*

○Koshiro Hyakutome^{1,2}, Moyu Tanishige¹, Riho Yasuoka¹, Yuma Kondo², Daichi Morita², Wakano Ogawa³, Takanori Kumagai², Teruo Kuroda² (1)Sch. Pharm., Hiroshima Univ., (2)Dept. Microbiol. Med., Sch. Med. Sci., Hiroshima Univ., (3)Dept. Microbiol. & Bioche. Daiichi Univ. of Pharm.)

Serratia marcescens は院内感染の原因菌の一つであり、本菌が複数の抗菌物質に対して高い自然耐性、獲得耐性を持つことからその感染症は重篤化しやすいといわれている。近年では、消毒薬に耐性化し、院内感染を引き起こした例も報告されている。しかし、*S. marcescens* の消毒薬耐性機構については未だ不明な点も多い。私たちはこれまでに、継代培養により分離した消毒薬 Chlorhexidine (CHX) 高度耐性株において RND 型多剤排出ポンプ SdeXY-OmsA の発現が上昇し、全ゲノムシーケンズの結果から5つの遺伝子が CHX 耐性に関与していることを明らかにした。このうち、新規2成分制御系の sensor kinase である SarS の変異が、response regulator である SarR を介してこの発現上昇に深く寄与することも見出している。今回は SarR についての解析結果を報告する。C末端に His-tag を付与した SarR は、大腸菌 KAM32 を用いて大量発現させた後、Ni-NTA 樹脂を用いて精製した。ゲルシフトアッセイは Electrophoretic Mobility Shift Assay Kit (Invitrogen) を用いて行った。精製した SarR を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、推定 sdeP プロモーター領域（開始コドンから約100bp上流）と推定 sarR プロモーター領域（開始コドンから約300bp上流）のそれぞれに SarR が特異的に結合することが示された。この結合により SarR が sdePQ-omsA の発現上昇を行っていることが強く示唆されるとともに、自己の発現を制御していることが強く示唆された。現在、SarR の結合部位が *S. marcescens* のゲノム上のどこに存在するかを網羅的に解析中である。

DP2-18-08/P1-181

ワンヘルスアプローチに基づくヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性調査

○四宮 博人, 浅野 由紀子, 平井 真太郎, 福口 優桂, 大塚 有加 (愛媛県立衛生環境研究所)

AMR surveillance of human and food-derived *Escherichia coli* strains based on the one health approach

○Hiroto Shinomiya, Yukiko Asano, Shintarou Hirai, Yuka Fukuguchi, Yuka Otsuka (Ehime Pref. Inst. Pub. Health Environ. Sci.)

In the issue of drug resistance (AMR), a one-health approach encompassing environment-animal-food-human, etc. is important. We have conducted drug susceptibility testing (18 drugs) of various *Escherichia coli* isolated from humans and foods between 2015 and 2022 to clarify the drug resistance status in Japan. Among 2611 human *E. coli* strains, 915 (35.0%) strains were resistant to one or more drugs. The resistance rates by category were 29.1% for EHEC strains, 68.6% for diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC, and 62.4% for other *E. coli* strains. The percentage of multidrug-resistant *E. coli* strains that were resistant to six or more drugs was 1.7% for EHEC strains, 9.4% for diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC, and 29.1% for other *E. coli* strains. On the other hand, 92 of 165 food-derived (beef, chicken, etc.) strains (55.8%) were resistant to one or more drugs, with EHEC strains accounting for 27.8%, diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC for 64.6%, and other *E. coli* strains for 56.6%. Moreover, resistance profiles to various antimicrobial agents differ significantly among EHEC strains, diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC, and other *E. coli* strains, suggesting the possibility that the selection pressure for antimicrobial agents varies depending on the habitat of different *E. coli* taxa. (共同研究者: 23地衛研の研究協力者)

DP2-18-09/P1-182

家畜および畜産農家の鼻前庭から分離された薬剤耐性グラム陽性球菌の性状解析

谷口 琉星¹, ○中野 竜一¹, 中野 章代¹, 鈴木 由希¹, 斧 康雄², 矢野 寿一¹ (1)奈良医大・医・微生物感染症, (2)京平成大)

Characteristics of drug-resistant gram-positive cocci nasal carriage in livestock and farmers

Ryusei Taniguchi¹, ○Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Yasuo Ono², Hisakazu Yano¹ (1)Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara. Med. Univ., (2)Teikyo Heisei. Univ.)

【目的】医療現場においてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌など薬剤耐性菌の制御は世界的にも重要な問題となっている。これら薬剤耐性菌は臨床のみならず動物やヒトからも分離されるため、One Health の概念に基づき包括的に解析することが求められている。本研究では家畜と畜産農家の鼻前庭から分離される薬剤耐性菌に注目し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】2013～2015年に63畜舎の家畜（ウシ105頭、ブタ67頭）ならびにその畜産農家61人から収集した鼻前庭ぬぐい液233検体を対象とした。マンニット食塩寒天培地に培養された菌株について、質量分析器（MALDI-TOF-MS）により菌種を同定した。薬剤感受性について寒天平板希釈法により決定した。耐性遺伝子 *mecA* の保有状況についてPCR法により決定した。

【結果】家畜（ウシ由来15菌種、ブタ由来8菌種）と畜産農家（12菌種）から *Mammaliococcus* もしくは *Staphylococcus* が同定された。いずれも *Mammaliococcus sciuri* が最多であり、ウシで52株（49.5%）、ブタで45株（67.1%）、畜産農家で18株（29.5%）分離された。*M. sciuri* の Cefoxitine に対する MIC90 はウシで8 µg/ml、ブタで16 µg/ml、畜産農家で8 µg/ml と高値だった。このうち *mecA* 保有株はウシで14株（26.9%）、ブタで36株（80.0%）、畜産農家で5株（27.8%）であった。また、畜産農家では *Staphylococcus aureus* が16株（26.2%）分離され、すべてメチシリン感受性黄色ブドウ球菌だった。

【結論】家畜、農家ともに鼻前庭常在菌は *M. sciuri* が多数を占めており、同菌株を共有している可能性が推測された。特にブタからの分離株は *mecA* 保有率が高かった。

DP2-18-10/P1-183

本邦医療機関の排水より分離された薬剤耐性大腸菌の分子遺伝学的特徴

○鈴木 由希¹, 中野 竜一¹, 中野 章代¹, 野村 泰充¹, 堀内 沙央里¹, 朝田 智子¹, 山口 晃一¹, 齊藤 開², 渡邊 真子³, 矢野 寿一¹ (1奈良医大・医・微生物感染症学, 2自治医科大学附属さいたま医療センター, 3深谷赤十字病院)

Molecular characteristics of drug resistant *Escherichia coli* isolated from hospital sewage in Japan

○Yuki Suzuki¹, Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yasumitsu Nomura¹, Saori Horiuchi¹, Tomoko Asada¹, Koichi Yamaguchi¹, Kai Saito², Mako Watanabe³, Hisakazu Yano¹ (1Dept. Microbiology and Infectious Diseases, Nara Medical Univ., 2Jichi Medical University Saitama Medical Center, 3Fukaya Red Cross Hospital)

【目的】近年、薬剤耐性菌対策の一環として環境排水のモニタリングや処理方法が注目されている。しかし、排水中の薬剤耐性菌の実態やヒト由来分離株との関連性、ヒトへのリスクについては不明な点が多い。今回私たちは、医療機関の排水から分離された薬剤耐性大腸菌について分子遺伝学的特徴を明らかにした。

【方法】2020年7月から2022年4月の期間に、本邦の医療機関一か所より排水を1回/月、計21回採取し、mSuper CARBATMと第3世代セファロスポリン含有DHL寒天培地にて薬剤耐性菌を選択培養した。コロニー形態と薬剤感受性パターンとの異なる株を選択し、質量分析(MALDI-TOF MS)により菌種を同定した。耐性遺伝子(ESBL, カルバペネマーゼ)の型別はPCRとDNAシークエンシングにより、薬剤感受性はCLSIに準拠した寒天平板希釈法により決定した。ゲノム型はMLST解析を実施した。

【結果】採取した病院排水21サンプルより、計2,345株のグラム陰性桿菌が分離された。ESBL産生大腸菌は51株あり、薬剤感受性はCTX 8->256 µg/ml, IPM ≤0.06 - 0.5 µg/mlであった。遺伝子解析の結果、CTX-M-27が19株と最も多く、CTX-M-14が14株、CTX-M-15が9株、他CTX-M-3やCTX-M-55産生株が分離された。MLST解析の結果、ST131が29株と最も多く検出された。ほかST1193, ST38, ST167などヒトからも分離されるSTを含め多様なゲノム型が検出された。

【結論】病院排水中のESBL, カルバペネマーゼ産生大腸菌の存在が明らかになり、ヒト臨床より報告の多いCTX-M-27やCTX-M-14を産生するST131が排水からも検出された。ヒト臨床分離株との関連性について調査が必要だと思われた。

DP2-18-11/P1-184

Viruses encode tRNA and harbor anti-retron to evade bacterial immunity

○アザム アアハエルマン¹, 千原 康太郎¹, 近藤 恒平², 中村 暢宏¹, 小島 新二郎¹, ニエ ウェンハン¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈¹, 崔 龍洙³, 氣賀 恒太郎^{1,3} (1国立感染症研・治ワク, 2国立感染症研・AMRセンター, 3自治医科大学・医・細菌学)

○Aa Haeruman Azam¹, Kotaro Chihara¹, Kohei Kondo², Tomohiro Nakamura¹, Shinjiro Ojima¹, Wenhan Nie¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita¹, Longzhu Cui³, Kotaro Kiga^{1,3} (1Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., 3Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Retrons are bacterial retroelements encoding reverse transcriptase, which can produce multicopy single-stranded DNA (msDNA) and serve as anti-phage defense systems. Nevertheless, our understanding of how phages evade retrons remains limited. We showed that tRNA and retron anti-defense (Rad) inhibit retron-Eco7 and various other retrons, respectively. The effector protein of retron-Eco7, PtuAB, degraded tRNA-Tyr leading to abortive infection; however, phage counteracted retron-Eco7 by supplying tRNA-Tyr. Rad inhibited retron function by degrading msrmsd RNA, the precursor of msDNA. In subsequent analyses, we showed that phage-derived tRNA neutralizes the tRNA-degrading defense system (PrrC170). Emphasizing the use of phage-derived tRNA to evade anti-phage defense represents a general strategy used by phages. We demonstrate that viruses utilize two strategies, anti-defense (e.g., Rad) and defense cancellation (e.g., tRNA), to overcome bacterial defenses. The identification of anti-defense proteins and tRNA defense-canceling functions illuminates the prospect of engineering phages with enhanced capabilities to circumvent bacterial defenses, thereby potentially augmenting their efficacy as therapeutic agents.

DP2-18-12/P1-185

結核菌異物排出系複合体のコンポーネント間相互作用

○川端 美希子¹, 山本 健太郎², 田島 寛隆^{3,4}, 阿戸 学², 川岸 郁朗^{1,3,4} (1法政大・院理工・生命機能, 2国立感染症研・感染制御, 3法政大・生命科学・生命機能, 4法政大・ナノテクセンター)

Direct interaction of xenobiotic efflux components MmpL5 and MmpS5 in *Mycobacterium tuberculosis*

○Mikiko Kawabata¹, Kentaro Yamamoto², Hirotaka Tajima^{3,4}, Manabu Ato², Ikuro Kawagishi^{1,3,4} (1Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., 2Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, 3Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., 4Res. Cen. Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は結核の原因となる抗酸菌である。抗酸菌はグラム陽性菌に分類されるが、ペプチドグリカン層 (PG) の外側にミコール酸を主成分とする外膜様構造 (mycomembrane) をもつ特殊な細菌群である。近年、複数薬剤に耐性を持つ多剤耐性結核菌が世界的に公衆衛生上の問題となっている。多剤耐性化の原因の一つとして、異物排出系の発現亢進が挙げられる。結核菌は異物排出系内膜チャネルである MmpL を 13 種類もち、そのうち MmpL5 は抗酸菌に使用される抗生物質であるベダキリンとクロファジミンに対する薬剤耐性に関与する。MmpL5 は膜タンパク質 MmpS5 と共に機能することが示唆されているが、これらの結合の詳細や排出メカニズムは分かっていない。本研究では、MmpL5 と MmpS5 の直接的な相互作用について検証した。まず MmpS5 のペリプラズムドメイン、MmpL5 全長を発現する系を構築した。MmpS5 のフラグメントと MmpL5 含む膜小胞を用いて超遠心によるプルダウンアッセイを行ったところ、MmpS5 が MmpL5 と直接結合することを示す結果が得られた。次に、MmpL5-S5 の推定輸送基質による結合への影響を検証するため、抗生物質存在下でプルダウンアッセイを行った。また、MmpS5 存在下で MmpL5-GFP の膜上の側方拡散が制限されることを利用して、*in vivo* で MmpL5-S5 間の結合に関与するアミノ酸残基を特定するための系を構築した。現在、非病原性の抗酸菌である *M. smegmatis* に MmpL5-GFP と一残基変異を導入した MmpS5 を発現させ、全反射蛍光顕微鏡による一分子観察を行っている。

DP2-18-13/P1-186

本邦医療機関の排水より分離されたカルバペネマーゼ産生 *Delftia tsuruhatensis* 3 株の解析

○藤倉 裕之^{1,2,3}, 鈴木 由希¹, 中野 竜一¹, 中野 章代¹, 野村 泰充¹, 堀内 沙央里¹, 山口 晃一¹, 笠原 敬³, 矢野 寿一¹ (1奈良医大・医・微生物感染症, 2尼崎総合医療センター・感染症内科, 3奈良県立医科大・感染症内科学)

Genetic analysis of three carbapenemase-producing *Delftia tsuruhatensis* from hospital sewage

○Hiroyuki Fujikura^{1,2,3}, Yuki Suzuki¹, Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yasumitsu Nomura¹, Saori Horiuchi¹, Koichi Yamaguchi¹, Kei Kasahara³, Hisakazu Yano¹ (1Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., 2Dept. Infect. Dis., Amagasaki Gen. Med. Ctr., 3Dept. Infect. Dis., Nara Med. Univ.)

【背景】カルバペネマーゼ産生菌は、人だけでなく環境にも広がっていることが知られている。*Delftia tsuruhatensis* は環境中に存在するグラム陰性桿菌で、ヒトに感染を起こすことは稀だが、特に免疫不全者や血管内デバイスを留置している患者において致死的な感染症を引き起こしうる。また、通常カルバペネムに感性であり、カルバペネマーゼ産生株の報告も稀である。今回、医療機関の排水から分離された3株のカルバペネマーゼ産生 *D. tsuruhatensis* について解析したので報告する。【方法】本邦医療機関の排水より分離され、質量分析装置により *Delftia acidovorans* として同定された3株 (NW967, NW1561, NW1562) を対象とした。菌種の同定はANIにより、薬剤感受性はCLSIに準じた寒天平板希釈法にて決定した。ゲノム解析として、次世代シークエンサーを用いてDNA塩基配列を決定し、遺伝子構造を解析した。【結果】ANI解析の結果、3株は全て *D. tsuruhatensis* であった。3株のMICは、IPMが1-8 µg/ml, MEPMが4-8 µg/mlで、全てmCIM陽性であった。ゲノム解析の結果、NW967, NW1561の2株はIMP-1を、NW1562はGES-24を保有しており、IMP-1はそれぞれ約21と27kbpの、GES-24は約65kbpのプラスミド上のクラス1インテグロン内にコードしていた。3株のプラスミド構造はそれぞれ異なっていた。【結論】病院排水からカルバペネマーゼ産生 *D. tsuruhatensis* を検出した。今後、環境中の薬剤耐性菌とヒトから検出した臨床検体との関連性を検討する必要がある。

DP2-18-14/P1-187

鶏肉を汚染する AmpC/ESBL 産生および mcr 保有コリスチン耐性大腸菌の比較解析

○中山 達哉¹, 大畑 奈月¹, 山口 貴弘², 陳内 理生³, 久米田 裕子⁴, 長谷 篤⁵ (1)広島大・統合生命, (2)大安研・微生物部, (3)神奈川衛研・微生物部, (4)大工大・微制研, (5)帝塚山大・現代生活)

Comparative analysis of AmpC/ESBL-producing and colistin-resistant *Escherichia coli* in chicken meat

○Tatsuya Nakayama¹, Natsuki Ohata¹, Takahiro Yamaguchi², Michio Jinnai³, Yuko Kumeda⁴, Atsushi Hase⁵ (1)Grad. Sch. Int. Sci. Life, Hiroshima Univ., (2)Dept. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health, (3)Div. Microbiol., Kanagawa Pref. Inst. Pub. Health, (4)Res. Cent. Microorg. Cont., Osaka Met. Univ., (5)Fac. Contemp. Human Life Sci., Tezukayama Univ.)

プラスミドを介した薬剤耐性菌の蔓延は公衆衛生上の懸念事項であり、特に食品における本菌汚染はヒト耐性菌汚染へと繋がることから注視されている。我々の先行研究から、鶏肉は食品の中でも耐性菌汚染率が高いこと、さらに国内産と比較してベトナム産鶏肉では、AmpC型/基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生 (ESBL-EC) 及び mcr 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌 (COL-EC) による汚染率が高いことを明らかにしてきた。しかしながら、コリスチン耐性 ESBL-EC (COL-ESBL-EC) の実態は明らかではない。そこで、本研究では、ベトナム産市販鶏肉から COL-ESBL-EC の汚染率を明らかにし、ESBL-EC 及び COL-EC との比較により、薬剤耐性傾向を明らかにすることを目的とした。ベトナム産鶏肉 60 検体から 25g を切除し、225mL 緩衝ペプトン水にて 37°C 24 時間、増菌培養し、抗菌剤を含む CHROMagar ECC 及び MacConkey 寒天培地に画線塗抹した。分離した結果、鶏肉 66.7% から COL-ESBL-EC、78.3% から ESBL-EC 及び 43.3% から COL-EC が分離された。blaCTX-M の検出・同定した結果から COL-ESBL-EC 及び ESBL-EC では、blaCTX-M-55/TEM, blaCTX-M-55, blaCMY-2, blaCTX-M-65 が優勢であった。また、mcr 遺伝子を検出した結果、COL-ESBL-EC 及び COL-EC とともに、全株で mcr-1 を保有していた。さらに、薬剤感受性試験の結果、COL-ESBL-EC 及び ESBL-EC の多くはキノロン、ホスホマイシン (FOS) に耐性を示すとともに、COL-ESBL-EC, ESBL-EC, COL-EC の順で多剤耐性傾向を示していた。本結果から、AmpC/ESBL 関連遺伝子とキノロン、FOS 耐性遺伝子は同じ耐性プラスミドにコードされ、耐性プラスミド獲得によって、同時に耐性を獲得していると示唆された。

DP2-18-15/P1-188

プラスミド上にあるインテグロンの遺伝子構造に着目した新規薬剤耐性遺伝子の検索

○津田 裕介¹, 法月 千尋², 荒川 宜親³ (1)京大・附病院・検査部, (2)修文大・医療科学・臨床検査, (3)藤田医科大・医・細菌学)

Search for novel antimicrobial resistance genes by analyzing genetic structure of integrons

○Yusuke Tsuda¹, Chihiro Norizuki², Yoshichika Arakawa³ (1)Div. Clinic. Labo., Kyoto Univ. Hosp., Kyoto Univ., (2)Dept. Med. Tech., Med. Sci., Shubun Univ., (3)Dept. Bacteriol., Med., Fujita Health Univ.)

プラスミド上のインテグロン中には多くの薬剤耐性遺伝子があり、細菌の生存戦略に寄与している。また、インテグロン中には機能不明な遺伝子 hypothetical protein (HP) も多く含まれているが、インテグロンに存在する新規薬剤耐性遺伝子の機能解析はゲノム解析単独では困難である。本研究では、インテグロン中の薬剤耐性遺伝子の構成に着目した遺伝子構造の比較により HP の機能推定の解析を行うことで、新規の薬剤耐性遺伝子候補を探索した。まず、公共データベースに登録されていた大腸菌由来の 36,427 のプラスミド配列から、3,359 のインテグロンを抽出した。インテグロン中にある全ての遺伝子について Prokka でアノテーションを行った。配列情報からインテグロン中の HP を抽出したところ、1,857、215 種類が抽出された。ここから 10 kDa 以上の 1,461、136 種類の HP を選択し、blastp (e-value 0.01 以下) により機能的な遺伝子の候補が全く検出されない HP を抽出し、アミノ酸配列の相同性により整理したところ、651、68 種類の真の HP が抽出された。次に、intI1 を中心にインテグロン中の遺伝子構造の整理を行った。その結果、複数の薬剤耐性遺伝子を持つインテグロンと遺伝子構造が類似した真の HP (hypoI) を含むインテグロンを特定した。この hypoI は真の HP のうち最も検出数が多かった (205/651, 31.4%)。また、hypoI の上流には大腸菌内で詳細な機能が不明な遺伝子 (geneA) が含まれていることがわかった。現在、hypoI と geneA が新規薬剤耐性遺伝子である可能性があると考え、機能解析を行っている。

DP2-18-16/P1-189

緑膿菌のアズトレオナム耐性における MexAB-OprM およびその制御因子の役割

○林 光太¹, 野島 瑠莉¹, 大西 杏¹, 鴨志田 剛¹, 河村 好章², 森田 雄二¹ (1)明治薬大・薬・感染制御, (2)愛知学院大・薬・微生物)

Role of the MexAB-OprM and its regulators in aztreonam resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

○Kota Hayashi¹, Ruri Nozima¹, Anne Ohnishi¹, Go Kamoshida¹, Yoshiaki Kawamura², Yuji Morita¹ (1)Dept. Infection Control Science., Sch. Pharm. Meiji Pharmaceutical Univ., (2)Dept. Microbiol., Sch. Med., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 は、IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ (MBL) を有し、調べる限りすべてのβ-ラクタム薬に耐性を示す。IMP-1 型 MBL は、モノバクタム系であるアズトレオナムに低親和性を示すため、NCGM2.S1 のアズトレオナム獲得耐性は他の系によると予想される。そこで NCGM2.S1 における MexAB-OprM とその制御因子の役割に焦点を当てた。【方法】緑膿菌の遺伝子組換え体の構築は、スクロース感受性遺伝子 sacB を含む suicide vector を用いた相同組換え法により行った。薬剤感受性は微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 MIC により評価した。【結果】NCGM2.S1 から IMP-1 型 MBL, AmpCβ-ラクタマーゼ, MexAB に関して一連の欠損株を作成したところ、MexAB 欠損株のみアズトレオナム感受性が上昇した。NCGM2.S1 由来の MexAB 欠損株と薬剤感受性 PAO1 由来の MexAB 欠損株ではアズトレオナム MIC は同程度だった。MexAB-OprM 制御因子 nalD の機能解析を試みたところ、NCGM2.S1 の nalD を PAO1 の nalD に置換した変異体 (NCGM2.S1 nalDPAO1) は、NCGM2.S1 と比較してアズトレオナムに高感受性であったが、PAO1 株と比較して低感受性であった。【考察】MexR, NalC, NalD は、それぞれ MexAB-OprM の産生を負に制御している。つまりこれらの変異は MexAB-OprM の産生上昇を引き起こす。NCGM2.S1 の NalD は PAO1 の NalD と比較して 6 アミノ酸残基を欠いており、NCGM2.S1 は少なくとも nalD 変異によりアズトレオナム耐性が亢進した株であることが示された。しかしながら、NCGM2.S1 nalDPAO1 はアズトレオナム耐性であり、NCGM2.S1 の耐性獲得には、他の因子の関与が予想される。現在 MexR や NalC に関して解析を進めている。

DP2-18-17/P1-190

Effects of dual therapy with betamethasone and josamycin in NC/Nga mouse model of atopic dermatitis

○松井 勝彦, 村中 円香, 山口 徒佳, 前田 真奈美 (明治薬大・臨床免疫)

○Katsuhiko Matsui, Madoka Muranaka, Tomoka Yamaguchi, Manami Maeda (Dept. Clin. Immunol., Meiji Pharmaceut. Univ.)

Objective: The present study was designed to evaluate the effectiveness of combination therapy with betamethasone and josamycin for atopic dermatitis (AD). **Methods:** Betamethasone (0.1%) and josamycin (0.1%) were topically administered to NC/Nga mice with severe AD-like skin lesions. Skin severity scores, histological changes in skin lesions, and serum IgE levels were assessed as indicators of therapeutic efficacy. **Results:** Topical treatment with both drugs suppressed the skin severity score to a greater degree than betamethasone alone. This was associated with a reduction of epidermal thickening, a reduced density of dermal cellular infiltration, a decreased mast cell count in the dermis, and a reduced serum IgE level. In addition, both drugs in combination markedly reduced the expression of IFN-γ and IL-4 in auricular lymph node cells, as well as the *Staphylococcus aureus* count on the lesioned skin. **Conclusion:** These results show that simultaneous topical application of both drugs can ameliorate severe AD-like skin lesions in NC/Nga mice. It is suggested that combination therapy with betamethasone and josamycin would be beneficial for control of severe AD lesions colonized by *S. aureus* by inhibiting the development of both Th1 and Th2 cells and also through elimination of superficially located *S. aureus*.

DP2-19-01/P1-126

Catheter-associated biofilm infection of non-tuberculosis mycobacteria in mice

○山本 健太郎¹, 辻村 祐佑¹, 鳥越 祥太^{1,2}, 阿戸 学¹ (1国立感染症研・感染制御, 2国立感染症研・安管)

○Kentaro Yamamoto¹, Yusuke Tsujimura¹, Shota Torigoe^{1,2}, Manabu Ato¹ (1Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, 2Mgmt. Dept. Biosafety, Lab. Anim., and Pathog. Bank, NIID)

Non-tuberculosis mycobacterial (NTM) diseases are steadily increasing in prevalence and mortality worldwide. *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare*, the two major pathogens of NTM diseases, are resistant to antibiotics, and chlorine, which requires their ability to survive in natural environments and disinfected municipal water. They can also form biofilms on artificial surfaces to provide a protective barrier and habitat for bacilli. This study develops a mouse model of catheter-associated systemic disseminated disease caused by *M. intracellulare* that reproduces the pathophysiology of catheter-associated infections observed in patients undergoing peritoneal dialysis. In addition, the bioluminescence system enabled noninvasive visualization of the amount and distribution of bacilli in vivo and conveniently examine the efficacy of antimicrobials. Furthermore, the cellulose-based biofilms, which were extensively formed in the tissue surrounding the catheter insertion site, reduced drug therapy effectiveness. Overall, this study provides insights into the cause of the drug resistance of NTM and may guide the development of new therapies for NTM diseases.

DP2-19-02/P2-122

家禽チフス菌の *ratA* は鶏における致死性の全身感染に寄与する

○相川 知宏, 岡村 雅史 (帯広畜産大・獣医学研究部門・獣医微生物)

Salmonella enterica serovar Gallinarum *ratA* contributes to lethal systemic infection in chickens

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

Salmonella enterica serovar Gallinarum (SG) は、鶏の致死性の全身性感染症である家禽チフスの原因菌であり、世界各国でしばしば甚大な経済被害を引き起こす。本症発症に関連する SG の病原性を理解することは、ワクチン等の効果的な感染制御策を講ずる上で重要だが、鶏生体内での SG の感染動態についてはほとんど分かっていない。

本研究では、先行研究において鶏生体内で強く発現する SG の抗原遺伝子の 1 つとして同定した *ratA* に着目し、本遺伝子欠損株の鶏接種試験から SG の病原性への寄与を解析した。また、*ratA* と同じ Pathogenicity Island に含まれる *ratB* と *shdA* の他、3 型分泌装置 (T3SS)-1 及び 2 の各構成因子 *invA* および *spiB* についても遺伝子欠損株を作成し、SG の病原性への寄与を解析した。

野生型接種鶏群では、接種 3 日後から嗜眠や食欲低下などの臨床症状が観察され、接種 7 日までに全羽死亡した。対して、5 種類の遺伝子欠損株接種群では、臨床症状を示す個体数やその程度は低減し死亡率も低下した。なかでも、*ratA* 及び *spiB* 欠損株接種群は、全個体が何ら臨床症状を呈さず実験期間終了まで生存した。接種 5 日後の盲腸内容からの回収菌数は、*spiB* 欠損株を除く全ての欠損変異株群で野生型群より減少し、また肝臓と脾臓からの回収菌数は、全ての欠損株接種群で野生型群より減少した。特に *ratA* 及び *spiB* 欠損株接種群の肝臓と脾臓からは菌が全く回収されなかった。以上より、*ratA* と *spiB* は鶏の致死性の全身感染に強く寄与していることが明らかになった。一方、*ratA* は *spiB* と異なり、糞便への SG の持続的な排菌にも関与しており、T3SS に依存しない独立した機序を介して SG の病原性に寄与していると考えられる。

DP2-19-03/P2-123

A 型ウエルシュ菌感染に対する宿主応答の解析

石原 知明¹, 阪口 義彦², 永浜 政博², 〇竹原 正也² (1長崎国際大・薬, 2徳島文理大・薬・微生物)

Analysis of host response to *Clostridium perfringens* type A infection

Tomoaki Ishihara¹, Yoshihiko Sakaguchi², Masahiro Nagahama², 〇Masaya Takehara² (1Fac. Pharm. Sci., Nagasaki International Univ., 2Dept. Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ.)

【目的】 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く、重篤な感染症である。これまでに、本菌の産生する α 毒素がガス壊疽の発症に関与することが判明している。本研究では、A 型ウエルシュ菌の感染に対する宿主応答について、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行ったので、その結果について報告する。

【方法】 1. 対数増殖期まで培養した野生型 (Wild-type)、または、α 毒素遺伝子をノックアウトした A 型ウエルシュ菌 (PLC-KO) を C3H/HeN マウスの大腿筋に投与し、大腿筋を採取した。

2. 採取した筋組織より、RNA を抽出・精製した。

3. 菌感染した大腿筋での遺伝子発現を、DNA マイクロアレイにより網羅的に測定した。

【結果と考察】 Wild-type に感染したマウスでは、Interleukin 1 beta など、炎症に関連する遺伝子や、血管新生や血管内皮細胞の機能に関与する Cysteine-rich angiogenic inducer 61 などの発現増加が認められた。また、Gene set enrichment analysis (GSEA) では、本菌に感染したマウスで脂肪酸の代謝に関与する遺伝子群の発現が減少した。さらに、Wild-type と PLC-KO との比較では、Wild-type で骨格筋の分化に関与する Myogenin や、ストレスから細胞を保護する Heat shock protein beta-1 などの発現が増加した。また、これらのマウスでの GSEA では、Wild-type 感染マウスでミトコンドリア関連遺伝子群や ATP 合成に関連する遺伝子群の発現増加が認められた。これまでに、α 毒素は末梢の循環障害を引き起こし、虚血を誘導するため、これらの遺伝子の発現増加は、虚血やこれに続く ATP 産生の低下に対する宿主の防御機構となっている可能性が考えられる。

DP2-19-04/P2-124

Ability of *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* to metabolize selenocysteine

○久網 僚, 富田 純子, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

○Ryo Kutsuna, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

以前、我々は潰瘍性大腸炎 (UC) モデルマウス糞便中に増加する特定細菌を見出し、分類学的精査解析により *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* sp. nov. PAGU 1678^T を提案した。さらに、当該菌をモデルマウスへ経口投与することによって、マウス病態増悪の証明に成功している。そして、PAGU 1678^T 株は類縁菌に比して細胞内侵入能が高く、細胞内では当該菌処理による炎症応答が確認されたことから、一連の炎症活性への菌体成分の関与を予想し、当該菌の全菌体タンパク質解析および全ゲノム解析を実施した。我々はそのから見出された PAGU 1678^T 株に特徴的な特定微量元素 A に対する代謝能に着目した。当該微量元素は生体内でタンパク質 B の合成に利用され、タンパク質 B は生体にとって生存に重要な働きをする。UC を含む炎症性腸疾患患者の多くは、A を含む微量栄養素の吸収が不十分であることが知られており、A 処理により PAGU 1678^T 株でのタンパク質 B レベルの上昇が認められたことから、当該菌とモデルマウス間での A の競合がマウス病態増悪の一因であると予想した。そこで、PAGU 1678^T 株で重症化した UC モデルマウスに対する A の補充を試みたところ、対照群に比して PAGU 1678^T 株処理群における炎症の軽減傾向を示した。今後、PAGU 1678^T 株による A の利用能およびモデルマウスとの A の競合を裏付けることが出来れば、PAGU 1678^T 株のマウス病態増悪メカニズムの解明に繋がれると考えている。

DP2-19-05/P2-125

Vibrio vulnificus 臨床分離株の比較解析による病原因子同定の試み

○外崎 佑果, 齋藤 和, 山崎 浩平, 上野 俊治, 柏本 孝茂 (北里大・獣医・公衆衛生)

Identification of virulence factors by comparative analysis of Vibrio vulnificus clinical isolates

○Yuuka Tonosaki, Ai Saito, Kohei Yamazaki, Shunji Ueno, Takashige Kashimoto (Lab. Vet. Public Health. Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Vibrio vulnificus (*V. v.*) は、ヒトに経口あるいは創傷感染し、軟部組織壊死症や敗血症を引き起こす。現在、*V. v.* の病原性研究には、敗血症患者より分離された CMCP6 株が世界中で使用されている。本研究では、*V. v.* の臨床分離株を 10 株収集し、マウスに対する致死性と既知の病原因子（運動性、莢膜発現、および Rtx）を CMCP6 と比較し、CMCP6 の病原株としての位置付けを解析するとともに、マウスの致死に必要な病原因子について解析した。新たに収集した 10 株をそれぞれマウスの右大腿部皮下に接種したところ、6 株がマウスを致死させ、そのうちの 1 株は、CMCP6 よりも短時間でマウスを致死させた。この 1 株の一定時間後における接種局所の筋肉および脾臓中菌数を算出したところ、CMCP6 より有意に高かった。既知の病原因子の比較では、運動性は CMCP6 よりも高く、莢膜発現度は同等であったが、Rtx は CMCP6 が臨床分離株タイプであったのに対し、環境分離株タイプであった。これらの結果から、この株の高い致死性の主要因は、運動性であると示唆された。マウスを致死させた他の 5 株の病原因子を CMCP6 と比較したところ、運動性は CMCP6 よりも同等が高く、逆にマウスを致死させなかった 5 株中 4 株の運動性は、CMCP6 よりも低かった。莢膜発現度および Rtx タイプとマウスに対する致死性との間に明確な関連はなかった。これらのことから、*V. v.* の運動性はマウスに対する致死性に最も重要であると考えられた。また、CMCP6 の致死性は高く、創傷感染モデルを利用した病原性研究に適した株であった。

DP2-19-06/P2-126

Analysis of immune responses in oral infection of mice with *Candida albicans*

○豊永 憲司^{1,2}, 永尾 潤一^{1,2}, 田崎 園子¹, 梅村 正幸³, 岸川 咲吏^{1,2}, 加地 英美¹, 岩沼 青葉¹, 中上 昌信¹, 岩井 寛¹, 田中 芳彦^{1,2} (1)福岡大・機能生物・感染生物, (2)福岡大・口腔医学セ, (3)琉球大・熱生研・感染防御)

○Kenji Toyonaga^{1,2}, Jun-ichi Nagao^{1,2}, Sonoko Tasaki¹, Masayuki Umemura³, Sari Kishikawa^{1,2}, Emi Kaji¹, Aoba Iwanuma¹, Masanobu Nakagami¹, Satoru Iwai¹, Yoshihiko Tanaka^{1,2} (1)Div. Infect. Biol., Dept. Funct. Biosci., Fukuoka Dent. Coll., (2)Oral Med. Res. Cent., Fukuoka Dent. Coll., (3)Mol. Microbiol. Gr., TBRC, Univ. Ryukyus)

Candida albicans is a commensal fungus in humans that causes oral candidiasis and disseminated candidiasis in immunocompromised hosts. Analysis of murine models of systemic candidiasis has revealed the important role of C-type lectin receptors in disseminated candidiasis, however, the detailed control mechanisms for oral candidiasis are poorly understood. Therefore, we attempted to analyze the host defense mechanism in a murine model of oral candidiasis (without immunosuppressive agents). In these mice, the production of various inflammatory cytokines and chemokines was observed in the tongue, which is an infected tissue, and most of the fungus were eliminated by four days after an infection. In this presentation, we would like to discuss the role of these inflammatory mediators in oral candidiasis.

DP2-19-07/P2-128

腐蛆病菌ではない蜂蜜由来 *Paenibacillus* 属細菌のミツバチ幼虫への病原性

○高松 大輔^{1,2}, 中村 佳子³, 原田 真理子³, 岡本 真理子¹, 馬田 貴史¹ (1)農研機構・動衛研, (2)岐阜大, (3)生安研)

Pathogenicity of *Paenibacillus* spp. from honey other than foulbrood pathogens to honeybee larvae

○Daisuke Takamatsu^{1,2}, Keiko Nakamura³, Mariko Harada³, Mariko Okamoto¹, Takashi Mada¹ (1)Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO, (2)Gifu Univ., (3)RIAS)

ミツバチは農作物の花粉媒介に広く活用される重要な生物資源である。ミツバチ幼虫の病原細菌としては、これまでアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* とヨーロッパ腐蛆病菌 *Melissococcus plutonius* の 2 菌種しか知られていなかったが、我々は、経口投与によってミツバチの幼虫の死亡率を上昇させる腐蛆病菌以外の *Paenibacillus* 属菌を蜂蜜の中から発見した。これらの菌の多くはゲノム解析によって、*P. azoreducens* または *P. melissococcoides* と同定されたが、1 株 (J27TS7 株) は、*Paenibacillus* 属ではあったものの、既知の菌種には属していなかった。孵化後 24 時間以内のミツバチ幼虫にこれらの *Paenibacillus* 属菌と *P. larvae* の芽胞を異なる濃度で 24 時間経口摂取させた結果、*P. larvae* の 50% 致死濃度 (LC₅₀) は 1,750-8,872 個/ml であったのに対し、J27TS7 株、*P. azoreducens* 代表株及び *P. melissococcoides* 代表株の LC₅₀ は、それぞれ 9,760 個/ml, 35,310 個/ml 及び 360,745 個/ml であり、J27TS7 株が *P. larvae* に最も近い毒性を示した。J27TS7 株は *P. larvae* と同様に孵化後 2 日以上経過した幼虫に対する毒性は極端に低下したが、孵化後 24 時間以内の幼虫に感染させた場合、日本で分離される遺伝子型の *P. larvae* 株より幼虫を早く殺す傾向があった。感染幼虫を病理組織学的に解析した結果、J27TS7 株の芽胞は、幼虫の中腸内で発芽・増殖し、中腸上皮細胞の変性が確認された。しかし、中腸上皮細胞の表面を覆う囲食膜は破壊せず、*P. larvae* のように積極的に中腸内から血体腔に侵入する様子は観察されなかった。今後は、これらの新規病原細菌の蜂群に対する影響を理解するため、各菌の国内における分布状況を調査する必要がある。

DP2-19-08/P2-129

オゾンウルトラファインバブル水の殺菌および細菌毒素不活化作用の解析

○滝澤 史雄¹, 土門 久哲^{1,2}, 平山 悟¹, 磯野 俊仁¹, 笹川 花梨¹, 米澤 大輔³, 牛田 晃臣⁴, 筒浦 さとみ⁵, 寺尾 豊^{1,2} (1)新潟大・院医歯・微生物, (2)新潟大・院医歯・高口研セ, (3)新潟大・院医歯・口腔衛生, (4)新潟大・工・機械システム, (5)新潟大・農)

Analysis of the effect of ozone ultrafine bubble water against various bacteria and bacterial toxins

○Fumio Takizawa¹, Hisanori Domon^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Toshihito Isono¹, Karin Sasagawa¹, Daisuke Yonezawa³, Akiomi Ushida⁴, Satomi Tsutsuura⁵, Yutaka Terao^{1,2} (1)Div. Microbiol. Infect Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., (2)Cent. For. Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., (3)Div. Oral Sci. Health Prom, Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., (4)Inst. Sci. Tech., Niigata Univ., (5)Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】オゾンガスは様々な細菌に対して殺菌作用を示すが、水溶液化が困難であった。そこで、気体をナノサイズの気泡にして水中に分散・安定させるウルトラファインバブル技術に着目し、新たなオゾンウルトラファインバブル水（以下オゾンナノ水）発生装置を開発した。本研究では、オゾンナノ水の消毒液としての応用に向け、殺菌作用および細菌毒素に対する不活化作用を解析した。【方法】オゾンナノ水を *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* の培養液に添加し、コロニーカウント法にて各細菌の生存率を算定した。また、オゾンナノ水に曝露した *S. pneumoniae* を透過型電子顕微鏡で観察した。続いて、*S. pneumoniae* の PLY もしくは *S. aureus* の SEA をオゾンナノ水に添加し、SDS-PAGE で展開後、銀染色を行った。また、ヒト好中球に組換え PLY またはオゾンナノ水処理した組換え PLY を添加し、LDH 細胞傷害性試験を行った。【結果】オゾン濃度 1 ppm 以上のオゾンナノ水は、供試した全ての菌株を 30 秒以内に死滅させた。透過型電子顕微鏡観察において、オゾンナノ水に曝露した *S. pneumoniae* の細胞壁の損傷が確認された。オゾンナノ水で処理した組換え PLY と SEA は銀染色で検出されなかった。また、オゾンナノ水で処理した PLY を添加した好中球の LDH 漏出量は、未処理群と比較して有意に少なかった。一方で、オゾンナノ水は LPS を分解せず、LPS の炎症誘導能も抑制しなかった。【考察】オゾンナノ水は様々な細菌を殺菌するとともに、タンパク質性の細菌毒素を分解・不活化することが示唆された。これらの結果から、オゾンナノ水を消毒薬として応用できる可能性が示された。

DP2-19-09/P2-130

ミツバチのヨーロッパ腐蛆病発症過程における低分子物質チラミンの影響の解析

○岡本 真理子¹, 高松 大輔^{1,2}, 上垣 隆一¹, 中村 佳子³, 原田 真理子³ (1)動物衛生研・農研機構, (2)岐阜大院, (3)生安研)

Analysis of the effect of tyramine on the pathogenesis of European foulbrood in honey bees

○Mariko Okamoto¹, Daisuke Takamatsu^{1,2}, Ryuichi Uegaki¹, Keiko Nakamura³, Mariko Harada³ (1)NIAH, NARO, (2)UGSVS, Gifu Univ., (3)RIAS)

ヨーロッパ腐蛆病 (EFB) は *Melissococcus plutonius* を原因とするミツバチ幼虫の細菌感染症である。本菌の遺伝子型 CC12 株は幼虫への毒性が最も強い重要な株であるが、その病原因子は明らかになっていない。幼虫に経口摂取された CC12 株は腸内で増殖し、中腸内壁を保護する餌食膜を破壊して中腸上皮細胞に接触する。餌食膜を失った上皮細胞は変性し、幼虫は死に至る。しかし、餌食膜を破壊できない CC12 株を幼虫に感染させても中腸上皮細胞は変性したことから、CC12 株は餌食膜を通過し細胞変性を起こす物質を分泌している可能性が示唆されている。M. plutonius のゲノム解析を行った報告では、CC12 株が細胞傷害活性を持つ低分子物質チラミンの合成遺伝子を保有することが明らかになっているが、EFB 発症への関与は不明であった。そこで、本研究では、CC12 株が実際にチラミンを産生することを確かめるため、LC-MS/MS を用いたチラミンの定量分析系を構築し、CC12 株感染および非感染幼虫中のチラミン量を比較した。その結果、非感染幼虫ではチラミンが未検出であったのに対し、感染幼虫では平均 11.8µg/幼虫の量で検出され、CC12 株は幼虫内でチラミンを産生していることが明らかとなった。続いて、チラミンが EFB 発症に関与しているか調査するため、CC12 株を親株として餌食膜分解及びチラミン合成に関与する遺伝子を欠失させた株を作成した。親株と欠失株を用いて幼虫への感染実験を行ったところ、欠失株では親株よりも幼虫の死亡率が低下し、これらの遺伝子が部分的に EFB 発症に関与している可能性が示唆された。今後、欠失遺伝子を再導入した相補株を作成し、EFB 発症へのチラミンの関与をさらに解析する予定である。

DP2-19-10/P2-131

胃炎・胃癌患者の胃粘膜より分離された硝酸塩還元菌の性状

○桑木 星里香¹, 山本 由弥子², 内山 淳平², 松下 治², 後藤 和義¹, 渡辺 朱理³, 横田 憲治¹ (1)岡山大学・保健学, (2)岡山大学・医歯薬・病原細菌学, (3)徳島大学・医歯薬学・口腔機能管理学)

Characteristics of nitrate-reducing bacteria from patients with gastritis and gastric cancer

○Serika Kuwagi¹, Yumiko Yamamoto², Jumpei Uchiyama², Osamu Matsushita², Kazuyoshi Gotoh¹, Akari Watanabe³, Kenji Yokota¹ (1)Health Science, Okayama Univ., (2)Dept. Path. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pham. Okayama Univ., (3)Oral Health Care and Rehabilitation, Inst. Biomed. Sciences, Tokushima Univ.)

【はじめに】これまでの研究により、胃炎患者の胃粘膜委縮の進行に伴い胃内の硝酸塩還元菌の検出率が高まることを報告した。本研究の目的は、胃内より分離された硝酸塩還元菌の硝酸塩還元能について胃炎患者と胃癌患者で比較することである。【実験方法】1.対象 ピロリ菌感染胃癌と診断された患者より、上部消化管内視鏡時にピロリ菌の培養目的で前庭部大弯、胃体部大弯より粘膜生検を行った。そのうち、19 検体から検出された硝酸塩還元菌について硝酸塩還元能を調べた。19 検体から検出された菌を増殖の早い菌と遅い菌に分けて比較・検討した。2.硝酸塩還元能測定 硝酸塩を添加した液体培地に硝酸塩還元菌をそれぞれ接種し、増殖が早い菌種と遅い菌種に分け、亜硝酸塩濃度と増殖曲線のタイムコースをそれぞれとった。尚、亜硝酸塩濃度については亜硝酸に反応する試薬を入れた後の発色度合いを ELISA リーダーにて測定し、菌量については培養した菌液そのものの吸光度を測定した。【結果と考察】培養総菌数は、胃癌患者で有意に増加し、硝酸塩還元菌の菌数も胃癌患者で有意に増加していた。また、胃癌では検出される菌種も口腔内細菌より腸内細菌の割合が高くなるということが判明した。分離した菌における亜硝酸産生量の最大値 (Vmax) を比較検討した。増殖の遅い菌については、胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の方が、Vmax が強い傾向があった。増殖の早い菌については、胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の Vmax が有意に高かった。増殖が早い菌・遅い菌ともに胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の方が、還元能が高いということから、ピロリ菌による胃癌発症への硝酸塩還元菌の関与が示唆された。

DP2-19-11/P2-132

Possibility of periodontal bacteria causing changes in liver drug metabolism

○三浦 利貴¹, 鈴木 舟², 及川 貴子³, 石河 太知¹ (1)岩手医大・歯・微生物・分子微生物, (2)岩手医大・歯・口腔顎顔面再建・口腔外科, (3)岩手医大・歯・歯科保存・歯周療法)

○Toshitaka Miura¹, Shuu Suzuki², Takako Oikawa³, Taichi Ishikawa¹ (1)Div. Mol. Microbiol., Dept. Microbiol., Sch. Dent., Iwate Med. Univ., (2)Div. Oral Maxillofac. Surg., Dep. Reconstructive Oral Maxillofac. Surg., Sch. Dent., Iwate Med. Univ., (3)Div. Periodont., Dep. Conservative Dent., Sch. Dent., Iwate Med. Univ.)

Periodontal bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, are indigenous oral bacteria and are implicated in periodontal disease. Recent studies also show their involvement in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma, are suggesting that these conditions may be caused by exposure to these bacteria. However, whether these affect liver drug metabolism have not been elucidated. In this study, human liver cancer cell line HuH7 was exposed to heat-killed *P. gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. After exposure, gene and protein expression levels were detected using real-time PCR and western blotting. Our results indicated that bacterial exposure induced a part of cytochrome P450 (CYP) expressions. These expressions were involved the aryl hydrocarbon receptor (AhR). The results suggested that these bacteria may activate the AhR pathway. The induction of drug metabolism enzymes increases the metabolism of chemical substances, may be impacting drug resistance in therapy. Additionally, the involvement of the AhR pathway extends to immune systems and cancer progression. Thus, the presence of periodontal bacteria, affecting the liver, may contribute to diseases and therapy resistance on a broader scale.

DP2-19-12/P1-127

病原真菌 *Trichosporon asahii* の Hog1 を介するストレス抵抗性機構

○松本 靖彦, 杉山 悠, 長町 多恵, 吉川 麻美, 杉田 隆 (明葉大・微生物)

Hog1-mediated stress tolerance in the pathogenic fungus *Trichosporon asahii*

○Yasuhiko Matsumoto, Yu Sugiyama, Tae Nagamachi, Asami Yoshikawa, Takashi Sugita (Dept. Microbiol., Meiji Pharm Univ.)

病原真菌である *Trichosporon asahii* は、酵母および菌糸・分節型分生子を形成する二形性の真菌であり、好中球が減少した患者に対して重篤な深在性真菌症を引き起こすことがある。近年、*T. asahii* の遺伝子欠損株を樹立するための遺伝子組換え技術と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おり、カルシニューリン経路が *T. asahii* のカイコに対する病原性に関与することが示されている。

Hog1 タンパク質は、細胞内の様々なリン酸化経路を担う Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである。*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、Hog1 タンパク質は浸透圧ストレスなどの様々なストレス抵抗性に関与する。しかし、*T. asahii* のストレス抵抗性や病原性に Hog1 タンパク質が寄与するか不明である。

本研究で我々は、*T. asahii* における Hog1 タンパク質をコードする遺伝子 (*hog1* 遺伝子) の欠損株を作製した。*hog1* 遺伝子欠損株は、親株より 40°C という高温ストレスに感受性であった。また、細胞膜ストレス、酸化ストレス、DNA 傷害化合物および抗真菌薬アムホテリシン B に対しても *hog1* 遺伝子欠損株は感受性を示した。さらに、*hog1* 遺伝子欠損株はカイコに対する病原性が低下していた。以上の結果は、Hog1 タンパク質を介するシグナル伝達経路が *T. asahii* のストレス抵抗性を担うことを示唆している。

DP2-19-13/P1-128

Mislocalization of the mechanosensor Piezo during leptospiral infection of epithelial cells

○Isabel Sebastian, 山城 哲, Claudia Toma (琉大・医院・細菌)

○Isabel Sebastian, Tetsu Yamashiro, Claudia Toma (Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. of the Ryukyus)

Piezo is a mechanosensor channel located in the plasma membrane which is required to preserve epithelial barrier function through extrusion of cells in crowding areas or cell division in sparse regions. We have reported that *Leptospira interrogans* induces E-cadherin (E-cad) endocytosis and actin cytoskeleton perturbation to disassemble the apical junctional complex (AJC) allowing bacterial paracellular migration through the epithelial monolayer. Piezo is functionally tethered to the actin cytoskeleton via the E-cad/ β -catenin complex, whose perturbation impairs Piezo-mediated responses. The aim of this study is to clarify if *L. interrogans* can also alter the function of Piezo as a homeostatic sensor.

Renal proximal tubule epithelial cells were infected with *L. interrogans* and the disassembly of the AJC was monitored by measurement of the transepithelial electrical resistance. Immunofluorescence analysis showed that Piezo was displaced from the plasma membrane in infected cells. A combination of lysosomal and proteasomal inhibitors, which prevented E-cad endocytosis, also inhibited the leptospiral induced-mislocalization of Piezo.

Our results suggested that induction of E-cad endocytosis by *L. interrogans* affects force transmission and signal transduction between the plasma membrane and the cytoskeleton which are critical for the maintenance of the epithelial barrier integrity.

DP2-19-14/P1-129

マイコプラズマの D アミノ酸産生にかかわるラセマーゼについての検討

○山本 武司¹, 奥野 未来¹, 土谷 祐一², 星子 裕貴¹, 山本 奈々絵², 今井 有未¹, 小椋 義俊¹ (1久留米大・医・感染医学, 2九大病院・薬剤部)The investigation of racemase involved in D-amino acid production by *Metamycoplasma hominis*○Takeshi Yamamoto¹, Miki Okuno¹, Yuichi Tsuchiya², Yuki Hoshiko¹, Nanae Yamamoto², Yumi Imai¹, Yoshitoshi Ogura¹ (1Dept. Infect. Med., Sch. Med., Kurume Univ., 2Dept. Pharmacy., Kyushu Univ. Hosp.)

D アミノ酸はアミノ酸の光学異性体の一つであり, L アミノ酸とは異なりヒト生体内ではごく少量しか存在しないとされている。しかしながら細菌において D アミノ酸は細胞壁構成アミノ酸として普遍的に存在しており, 近年では菌体外に放出される D アミノ酸が細菌-細菌間あるいは細菌-宿主間相互作用において重要な役割を担っていることが明らかとなっている。一方, 細胞壁を持たないマイコプラズマではこれまで D アミノ酸の産生は確認されておらず, その産生に関わる D アミノ酸ラセマーゼについても十分な評価が行われていない。そこで本研究では過去に D アミノ酸ラセマーゼについての報告があった *M. hominis* に着目し, 同遺伝子のマイコプラズマにおける位置づけの解析と D アミノ酸産生における役割の評価を行った。まず D/L 体を分離するためのラベル化後, LC-MS/MS を用いて D アミノ酸産生の評価を行った。その結果, D アミノ酸ラセマーゼをコードする *orr* 遺伝子陽性株では D-lysine と D-arginine が培養上清並びに菌体中に観察された。このことから *M. hominis* は D アミノ酸を産生することが明らかとなった。また公開データベース上のマイコプラズマについて *orr* 遺伝子の保有状況を確認したところ, 同遺伝子は *Metamycoplasma* 属のマイコプラズマに広く保存されていることが確認された。また, 同属において株間で *orr* 遺伝子の保有状況に差がある種は *M. hominis* のみであった。D アミノ酸には感染/定着のニッチの獲得に重要な働きがある一方で, 宿主免疫機構を刺激する働きが一部報告されている。このことから *M. hominis* は病原体としての進化の過程で同遺伝子の保有状況に変化が生じていることが示唆された。

DP2-19-15/P1-130

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宿主感染関連遺伝子群の解析

○阪口 義彦¹, 武 晃², 後藤 和義³, 山本 由弥子³, 幸田 知子⁴, 向本 雅都⁴, 竹原 正也¹, 林 哲也⁵, 小熊 恵三³, 永浜 政博¹ (1徳島文理大・薬, 2北里大・医, 3岡山大・学術研究院, 4大阪大院・獣医, 5九大院・医)

Analysis of host infection-related genes of bacteriophages encoding botulinum toxin types C and D

○Yoshihiko Sakaguchi¹, Akira Take², Kazuyoshi Gotoh³, Yumiko Yamamoto³, Tomoko Kohda⁴, Masafumi Mukamoto⁴, Masaya Takehara¹, Tetsuya Hayashi⁵, Keiji Oguma³, Masahiro Nagahama¹ (1Facul. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ., 2Kitasato Univ. Sch. Med., 3Dept. Med., Lab. Sci., Grad. Sch. Heal. Sci., Okayama Univ., 4Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 5Facul. 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。このうち C 型と D 型毒素遺伝子のみ, バクテリオファージ (ファージ) によりボツリヌス無毒株に伝播される。我々は, ファージの感染サイクルの全容を明らかにするため, まずは C 型と D 型毒素遺伝子を伝播するファージ (c-468, c-6813, d-1873, d-4947, d-sa) のゲノム構造の比較解析を行った。また, ゲノム上の種々の遺伝子産物の機能についても解析した。C 型毒素を伝播するファージ (c-st) において, ゲノムサイズは 185,681 bp で, C 型毒素を含む 198 個のタンパク質コード領域 (ORF) が同定された。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し, ボツリヌス毒素の産生能力を獲得することが明らかとなった (偽溶原化)。このことから, 培養条件によってボツリヌス毒素産生性が消失する現象との関連性が推察された。偽溶原化において, *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, 複数の C 型および D 型ファージ株で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 C 型または D 型毒素遺伝子, 溶原化関連遺伝子群が共通して保存されていた。しかしながら, 種々のファージゲノム配列を比較すると, c-st は c-468 とは類似していたが, 他のファージとは大きく異なっていた。また, c-st の溶原化に必須とされる溶菌酵素関連遺伝子を同定し, その遺伝子産物のボツリヌス無毒株に対する溶菌活性および結合性を解析している。詳細については, 本学会総会にて発表する。

DP2-19-16/P1-131

Streptococcus pneumonia infection induced kidney specific depletion of sulfur metabolites in mice

Rahman Azizur, 張 田力, 津々木 博康, 豊元 悠弥, 澤 智裕 (熊本大・院生命科学・微生物学)

Rahman Azizur, Tianli Zhang, Hiroyasu Tsutsuki, Touya Toyomoto, 〇Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kumamoto Univ.)

Streptococcus pneumonia infection is a leading cause of community-acquired pneumonia. Its invasive infection causes severe diseases such as bacteremia and meningitis, and also associates with several complications including kidney injury. Detail mechanisms how bacterial infection causes systemic complications remains largely unknown. Host derived low molecular weight (LMW)-sulfur metabolites such as glutathione (GSH) and its supersulfide derivative glutathione persulfide (GSSH) play important roles in regulating cellular redox homeostasis and energy metabolisms. We examined whether bacterial infection influenced LMW-sulfur metabolites in infected hosts. Male ddY mice were infected with *S. pneumonia* D39 strain intraperitoneally at 10 cfu/mouse. Remarkable numbers of bacteria were detected in blood at 3 h after infection, followed by other organs including liver, kidney, spleen, and lung. In this model, all infected mice died within 30 h. Quantitative analyses of LMW-sulfur metabolites by tandem mass spectrometry revealed that GSH and GSSH were depleted in kidney at 6 h after infection, whereas no such depletion was noted for other organs. Serum creatinine test suggested the occurrence of kidney injury in infected mice. These data warrant further investigation to clarify the causal relationship between *S. pneumonia* infection and kidney injury in view of GSH and GSSH depletion.

DP2-19-17/P1-198

大腸がんの腸内マイクロバイオームにおける真菌叢の関与

○林 瑤大¹, 内野 祥徳¹, 後藤 雄一¹, 湯田 彩花¹, 比地岡 浩志¹, 杉浦 剛², 奥井 達雄¹ (1)鹿児島大・院・医歯・顎顔面機能再建学・顎顔面疾患制御学, 2)東北大・院・歯・病態マネジメント歯学・顎顔面口腔腫瘍外科学)

Involvement of the fungal flora in the colonic microbiota of the colorectal cancer

○Yodai Hayashi¹, Yoshinori Uchino¹, Yuichi Goto¹, Sayaka Yuda¹, Hiroshi Hijioka¹, Tsuyoshi Sugiura², Tatsuo Okui¹ (1)Dept. Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science, Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation, Kagoshima Univ., 2)Div. Oral and Maxillofacial Oncology and Surgical Sciences, Div. Oral and Maxillofacial Reconstructive Surgery, Tohoku Univ.)

【緒言】大腸がん患者は近年著明な増加傾向を示し、その死亡者数は男性3位、女性1位である。次世代シーケンスの発展により、大腸がんの発生や進展に腸内細菌叢の関与が示されつつある。一方、その他の消化器系疾患において、近年真菌叢の関与が報告されるようになり、口腔においても口腔潜在的悪性疾患に対する真菌の関与がクローズアップされている。しかし、大腸がんにおける真菌叢の関与は未だ不明である。われわれは口腔内の真菌が腸へ供給され、大腸がんの発生に影響を与えている可能性を検討したので報告する。【対象と方法】対象は鹿児島大学病院消化器外科にて大腸がんと診断された52名(疾患群)と健常者51名(対照群)の中から、Qiime2解析においてSample depthが500以上の検体(疾患群15名、対照群15名)とした。被験者より唾液と便を採取し、次世代シーケンサーによりITS領域で真菌叢の解析を行った。【結果】対照群と比較して疾患群の便ではα多様性が有意に低下した。唾液にて、ANCOM解析とWilcoxon検定の両方において、Agaricomycetesが健常者群と疾患群の間に有意差をみとめた。また、ヒートマップ解析において疾患群の唾液では主にMalassezia restricta、便では不特定の真菌種が健常者群と比較して増加傾向にあった。今回の結果より、口腔や皮膚に常在する真菌が大腸がんに関与している可能性が指摘された。【結語】大腸マイクロバイオームにおいて口腔や皮膚に常在する真菌が認められ、疾患群ではMalasseziaを始めとした特定の真菌の存在量に変化を認めた。

DP2-20-01/P2-065

The type VII secretion system's EsxA reveals a novel function in the sporulation of *Bacillus cereus*

○Harvey Kamboyi¹, 東 秀明¹, Atmika Paudel¹, Misheck Shawa¹, 菅原 未紗¹, Tuvshinzaya Zorigt¹, Joseph Chizimu¹, 古田 芳一¹, Bernard Hang'ombe², Musso Munyeme³ (1)北大・人獣共通感染症国際共同研究所・感染・免疫, 2)Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, 3)Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

○Harvey Kamboyi¹, Hideaki Higashi¹, Atmika Paudel¹, Misheck Shawa¹, Misa Sugawara¹, Tuvshinzaya Zorigt¹, Joseph Chizimu¹, Yoshikazu Furuta¹, Bernard Hang'ombe², Musso Munyeme³ (1)Div. Infection and Immunity, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., 2)Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, 3)Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

Bacillus cereus is a spore-forming bacteria that produces a variety of effectors important for niche adaptation and the development of various infections. Among these is EsxA, the major effector of the type VII secretion system (T7SS). EsxA's roles within the bacterial cell have not yet been reported, although some studies have suggested it may play a role in sporulation. *B. cereus* ATCC14579 was used to generate the T7SSb mutant, Δ essC, and, comparatively, analyzed the culture supernatant of wild type and the Δ essC mutant through LC-MS/MS. Based on LC-MS/MS results, we further generated T7SSb-specific gene deletions to investigate their roles on growth under normal and stress conditions. From LC-MS/MS analysis, we identified a pair of nearly identical (94%) effector proteins named EsxA belonging to the sagEsxA-like subfamily of the WXG100 protein superfamily in the culture supernatant of the wild type and none in the Δ essC mutant. Independent deletions of *esxA1* and *esxA2* resulted in strains with similar phenotypes and growth rates under all conditions. In contrast, the Δ esxA1 Δ esxA2 deletion resulted in significantly fewer viable spores and a slower sporulation process. The maximum spore ratios for the wild type and Δ esxA1 Δ esxA2 were 0.96 and 0.72, respectively. These results indicated that EsxA1 and EsxA2 are required for sporulation in *B. cereus* ATCC14567.

DP2-20-02/P2-066

Novel structure of lipoteichoic acid in *Apilactobacillus kosoii* and its IgA-inducing activity

○白石 宗¹, 松崎 千秋², 邱 泰瑛³, 久米田 博⁴, 川田 真実², 山本 憲二⁵, 高橋 知也⁶, 横田 伸一¹ (1)札幌医科大・医・微生物, 2)石川県大・生物資源工学, 3)北見工大・バイオ環境化学, 4)北大・先端生命科学, 5)和歌山大, 6)アルソア慧央グループ・アルソアR&Dセンター)

○Tsukasa Shiraiishi¹, Chiaki Matsuzaki², Tai-Ying Chiou³, Hiroyuki Kumeta⁴, Manami Kawada², Kenji Yamamoto⁵, Tomoya Takahashi⁶, Shin-ichi Yokota¹ (1)Dept. Microbiol., Sch. Med., Sapporo Medical Univ., 2)Research Inst. Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural Univ., 3)Dept. Biotechnol. Environ. Chem., Kitami Inst. Technology, 4)Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ., 5)Wakayama Univ., 6)ARSOA Research & Development Center, Arsoa Keioh Group Corp.)

Gram-positive bacterial lipoteichoic acid (LTA), an accessory molecule in the cell wall, acts as an immunomodulatory factor on host cells. The chemical structures of LTA vary among bacterial species and strains, and may be related to biological activities. In our previous work, much higher immunoglobulin A (IgA)-inducing activity was observed in cells of the *Apilactobacillus kosoii* 10H^T than those of other lactic acid bacteria, and their LTA was responsible for the activity. In the present study, we elucidated the chemical structures of LTA from *A. kosoii* 10H^T to explore the structure-function relationship of the high IgA-inducing activity. The ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy suggested that LTA had a glycerolphosphate polymer as a hydrophilic main chain with partial substitution of glucose(α1-, glucosyl(α1-2)glucose(α1-, and L-lysine at the C-2 hydroxyl group of the glycerol residue. This is the first report of L-lysine in bacterial LTA. Anchor glycolipids of LTA were typical dihexosyldiacylglycerol. Removal of L-lysine from LTA by mild alkaline treatment decreased IgA induction in mouse Peyer's patch cells. The novel L-lysine residue in *A. kosoii* 10H^T LTA plays a crucial role in the remarkably high IgA-inducing activity.

DP2-20-03/P2-067

The biosynthesis of glycopeptidolipid in nontuberculous bacteria

○藤原 永年¹, 宮本 友司², 星野 仁彦², 慶長 直人³, 中屋 慎⁴, 前田 伸司⁵ (1)帝塚山大・現代生活・食物栄養, 2)国立感染症研・ハンセン研, 3)結核予防会・結核研, 4)大阪公立大・研究推進機構, 5)北海道科学大・薬・薬)

○Nagatoshi Fujiwara¹, Yuji Miyamoto², Yoshihiko Hoshino², Naoto Keicho³, Makoto Nakaya⁴, Shinji Maeda⁵ (1)Dept. Food Nutrition, Facult. Contemp. Human Life Scie., Tezukayama Univ., 2)Nat. Inst. Infec. Dis.: Lep. Res. Cent., 3)The Res. Inst. TB, Jap. Anti-TB Assoc., 4)Org. Res. Prom., Osaka Metrop. Univ., 5)Fac. Pharm., Hokkaido Univ. Scie.)

MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) is one of the major nontuberculous bacteria, and is classified into 28 serotypes by the serotype-specific glycopeptidolipid (GPL). We have reported the deletion of GPL in some strains. The colony morphology of the GPL-deleted strains changed rough-type instead of smooth-type, and implies to affect their virulence and pathogenicity. In this study, we focused the GPL biosynthesis in MAC strains. We showed the features of a clinical isolate, *M. intracellulare* Ku11 which produced a novel GPL. Its oligosaccharide was composed of six sugar moieties. We analyzed the gene cluster involved in the GPL biosynthesis, and found the similarity of the deduced amino acid sequences in the eight open reading frames (*orf*s) of Ku11. *M. intracellulare* NF113 produces serotype-1 GPL which oligosaccharide is composed of just only two sugar moieties. We introduced the *orf1-8* of Ku11 into *M. intracellulare* NF113, and the GPL was replaced to Ku11-GPL from serotype-1 GPL. The gene cluster of *orf1-8* was functionally responsible for the complete elongation of oligosaccharide in Ku11-GPL. We also deleted the *orf1* in the Ku11 genome by CRISPR-Cas9 system. This mutant produced serotype-1 GPL, and the *orf1* was identified as glycosyltransferase at second Rha position. We discuss the structural and functional diversity of GPLs.

DP2-20-04/P2-068

Vibrio FliK and FlhB catalyze export switching of the *Salmonella* flagellar type III secretion system

○南野 徹¹, 木下 実紀¹, 難波 啓一^{1,2} (¹大阪大・生命機能, ²大阪大・日本電子YOKOGUSHI協働研究所)

○Tohru Minamino¹, Miki Kinoshita¹, Keiichi Namba^{1,2} (¹Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ²JEOL YOKOGUSHI, Osaka Univ.)

The bacterial flagellum is a supramolecular motility machine consisting of the basal body, the hook, and the filament. For construction of the flagella on the cell surface, the flagellar type III secretion system (FT3SS) transports flagellar structural subunits from the cytoplasm to the distal end of the growing flagellar structure. The hook length is relatively well controlled at about 55 nm in *Salmonella* by the FT3SS using a secreted molecular ruler protein, FliK, to monitor the assembly state of the hook structure. When the hook length reaches about 55 nm, FliK transmits the hook length signal to FlhA through an interaction between FliK and FlhB. As a result, the FT3SS switches substrate specificity from the rod-hook-type to the filament-type, terminating hook assembly and initiating filament assembly. However, it is still unclear how the hook length signal is transmitted to FlhA via FliK and FlhB. In this study, we performed a cross-complementation assay in *Salmonella* and provide experimental evidence that *Vibrio* FliK and FlhB can catalyze the substrate specificity switching of the *Salmonella* FT3SS to a significant degree. Based on the results obtained in this study, the export switching mechanism of the FT3SS will be discussed.

DP2-20-05/P2-069

9型分泌機構関連タンパク質 PorE の機能解析

富永 孝志, ○庄子 幹郎, 雪竹 英治, 内藤 真理子 (長崎大院・医歯薬・口腔病原微生物学)

Functional analyses of a T9SS PorE protein

Takashi Tominaga, ○Mikio Shoji, Hideharu YukiTake, Mariko Naito (Dept. Microbiol. Oral Infect. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

【目的】歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* は9型分泌機構 (T9SS) によりジンジバインと呼ばれる強力なタンパク質分解酵素を分泌する。以前、血液寒天培地上の黒色集落形成を指標にしてトランスポゾン挿入位置を調べた際に T9SS 関連タンパク質 PorE の C 末端側にはトランスポゾンが全く挿入されなかったことから、その部分は機能に無関係と考えていた。PorE は外膜内葉に存在するリポタンパク質であり、PorE-PorP 複合体を形成する。本研究では PorE の機能解析について調べた。【方法】(1) PorE は N 末端側より TPR, WD40, CRD, OmpA という4つのドメインからなる。それぞれのドメイン欠損 PorE の機能性について調べた。(2) PorE リポタンパク質の重要性について調べた。(3) PorP の挿入変異株と完全欠損株を作製し性状解析を調べた。(4) ドメイン欠損 PorE は PorP と結合できるかを調べた。(5) PorE 依存型もしくは非依存型の T9SS 分泌タンパク質について調べた。【結果】(1) PorE の CRD 以外の3つのドメインは機能に必須であった。(2) PorE の18番目と24番目の両方のドメインが機能に必須であった。(3) PorP 完全欠損株は下流の遺伝子発現に影響があったが、PorP 挿入欠損株は下流の遺伝子発現に影響がなかった。(4) PorE-PorP の結合には PorE の TPR, WD40 ドメインが重要であった。(5) ジンジバインは PorE 依存型分泌であるのに対し PorA や Hbp35 は PorE 非依存型分泌であった。【考察】ドメイン欠損解析から PorE の C 末端側にある OmpA ドメインは機能に必須であり、特にペプチドグリカンとの結合が重要であることを見出した。また、T9SS 分泌には PorE 依存型または非依存型の分泌機構があることを新規に見出した。

DP2-20-06/P2-070

物質封入膜小胞による受け渡し関連遺伝子の探索

○小松 詩温¹, 白倉 雄紀¹, 野村 暢彦², 豊福 雅典² (¹筑波大・理工情報生命・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系・微生物サスティナビリティ研究センター)

Genetic screening of genes involved in membrane vesicles delivery

○Shion Komatsu¹, Yuki Usukura¹, Nobuhiko Nomura², Masanori Toyofuku² (¹Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci. Univ. Tsukuba, ²MICS, Fac. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる数十～数百 nm の膜小胞を形成する。MV には DNA や RNA, シグナル物質が含まれていると報告されている。また、MV は細菌間のコミュニケーションや遺伝子の水平伝播などに使用されることが知られている。MV による DNA などの物質送達において、MV の形成、伝播、付着・融合の過程があるとされている。形成メカニズムについてはグラム陰性、陽性細菌の機構は明らかになっている。一方で、付着・融合することで MV が細菌に受け渡されるとされるが、それらに関わる遺伝子やメカニズムについては未だに明らかになっていない。本研究では MV が受け渡されるのかを確認する指標として抗生物質を用い、抗生物質封入 MV を作製した。作製にあたり、当研究室で見出した細胞死を介した MV 形成経路を利用することで、ゲンタマイシンを緑膿菌の MV に封入させることに成功した。また、MV の受け渡しに関わる遺伝子を同定するためにトランスポゾンを用いて、ランダムミュータントライブラリーを作製し、抗生物質封入 MV への耐性・感受性を指標にスクリーニングを実施した。その結果、ゲンタマイシンには野生株と同等の感受性を示すが、抗生物質封入 MV に対する耐性・感受性のみが野生株と異なる変異株が確認された。スクリーニングで選抜された遺伝子の機能解析を行い、MV 受け渡し機構との関連について考察する予定である。これにより細菌間の物質送達メカニズムが解明できれば、医療面への応用が期待できる。

DP2-20-07/P2-071

ヒト腸内細菌 *Phocaeicola plebeius* 由来キシラン取り込みに関する SusD の解析

○力石 佑紀¹, 林 秀謙^{1,2}, 辻 省吾¹ (¹前工大院・工・生物工, ²前工大・工・生物工)

Characterization of SusD regarding xylan uptake from the human gut bacterium *Phocaeicola plebeius*

○Yuki Chikaraishi¹, Hidenori Hayashi^{1,2}, Shogo Tsujii¹ (¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Maebashi Inst. Technol., ²Dept. Biotech., Fac. Eng., Maebashi Inst. Technol.)

【目的】*Phocaeicola plebeius* のキシラン資化遺伝子群 (PUL17) にはキシラン取り込みに関与する外膜タンパク質 SusC と SusD が各2種類ずつ存在している。キシロオリゴ糖の結合に関与すると思われる2つの SusD を大腸菌で発現させ、キシランとセルロースの吸着解析を行った。

【方法】コドン最適化した SusD (01963) の遺伝子を発現ベクターに連結して、大腸菌を形質転換した。形質転換体より発現したタンパク質を抽出し、精製を行った。SusD の基質との吸着を明らかにするために、Native-affinity-PAGE により SusD の移動度を測定した。また、SusD を各基質と混合し、遠心分離後、その上清と沈殿 (基質) を SDS-PAGE により定性的に吸着量の解析を行った。SusD を各基質と混合し、遠心分離後、その上清のタンパク質量を定量し、吸着等温式を用いて最大結合量 [PX]_{max} と吸着平衡定数 Ka を求めた。

【結果および考察】SusD (01963) は Native-affinity-PAGE において SusD は可溶性のキシラン、セルロースいずれとも親和性は確認されなかった。SDS-PAGE による定性的な結合解析ではキシランとセルロースとの吸着が確認できた。定性結合実験では基質との吸着が確認されたが Native-affinity-PAGE では吸着は確認できなかった。このことから SusD は不溶性基質とは結合するが可溶性基質とは結合が弱いかも知れない。現在、SusD (01963) の定量的結合解析および SusD (01961) の解析を行っている。

DP2-20-08/P1-073

Static cultivation induces avirulent phase conversion in *Bordetella bronchiseptica*

○Xingyan Ma¹, Nugraga Dendi Krisna¹, 堀口 安彦^{1,2} (1阪大微研, 2阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Xingyan Ma¹, Nugraga Dendi Krisna¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (1RIMD, Osaka Univ., 2CiDER, Osaka Univ.)

Bordetella bronchiseptica, a respiratory pathogen, exhibits the phenotypic conversion between the virulent Bvg⁺ phase and the avirulent and low-nutrient demanding Bvg⁻ phase. This phase conversion, which may represent an environmental adaptation of the bacteria, is regulated by the BvgAS two-component system, or spontaneously occurs by a mutation of BvgS sensor kinase. The mutations on *bvgS* reportedly occur with a frequency of 10⁻⁶ to 10⁻³. However, in the present study, we show that ~80% of the bacteria convert from Bvg⁺ to Bvg⁻ after a 48-h static incubation but not a 48-h shaking incubation. This conversion resulted from the mutations of varied regions on *bvgS*. Bvg⁻ phase bacteria directed by the BvgAS system did not exhibit *bvgS* mutations after the static incubation. When a wild-type strain was co-cultured with a Bvg⁻ phase-locked mutant under static conditions, the former was out-competed by the latter, indicating that the Bvg⁻ phase is better adapted to static culture conditions than the Bvg⁺ phase. Furthermore, we found that a mutant strain deficient in RpoN (σ^{54}), did not generate Bvg⁻ mutants even after 48-h static cultivation. Collectively, we consider that the mutational conversion to the Bvg⁻ phase may result from their adaptation to static conditions. RpoN is likely involved in this phenomenon. We are now elucidating the role of RpoN in this phenomenon.

DP2-20-09/P1-074

Color tuning mechanism of the L/Q switch in Green- and Blue-absorbing proteorhodopsin

○錦野 達郎¹, 杉本 哲平¹, 神取 秀樹^{1,2} (1名工大・院工・工, 2名工大・オプトバイオテクノロジー)

○Tatsuro Nishikino¹, Teppei Sugimoto¹, Hideki Kandori^{1,2} (1Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Tech., 2OptoBio Tech. Res. Cent., Nagoya Inst. of Tech.)

Rhodopsin is a protein family that binds a retinal as chromophore in seven transmembrane helices. Photoisomerization of the retinal chromophore induces conformational changes in rhodopsin to perform its diverse functions. Proteorhodopsin (PR) is a light-driven proton pump found in marine bacteria. PR is classified into blue-absorbing (BPR, λ_{max} ~ 490 nm) and green-absorbing (GPR, λ_{max} ~ 525 nm) forms, which functions in deep and shallow ocean waters, respectively. BPR and GPR are discriminated by the "color switch" residue at position 105; Gln in BPR and Leu in GPR. Although Gln and Leu are hydrophilic and hydrophobic residues, respectively, absorptions of the 19 replacement mutants at L105 in GPR were correlated with the volume at position 105, not hydrophobicity (Ozaki et al. 2014). Here we applied FTIR spectroscopy to GPR, L105Q mutant GPR, and BPR to clarify the color-tuning mechanism. Light-induced difference FTIR spectra were measured at 77 K, and the obtained spectra were compared with each other. We found that distortion and hydrogen-bond of the retinal chromophore were changed by the L-to-Q mutation. Hydrophobicity around the retinal was also changed in those proteins. We will discuss the structural elements controlling their colors.

DP2-20-10/P1-075

大腸菌の細胞外アミロイド産生における GrpE の必須性の解析

○藤田 かのん¹, 奈良 萌子¹, 大瀧 琴音¹, 重盛 林太郎¹, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (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慈恵医大・アミロイド制御研)

Analysis of essentiality of GrpE in the production of extracellular amyloids in *E. coli*

○Canon Fujita¹, Moeko Nara¹, Kotone Ohtaki¹, Rintaro Shigemori¹, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Regulation, Jikei Univ. Sch. Med.)

Curliは大腸菌のバイオフィーム形成に重要な役割を果たす細胞外アミロイド線維である。Curliの主要成分であるCsgAは、翻訳後、Sec経路によってペリプラズムに輸送され、外膜に局在するCsgG輸送体によって菌体外へ分泌される。これまでに我々は、(1)分子シャペロンDnaKがCurliの産生に必須であること、(2)DnaKが細胞質でのCsgAの凝集を抑制し、ペリプラズムへの輸送を助けること、(3)DnaKと協調して働く3つのJドメインタンパク質のうちDnaKとCbpAがCurli産生において相補的に機能することを報告した (Sugimoto et al. **Commun. Biol.** 2018, Sugimoto et al. **J. Mol. Biol.** 2021)。本研究では、DnaKのヌクレオチド交換因子であるGrpEのCurli産生における必須性を検討した。

大腸菌 C600 (野生株) と DA259 (*grpE* 欠損株) を Congo Red 含有寒天培地上で培養し、Curliの産生を評価した結果、野生株のコロニーのみがアミロイド線維に特徴的な赤色を呈した。プラスミドを用いて *grpE* を相補したが、*grpE* 欠損株の Curli の産生は回復しなかったことから、*grpE* 欠損株のゲノム上に *grpE* 以外の遺伝子の変異や欠損が存在する可能性が示唆された。PCR および次世代シーケンス解析で Curli 関連遺伝子の存在の有無を調べたところ、*csgABCDEF* の欠損が判明した。そこで、*CsgABCDEF* 共発現プラスミドを *grpE* 欠損株に導入し、Curliの産生を評価した結果、Curliの産生が認められた。また、GrpEに結合できないDnaK変異体発現プラスミドを *dnaK* 欠損株に導入すると Curli の産生が回復した。以上より、DnaKはCurliの産生に必須だが、GrpEは必須ではないことが判明した。本知見はGrpE非依存的なDnaKの生理機能を示唆するものである。

DP2-20-11/P1-076

大腸菌ゲノムに存在する GrpE 遺伝子欠損時に致死性を発揮するエレメントの探索

○大瀧 琴音¹, 奈良 萌子¹, 重盛 林太郎¹, 藤田 かのん¹, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (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慈恵医大・アミロイド制御研)

Screening for lethal elements in the GrpE gene deletion in the genome of *E. coli*

○Kotone Otaki¹, Moeko Nara¹, Rintaro Shigemori¹, Canon Fujita¹, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Regulation, Jikei Univ. Sch. Med.)

分子シャペロン DnaK のヌクレオチド交換因子 GrpE は大腸菌の生存に必須とされている。しかし、大腸菌 C600 株をもとに作製された DA259 株は、例外的に *grpE* を欠損しているのに関わらず、30°C 付近の温度で生育可能である。これまでの研究により、DA259 株には *grpE* 以外の遺伝子の欠損や変異が存在し、そのことによって必須遺伝子である *grpE* を欠損しても生育できることが示唆されている。本研究では、DA259 株が欠損していると予想される *grpE* 欠損時致死性発揮エレメント (LEGEND: lethal elements in the GrpE gene deletion) を探索し、大腸菌における GrpE の必須機能の解明につなげることを目的とする。

まず、DA259 株のゲノム解析を実施し、データベースに登録されている C600 株のゲノムと比較した。その結果、DA259 株のゲノムにおいて、8カ所の欠損領域 (0.1~23 kb) と 177カ所の一塩基置換を見出した。次に、これらの欠損領域をそれぞれ PCR で増幅し、アンピシリン耐性マーカーを持つプラスミドに連結した後、DA259 株をエレクトロポレーションで形質転換した。その結果、Rac プロファージをコードする領域 (LEGEND-1) を含んだプラスミドを用いた場合に形質転換効率が著しく低いことがわかった。一方、C600 株ではこのプラスミドを用いて多くの形質転換体が得られた。また、LEGEND-1 と *grpE* を連結したプラスミドを用いた場合も DA259 株の形質転換体が多く得られた。さらに、LEGEND-1 に含まれる遺伝子を部分的に欠損させたプラスミドを用いた形質転換実験により、*racR*, *ydaG*, *ydaF*, *recT*, および *sieB* と *kilR* 間のノンコーディング領域が DA259 において致死性を発揮する上で重要な役割を果たすことが明らかとなった。

DP2-20-12/P1-077

分子シャペロン DnaK のヌクレオチド交換因子 GrpE の大腸菌の生存に必須な細胞機能の解明

○重盛 林太郎^{1,2}, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (1慈恵医大・医・細菌, 2慈恵医大・バイオフィーム研究センター, 3慈恵医大・アミロイド制御研)

Elucidation of an essential cellular function of GrpE for survival of *E. coli*

○Rintaro Shigemori^{1,2}, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Reg., Jikei Univ. Sch. Med.)

DnaKはATPase活性を有し、基質タンパク質のフォールディングを担う分子シャペロンである。DnaKのヌクレオチド交換因子GrpEは、ATP加水分解によって生じたADP結合型DnaKからADPと基質タンパク質を解離させる。興味深いことに、DnaKは大腸菌の生存に必須ではないが、GrpEは必須である。本研究では、これまで未解明であった大腸菌におけるGrpEの必須機能の解明を目指した。まず、ATP依存性プロテアーゼClpXPが認識するSsrA-tag遺伝子が大腸菌clpP欠損株のgrpEの3'末端に挿入した株(BW25113 ΔclpP grpE-ssrA)を作製した。この株を、アラビノース誘導プロモーター下流にclpXPを連結したプラスミド(pBAD-ClpXP)を用いて形質転換し、アラビノースの添加によって強制的にGrpEを分解するprotein knockdown (PKD)株を作製した。本株を0.2%アラビノース添加LB培地で培養すると、10分以内に細胞内GrpEが完全に分解された。ライプセルイメーキングの結果、0.2%アラビノース添加後1時間以内にPKD株の細胞伸長が確認され、数時間から24時間で細胞膜が破綻して死滅する様子が観察された。一方、ΔclpP pBAD-ClpXP株や空ベクターを導入したΔclpP grpE-ssrA株では正常な細胞分裂が観察された。また、PKD株に野生型GrpE、またはDnaKと相互作用できない変異型GrpE^{G122D}を発現させたところ、どちらの場合も正常に分裂・増殖した。以上より、大腸菌はGrpEが分解されるとDnaK非依存的に細胞分裂が阻害され、続いて細胞膜の恒常性が破綻し、死滅することがわかった。現在、PKD株をもとにGrpEが分解されても死滅しないサプレッサー変異株を取得しており、変異遺伝子とGrpEの必須性の関連性について解析中である。

DP2-20-13/P2-072

細菌共存が使用済みオルソケラトロジーケースから検出された細菌のバイオフィーム形成能に与える影響

○渡邊 愛, 木村 優那, 角出 泰造 ((株)メニコン)

Effect of coexistence on biofilm-forming potency of bacteria from used orthokeratology lens cases

○Ai Watanabe, Yuna Kimura, Taizo Sumide (Menicon Co., Ltd.)

【目的】オルソケラトロジー (OK) はコンタクトレンズによる視力矯正の一つである。OKレンズは、内面形状が特殊なガス透過性ハードコンタクトレンズであり、就寝時着用による角膜前面の平坦化で、一時的に近視を軽減させる。日中は専用ケースでレンズを保管し、使用後ケースは水道水での洗浄や乾燥が推奨される。OKレンズ装用者が使用したケース内の微生物汚染調査では、ほぼ全てのケースで日和見病原体やBSL2の細菌が生菌の状態で見出され、結膜嚢常在菌 *Staphylococcus epidermidis* や口腔常在菌 *Streptococcus salivarius*、ケース洗浄で用いる水道水に含まれる *Methylobacterium rhodesianum* 等が複数のケースから検出された。これらの中には高いバイオフィーム (BF) 形成能を示す細菌も存在した。本研究では、使用済みOKレンズケースから検出された細菌のBF形成能へ他細菌の共存が与える影響を検証した。【方法】BF形成能が比較的低い *S.epidermidis* に着目し、培養用インサートを介して他細菌共存によるBF形成能の変化をクリスタルバイオレット染色法で評価した。共存菌には、使用済みケースで検出された *S.salivarius*、*Streptococcus parasanguinis*、*M.rhodesianum*、*Stenotrophomonas maltophilia* を用いた。【結果と考察】*S.epidermidis* のBF形成能は *S.salivarius* 共存下でのみ有意に上昇した ($p < 0.05$, Dunnett検定)。洗浄後レンズケースは、洗面台で蓋を開けた開放系で乾燥、保管される場合が多いため、飛散した唾液により口腔常在菌 *S.salivarius* が混入する可能性が高い。本結果から、洗面台でのケース保管に起因した口腔常在菌 *S.salivarius* 混入は、BFによるケース汚染リスク増大に繋がると示唆された。

DP2-20-14/P2-073

Group B Streptococcus が保持するストレス応答性酵素 MazF の働き

○岡部 拓真^{1,2}, 葵 理恵^{1,2}, 横田 亜紀子², 石塚 寛子², Jiang Yunong^{2,3}, 常田 聡¹, 野田 尚宏^{1,2,4} (1早大院・先進理工・生命医科, 2産総研・バイオメディカル, 3筑大院・人間総合科学, 4筑大・グローバル教育院)

Group B Streptococcus of Stress-responsive ribonuclease MazF

○Takuma Okabe^{1,2}, Rie Aoi^{1,2}, Akiko Yokota², Hiroko Tamiya-Ishitsuka², Jiang Yunong^{2,3}, Satoshi Tsuneda¹, Naohiro Noda^{1,2,4} (1Dept. Life Sci. & Med. Biosci., Waseda Univ., 2Biomed. Res. Inst., Natl. Inst. of Adv. Ind. Sci. & Tech. (AIST), 3Grad. Sch. of Compr. Hum. Sci., Univ. of Tsukuba, 4SIGMA, Univ. of Tsukuba)

MazFはストレス応答性の毒性タンパク質であり、原核生物間で広く保存される。宿主細菌が通常環境にいる場合、MazFは同時に発現する抗毒性タンパク質 MazE と結合し、その活性を抑制される。一方、宿主細菌が栄養飢餓等の環境ストレスに曝されると、MazEがプロテアーゼによって優先的に分解され、遊離したMazFは配列特異的にRNAを切断することで翻訳を制御し宿主の細胞活動を抑制する。MazFの配列特異性は原核生物種によって異なり、例えば、大腸菌ではACAを切断し、黄色ブドウ球菌ではUACAUを切断する。現在まで複数のMazFが解析されたが、未だ多くの原核生物種のMazFのRNA切断配列は調査されていない。本研究ではGroup B Streptococcus が保持するMazF (MazF-GBS)に着目した。MazF-GBSは株間でMazFの長さが異なり、NEM316株の112アミノ酸に対して2603V/R株では62アミノ酸であった。2603V/R株のMazFが小さい原因は、ORF上のトリプトファンのコドンTGGが終止コドンTAGに置き換わったためである。一般的なMazFのアミノ酸長は110アミノ酸前後であるのに対して、MazF-GBS (2603V/R)はそれよりも大幅に小さい62アミノ酸であるため、切断活性または配列特異性が機能的に欠如していると予想された。しかし実際にMazF-GBS (2603V/R)とRNAを反応させ、ゲル電気泳動によりRNAの様子を確認したところ、RNAの切断が確認された。さらに次世代シーケンサーおよび蛍光プローブを用いたMazF-GBSのRNA切断配列同定を行ったところ、特定の6塩基UACAUAを認識してRNAを切断することが明らかになった。このようにMazF-GBSはタンパク質のサイズが小さいながらも、配列特異的なRNA切断活性を保持していることが示唆された。

DP2-20-15/P2-074

リボソームタンパク質の過剰発現による大腸菌の亜鉛耐性化機構

○小崎 智己, 白川 璃子, 石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡大院・医歯薬・分子生物学)

Overexpression of ribosomal proteins leads to zinc resistance in *Escherichia coli*

○Tomoki Kosaki, Riko Shirakawa, Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

亜鉛は細菌の生存に必須であると同時に過剰量では細菌に対して毒性を示す。宿主は過剰な亜鉛を細菌に暴露することで細菌を殺菌する生体防御機能を有している。我々は以前に、リボソームタンパク質RpmJの遺伝子欠損株が亜鉛耐性を示すこと、RpmJ遺伝子欠損株ではRpmJ以外のリボソームタンパク質の発現量が増加していることを報告している。本研究では、リボソームタンパク質の過剰発現が亜鉛耐性化を引き起こすのではないかと考え、大腸菌遺伝子過剰発現ライブラリー (ASKA クローン) を用いて検証をおこなった。解析の結果、リボソームタンパク質過剰発現株54株のうち、49株が亜鉛耐性を示すことを見出した。一方、リボソームタンパク質以外のタンパク質の過剰発現では亜鉛耐性は導かれず、亜鉛耐性化はリボソームタンパク質の過剰発現に特異的な現象であると考えられた。また、リボソームタンパク質の過剰発現は亜鉛以外の金属イオン (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+) に対する耐性を導かないことから、亜鉛特異的な耐性化機構が示唆された。リボソームタンパク質過剰発現株において亜鉛排出ポンプZntAが欠損させると、亜鉛耐性が失われた。また、ATP依存性に細胞内の異常タンパク質を分解するLonプロテアーゼをリボソームタンパク質過剰発現株において欠損すると、過剰発現したリボソームタンパク質の蓄積が検出され、亜鉛耐性が失われた。以上の結果は、リボソームタンパク質の過剰発現は、亜鉛排出ポンプZntAならびにLonプロテアーゼを介して亜鉛耐性を導くことを示唆している。

DP2-20-16/P2-075

Limited proteolysis of mycobacterial DNA-binding protein 1 to unveil posttranslational modifications

○西山 晃史¹, 吉田 豊¹, Desak NSS Dewi¹, 山崎 智也¹, 横山 晃¹, 小林 大記², 今道 仁¹, 尾関 百合子¹, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (1新潟大院・医歯学総合・細菌, 2新潟大院・医歯学総合・研究推進センター)

○Akihito Nishiyama¹, Yutaka Yoshida¹, Desak NSS Dewi¹, Tomoya Yamazaki¹, Akira Yokoyama¹, Daiki Kobayashi², Hitoshi Kondo¹, Yuriko Ozeki¹, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (1Dept. Bacteriol., Niigata Univ. Sch. Med., 2Omics Unit, Niigata Univ. Sch. Med.)

The basic, intrinsically disordered regions (IDRs) of eukaryotic histones and their bacterial counterparts are presumed to act as signaling hubs to regulate the compaction of chromosomes and various DNA processes. Posttranslational modifications (PTMs) on these regions are pivotal in regulating chromosome compaction and DNA processes. However, the low sequence complexity and the presence of short Lys-rich repeats in the regions have hindered the accurate determination of PTMs using conventional proteomic procedures. In this study, we developed a limited proteolysis protocol using trypsin to analyze PTMs on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1), a histone-like protein conserved among mycobacterial species that possesses a Lys-rich IDR. This limited proteolysis approach successfully revealed significant methylation on many Lys residues in IDR of MDP1 purified from *Mycobacterium tuberculosis*, which was lacking in the corresponding region of recombinant MDP1 expressed in *Escherichia coli*.

DP2-20-17/P2-076

黄色ブドウ球菌の膜タンパク質から成るトキシン・アンチトキシンシステムの機能解析

○加藤 文紀 (広島大院・医)

Characterization of *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system composed of membrane proteins

○Fuminori Kato (Grad. Sch. Biomed. Heal Sci., Hiroshima Univ.)

多くの生物においてゲノム配列情報が解読されているが、小さいサイズのタンパク質に関しては、その機能解明が進んでいない。我々は黄色ブドウ球菌の保有する 100 アミノ酸残基以下から成るタンパク質に注目し、その機能解明を試みている。トキシン・アンチトキシン (TA) システムは、小さなタンパク質から成る事が知られており、これまでに我々は黄色ブドウ球菌のゲノム上に存在する 100 アミノ酸以下の機能未解明な遺伝子群から、新規な TA システムを複数種見出ししている。本研究では、膜タンパク質と推定される黄色ブドウ球菌の TA システムである TsaA/TsaT の機能を明らかにすることを目的とした。Macromolecules Assay および LIVE/DEAD 染色から、TsaT トキシンは大腸菌および黄色ブドウ球菌の細胞膜に障害を引き起こす事が示唆された。さらに、FLAGx3 タグを融合させた TsaT トキシンおよび TsaA アンチトキシンを黄色ブドウ球菌内で発現させ、細胞内局在を解析した結果、TsaT トキシンと TsaA アンチトキシンの両タンパク質は膜画分に存在しており、膜タンパク質であることが実験的に示唆された。また、相同性検索の結果、新規 TA システム TsaA/TsaT は、ゲノム情報が登録されている全ての黄色ブドウ球菌で保存されており、加えて、周辺領域の遺伝子群もブドウ球菌属で保存されている傾向が見られた。細菌の TA システムにおいて、トキシンが膜タンパク質である報告は存在するが、アンチトキシンも膜タンパク質である報告は無く、新規な知見である。現在、黄色ブドウ球菌における役割の解明に向けて取り組んでいる。【会員外共同研究者: Masayori Inouye, Keiko Inouye (Rutgers University)】

DP2-21-01/P1-191

非抗菌性エリスロマイシン誘導体による免疫調節作用の解析

○齋藤 瑠都^{1,2}, 土門 久哲^{1,3}, 日吉 巧^{1,3}, 池田 朱里^{4,5}, 廣瀬 友靖^{4,5}, 砂塚 敏明^{4,5}, 寺尾 豊^{1,3} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・う蝕, 3新潟大・院医歯・高口研セ, 4北里大・大村研, 5北里大・院・感染制御)

Molecular Analysis of Immunomodulatory Effects of Non-antimicrobial Erythromycin Derivatives

○Rui Saito^{1,2}, Hisanori Doman^{1,3}, Takumi Hiyoshi^{1,3}, Akari Ikeda^{4,5}, Tomoyasu Hirose^{4,5}, Toshiaki Sunazuka^{4,5}, Yutaka Terao^{1,3} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch., Med. Dent. Sci., 2Div. Cariol. Oper. Dent. Endo., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Cent. for Adv. Oral. Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 4Omura Inst., Kitasato Univ., 5Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ.)

【背景と目的】マクロライド系薬に対する薬剤耐性が拡大し、使用量削減が求められている。一方、マクロライド系薬が併せ持つ免疫調節作用はさまざまな炎症性疾患に有効であると報告されている。そこで本研究では、抗菌作用の無いエリスロマイシン (EM) 誘導体を開発し、その免疫調節作用について解析した。【方法と結果】マクロライド感受性 *Staphylococcus aureus* NLS6 株に 37 種類の EM 誘導体を添加して培養し、非抗菌性の誘導体を選別した。次に、非抗菌性誘導体と LPS を THP-1 細胞に混合添加して培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA にて測定した。その結果、誘導体 EM982 と LPS を混合添加した群では、LPS 単独添加群と比べて、TNF- α , IL-6, IL-8 および IL-10 の濃度が有意に低かった。続いて、Toll-like receptor (TLR) 4 を発現させた HEK293 細胞に EM982 と LPS を混合添加して培養し、NF- κ B および AP-1 の活性化に伴って分泌されるアルカリフォスファターゼの活性を測定した。その結果、EM982 添加群では、LPS 単独添加群と比較して、アルカリフォスファターゼ活性が有意に低かった。さらに、TLR4 シグナル伝達分子に及ぼす EM982 の影響を real-time PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析した。その結果、EM982 添加群では、LPS 単独添加群と比較して、NF- κ B の上流で機能する IKK β および I κ B α のリン酸化レベルが低かった。【考察と結論】EM982 は TLR4 シグナル伝達分子 IKK β および I κ B α のリン酸化を阻害し、NF- κ B の活性化を抑制することで、炎症性および抗炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。また、EM982 は抗菌作用を欠き、薬剤耐性菌を生じさせる懸念が少ないことも示唆された。

DP2-21-02/P1-192

ディフィシル菌の溶菌酵素 CD3380 の生化学的解析

○関谷 洋志¹, 高橋 瑞稀¹, 岡崎 留性¹, 神島 成弘², 玉井 栄治¹ (1松山大・薬・感染症学, 2香川大・医・研基セ)

Analysis of lytic enzyme CD3380 of *Clostridioides difficile*

○Hiroshi Sekiya¹, Mizuki Takahashi¹, Rui Okazaki¹, Shigehiro Kamitori², Eiji Tamai¹ (1Dept., Infect. Disease., Pharma., Matsuyama Univ., 2Res. Faci. Cent. Sci. & Tec. Facul. Med., Kagawa 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加水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エンドペプチダーゼと推定される溶菌酵素 CD3380 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 CD3380 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 (CD3380_CD2) 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】Signal peptide を除いた全領域を持つ CD3380 はディフィシル菌に対して溶菌活性を示さなかった。一方、触媒ドメインのみの CD3380_CD2 は、強い溶菌活性を示した。そこで、CD3380_CD2 の生化学的性質を調べた結果、pH7.0, 0 mM NaCl の条件下で最も溶菌活性が高く、NaCl 濃度が高くなると活性の低下がみられた。また、ノビー菌などに対して弱い溶菌活性を示し、枯草菌には比較的強い溶菌活性を示した。しかし、調べた全てのディフィシル菌株に対して高い溶菌活性を示していることからディフィシル菌に特異的に作用すると考えられた。一方、溶菌活性と菌との結合の有無に相関性はみられなかった。

DP2-21-03/P1-193

尿路感染症原因菌 *Actinotignum* spp. の各種抗菌薬に対する感受性評価および系統解析

○富田 純子, 久綱 僚, 森 亮太, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

Antimicrobial susceptibility survey and phylogenetic analysis of *Actinotignum* spp.

○Junko Tomida, Ryo Kutsuna, Ryota Mori, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】グラム陽性嫌気性桿菌である *Actinotignum* 属菌種は、尿路感染症からの分離が多く報告されており、その他には菌血症、感染性心内膜炎、軟部組織感染症等からの分離報告もある。*Actinotignum* 属菌種は、質量分析や生化学性状試験による識別が難しいことから、臨床現場において同定が困難な菌群として認識されている。また、本属菌種による感染症では、各抗菌薬のブレイクポイントや治療法が十分に策定されていないことが問題となっている。そこで、本研究では *Actinotignum* 属菌種の各種抗菌薬に対する MIC データを収集し、薬剤感受性および耐性の傾向を明らかにした。

【方法】*Actinotignum* 属の基準株および臨床分離株 72 株について、ブルセラ培地を用いた Etest により MIC を測定した。抗菌薬は各系統 15 薬剤について評価した。また、16S rRNA およびハウスkeeping 遺伝子を PCR にて増幅後、塩基配列を決定し比較した。

【結果および考察】*Actinotignum* 属は現在 4 菌種存在するが、16S rRNA 遺伝子の同源性が高く、菌種を識別するためには他の遺伝子による解析が必要であった。MIC 測定の結果、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系薬剤の MIC₉₀ は 0.1 μg/mL 以下であり、感受性を示した。アミノグリコシド系、マクロライド系、リンコマイシン系薬剤には一部の株が耐性を示した。シプロフロキサシンには 45% の株が耐性を示し、メトロニダゾールはすべての株が耐性であった。耐性機構について調べたところ、キノロン系薬剤への耐性には *gyrA* 遺伝子の変異が、マクロライド系薬剤への耐性には *erm* (X) 遺伝子の関与が示唆された。

DP2-21-04/P1-194

ファージの尾繊維先端と大腸菌ポーリンの相互作用

○寺崎 陽香, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Interaction between the tip of long tail fiber of PP01 phage and a porin of *Escherichia coli*

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

近年、多剤耐性菌の蔓延を背景にファージ療法が注目されている。我々は、ファージの宿主認識を分子レベルで理解し、その成果をファージ療法へ応用することを目指している。O157 株に感染する PP01 ファージは、尾繊維先端に位置する Gp38 を用いて、大腸菌ポーリンである外膜タンパク質 C (OmpC) に吸着する。これまでの解析により、Gp38 の 230 番目の Tyr が、OmpC の細胞外領域に位置する 303 番目から 306 番目の 4 アミノ酸 Gly-Val-Ile-Asn と相互作用する可能性が示唆されている。本研究ではまず、Gp38 における Tyr230 の必要性を検討した。Tyr230 を欠失した Gp38 を持つ PP01 は、O157 株の OmpC を発現する大腸菌で増殖できなかった。興味深いことに、PP01 は Tyr230 を Ala に置換しても増殖できたが、Pro に置換すると増殖不能になった。Pro への置換は主鎖の構造に変化を与えるため、Tyr230 の主鎖が OmpC との相互作用に必要であることがわかった。次に、OmpC の Gly-Val-Ile-Asn の必要性を検討した。各アミノ酸を欠失、または Ala や Pro に置換した OmpC を発現させて、PP01 の増殖と吸着を調べた。Asn306 を欠失または Pro に置換した OmpC 発現株では PP01 は増殖も吸着もできなかった。よって、PP01 の吸着には Asn306 の主鎖が必要であることがわかった。以上の結果より、Gp38 の Tyr230 の主鎖と OmpC の Asn306 の主鎖が相互作用する可能性が示唆された。我々はさらに、Tyr230 以外に、Gp38 の 147 番目から 170 番目の領域が OmpC との相互作用に必要であることを見出した。吸着のレセプター分子が異なる PP01 と類縁ファージの間でこの領域を比較したところ、他の領域に比べて同源性が著しく低かった。よって、この領域は宿主認識に関わることが示唆される。

DP2-21-05/P1-195

Isolation and characterization of lytic phages against colibactin-producing *Escherichia coli*

○日高 侑也¹, Kanate Thitiananpakorn¹, XinEe Tan¹, 相羽 由詞¹, 宮永 一彦¹, 笹原 鉄平^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 崔 龍洙¹ (1自治医大・医・細菌, 2自治医大・医・臨床感染)

○Yuya Hidaka¹, Kanate Thitiananpakorn¹, XinEe Tan¹, Yoshifumi Aiba¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Teppei Sasahara^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Longzhu Cui¹ (1Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., 2Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Gut dysbiosis has been implicated in various diseases, yet addressing disease-causing bacteria remains a formidable challenge. Conventional techniques lack specificity in eliminating target bacteria, complicating the understanding of their role in disease and presenting significant obstacles to developing pharmaceutical agents. To address this issue, our focus was on the specific elimination of the colibactin-producing *Escherichia coli* (*pkst*⁺ *E. coli*), associated with colorectal cancer, from the gut by utilizing phages with specific lytic activity. Initially, a wild-type phage (ΦEC75_05) was isolated from sewage at Jichi Medical University Hospital, classified as belonging to the genus *Felixovirus*, and demonstrated lytic activity against 38 out of 56 *pkst*⁺ *E. coli* strains. Subsequently, we assessed the efficacy of ΦEC75_05 using the tetracycline-resistant *pkst*⁺ *E. coli* 75 strain *in vitro*. ΦEC75_05 selectively inhibited the growth of *pkst*⁺ *E. coli* 75 strain in both pure culture and mouse feces suspension, with the extent of inhibition depending on the multiplicity of infection (MOI). Ongoing efforts involve the development of an animal gut infection model using mice and the continuous assessment of ΦEC75_05 efficacy against *pkst*⁺ *E. coli* 75 strain in the mouse gut.

DP2-21-06/P2-189

系統学的に新規な複数の大腸菌ファージの標的レセプターの同定

○金子 知義^{1,2}, 常田 聡^{1,2} (1早大・先進理工学・生命医科, 2早大・ファージセラピー研)

Identification of Receptors for Multiple Phylogenetically Novel *Escherichia coli* Phages

○Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (1Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 2Phage Therapy Inst., Waseda Univ.)

【背景】バクテリオファージは薬剤耐性菌に対抗する切り札として再び注目をされているが、多くの細菌がファージに対しても耐性を獲得する。ファージ耐性を防ぐ手法として異なるファージの混合投与が提案されている。しかし、ファージは系統学的に未分類なものが多く、従ってファージの標的レセプターに関する情報も不足している。そこで、本研究では、系統学的に新規な大腸菌ファージの標的レセプターを調査した。

【方法】下水から単離した大腸菌ファージ 17 株の系統分類を比較解析した。次に、各ファージの耐性菌を作製し、比較ゲノム解析により変異部を同定することで標的レセプターの推定を行った。また、K12 株を宿主とするファージについては遺伝子の網羅的欠損株ライブラリーに対する感受性試験による標的レセプターの推定を行った。

【結果】単離した大腸菌ファージは主に 3 つの新規な系統に分離された。系統その 1 は *Ounavirinae* 亜科で *Felixovirus* 属に近く、系統その 2 は *Stephanstirmvirinae* 亜科で *Phapecoetavirus* 属に近く、系統その 3 は *Caudovirales* 目の *Stephanstirmvirinae* 亜科および亜科未分類の *Barbavirus* 属に近かった。レセプターの推定の結果、系統その 1 はリボ多糖の外核の側鎖部分を、系統その 2 は外核の主鎖部分を、系統 3 は内核のリン酸化された主鎖部分および外膜分子 NfrA を標的とすることが示唆された。

DP2-21-07/P2-190

ライブラリーの拡張：ファージセラピー強化のための複数の黄色ブドウ球菌ファージの性状調査

○水谷 拓聖¹, 金子 知義^{1,2}, アザム アア ハエルマン³, 北岡 一樹^{2,5}, 氣駕 恒太郎^{2,3,4}, 常田 聡^{1,2} (1早大・先進理工学・生命医科, 2早大・ファージセラピー研, 3感染研・治ワク, 4自治医科大・医・細菌学, 5医療法人社団 予防会 新宿サテライトクリニック)

Exploring the Arsenal: A Comprehensive Study of Staphylococcus aureus Phages for Phage Therapy

○Hiromasa Mizutani¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Aa Haeruman Azam³, Kazuki Kitaoka^{2,5}, Kotaro Kiga^{2,3,4}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (1Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 2Phage Therapy Inst., Waseda Univ., 3Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 4Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ., 5Shinjuku Satellite Clinic)

昨今の薬剤耐性菌の増加に伴い、ファージセラピーが再び注目を集めている。様々な細菌が薬剤耐性を獲得しており、特に感染症治療の脅威となりうる細菌群として ESKAPE がある。そこに含まれる黄色ブドウ球菌は薬剤耐性化率が高く、感染症治療における重大な脅威となっている。黄色ブドウ球菌は、皮膚や粘膜に定着して感染症を引き起こすだけでなく、敗血症などの命に関わる感染症の原因となる場合もある。そのため、黄色ブドウ球菌に対するファージセラピーが期待されているが、黄色ブドウ球菌ファージは環境中から取得困難であると指摘されている。ゆえに、他の ESKAPE に感染するファージに比べて黄色ブドウ球菌ファージの単離株のデータは不足している。当研究室では 14 株の黄色ブドウ球菌感染ファージの取得に成功している。本研究では、これらのファージの感染域調査、濁度カーブ測定、吸着速度試験、ゲノム解析を網羅的に実施し、黄色ブドウ球菌ファージの特性を明らかにすることを目的とした。メチシリン耐性株を含む 24 株の黄色ブドウ球菌に対する感染域調査の結果、複数のファージで広域な感染性を示した。また、濁度測定の結果、14 株中 13 株で顕著な溶菌活性が確認され、そのうち 12 株は 24 時間以上にわたり細菌の増殖を抑制した。濁度カーブの形状は様々で、潜伏期間が非常に長いファージや、溶菌開始時間が一定でないファージの存在が示唆された。本研究により、臨床現場で課題となっている黄色ブドウ球菌の溶菌に有効なファージが見出された。また、14 株のファージは多様な溶菌形態を呈したことから、詳細な生理学的評価を行ったうえでライブラリー化することの重要性が示唆された。

DP2-21-08

【発表取り下げ】

【Withdrawn】

DP2-21-09/P2-193

Reactive oxygen species generated by 222 nm Far UV-C impair photorepair in Escherichia coli

○成田 浩司^{1,2}, 浅野 クリスナ^{1,3}, 福土 理沙子^{1,4}, 山根 享介⁵, 奥村 善彦⁵, 中根 明夫^{1,3,4} (1弘前大・院医・感染生体防御, 2弘前大・院医・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・看護, 5ウシオ電機(株))

○Kouji Narita^{1,2}, Krisana Asano^{1,3}, Risako Fukushi^{1,4}, Kyosuke Yamane⁵, Yoshihiko Okumura⁵, Akio Nakane^{1,3,4} (1Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 2Inst. Animal Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 3Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 4Dept. Nursing, Sch. Health Sci., Hirosaki Univ. Health Welfare, 5Ushio Inc.)

222 nm Far UV-C (222 UVC) elicits a germicidal effect as well as conventional 254 nm UV-C (254 UVC) and is available in dwelling spaces because of harmless to human. UVC causes DNA lesions such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) that inhibit DNA replication and transcription. However, in many pathogens, CPD is repaired by photolyase and the proliferation ability is recovered by photorepair. In this study, bacterial count of *E. coli* irradiated with 254 UVC was reduced, but the count was increased after photorepair. 254 UVC induced CPD formation in *E. coli* but the amount of CPD was reduced by photorepair. On the other hand, count of *E. coli* irradiated with 222 UVC reduced, but the count was not increased, and amount of CPD did not reduce after photorepair. 254 UVC was reported to induce reactive oxygen species (ROS) that are involved in the germicidal effect. In this study, ROS-producing *E. coli* cells were increased by irradiation with 222 UVC compared with 254 UVC after photorepair. ROS can induce carbonylation of proteins, which changes their functional properties. Carbonylated proteins were increased in *E. coli* irradiated with 222 UVC but not 254 UVC after photorepair. These results indicated that ROS, which is induced by 222 UVC, impair protein function related to photorepair and inhibit recover of proliferation ability of *E. coli*.

DP2-21-10/P2-194

デフィシル菌溶菌酵素 Ecd09610 触媒ドメインの生化学的構造学的解析

○玉井 栄治¹, 関谷 洋志¹, 野中 康宏², 神鳥 成弘³, 宮地 ともみ¹ (1松山大・薬・感染症学, 2香川大・医・分子細胞, 3香川大・医・研基セ)

Biochemical and structural analysis of the endolysin Ecd09610 catalytic domain from *C. difficile*

○Eiji Tamai¹, Hiroshi Sekiya¹, Yasuhiro Nonaka², Shigehiro Kamitori³, Tomomi Miyaji¹ (1Dept. Infec. Dis., Col. Pharm. Sci., Matsuyama Univ., 2Dept. Endocrinol., Fac. Med., Kagawa Univ., 3Res. Faci. Cent. Sci. & Tec. Facul. Med., Kagawa Univ.)

【目的】デ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問題となっている。溶菌酵素は、ペプチドグリカンに直接加水分解し菌を死滅させることから、耐性菌にも有効な新規抗菌薬として期待されている。本研究では、デフィシル菌溶菌酵素 Ecd09610 が持つ 2 つの触媒ドメイン (グルコサミニダーゼドメイン (GCD) とエンドペプチダーゼドメイン (ECD)) の生化学的性質とその構造を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】デフィシル菌 630 株のゲノム DNA を鋳型に PCR にて Ecd09610 の全体、触媒ドメイン、変異体の遺伝子を増幅し pColdII に組み込み、大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL を用いて発現させ、各種カラムを用いて精製した。溶菌活性は濁度低下法で、菌との結合はブルダウ法で調べた。さらに、高度に精製したタンパク質を用いて結晶化スクリーニングを行い、得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析を実施した。

【結果・考察】Ecd09610 の全体及びドメイン変異体はデフィシル菌に対して溶菌活性を示した。特に、GCD-ECD が全体よりも強い溶菌活性を示し、GCD の溶菌活性は最も低かった。また、これらの活性は Ecd09610 全体と GCD-ECD、GCD では pH6 で、ECD では pH8 で最も活性が高かった。また、これらの活性は 50-75mM の NaCl で最も高く、Zn や Mn、Cu によって一部低下した。さらに、GCD-ECD、ECD は加熱により活性が著しく低下したが GCD は 100°C で加熱しても活性を維持していた。一方、GCD の結晶を得ることができ、構造解析に成功した。さらに、GCD とペプチドグリカンのドッキングモデルを作成し、基質結合部位の変異体を用いた解析により反応メカニズムを推定した。

DP2-21-11/P2-195**The effects of *Monascus* Fermented Rice Extract on the pathogenicity of toxigenic *Vibrio cholerae***

○山城 哲¹, 許 駿¹, 金城 麗菜², 石原 圭一郎³, 金城 朱似乃², 橘 信二郎³
(¹琉球大・院医・細菌学, ²琉球大・院農, ³琉球大・農)

○Tetsu Yamashiro¹, Jun Xu¹, Rena Kinjo², Keiichiro Ishihara³, Aino Kinjo², Shinjiro Tachibana³ (¹Dept. Bacteriol. Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, ²Grad. Sch. Agri., Univ. Ryukyus, ³Fac. Agri., Univ. Ryukyus)

The main pathogenic properties of *Vibrio cholerae* are ability to produce cholera toxin, superior motility, and ability to colonize the epithelial cells of the small intestine. In recent years, multi-drug resistant toxigenic *V. cholerae* strains have emerged, and intensive efforts have been made to find natural products that target the key virulence factors of the bacteria without inhibiting their development. *Monascus* spp. are filamentous fungi used in fermented foods. Certain metabolites of *Monascus* spp. have been reported to have health benefits in humans, however, there are few studies on the effects of *Monascus* spp. on pathogenic bacteria and their virulence factors. In the present study, we demonstrate the effects of *Monascus* spp. fermented rice extracts (MFRE) on the major virulence factors of a toxigenic *V. cholerae* strain.

When CTx was induced by *V. cholerae* O1 El Tor strain N16961 in the AKI medium with MFRE, the CTx concentration was affected compared to those of the controls. The effect of MFRE on the bioactivities of CTx against animal cell lines was investigated using the CHO cell elongation index and the cAMP assay. In both assays, MFRE had a marked effect on the activity of CTx. In addition, the excellent mobility of N16961 was affected in the presence of MFRE. In the presentation, some of the respective mechanisms will also be discussed.

DP2-21-12/P2-197**Development of periodontal disease prevention using ultraviolet light-emitting diodes**

○松村 多恵¹, 鈴木 美里¹, 湯本 浩通², 田中 保¹, 栗飯原 睦美¹ (徳島大院・社会産業理工学研究所, ²徳島大院・医歯薬)

○Tae Matsumura¹, Misato Suzuki¹, Hiromichi Yumoto², Tamotsu Tanaka¹, Mutsumi Aihara¹ (¹Grad. Sch. Tech. Indust. & Social Sci., Tokushima Univ., ²Grad. Sch. Inst. of Biomed Sci., Tokushima Univ.)

Periodontal disease affects about 80% of Japanese adults and is a risk factor for various systemic disease. *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) is often isolated from the periodontal pocket of severe chronic periodontitis sites. To prevent and treat periodontal disease, effective methods for disinfection of *P.g.* are needed. In this study, we focused on ultraviolet light-emitting diodes (UV-LED) to examine the bactericidal effect on *P.g.* and to analyze the underlying mechanism. *P.g.* ATCC33277 was cultured and adjusted at certain condition then irradiated with UV-LED (wavelength 280, 365 nm) to evaluate bactericidal effect by colony count. The UV dose-dependent bactericidal effect was achieved at each of UV wavelengths. At the same level of bactericidal effect, cell membrane surface damage was compared by the images with a scanning electron microscope. The cell membrane damage was observed at 365 nm, not 280 nm, suggesting the generation of reactive oxygen species. The amount of gingipain produced in *P.g.* was also compared. These results suggest that UV-LED is an effective bactericidal method against *P.g.* and may contribute to prevent and treat periodontal disease.

DP2-21-13/P2-198**Development of a water disinfection system by a combination of UV and chitosan**

○鈴木 美里, 松村 多恵, 川上 竜巳, 田中 保, 栗飯原 睦美 (徳島大院・社会産業理工学研究所)

○Misato Suzuki, Tae Matsumura, Ryushi Kawakami, Tamotsu Tanaka, Mutsumi Aihara (Grad. Sch. Tech. Indust. & Social Sci., Tokushima Univ.)

Water disinfection technologies such as chlorination, ozone, and ultraviolet (UV) are commonly used, but there are concerns about environmental impact and human health, including the development of drug-resistant bacteria, toxicity, and carcinogenicity. Therefore, effective methods for water disinfection are needed. Combined effects of UV and chitosan, a polysaccharide extracted from natural chitin, as a biopolymer with antimicrobial activity are few reported. To developing a new water disinfection technology, we investigated the bactericidal effect of the combined use of UV and chitosan. *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli*) or *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (*S. aureus*) were used as bactericidal indicators. Chitosan was mixed with the bacteria solution and irradiated with UV to examine its bactericidal effect under various conditions. The results showed a synergistic bactericidal effect on *E. coli*, but no effect on *S. aureus*. Experiments using reactive oxygen species (ROS) scavengers showed differences in the species and amount of ROS generated. Damage to cell membranes caused by the combination of UV and chitosan was observed by scanning electron microscopy. These results indicate that treatment of chitosan combined with UV irradiation is potential method for effective water disinfection.

DP2-21-14/P1-197**膜小胞修飾銀ナノ粒子を用いた細胞内寄生菌に対する抗菌活性**

○徐 薇, 吉井 僚祐, 丸山 紗代, 新留 琢郎 (熊大・先端科学研究部)

Antimicrobial activity of bacterial membrane vesicles-coated silver nanoparticles

○Wei Xu, Ryosuke Yoshii, Sayo Maruyama, Takuro Niidome (FAST, Kumamoto Univ.)

サルモネラ菌は食中毒菌として知られ、腸管上皮細胞やマクロファージ内に寄生し、増殖する。ニューキノロン系抗生物質のような抗菌薬が主に治療に使用されるが、細胞浸透性や安定性が低いため細胞内寄生菌に対して効果が乏しい。そこで、我々は細菌が分泌する膜小胞(MV)に着目した。MVには、細菌由来膜タンパク質やシグナル伝達物質が含まれ、細菌間あるいは細菌-宿主間に情報伝達などの役割を持つ。そこで、サルモネラ菌が産生するMVに何かしら細胞認識する物質が存在すれば、細胞選択的な薬物送達ができるのではないかと着想した。一方、抗菌剤として銀ナノ粒子が多く使用されている。しかし、その分散安定性が低いことも指摘されている。そこで本研究では、銀ナノ粒子にMVを用いて表面修飾し、銀ナノ粒子の安定性とマクロファージへの取り込み効率を向上させ、細胞内に寄生するサルモネラ菌を効果的に殺菌することを検証した。

P1-001/DP1-01-01

New species belonging to the genus *Waltera*

○坂本 光央, 久富 敦, 大熊 盛也 (理研・バイオリソース・微生物材料)

○Mitsuo Sakamoto, Atsushi Hisatomi, Moriya Ohkuma (RIKEN BRC-JCM)

The genus *Waltera* was proposed in 2020 with *Waltera intestinalis* as the type species, which was isolated from pig intestine. *W. intestinalis* is considered to be a prevalent gut bacterial species in humans based on the overlap between pig novel taxa and the catalogue of human-associated bacteria. Recently, we isolated strains 17YCFACo10^T, 18YCFAH0.3Co2, and 19YCFAH0.3Co2 from human feces, which appear to be *W. intestinalis*. The aim of this study was to identify the taxonomic position of the three isolates. We characterized the isolates using a polyphasic approach integrating genomic analyses. All three isolates were characterized as obligately anaerobic, Gram-stain-negative, wavy rods. Moreover, the 16S rRNA gene sequence similarity of these isolates was the highest (99.2-100%) to *W. intestinalis* WCA3-601-WT-6H^T. The results show that strain 19YCFAH0.3Co2 can be classified as *W. intestinalis* based on the higher values of digital DNA-DNA hybridization (dddDH) and average nucleotide identity (ANI) (72% dddDH and 97% ANI) compared to *W. intestinalis* WCA3-601-WT-6H^T. Conversely, strains 17YCFACo10^T and 18YCFAH0.3Co2 were found to be different species from *W. intestinalis* due to the lower dddDH and ANI values (34% dddDH and 87% ANI). Based on the data collected, strains 17YCFACo10^T and 18YCFAH0.3Co2 represent a novel *Waltera* species and we propose the name *Waltera elongata* sp. nov.

P1-002/DP1-01-02

Clostridium 属菌鑑別 PCR の改良の必要性が示唆された死亡牛からの *Clostridium massiliodiemoense* 分離例

○馬田 貴史¹, 梅田 麻美², 児玉 彬², 高松 大輔^{1,3} (¹農研機構・動衛研・動物感染症, ²大分県・大分家保, ³岐阜大院・連合獣医)

Clostridium massiliodiemoense from dead cattle suggests the need for improved PCR for *Clostridium*

○Takashi Mada¹, Asami Umeda², Akira Kodama², Daisuke Takamatsu^{1,3} (¹Anim. Infect. Res. Div., Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO, ²Oita LHSC, Oita Pref., ³Utd. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

Clostridium massiliodiemoense (CM) は、2016年に人の腸内容物から分離され、新種として報告された菌である。これまで国内でCM分離例は報告されていなかったが、今回、同菌による菌血症を呈し死亡した牛の症例を経験した。しかし、*fljC* を標的とした現行の *Clostridium* 属菌鑑別 PCR (*fljC* PCR) では、本症例分離株は *Clostridium novyi* A 型 (CNA) と判定されたため、これら2菌種の関係性を調査した。患者は96ヶ月齢の黒毛和種の雌牛で、食欲廃絶と黒色水様便を呈した3日後に死亡した。同個体の心臓、肺、肝臓及び腎臓由来 DNA を用いた *fljC* PCR で CNA を示す大きさの増幅産物が認められたが、臓器から CNA は分離されず、肝臓と脾臓から分離された菌は 16S rDNA 解析で CM と同定された。*fljC* PCR は CM を標的としていない。しかし、分離 CM 株からも CNA を示唆する大きさの *fljC* 産物が増幅され、その配列は臓器由来産物の配列と 100%一致したため、臓器からの増幅産物は CM に由来することが示唆された。MiSeq 及び MinION を用いたゲノム解析の結果、本症例分離株と CNA 基準株及び CM 基準株の Average nucleotide identity は各々 90.37% 及び 96.37% であり、系統解析では分離株は CNA 株よりも既報の CM 株とより近縁な関係にあった。以上より、本症例分離株は CM であることが確認されたが、分離株由来の *fljC* PCR 産物の配列は、既報の CM 株の *fljC* 領域の配列 (一致率 91.7%) よりも CNA 株由来の配列 (一致率 92.7%) に類似しており、現行の *fljC* PCR は CNA の特異的検出に適していないことが示唆された。分離 CM 株は、CNA の毒素遺伝子は保有しておらず、CM の病原性及び CNA との差異を明確にするためには同菌について更なる解析が必要である。

P1-003/DP1-01-03

少量のシーケンスデータにより薬剤耐性菌の遺伝的特徴を推定可能な「Shallow-Seq」の確立

○屋宜 宣慶¹, 宮城 七彩², 平井 到² (¹琉球大・医・保健・生理機能, ²琉球大・保健・微生物)

Shallow-Seq; the method for presuming genetic lineage of bacteria with small amount of sequence data

○Nobuyoshi Yagi¹, Nanase Miyagi², Itaru Hirai² (¹Lab. Clin. Physiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus, ²Lab. Microbiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus)

薬剤耐性菌の蔓延状況は深刻であり、医療関連機関だけでなく、市中や環境からも検出されるようになった。薬剤耐性菌の拡散防止には、薬剤耐性菌拡散の実態解明が必要不可欠であり、最近では、薬剤耐性菌拡散の実態解明には全ゲノム (WGS) 解析を利用した分子疫学的手法が研究レベルでは主流となっている。また、それに伴い遺伝子データベース (DB) 上に記載される大腸菌などの主要細菌の全ゲノム配列の件数は充実しており、今後も増加が見込まれる。しかしながら、薬剤耐性菌拡散の実態解明には、数百から数千以上の薬剤耐性菌の解析が必要であり、検出された全薬剤耐性菌を WGS 解析するのは現実的ではない。そこで、本研究では、遺伝子 DB を利用することで解析に必要なシーケンスデータ量を最小化し、臨床分離株の遺伝系統を推定可能な新たな手法を確立した。

沖縄県内の医療関連機関から検出された臨床分離大腸菌 29 株について Nanopore シーケンサーにより解析し、得たリードを遺伝子 DB に記載される 3,185 の大腸菌ゲノムにアライメントした。通常、大腸菌ゲノムを *de novo* assembly により解析する際には、少なくとも 1GB 程度のデータ量が必要であるが、上記の手法を用いることで、約 130MB 程度のデータ量で大腸菌の遺伝系統を推定可能であることが示唆された。また、少量のデータ量でも薬剤耐性遺伝子を検出可能であった。以上の結果から、少量のデータでも薬剤耐性菌の遺伝系統をスクリーニング可能であることが示唆され、本手法を「Shallow-Seq」と命名した。Shallow-Seq を応用することで、これまで現実的ではなかった市中・環境の薬剤耐性菌の菌株ベースのモニタリングが可能となることが期待される。

P1-004/DP1-01-04

Molecular epidemiological characterization of MRSA from bloodstream infections in Hokkaido

○Meiji Soe Aung¹, 漆原 範子¹, 川口谷 充代¹, 大橋 伸英¹, 荒木 露羽², 松原 加奈², 伊藤 政彦², 小林 宣道¹ (札幌医大・医・衛生, ²札幌臨床検査センター)

○Meiji Soe Aung¹, Noriko Urushibara¹, Mitsuyo Kawaguchiya¹, Nobuhide Ohashi¹, Rou Araki², Kana Matsubara², Masahiko Ito², Nobumichi Kobayashi¹ (¹Dept. Hygiene, Sch. Med., Sapporo Med. Univ., ²Sapporo Clin. Lab. Inc.)

Objective: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major causative agent of community-acquired and healthcare-associated infections. We investigated the molecular epidemiological characteristics of MRSA from bloodstream infections in Hokkaido.

Methods: For two year-period from August 2019, we collected 279 MRSA isolates from blood samples in medical institutions in Hokkaido, and analyzed for their antimicrobial susceptibility, genotypes, antimicrobial resistance genes and virulence factors.

Results: CC5 (ST5/ST764)-IIa (SCCmec IIa) and CC1 (ST1/ST2725/ST2764)-IVa were the major genotypes, accounting for 47% and 42%, respectively. The proportion of CC1 increased significantly compared to that in 2017-2019. CC8 was detected in 9% of the total (CC8-IVa, 5%), of which ST8-IVa (7 isolates, 2.5%) were positive for the PVL (Panton-Valentine leukocidin) gene with *spa* type t008, which was considered the USA300 clone, the predominant community-acquired MRSA in the United States. Six of these strains had the ACME (arginine metabolic mobile genetic element) that is characteristic to USA300, but only one strain lacked it. Nine PVL-negative ACME-positive strains were detected, which belonged to CC5 (ST5/ST764)-IIa.

Conclusions: An increasing trend of genotypes CC1-IV was suggested among MRSA derived from bloodstream infections in Hokkaido.

P1-005/DP1-01-05

在宅診療患者における口腔由来多剤耐性菌の検出ならびに口腔疾患及び全身基礎疾患との関連性の検証

○西濱 早紀¹, 松尾 美樹^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, 荒井 千夏^{3,4}, 梶原 俊毅^{3,4}, 菅原 庸⁴, 大毛 宏喜^{3,5}, 菅井 基行^{3,4}, 柴 秀樹¹, 小松澤 均^{2,3} (1)広島大・医系科学研究科・歯髄生物学, (2)広島大・医系科学研究科・細菌学, (3)広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, (4)国立感染症研究所薬剤耐性研究センター, (5)広島大・感染症科)

Isolation of Oral Drug-Resistant Bacteria from Home-care Patient and Relation to Medical Information

○Saki Nishihama¹, Miki Matsuo^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, Chika Arai^{3,4}, Toshiki Kajihara^{3,4}, Yo Sugawara⁴, Hiroki Ohge^{3,5}, Motoyuki Sugai^{3,4}, Hideki Shiba¹, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (1)Dept. Biol. Endod., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., (3)Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., (4)Res. Cent for AMR, NIID, (5)Dept. Infectious Diseases, Hiroshima Univ. Hosp.)

【目的】多剤耐性菌 (ARB) の出現は世界的な傾向である。高齢者の口腔 ARB 保有率は高いとされているが、調査対象の多くは介護施設入居者である。世界的に高齢化社会が問題視される中で、高齢者の口腔 ARB 保有の実態を把握するには、在宅医療サービス利用の高齢者を対象とする調査も必要である。本研究では、在宅医療を受ける高齢者 101 名から口腔 ARB を分離し、耐性遺伝子保有と薬剤耐性を調べた。また、耐性菌の保有と医療情報との関連性も検証した。【方法】ARB は *Staphylococcus aureus* (S.a) とグラム陰性薬剤耐性菌 (GNARB) を対象とした。スワブ法により口腔内から検体を採取し、No.110 培地とクロモアガーTMESBL 培地を用いて分離した。分離菌から DNA を抽出し、全ゲノム塩基配列を決定し、菌種の同定と耐性遺伝子の保有状況を解析した【結果】在宅医療サービス利用者 101 名から、S.a が 32 名、このうちメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が 8 名、GNARB が 18 名であった。統計解析から S.a と MRSA の保有は義歯破損と関連が見られ、GNARB の保有は経管栄養の有無と関連していた。GNARB の全ゲノム塩基配列から菌種を同定し、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL)、カルバペネマーゼ関連遺伝子の保有を解析した。また、微量液体希釈法により最小発育濃度を決定し、CLSI 基準に基づいて薬剤耐性を判定した。その結果、薬剤耐性と耐性遺伝子の保有の関連が見られた。【考察】在宅医療を受ける高齢者は口腔内に様々な ARB を保有し、歯科治療や食事形態との関連性も示唆された。

P1-006/DP1-01-06

熊本患者および保護ネコから分離された *Corynebacterium ulcerans* の分子系統解析

○志多田 千恵¹, 山本 隆樹¹, 森口 美琴², 林 秀幸³, 森 美聡⁴, 徳岡 亮亮⁴, 松本 一俊⁴, 堀場 千尋⁵, 黒田 誠⁵, 高橋 元秀¹ (1)熊本大・生物毒素抗毒素, (2)熊本労災病院・検査部, (3)熊本大病院・検査部, (4)熊本保環研, (5)感染研・ゲノム)

Phylogenetic analysis of *C. ulcerans* isolated from patients and protected cats in Kumamoto

○Chie Shitada¹, Takatoshi Yamamoto¹, Mikoto Moriguchi², Hideyuki Hayashi³, Misato Mori⁴, Hideaki Tokukuwa⁴, Kazutoshi Matsumoto⁴, Chihiro Horiba⁵, Makoto Kuroda⁵, Motohide Takahashi¹ (1)Dept. Toxin and Biologicals., Kumamoto Health Science Univ., (2)Kumamotorousai Hospital Clinical Laboratory Center, (3)Kumamoto Univ. Hospital Clinical Laboratory Center, (4)Kumamoto Prefectural Inst. Public Health and Environmental Science, (5)Pathogen Genomics Center Nat. Inst. Infect. Dis.)

【背景・目的】*Corynebacterium ulcerans* はグラム陽性短桿菌で、ジフテリア菌と似た毒素を産生する株が自然界に存在している。ジフテリアと同様、呼吸器に感染すると咽頭に偽膜を形成し喉炎など特徴的な症状がみられる。呼吸器以外にも皮膚の粘膜、潰瘍部などの感染例も報告されている。感染様式として、野良ネコ、狢犬等からヒトへの感染が強く疑われている動物由来感染症に分類され、国内では過去に 2 例の死亡報告もある。今回、熊本県内の入院患者の潰瘍部分の臨床分離株 (1 株) および保護ネコの分離株 (7 株) の関連性について分子系統解析をおこなった。【方法】患者潰瘍スワブを羊血液寒天培地で 35°C・12 時間・炭酸ガス培養し、継代単離コロニーから PCR にてジフテリア毒素陽性を確認した。臨床分離株と保護ネコ分離株を合わせた 8 株をゲノム解読した (QIAseq FX, iSeq 100)。抄録登録時点で臨床分離株の全ゲノム確定済み、保護ネコ分離株は解読・解析中であり、学会発表時に分子系統解析の結果を統合する。【結果・考察】患者と保護ネコからジフテリア毒素遺伝子を有する *C. ulcerans* を分離・同定した。ゲノム情報を用いた分子系統解析による菌株比較により、ジフテリア毒素を有する他の類縁菌である *C. pseudotuberculosis* との鑑別にも有効であった。患者が *C. ulcerans* に感染した背景を突き止めることはできなかったが、愛玩動物の健康管理、感染経路確認や環境調査など、*C. ulcerans* によるジフテリア様症状は引き続き注視すべき動物由来感染症と考える。

P1-007/DP1-01-07

インド・コルカタ市と富山県で分離された *C. jejuni* のゲノム比較解析

○森田 大地¹, 磯部 順子², 前西 絵美², 丸山 史人³, 山本 佑樹¹, 田原 崇俊¹, 大野 歩⁴, 北原 圭³, 三好 伸一^{4,5}, 黒田 照夫¹ (1)広島大・院・医系科学, (2)富山県衛生研究所, (3)広島大・IDEC, (4)岡山大・インド感染症共同研究センター, (5)岡山大・学術研究院・医歯薬学域)

Comparative genomic analysis of *C. jejuni* isolates from Kolkata, India and Toyama

○Daichi Morita¹, Junko Isebe², Emi Maenishi², Fumito Maruyama³, Yuki Yamamoto¹, Hidetoshi Tahara¹, Ayumi Ohno⁴, Kei Kitahara³, Shin-ichi Miyoshi^{4,5}, Teruo Kuroda¹ (1)Grad. Sch. Bio. Heal. Sci., Hiroshima Univ., (2)Toyama Inst. Heal., (3)The IDEC Inst., Hiroshima Univ., (4)Collab. Res. Cent. of Okayama Univ. for Inf. Diseases. India, (5)Grad. Sch. Med., Dent. & Pharm. Sci., Okayama Univ.)

インドは多様な下痢性感染症の流行地域であり、加熱処理が不十分な鶏肉や生水が原因となる *Campylobacter* 食中毒は多くみられるものの、その混入ルートや疫学調査のための遺伝情報が欠落している。本研究では、インド・コルカタ市で 2019 年に下痢症患者から分離された 90 株と 2016 年から 2020 年に富山衛生研究所において分離された 116 株の *C. jejuni* の全ゲノム解析を行い、遺伝的特徴を比較解析した。系統解析では日本株は世界的な流行型の Clonal Complex (CC) 型である CC21 に分類されるものが多かったが、インド株では CC21 は見られず、CC353 が多く見られた。検出された耐性遺伝子の種類は両国で大きな違いは見られなかったが、*tet(O)*, QRDR 変異, 23S rRNA 変異の保有率はインド株の方が高かった。また、*blaOXA* の保有率は日本株の方が高かったが、*blaOXA* の発現上昇に関与するプロモーター変異はインド株で多く見られた。病原性遺伝子では大きな違いは見られなかったが、日本株では稀な VI 型分泌装置をインド株では約半数が保有していた。コルカタ市における *C. jejuni* の遺伝的系統は世界的な流行傾向と異なった株が多くみられた。またインド株では日本株よりも薬剤耐性の保有率が高く、特にほぼ全ての株で QRDR 変異, 10% で 23S rRNA 変異が確認され、*Campylobacter* 症の治療薬に対する選択が狭まっていた。この結果は、インドにおける本細菌種での全ゲノム解析の有用性と全域でのサーベイランスによるインド特異グループの分布調査を行う重要性を示した。

P1-008/DP1-01-08

Whole-genome analysis of *Bordetella parapertussis* Isolated in Japan

○小出 健太郎¹, 小野 寺 梓², 小棚 雅寛², 市村 辰太郎², 大塚 奈緒¹, 後藤 雅貴¹, 蒲地 一成¹, 見理 剛¹ (1)感染研・細菌二, (2)埼玉医大病院・中央検査部)

○Kentaro Koide¹, Azusa Onodera², Masahiro Kodana², Shintarou Ichimura², Nao Otsuka¹, Masataka Goto¹, Kazunari Kamachi¹, Tsuyoshi Kenri¹ (1)Dept. Bact. II, Nat. Inst. Infectious Diseases, (2)Dept. Clin. Lab., Saitama Med. Univ. Hosp.)

Bordetella pertussis and *B. parapertussis* are the causative agents of pertussis. *B. parapertussis* is less often involved in the disease than *B. pertussis* and no isolate of *B. parapertussis* was identified in Japan between 2019 and 2022 in our study. However, three isolates of *B. parapertussis* (isolate IDs: BPP43, 44, 45) were collected in 2023. Multi-locus variable-number tandem-repeat analysis showed these isolates harbored the MT21 genotype, which was rare in Japanese isolates collected before 2018. In this study, we performed whole-genome analysis to gain further insight into the genetic relationship among the Japanese isolates. The three isolates and 14 Japanese isolates collected between 2005 and 2018 were sequenced. Single nucleotide variants (SNVs) were then identified by comparison to a Japanese isolate BPP01. Together with BPP01 and 102 global isolates whose sequence data were publicly available, a total of 120 isolates were included in the analysis, and SNV-based phylogenetic tree was constructed. BPP43, 44 and 45 clustered together on the phylogenetic tree. These isolates were genetically closer to the global isolates than to other Japanese isolates. This result suggests a potential spread of the distinct lineage, likely introduced from abroad. These findings underscore the importance of surveillance and investigation of *B. parapertussis*.

P1-009/DP1-01-17

Drug Resistance and Molecular Typing of *Campylobacter* Associated with Food Poisoning in Saitama

○古山 裕樹, 久保川 竣介, 八木 耕太郎, 荒島 麻美, 貫洞 里美, 土井 りえ, 成澤 かずみ (埼玉衛研・食品微生物)

○Yuki Koyama, Shunsuke Kubokawa, Kotaro Yagi, Asami Arashima, Satomi Kando, Rie Doi, Kazumi Narisawa (Dept. Food Microbiol., Saitama Inst. Pub. Health)

There is little information on drug resistance and molecular epidemiology of *Campylobacter* associated with food poisoning in Japan. In this study, we analyzed their characteristics of *Campylobacter* isolated in Saitama, Japan. A total of 150 *C. jejuni* and 20 *C. coli* strains isolated from stool specimens of food poisoning patients were tested for susceptibility to erythromycin (EM), tetracycline (TC), and quinolones (nalidixic acid (NA), ciprofloxacin (CPFX), norfloxacin (NFLX), and ofloxacin (OFLX)). Of the strains tested for drug susceptibility, 38 *C. jejuni* and 20 *C. coli* strains were typed by MLST. The results showed that 26% of *C. jejuni* strains were resistant to TC, 46% to quinolones, and none were resistant to EM, whereas 60% of *C. coli* were resistant to TC, 50% to quinolones, and 25% to EM. For MLST, *C. jejuni* were classified into 20 sequence types (STs) and nine clonal complexes (CCs). ST-4526 was the most common type, and all strains of this ST were resistant to quinolones. In *C. coli*, they were classified as one CC despite the identification of 14 STs. The drug resistance profiles of *C. jejuni* and *C. coli* were similar to those of previous studies. The distribution of ST in *C. jejuni* seems to be unique to Japan, as ST-4526 has been isolated only in Japan so far. In addition, it was suggested that quinolone resistance is highly conserved in ST-4526.

P1-010/DP1-01-18

Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. in bats in Japan

○及能 和輝¹, 西里 美優香¹, 胡 蔚殷¹, 光永 早紀¹, 村上 崇史², 小藪 大輔³, 高野 愛⁴, 小泉 信夫⁵, 下田 宙¹, 早坂 大輔¹ (1山口大・獣・獣医微生物, 2美祿市・文化財保護課, 3筑波大・プレジジョンメディスン開発研究センター, 4山口大・獣・獣医疫学, 5感染研・細菌第一)

○Kazuki Kiuno¹, Miyuka Nishizato¹, Weuyin Hu¹, Saki Mitsunaga¹, Takashi Murakami², Daisuke Koyabu³, Ai Takano⁴, Nobuo Koizumi⁵, Hiroshi Shimoda¹, Daisuke Hayasaka¹ (1Dept. Micro., Vet. Med., Yamaguchi Univ., 2Div. Cultural Properties Protection, Mine City, 3Dept. Precision Medicine, Res and Dev. Ctr., Tsukuba Univ., 4Dept. Epi., Vet. Med., Yamaguchi Univ., 5Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

Leptospirosis is a prevalent zoonosis having a broad host range. Although bats are known to be one of the reservoirs of pathogenic *Leptospira* spp., there are no report on the detection of *Leptospira* spp. from bats in Japan. In this study, the prevalence and genetic diversity of bat *Leptospira* spp. in bats were investigated. Kidney tissue samples were collected from five species of bats, 37 *Rhinolophus ferrumequinum* (Rf), 6 *R. cornutus* (Rc), 37 *Miniopterus schreibersii* (Ms), and 15 *Myotis macrodactylus* (Mm) in Yamaguchi and 19 *Vespertilio sinensis* (Vs) in Hokkaido, during 2021 to 2023. PCR were performed based on the lipL32 and 16s rRNA genes, followed by multi-locus sequence typing (MLST) on positive samples. Nucleotide sequences of the amplicons were determined by direct sequencing, and phylogenetic analysis were performed. As a result, the prevalence of *Leptospira* spp. was 2.7%, 33.3%, 16.2%, 73.3%, and 11.1% in Rf, Rc, Ms, Mm, and Vs, respectively. Most of the genes determined were novel alleles. Phylogenetic analysis demonstrated that the concatenated sequences from 2 Mm were clustered with *L. kirshneri* closely related to the one detected from *Myotis* spp. in China. This is the first report on pathogenic *Leptospira* spp. detected from bats in Japan. Further analysis is required to determine their pathogenicity and transmission cycle to assess the risk of human infection.

P1-011/DP1-01-19

分子疫学解析による富山県内のレジオネラ症患者の実態把握と感染源調査

○金谷 潤一, 磯部 順子, 木全 恵子, 池田 佳歩, 齋藤 和輝, 前西 絵美, 大石 和徳 (富山衛研・細菌)

Molecular epidemiological analysis of Legionnaires' disease in Toyama Prefecture, Japan

○Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Keiko Kimata, Kaho Ikeda, Kazuki Saito, Emi Maenishi, Kazunori Oishi (Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health)

【目的】レジオネラ症の原因菌であるレジオネラ属菌は、土壌、河川などの自然環境だけでなく、公衆浴場、冷却塔などの人工環境にも広く分布している。本研究では、積極的な喀痰培養検査によってレジオネラ症患者の実態を把握し、患者や環境中から分離したレジオネラ属菌の遺伝子解析を行って、患者の感染源について精査した。【方法】レジオネラ症患者（疑い症例を含む）の呼吸器検体から培養検査を実施し、レジオネラ属菌を分離した。レジオネラ・ニューモフィラ血清群1 (Lp1) については SBT 法による遺伝子型別、一部はドラフトゲノム配列による系統解析も実施した。【結果及び考察】レジオネラ症と診断された患者喀痰 65/177 検体 (36.8%) から Lp1 が分離された。また、尿中抗原陰性のレジオネラ症疑い患者の喀痰 2/24 検体 (8.3%) から Lp2 が分離され、尿中抗原検査では診断できない潜在的なレジオネラ症患者の存在が示唆された。SBT 法による Lp1 の遺伝子型別の結果、ST502、ST505 の Lp1 は、入浴施設から多く検出されており、これらが分離された患者は入浴施設で感染したことが示唆された。一方、ST23、ST120 は土壌や水たまりなどからも分離されたため、これらの自然環境も患者の感染源となりうる環境要因であることが明らかとなった。また、上記の4遺伝子型の菌についてドラフトゲノム配列による系統解析を実施した結果、同一事例で分離された患者および患者が利用した入浴施設等環境由来の株は、それぞれ互いに近縁な系統であり、疫学調査の結果を反映していた。本研究で検討した全ゲノム配列による系統解析は、今後、より高精度な型別法として感染源調査に活用できると考えられた。

P1-012/DP1-07-01

2023年に小児から分離された肺炎球菌の血清型分布の動向

○川口谷 充代¹, 漆原 範子¹, Meiji Soe Aung¹, 大橋 伸英¹, 木村 優希², 堀野 裕香², 伊藤 政彦², 小林 宣道¹ (1札幌医科大・医・衛生学, 2札幌臨床検査センター株式会社)

Current trends in serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in 2023

○Mitsuyo Kawaguchiya¹, Noriko Urushibara¹, Meiji Soe Aung¹, Nobuhide Ohashi¹, Yuuki Kimura², Yuuka Horino², Masahiko Ito², Nobumichi Kobayashi¹ (1Dept. Hygiene, Sapporo Medical Univ. Sch. Med., 2Sapporo Clinical Laboratory Inc.)

【背景】本邦では13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) が小児への定期接種として使用されている。PCVの世界的普及により、本ワクチンに含まれない血清型による肺炎球菌感染症の増加およびその薬剤耐性が臨床上的問題となっている。米国では2023年6月からPCV13に7つの血清型を加えたPCV20に切り替えられており、一方、本邦におけるPCV20の小児への適用は現在承認申請中である。本研究では2023年に分離された小児由来肺炎球菌の血清型分布を調査したので報告する。【対象・方法】2023年3月~7月に北海道内の医療機関から集められた小児由来肺炎球菌353株を対象とした。血清型の判別はCenters for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html>) に記載されている多重PCR法を用い、血清型群6、15、24亜型の判別には我々が考案した鑑別法 (Kawaguchiya et al., J Med Microbiol.2018 他) を用いた。【結果・考察】対象株は鼻汁 (53.6%)、鼻腔 (42.2%)、咽頭、耳漏から分離され、全菌株中、PCVワクチンに含有される血清型の割合はPCV13において3.1%、PCV20においては22.1%であった。血清型の分布では23A (16.1%) が最も多く、次いで35B (15.3%)、15A (10.5%)、15C (9.3%)、34 (9.1%) で、これら5つのPCV非含有血清型で全体の60.3%を占めていた。加えて英膜を持たない無莢膜型 (2.0%) も確認された。本研究から本邦への導入前のPCV20に含まれない血清型の分布率が77.9%と高いことが明らかとなったことから、継続的なサーベイランスの実施が重要であると考えられた。これら菌株における薬剤感受性の結果および考察は、本総会で合わせて報告する。

P1-013/W2-7

無症候性保菌者由来 *stx2f* 保有大腸菌, *E. albertii* の分子疫学○菊池 賢¹, 荒井 裕子¹, 阿部 蘭¹, 野口 秋雄², 宇野 浩一², 金子 寛², 佐藤 寿夫² (東女医・感染, ²日本微生物研究所)Molecular epidemiology of *stx2f*EHEC strains isolated from asymptomatic carriers○Ken Kikuchi¹, Yuko Arai¹, Ran Abe¹, Akio Noguchi², Ko-ichi Uno², Hiroshi Kaneko², Toshio Sato² (¹Dept. Infect. Dis., Tokyo Women's Med Univ, ²Japan Microbiological Institute)

2021 年度に無症候性保菌者から分離された *stx2f* 保有 EHEC 41 株について, その病原性, 遺伝子背景, 薬剤感受性, 耐性遺伝子について検討を行った。 *stx2f* 保有 41 株のうち, 大腸菌は 37 株で 4 株は, 類縁の *Escherichia albertii* であった。 *stx2f* 以外では大腸菌 1 株が *stx1c*, *stx2b* を保有していた。大腸菌 37 株の内訳では, 血清型 O-105, MLST 13581 が 15 株, O-63, MLST 583 4 株, O-148 MLST 11102 3 株, 同, MLST 3558 2 株, O-109, MLST 40 3 株などとなっており, *eae+* (subtype $\alpha 2$, $\beta 1$, θ) が 72% と大半を占めていた。また, 他の病原因子では *astA+* が 49% に見られ, 病原性は高いことが示唆された。 *E. albertii* は MLST 2683, 383-like, 5991-like で, いずれも *eae* (subtype y5, $\epsilon 3$, N1.1), *cdt-II* を保有していた。大腸菌 13 株は *cdt-I*, 1 株は *cdt-II* を持っていた。薬剤感受性では *E. albertii* 2 株, 大腸菌 1 株が ESBL 産生菌であり, いずれも *bla_{TEM-1}* 保有株であった。 *stx2f* は臨床検査で行われる *stx* 検査では検出できず, その状態はほとんど明らかになっていない。今回の結果から, *stx2f* 保有株の高い病原性と, 一部にみられた薬剤耐性から, *stx2f* 保有株の臨床現場での感染実態などを早急に調査する必要があると考えられ, これを検出できるシステム構築が喫緊の課題である事が明らかとなった。

P1-014/DP1-07-03

日本の犬膿皮症由来メチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* の分子疫学○佐々木 崇¹, 山崎 真大², 原田 和記³, 西藤 公⁴ (札幌大・医・動物実験, ²岩手大・農・小動物病態診断学, ³鳥取大・農・獣医内科学, ⁴東京農工大・農・動物生命科学部門)Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in canine pyoderma○Takashi Sasaki¹, Masahiro Yamasaki², Kazuki Harada³, Koji Nishifuji⁴ (¹Animal Research Center, Sch. Med., Sapporo Med. Univ., ²Lab. Vet. Small Animal Int. Med., Facult. Agr., Iwate Univ., ³Dept. Vet. Int. Med., Facult. Agr., Tottori Univ., ⁴Div. Animal Life Sci., Fac. Agr., Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

犬表在性膿皮症は, *Staphylococcus* 属を主な起因菌とする細菌性皮膚疾患であり, セファレキシム (CEX) が第一選択薬とされている。2000 年代以降, 院内感染型メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) クローンが世界的に蔓延しているが, 本疾患における MRSP クローンの国内動向や海外流行クローンとの関連は不明であった。本研究では, 本疾患一次診療症例分離株の薬剤耐性と MRSP クローン動向の把握を目的とした。2018-2023 年の分離株に対し, 薬剤感受性試験, 全ゲノム解析による遺伝子型解析と分子系統解析を行った。全 82 株中, *S. pseudintermedius* が 76.8%, *S. schleiferi* が 23.2% を占め, *S. aureus* は 0% であった。メチシリン耐性率は 26.8% であった。メチシリン感受性株では, CEX 感受性率 100% に対し, フルオロキノロン系感受性率が 50.8% と顕著に低く, 過去の国内高次診療症例報告の同値 [Kawakami ら (2007-2009 年): 66.2%, Kasai ら (2009-20014 年): 63.2%] をも下回ったことから, 市中動物病院における CEX 回避傾向とフルオロキノロン使用増が示唆された。MRSP 株に対する遺伝子型解析から, 院内感染型 MRSP クローン (ST71-SCCmec III 型) はわずか 1 株と稀であった。一方, ST121-SCCmec V 型の互いに近縁な市中感染型 MRSP クローンの国内流行が確認され, 海外の流行報告がないことから日本固有の現象と考えられた。当クローンについて, リスク要因解析と継続監視が求められる。

P1-015/DP1-07-04

広範囲薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii* ST1050 の全ゲノム解析○西田 智¹, 斧 康雄^{1,2}, 吉野 友祐¹ (帝京大・医・微生物, ²帝京平成大・健康メディカル)Whole genome sequence analysis of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST1050○Satoshi Nishida¹, Yasuo Ono^{1,2}, Yusuke Yoshino¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., ²Fac. Health Med. Sci., Teikyo Heisei Univ.)

【目的】 *Acinetobacter baumannii* は日和見感染症の病原体であり, 多剤耐性 *A. baumannii* (MDRA) による感染症は有効な治療薬の少ないことから临床上重要な問題となっている。近年, MDRA よりも広範囲に薬剤耐性の *A. baumannii* (XDRA) が分離されている。海外治療歴のある患者から分離された XDRA の薬剤耐性機構と分子疫学解析を目的として全ゲノム配列 (WGS) を解析した。

【方法】帝京大学医学部附属病院においてインドネシアで治療歴のある日本人患者から分離された XDRA からゲノム DNA を抽出した。WGS は Illumina MiSeq および Oxford Nanopore Technologies GridION を用いたハイブリッドゲノムシーケンシングにより決定した。

【結果】 *de novo* アセンブリーの結果, 3.9 Mb の染色体と 70 kb および 8.7 kb のプラスミドの塩基配列を決定できた。MLST は Oxford ST1050 及び Pasteur ST2 であり, グローバルクローン 2 (GC2) に属していた。カルバペネマーゼ遺伝子として *bla_{OXA-23}* と *bla_{OXA-66}* を有していた。キノロン耐性遺伝子として *gyrA* S81L と *parC* S84L の変異を有していた。また, 高度アミノグリコシド耐性遺伝子 *armA* を保有していた。更に, アミノグリコシド耐性トランスポゾン *TnaphA6* を接合伝達プラスミドに保有していた。

【考察】本分離株は全ゲノム解析からオーストラリアと北米で近年確認された MDRA と類似していた。ST1050 株は 2010 年に北米で分離された後, オーストラリアの集中治療室でアウトブレイクを起こしている。最近では, 南アジア, 中東での分離が確認され, アフリカの病院でアウトブレイクが起きている。今後, 本研究の分離株や類縁の ST1050 株については引き続き病院や地域での広がりを注視していく必要がある。

P1-016/DP1-07-05

Specific clonal types of MRSA associated with skin and soft tissue infections

金子 寛, 小林 華, 大竹 省吾, 柳 侑花, 齊藤 拓光, 金井 美樹, ○中南 秀将 (東京薬大・薬・臨床微生物)

Hiroshi Kaneko, Hana Kobayashi, Shogo Otake, Yuka Yanagi, Takumi Saito, Miki Kanai, ○Hidemasa Nakaminami (Dept. Clin. Microbiol., Sch. Pharm., Tokyo Univ. Pharm. and Life Sci.)

Staphylococcus aureus cause skin and soft tissue infections (SSTIs). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) accounts for approximately 25% of the strains isolated from outpatients with SSTIs in Japan. Exfoliative toxin and Panton-Valentine leukocidin (PVL) have been reported to be associated with impetigo and deep-seated SSTIs, respectively. We analysed molecular epidemiological characteristics of MRSA isolated from patients with SSTIs in Japan to clarify these associations.

A total of 979 *S. aureus* strains isolated from SSTI patients in Japan between 2018 and 2021 were assessed. Molecular epidemiological characteristics were analysed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis.

The mean prevalence of MRSA among *S. aureus* was 29.8%. MRSA strains were most frequently isolated from patients with impetigo, followed by furuncles/carbuncles. Clonal complex (CC)121 and CC89 strains accounted for 56.9% and 13.7%, respectively, of the MRSA isolated from patients with impetigo. PVL-positive CC8 strains were the major strains of MRSA in furuncles/carbuncles, abscesses and cellulitis, which are classified as deep-seated SSTIs. Most PVL-positive CC8 strains were classified as the globally disseminated PVL-positive clone USA300 and its variants.

This study revealed that certain MRSA genotypes are associated with specific SSTI types.

P1-017/W2-3

Novel *Streptococcus* species forming extremely long chains isolated from the human oral cavity

○藤藤 真規, 桑原 紀子, 瀧澤 智美, 泉福 英信 (日大・松戸歯・感染免疫)

○Masanori Saito, Noriko Shinozaki-Kuwahara, Tomomi Hashizume-Takizawa, Hidenobu Senpuku (Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Matsudo, Nihon Univ.)

A novel species of facultative anaerobic, gram-stain-positive coccus, designated strain SN-1^T, was isolated from the oral cavity of a healthy human. The strain SN-1^T forms extremely long chains when cultured in liquid culture. Based on the 16S rRNA gene sequence analysis, strain SN-1^T belonged to the genus *Streptococcus* and was most closely related to *Streptococcus gwangjuense*, with 99.81% similarities. The genome sequence of strain SN-1^T was 2,111,706 bp and deposited in DDBJ under the accession number AP028929 (not published). The genomic DNA GC content of strain SN-1^T was 39.9 mol%. Genome-to-genome distance values and average nucleotide identity values between strain SN-1^T and its highly related taxa were below the threshold values (70% and 95%, respectively) for species delineation. Based on these results, strain SN-1^T (=JCM 36619^T, DSM 117271^T) should be classified as a novel species of *Streptococcus*, and we propose the name *Streptococcus catena* sp. nov.

Description of *Streptococcus catena* sp. nov.

Streptococcus catena (ca.te'na. L. fem. n. catena, a chain, in view of the extremely long chains formed in liquid culture).

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP20K10299.

P1-018

不織布マスク用スプレーの噴霧効果の細菌学的再検証

○阿部 峰士, 涌井 杏奈, 宮沢 美里, 佐藤 彩, 河内 美帆, 関口 未来, 今井 真奈美, 丸山 伸吾, 佐野 拓人, 佐藤 拓一 (新潟大・院保・臨床化学)

Microbiological profiling of the surfaces of used-masks: Effects of non-woven fabric mask sprays

○Takashi Abe, Anna Wakui, Misato Miyazawa, Aya Sato, Miho Kawachi, Mirai Sekiguchi, Manami Imai, Shingo Maruyama, Hiroto Sano, Takuichi Sato (Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci.)

【目的】使用済み不織布マスクから検出される細菌叢を量的・質的に分子生物学的に解析した。併せて、市販されている各種マスク用スプレーの効果について細菌学的に再検証した。

【方法】インフォームドコンセントを得た、健康な20歳台の成人6名を被験者とした。通常通り(半日)マスク着用後、口唇部分に触れていたマスクの内側部分を滅菌綿棒で擦過し、緩衝液に懸濁し試料とした。別日に、同様に着用した不織布マスクに各社製品のマスク用スプレーを噴霧し、1晩陰干しし、試料採取した。分散均一化後、CDC血液寒天平板に接種し、37°Cで嫌気培養し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種の同定を行った。

【結果】使用済みマスクの内側からは、 $(1.5 \pm 0.9) \times 10^3$ CFU/mLの細菌が検出された。細菌構成(334菌株の内訳)は *Cutibacterium* (79.3%), *Staphylococcus* (16.5%), *Streptococcus* (2.4%) が優勢であった。これに対して、各社製品のマスク用スプレー(B, E, M製品)を(用法通りに)噴霧・陰干した試料では各々 $(1.2 \pm 1.3) \times 10^3$, $(2.1 \pm 2.6) \times 10^2$, $(7.5 \pm 9.3) \times 10^1$ にまで減少し、残存した細菌は *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Actinomyces* であった。一方、F, G製品からは細菌が殆ど検出されず、またE, M製品において噴霧を10回に増やすと細菌が殆ど検出されなくなった。

【考察】半日程度、普段通りに不織布マスクを着用すると、30%程度の細菌が残留すること、マスク用スプレーを噴霧すると、ある程度細菌が残留すること、また噴霧回数を増やすと細菌が殆ど検出されなくなることが判明した。今後、マスク用スプレーの効果の再検証を進め、効果的な適用・使用法を提案することを目指している。

P1-019/DP1-07-14

口腔・鼻腔から分離したグラム陰性薬剤耐性菌の性状解析および細菌叢との関連性

○川柳 智暉^{1,2}, 松尾 美樹^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, 朝川 美加李⁴, 菅原 庸⁵, 荒井 千夏⁵, 竹下 徹⁴, 柴 秀樹¹, 菅井 基行⁵, 小松澤 均^{2,3} (1)広島大・医系科学研究科・歯髄生物学, (2)広島大・医系科学研究科・細菌学, (3)広島大・口腔感染症プロジェクト研究センター, (4)九州大・歯学研究院・口腔予防医学, (5)国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Characterization of GN-ARB from nasal and oral cavities and their relationship to bacterial flora

○Tomoki Kawayanagi^{1,2}, Miki Matsuo^{2,3}, Nguyen Tra Mi Le^{2,3}, Mikari Asakawa⁴, Yo Sugawara⁵, Chika Arai⁵, Toru Takeshita⁴, Hideki Shiba¹, Motoyuki Suga⁵, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (1)Dept. Biological Endodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed., Hiroshima Univ., (3)Project. Research Center for Oral Infectious Diseases., Hiroshima Univ., (4)Sec. Preventive & Public Health Dentist., Div. Oral Health., Growth and Deve., Kyushu Univ., (5)Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Inst. Infectious Dis.)

【目的】薬剤耐性菌(ARB)の問題は世界的な公衆衛生上の脅威である。最近、口腔内にも医科領域で問題となるようなグラム陰性薬剤耐性菌(GN-ARB)である腸内細菌目細菌、アシネトバクター、緑膿菌などの分離が報告されている。その詳細な実態を明らかにするため、鼻腔・口腔からGN-ARBを分離した(昨年度の本総会で報告)。今回、分離したGN-ARBのゲノム解析、およびGN-ARBの有無と細菌叢との関連性を検討した。【方法】広島大学病院歯科外来を受診した患者514名の口腔・鼻腔から分離した第三世代セファロsporin/カルバペネム耐性グラム陰性菌144株(口腔:131株、鼻腔:13株)を用いた。ゲノム解析によって分離株の菌種と薬剤耐性遺伝子(ESBL・カルバペネマーゼ等)を同定し、細菌叢解析によりGN-ARB保有(定着)に関与する要因を検討した。【結果と考察】ESBL遺伝子(blaCTX-M-15, blaCTX-M-27とblaTEM-1BおよびblaCME-1)はそれぞれE.coli 1株、E.coli 3株およびElizabethkingia sp. 1株(合計5株)から検出され、カルバペネマーゼ遺伝子(blaOXA型, blaIND型, blaGOB型とblaB型およびblaL1型)はそれぞれAcinetobacter属15株、Chryseobacterium属6株とPseudomonas属1株、Elizabethkingia属1株およびStenotrophomonas属34株(合計57株)から検出された。特にこれらの遺伝子保有株は1株(Chryseobacterium sp.)を除いて全て口腔からの分離株であった。ARB保有の有無で、口腔細菌叢の全体的な細菌組成や優勢に存在する常在細菌の存在量に有意差は認められなかったが、通常口腔では構成比率の低い特定の菌種(S.aureus, C.simulans, Klebsiella aerogenes)がARB保有群で有意に検出された。

P1-020

緑茶ペットボトル飲料内の細菌プロファイリング:スクリーニング実験

○加藤 優希¹, 涌井 杏奈^{1,2}, 宮沢 美里¹, 河内 美帆¹, 阿部 峰士¹, 佐藤 彩¹, 今井 真奈美¹, 佐藤 遥菜¹, 岡部 瑠佳¹, 佐藤 拓一¹ (1)新潟大・院保・臨床化学, (2)新潟医福大・医療技術)

Molecular microbiological profiling of green tea bottled beverages: A screening experiment

○Yuki Kato¹, Anna Wakui^{1,2}, Misato Miyazawa¹, Miho Kawachi¹, Takashi Abe¹, Aya Sato¹, Manami Imai¹, Haruna Sato¹, Rika Okabe¹, Takuichi Sato¹ (1)Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., (2)Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare)

【目的】ペットボトル飲料を飲んだ際、唾液の流入・汚染が懸念される。そこで各種緑茶ペットボトル飲料を対象に、唾液細菌の生育のスクリーニング実験を実施し、飲料物の保存・再飲用の可能性を探索した。

【方法】20歳台の健康な10名から唾液を採取し細菌カウンタ(Panasonic社)で細菌量を求め、市販の緑茶(6種)および烏龍茶ペットボトル飲料に唾液(10³台の細菌)を混入させた。37°Cで1日置いた後、試料を採取し、CDC血液寒天平板に接種し、37°Cで1週間、嫌気培養し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種の同定を行った。

【結果】N茶、I茶、A茶、F茶の4種類では、1日後、増加する割合が6割以上と優勢で、特にN茶では全例で増加した。一方、S茶、K茶、烏龍茶の3種類では逆に減少する割合が6割以上と優勢で、特に烏龍茶では全例で減少した。また、増加した群の細菌構成は、N茶(*Streptococcus*, *Limosilactobacillus*), I茶(*Streptococcus*, *Limosilactobacillus*), A茶(*Limosilactobacillus*, *Streptococcus*, *Ligilactobacillus*), F茶(*Limosilactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Streptococcus*)が各々優勢という特徴が見られた。

【考察】今回、中性pHを示すお茶でも、細菌が増えやすいお茶と増えにくいお茶がある可能性が示された。また緑茶で増える細菌が*Streptococcus*に加えて、*Limosilactobacillus*などの旧*Lactobacillus*であることも判明した。ペットボトル飲料の保存の可能性としては、S茶、K茶、烏龍茶の3種類が保存および再飲用に適していると思われる。また、唾液中に旧*Lactobacillus*を多く含む人では、緑茶中で細菌が増殖する可能性があり、再飲用に注意を払う必要があるのかもしれない。

P1-021/DP2-13-01

大腸菌が保有する *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

○新井 沙倉¹, 大岡 唯祐², 池田 伸代³, 新免 香織⁴, 横山 孝治⁵, 有川 衣美⁶, 門口 真由美⁷, 溝腰 朗人⁸, 今野 貴之⁹, 小嶋 由香¹⁰, 貫洞 里美¹¹, 小西 典子¹², 廣瀬 昌平¹, 工藤 由起子¹ (国立衛研・衛微, ²鹿児島大・医歯学・微生物, ³広島市衛研, ⁴姫路市衛研, ⁵福井衛環研, ⁶北九州市保環研, ⁷熊本市環総セ, ⁸大分衛環研, ⁹秋田健環セ, ¹⁰川崎健安, ¹¹埼玉衛研, ¹²東京都健安研)

Development of real-time PCR assay specific for *astA* of *Escherichia coli*

○Sakura Arai¹, Tadasuke Ooka², Nobuyo Ikeda³, Kaori Shimmen⁴, Koji Yokoyama⁵, Emi Arikawa⁶, Mayumi Kadoguchi⁷, Akito Mizokoshi⁸, Takayuki Konno⁹, Yuka Kojima¹⁰, Satomi Kando¹¹, Noriko Konishi¹², Shouhei Hirose¹, Yukiko Kudo¹ (Div. Microbiol., Natl. Inst. Health Sci., ²Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., ³Hiroshima City Inst. Public Health, ⁴Himeji Inst. Env. Health, ⁵Fukui Inst. Health and Env. Sci., ⁶Kitakyushu Inst. Health and Environ. Sci., ⁷Kumamoto City Env. Res. Ctr., ⁸Oita Pref. Inst. Health. Environ., ⁹Akita Pref. Res. Ctr. Public Health and Env., ¹⁰Kawasaki City Inst. for Public Health, ¹¹Saitama Inst. Public Health, ¹²Tokyo Metropol. Inst. Public Health)

【背景】腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による集団食中毒事例が国内で発生している。しかし、原因食品不明の事例が多いため、食品における本菌の検査法が求められている。また、*astA* は多数の遺伝子多型 (バリエーション) が報告されているが、どのバリエーションが食中毒の発生に関与しているかは不明である。そこで、本菌を食品から特異的および高感度に検出することを目的に、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発を検討した。【方法】集団食中毒事例由来株 14 株について、保有する *astA* のバリエーションの種類、局およびコピー数を特定するため、Illumina Miniseq および Nanopore PrometION による全ゲノム解析を実施した。登録のある *astA* 配列を精査し、特異的配列部分にリアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブを設計した。特異性試験では、集団食中毒事例由来株を含めた *astA* 保有細菌 219 株を含む多数の株をリアルタイム PCR 法に供試し、Ct 値が得られた場合を陽性と判定した。感度試験では、野菜、魚介類および肉類の代表食品の培養液に *astA* 保有大腸菌を接種し抽出した DNA を用いて検出限界を求めた。【結果と考察】全ゲノム解析の結果、集団食中毒事例由来株は多様なバリエーションを保有することが示された。また、特異性試験の結果、リアルタイム PCR 法は *astA* 保有大腸菌特異的に検出することが示された。感度試験では、いずれの食品でも検出限界は 3 log CFU/mL 未満であり、少ない菌数でも検出可能であった。以上から、開発したリアルタイム PCR 法は、*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出するため、食中毒事例発生時の汚染食品調査や分離株の特定等に有用であると考えられた。

P1-022/DP2-13-02

Diagnosis of *Helicobacter suis* infection as a potential contributor to gastric malignancies

○松井 英則^{1,2}, 林原 絵美子¹, 青木 沙恵¹, 柴山 恵吾², 鈴木 仁人³ (1)感染研・細菌二, 2)名古屋大・医・細菌, 3)感染研・薬剤耐性)

○Hidenori Matsui^{1,2}, Emiko Rimbara¹, Sae Aoki¹, Keigo Shibayama², Masato Suzuki³ (1)Dept. Bacteriol. II, NIID, 2)Dept. Bacteriol., Sch. Med., Nagoya Univ., 3)AMR Res. Cent., NIID)

Background: *Helicobacter suis*, hosted by hogs, wild boars, and macaques, is the most prevalent non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species (NHPH) in the human stomach. Infection with *H. suis*, which causes many cases of gastric disease such as mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, is not reliably diagnosed in clinical practice.

Objective: In this study, we develop a protocol for detecting *H. suis* infection.

Protocol: Step 1: Collect gastric biopsies and sera from patients. Step 2: Prepare DNA and perform PCR, targeting the *H. suis*-specific gene. Step 3: Conduct culture to detect NHPH and perform whole-genome sequencing of cultured bacteria. Step 4: Utilize ELISA to detect *H. suis* or *H. pylori* infection.

Results: Using PCR and ELISA alone, *H. suis* infection was detected with 100% sensitivity within a week after specimen collection. However, for NHPH infections other than *H. suis*, whole-genome sequencing (WGS) of cultured bacteria was required, which took a month after specimen collection.

Conclusion: This protocol enables accurate diagnosis of *H. suis* infection, marking a significant advancement in the field.

Non-member co-investigators: Kengo Tokunaga, Hidekazu Suzuki, Katsuhiko Mabe, and Tsuyoshi Kenri

P1-023/DP2-13-03

炭疽菌芽胞の迅速識別における MALDI Biotyper システムの評価

○藤浪 良仁, 中原 弘明, 武藤 淳二, 今村 章 (科警研・法一部・生五)

Evaluation of MALDI Biotyper system in rapid identification of *Bacillus anthracis* spores

○Yoshihito Fujinami, Hiroaki Nakahara, Junji Hosokawa-Muto, Akira Imamura (National Research Inst. Police Science)

【目的】米国炭疽菌郵送事件のような炭疽菌芽胞散布事件に迅速対応するため、分離培養なしで炭疽菌芽胞を迅速識別する時の MALDI Biotyper システムを評価した。【実験方法】*Bacillus* 属の芽胞および桿菌は、炭疽菌 PasteurII, セレウス菌 ATCC4342, チューリンゲンシス菌 NBRC13866 および枯草菌 IAM12118T の菌株を使用した。MALDI Biotyper に供する Small acid-soluble proteins の抽出法は、各精製芽胞の約 5x10⁷ CFU に対して Biotyper User Manual に従い実施し、抽出液を MALDI Biotyper システムで解析した。解析結果の類似度は Score 0.0-3.0 のうち 2.0 以上を高い確率で同種として、1.7 以上を高い確率で同属近縁種と同定するとして評価した。【結果と考察】作製した炭疽菌芽胞および桿菌の形態間の類似度は、その形態が異なるように Score 0.81-0.00 と類似度が低かった。得られた炭疽菌芽胞および桿菌のマスマスペクトルを MALDI Biotyper システムの既存ライブラリを用いて解析すると、炭疽菌芽胞のマスマスペクトルが Score 2.41-2.24, 桿菌型が Score 2.46-2.35 と全て Score ランキングで炭疽菌がトップ Score を示し、炭疽菌が芽胞型でも桿菌型でも高い確率で同種として検出できることが確認された。しかし、*Bacillus* 属の芽胞および桿菌のデータをライブラリにユーザーで追加登録し再解析すると、炭疽菌芽胞型は炭疽菌芽胞として Score 2.76-2.63 とより高い同定精度を示した。また炭疽菌芽胞と同属近縁種の芽胞との類似度 Score は、セレウス菌芽胞が 2.30-2.07, チューリンゲンシス芽胞が 1.63-0.90, 枯草菌芽胞が 0.82-0.00 であり、これら同属近縁種の芽胞間の類似度も炭疽菌芽胞の同定の確度を高めるものとなった。

P1-024/DP2-13-04

血清中 Ag85B 抗体価検出による結核診断法の有用性評価と最適化

○山崎 智也¹, Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi², 石川 智史^{1,3}, 吉田 豊¹, 尾関 百合子¹, 西山 晃史¹, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (1)新潟大院・医歯学総合・細菌学, 2)Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., 3)福山市立動物園)

Optimization of tuberculosis diagnostics by detection of Ag85B antibody titer

○Tomoya Yamazaki¹, Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi², Satoshi Ishikawa^{1,3}, Yutaka Yoshida¹, Yuriko Ozeki¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (1)Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., 2)Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., 3)Fukuyama Zoo)

膨大な数の結核菌の無症候感染者は結核の発生母体となっている。しかし、現行の結核菌感染診断法は感染の有無を判別できるが、無症候感染者の発症を検知できない。これに対し、結核菌に感染したヒトおよびゾウの一部抗原に対する抗体価は結核発症前より上昇することが報告された。よって、Ag85B 抗体価検出が、活動性結核の検出に加え、無症候感染者の結核発症予知に有用であると仮定し、その有用性の検証および最適化を行った。先行研究において、結核菌 Native 抗原を使った抗体価検出が、C 末端に His タグを付加した大腸菌組換え抗原よりも高い反応性を呈し、健常者と結核患者を区別できることが示された。したがって、余剰配列が、抗体反応を阻害していると考え、His タグをエンテロキナーゼによって除去し、Native 抗原と同一の配列をもつ組換え抗原を得る構築を設計した。この組換え抗原と Native 抗原に対する抗体の反応性を比較した。また、両抗原に対する抗体の構造認識の差異を探るため、各抗原を用いた競合 ELISA と、変性剤処理抗原を用いた ELISA を行った。結果として、タグなしの組換え抗原は患者血清に対して Native 抗原と同等の反応性を示したが、健常者血清に対する非特異反応が見られた。また、各抗原に対する抗体反応は競合することが示された。一方で、変性剤処理後の抗体反応性は異なる。したがって、タグなしの組換え抗原は Native 抗原と同様にして、結核患者の検出に利用できると考えられる。ただし、Native 抗原における特有の翻訳後修飾や、大腸菌組換え抗原における大腸菌成分の混入の可能性があり、これらが組換え抗原の非特異反応や、変性剤に対する影響の差異を生じる可能性がある。

P1-025/DP2-13-05

Improved Accurate Quantitative Analysis of Microbiome Using DNA Standard for 16S rRNA NGS analysis

○宮倉 穂奈美, 木村 剛隆 (タカラバイオ株式会社)

○Honami Miyakura, Yoshitaka Kimura (TAKARA BIO INC.)

Microbiome analysis commonly employs next-generation sequencing (NGS) targeting 16S rRNA to identify bacterial taxonomy and compare relative abundance. However, previous studies have primarily focused on relative comparisons of bacterial abundance, lacking information on absolute bacterial abundance. Quantifying bacterial abundance in NGS-based bacterial community analysis presents a challenge. This study addresses this issue by incorporating a nucleic acid standard for the 16S rRNA gene, which contains an artificial nucleotide sequence not found naturally. This reference material serves as a community standard, consisting of a mixture of multiple 16S sequences at varying abundance. Incorporating this standard into the sample prior to NGS analysis enables absolute quantitative 16S rRNA NGS analysis. This approach facilitates the comparison of bacterial abundance between samples and also allows for confirming the detection limit. We demonstrate practical examples showcasing the use of the DNA standards for 16S rRNA genes and their utility in quantitative 16S rRNA sequencing.

P1-026/DP2-13-06

白癬菌 *Trichophyton benhamiae* ケラチナーゼ変異株のMVOCsの検出

○水谷 透葉¹, 山田 剛^{2,3}, 榎村 浩一², 岩口 伸一¹ (1奈良女子大・理・生物科学, 2帝京大・真菌センター, 3帝京大・アジア国際感染症制御研)

Detection of MVOCs from Keratinase Mutant Strain of *Trichophyton benhamiae*

○Toha Mizutani¹, Tsuyoshi Yamada^{2,3}, Koichi Makimura², Shinichi Iwaguchi¹ (1Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ., 2Inst. Med Mycol., Teikyo Univ., 3Asia Intl. Inst. Infect. Dis. Ctrl., Teikyo Univ.)

微生物からは増殖・代謝の過程で多様な二次代謝産物が放出され、分子量が200程度までのものは微生物由来揮発性有機化合物 (MVOCs) と呼ばれる。特定の病気には特定のニオイがあることが知られており、真菌感染症に特異的なMVOCsを同定することで、非侵襲性の新たな診断法の開発へと繋げられる可能性がある。白癬菌 *Trichophyton benhamiae* のモルモット感染時に発現する遺伝子を検出した研究では、感染時にSUB6を含む25個の分泌型タンパク質をコードする遺伝子が高発現することが明らかになっている (Van et al., 2016)。本研究では感染に関与すると予想される5つの高発現プロテアーゼの有無に関連したMVOCsがあるのかについて調べた。*T. benhamiae* の野生株とモルモット感染時に高発現する遺伝子に関する五重欠損株を作製し、培養時に放出されるMVOCsをGC/MSで検出した。その結果、野生株と五重欠損株で検出される化合物種に違いはなく、ケトン類や高級アルコール類などの化合物種が検出された。また、培養日数条件を変えても検出される化合物種に変わりはない。検出された化合物種の中には菌特異的なMVOCsの可能性のある化合物種があり、これらの化合物種は白癬菌の存在をモニタリングする際の指標として利用できる可能性がある。(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)

P1-027/DP2-13-13

屋久島のヤクシカから検出されるアナプラズマ科細菌

○安藤 匡子^{1,2}, 後藤 真優¹, 中村 昂紀¹ (1鹿児島大・獣医・病態予防, 2鹿児島大・島嶼研)

Anaplasma spp. in Yaku-deer of Yaku-shima Island, Kagoshima prefecture

○Masako Andoh^{1,2}, Mayu Goto¹, Takaki Nakamura¹ (1Vet. Med., Kagoshima Univ., 2Int. Ctr. Is. Stud., Kagoshima Univ.)

アナプラズマ科細菌は偏性細胞内寄生性であり、家畜牛では赤血球に感染する種が古くから知られ、人獣共通感染症を起こす種は1994年に人の好中球内にて発見された。日本においても様々な動物、マダニ、熱性疾患患者などから検出されている。しかし、分離が極めて困難であり、遺伝子情報はPCRによる増幅断片に限られ、国内の菌種は不確定であることが多い。我々は国内の野生動物におけるコクシエラ科、リケッチア科、アナプラズマ科細菌の遺伝子検出による保有調査を行っている。本研究では、ニホンジカ (山口県のホンシュウジカ、鹿児島県のキュウシュウジカ、鹿児島県・屋久島のヤクシカ) からの結果を報告する。ヤクシカからのアナプラズマ科細菌の検出 (脾臓 17/19; 89.5%, 血液 6/8; 75.0%) は、ホンシュウジカ (脾臓 11/22; 50.0%) およびキュウシュウジカ (脾臓 1/21; 4.8%, 1/1; 血液 100%) と比較して高率であった。検出した *groEL* および 16SrRNA 遺伝子の配列の解析では、ヤクシカ由来の配列は同源性が高く同一種のアナプラズマ科細菌を保有していることが示唆された。BLAST 検索においては同源性の高い配列は「未同定・培養されていないアナプラズマ科細菌」として登録されているものが多く、新興細菌であると考えられる。アナプラズマ科細菌陽性であったシカ個体については主要臓器の組織も観察したが、共通する病理所見は見いだされなかった。今後、我々が検出したアナプラズマ科細菌の分離を試み、種を同定し、性状を解析したい。また、シカ個体の新鮮サンプルから感染標的細胞を検索するなど、宿主動物での病原性も解析したい。

P1-028/DP2-13-14

オルソケラトロジーレンズ装着における口腔常在菌が眼感染症リスクに与える影響について

○木村 優那, 渡邊 愛, 角出 泰造 ((株) メニコン)

Effect of oral resident bacteria on risk of ocular infections when wearing orthokeratology lenses

○Yuna Kimura, Ai Watanabe, Taizo Sumide (Menicon Co., Ltd.)

オルソケラトロジー (OK) は内面形状が特殊なハードコンタクトレンズを就寝時装着し、角膜前面の平坦化により一時的に近視を軽減させる治療法である。日中 OK レンズは専用ケースで保管され、洗面台にて保管される割合が高い。先行研究において、実使用 OK レンズケースから検出された口腔常在菌 *Streptococcus salivarius* (*S.sal*) 共存下での、*Staphylococcus epidermidis* (*S.epi*) のバイオフィーム (BF) 形成量や、眼感染症の原因となる *Acanthamoeba castellanii* (*A.cas*) 増殖性が上昇したことが明らかとなっている。本研究では、口腔常在菌 *Streptococcus oralis* (*S.ora*) 共存下での *S.epi* の BF 形成能と主要な眼感染症原因である *A.cas* 及び *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aer*) 増殖性への影響を評価した。1. *S.epi* BF 定量評価: *S.epi* を播種後、培養用インサートを介して *S.ora* を共存させ、クリスタルバイオレット染色法により、*S.epi* の BF 形成量を定量した。2. *A.cas* 増殖性評価: *S.ora* と共存させた *A.cas* を培養後、カウントした。3. *P.aer* 増殖性評価: *P.aer* を播種後、培養用インサートを介して *S.sal*, *S.ora* それぞれの共存下で、*P.aer* の菌数をリアルタイム PCR にて定量した。*S.ora* 共存下において、*S.epi* の BF 形成量は増加したが、*A.cas* 増殖性は変化しなかった。また、いずれの口腔常在菌共存下においても *P.aer* 増殖性は変化しなかった。本結果より、*S.sal* と同様に、*S.ora* 共存下で *S.epi* の BF 形成量が上昇した。ケースの洗面台での保管は、飛沫による口腔常在菌混入での BF 産生増大の可能性があり、これを足場とした眼感染症のリスクが示唆される。

P1-029/W2-9

Helicobacter pylori 母子感染モデルの水平感染効率の検討

○大崎 敬子¹, 北条 史², 岡 健太郎³, 蔵田 訓⁴, 高橋 志達¹, 三戸部 治郎¹, 神谷 茂^{1,3} (1)杏林大・医・感染症学, (2)杏林大・医・実験動物施設, (3)ミヤリサン製薬・研究開発本部, (4)杏林大・保健・臨床検査微生物)

Efficiency of transmission of Helicobacter pylori in an animal model of mother-to-child infection

○Takako Osaki¹, Fuhito Hojo², Kentaro Oka³, Satoshi Kurata⁴, Motomichi Takahashi¹, Jiro Mitobe¹, Shigeru Kamiya^{1,3} (1)Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med., (2)Inst. Lab. Animals, Grad. Sch. Med, Kyorin Univ., (3)R&D Division, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd., (4)Div. Microbial., Dept. Med Technol., Fac. Health Sci., Kyorin Univ.)

Helicobacter pylori はヒトを自然宿主として 4-5 歳ころまでに感染し、除菌治療が施されない限り生涯にわたって持続感染する。衛生状態の良い現在の国内では感染の主因は家族内感染である。これまで本学会において MPS マウスを用いて *H. pylori* の長期間持続感染を報告してきた。MPS マウスは *H. pylori* の経口投与によりほぼ 100% の確率で感染が成立し、1 年以上感染が持続し、易感染性であることを示した。そこで、MPS マウスを用いた *H. pylori* 母子水平感染の効率やそれに影響する環境因子を調べたいことを目的とし、母マウスに感染後、交配させるモデルを立ち上げた。MPS マウス 6 週齢雌に *H. pylori* を経口投与し、10 週齢で交配、その仔への感染状況を調べた。生後 1-4 週までの各週と、5 週 (雄) および 10 週 (雌) の時点で、それぞれ評価した。培養法による評価では仔マウスは全頭 *H. pylori* の感染が陰性であり、母マウスは全頭感染陽性であった。マウスの母乳および血清中に抗 *H. pylori* 抗体を認め、仔マウスの血清中に抗 *H. pylori* IgG 抗体が存在していた。一方、胃内総 DNA の定量 PCR により、仔マウスの胃内にも *H. pylori* の DNA を認めたが、母マウスと比較して 1/100 から 1000 程度であった。本実験において、母親由来の抗体の存在が仔マウスへの感染を防いでいる可能性が示された。現在、感染母マウスと、非感染母マウスから生まれた仔マウスを入れ替える系を立ち上げており、母親からの移行抗体の無い子供に *H. pylori* 感染が成立するかを検討している。

P1-030/DP2-13-15

日本国内実験用カニクイザルにおける Corynebacterium ulcerans 感染歴の遡及的解析

○木村 美幸¹, 米満 研三², 網 康至², 結城 明香², 妹尾 充敏¹, 見理 剛¹, 花木 賢一², 岩城 正昭² (1)国立感染研・細菌2, (2)国立感染研・安全実験管理部)

Prevalence of Corynebacterium ulcerans in cynomolgus monkeys in Japan: retrospective analysis

○Miyuki Kimura¹, Kenzo Yonemitsu², Yasushi Ami², Asuka Hirai-Yuki², Mitsutoshi Senoh¹, Tsuyoshi Kenri¹, Ken-ichi Hanaki², Masaaki Iwaki² (1)Dept. Bacteriology II, NIID, (2)Management Dept. Biosafety, Lab. Animal, and Pathogen Bank, NIID)

【目的】ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) は、人獣共通感染症であるウルセランス感染症を引き起こす。種々の動物が保菌するが、実験用カニクイザルにおいても報告がある。本研究は、1961 年以降に感染研に入荷したカニクイザルの感染歴調査を目的とし、保存血清におけるジフテリア抗毒素価を調べた。また、ヒトからの感染との関連性を調べるため、抗麻疹抗体価についても評価した。

【方法】1961-2022 年入荷の 535 頭を対象とし、入荷時の検疫で採取された保存血清を使用した。ジフテリア抗毒素価は、ジフテリア毒素の Vero 細胞に対する毒性の中和活性により評価した。抗麻疹抗体価は EIA 法により測定した。

【結果・考察】今回ジフテリア抗毒素価を評価した 535 頭のうち、120 頭 (22.4%) が陽性であった。1985-1995 年入荷のサルで陽性率が高く、2000 年以降は減少した。1990 年で最も陽性率が高く、1990、95 年では、0.08 IU/ml 以上と比較的高い抗体価を示すサルが多かった。また、1985-95 年の抗毒素価陽性率は、ヒトとの接触の指標となる抗麻疹抗体陽性率と必ずしも一致しなかった。2020-22 年のサルから分離された *C. ulcerans* は、すべて毒素遺伝子陰性であったことから、毒素非産生性菌の感染が考えられた。2020 年以降では陽性率は低いものの、毒素産生性 *C. ulcerans* 感染歴を示すカニクイザルは存在し続けており、飼育群での感染拡大及びヒトへの感染が懸念される。従って、実験用カニクイザルにおける *C. ulcerans* 感染状況の監視が必要であると考えられる。

P1-031/DP1-03-01

Reactivity of autologous serum IgG to gut microbes in pediatric ulcerative colitis patients

○Tabassum Nafisa¹, 今大路 治之¹, 近藤 健夫², 近藤 園子², Emmanuel Munyeshyaka¹, 多田 彩乃¹, 日下 隆², 桑原 知巳¹ (1)香大・医・分子微生物学, (2)香大・医・小児科)

○Tabassum Nafisa¹, Haruyuki Imaohji¹, Takeo Kondo², Sonoko Kondo², Emmanuel Munyeshyaka¹, Ayano Tada¹, Takashi Kusaka², Tomomi Kuwahara¹ (1)Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., (2)Dept. Pediatr., Sch. Med., Kagawa Univ.)

Ulcerative colitis (UC) is caused by excessive immune response to gut microbiota. IgG-coated gut bacteria increase with disease severity, while no change in the abundance of IgA-coated bacteria. However, the role of IgG-coated bacteria in the disease activity remains to be elucidated.

Serum and colonoscopic lavage fluids were collected from pediatric UC patients (n=37) including 5 pairs of serum and lavage samples from the individual patients in active and remission stages. *Lactobacillus paracasei* (Lc) and *Escherichia coli* (Ec) were isolated from the lavage fluid. Western blotting was conducted to evaluate the reactivity of serum IgG to microbes-derived proteins or PFA-fixed bacterial cells. The reactivity of Lc-absorbed IgG to the isolated bacteria was also investigated. Activation of the complement pathway by the immune complex formed with serum IgG and Ec or Lc was examined. The study was approved by the Ethical Committees of Kagawa University.

The IgG of UC patients showed high reactivity to *Lactobacillus*, *Enterococcus* and Ec regardless of disease activity. The Lc-absorbed IgG reduced its reactivity to all the bacterial strains. Lc inhibited the complement activation by Ec-IgG immune complex. These results might indicate that Lc nonspecifically traps the IgG recognizing the epitope derived from other bacteria, reducing the inflammatory immune complex formation in the gut.

P1-032/W2-5

乳酸菌から単離した胆汁酸耐性と抗生物質耐性を同時に付与する両機能性酵素の機能解析

○草田 裕之, 玉木 秀幸 (産総研・生命工学・生物プロセス)

Bile salt hydrolase degrades β-Lactam antibiotics and confers antibiotic resistance on Lactobacillus

○Hiroyuki Kusada, Hideyuki Tamaki (BPRI., Dept. Life Sci. Biotechnol., AIST)

Lactobacillus 属乳酸菌は古くからヒトの健康に有益な効果をもたらすプロバイオティクスとして関心を集めている。これら乳酸菌群が効果的にプロバイオティック機能を発揮するためには、ヒト腸内で安定的に生存・定着・増殖することが重要と考えられている。しかしながら、ヒト腸内は細菌にとって毒性の高い消化液成分の胆汁酸や抗生物質の影響により、これら有益な乳酸菌群の腸内生残性は大きく低下すると予想される。近年、我々は胆汁酸のみならず抗生物質をも同時に分解する新規な胆汁酸塩加水分解酵素 (Bile salt hydrolase, BSH) をヒト由来乳酸菌から単離することに成功した。本発表では、胆汁酸と抗生物質の両耐性能に寄与する新規酵素について報告する。

まず、*L. paragasseri* のゲノム解析から 2 つの BSH 候補遺伝子 (LpBSH・LapBSH) を見出し、大腸菌を宿主とした組換え酵素の発現系を構築した。酵素活性測定の結果、どちらの酵素も多様な抱合型胆汁酸のアミド結合の切断反応を触媒する BSH 活性を有することが判明した。さらに、LpBSH と LapBSH はペニシリン分解酵素 (Penicillin acylase) とも有意な相同性を有しており、実際にペニシリンをも分解可能な「両機能性酵素」であることが明らかとなった。本乳酸菌は高い胆汁酸耐性を示すと共に、ペニシリンを含む各種 β ラクタム系抗生物質に対しても緩やかな耐性能を示したことから、本菌においては、これら両機能性酵素が胆汁酸耐性と抗生物質耐性という 2 つの異なる重要な微生物機能を担うことで、腸内生残性の向上に寄与している可能性が示唆された。

P1-033/DP1-03-02

Comparative analysis of Legionella symbiosis mechanisms between different protist hosts

○渡邊 健太, 清水 隆, 度会 雅久 (山口大・共同獣医・獣医公衆衛生)

○Kenta Watanabe, Takashi Shimizu, Masahisa Watarai (Dept. Vet Med., Yamaguchi Univ.)

Paramecium and *Tetrahymena* are freshwater ciliates and found widely in environmental water. Their capability as host organisms that maintain other species including *Legionella* in environment has been largely studied. However, the details of their symbiotic mechanisms are largely unknown. In our previous studies, we have reported a case in which some *Legionella* strains isolated from the environment killed *Paramecium* hosts, preventing a symbiotic relationship. Therefore, when these *Legionella* strains were also examined to infect *Tetrahymena* cells, similar cytotoxicity was observed. In infection experiments with both host cells, the morphological abnormalities of the *Legionella*-containing vacuoles and the time required for the cells to be killed were similar. Although we had identified LefA of *Legionella* as a factor required for cytotoxicity to *Paramecium* hosts, it did not have a function as a cytotoxic factor against *Tetrahymena* hosts. On the other hand, the type IV secretion system (T4SS) was not involved in the cytotoxicity against *Paramecium* hosts, while in *Tetrahymena* hosts, a reduction in cytotoxicity was observed in the infection of the T4SS deletion mutant. In nature environment, *Legionella* may establish various relationships with a wide variety of protist hosts, and it is possible that the mechanisms and factors defining these relationships may also vary among different hosts.

P1-034/W2-4

Comparative genomic analysis of long-term colonization of Bifidobacterium longum in the human gut

○四宮 彩名^{1,2}, 月見 友哉¹, 渡部 翔¹, 吉田 祐貴¹, 鈴木 治夫^{1,2}, 加藤 久美子³, 小田 卷 俊孝³, 佐藤 光彦⁴, 小椋 義俊⁵, 福田 真嗣¹ (1慶大・先端生命研, 2慶大・環境情報, 3森永乳業(株)・基礎研, 4かずさDNA研究所, 5久留米大・医)

○Ayana Shinomiya^{1,2}, Tomoya Tsukimi¹, Tsubasa Watabe¹, Yuki Yoshida¹, Haruo Suzuki^{1,2}, Kumiko Kato³, Toshitaka Odamaki³, Mitsuhiro Sato⁴, Yoshitoshi Ogura⁵, Shinji Fukuda¹ (1Inst. Adv. Biosci, Keio Univ., 2Fac. Environ. Info. Stud., Keio Univ., 3Innov. Res. Inst., Morinaga Milk Indust., 4Kazusa DNA Res. Inst., 5Kurume Univ. Sch. Med.)

Bifidobacterium longum, exhibits genomic variations among individual hosts, contributing to human health. Notably, identical *B. longum* genomes persist within an individual over extended periods, suggesting the potential for modulating its abundance to contribute to human health maintenance. The aim of this study is to explore how *B. longum* adapt through adaptive mutations to establish colonization in the individual gut. We conducted isolation and cultivation of *B. longum* from fecal samples obtained at multiple time points over 13 years from 23 Japanese subjects, resulting in 475 draft genomes of *B. longum* strains through subsequent whole-genome analysis. Comparative genomic analysis revealed a consistent trend of a lower total number of SNPs per isolate at the same time point within a subject, compared to SNPs at different time points. Additionally, an observable clustering by time point indicated temporal variations in strains even within the same individual. Conversely, stable strains were identified, irrespective of the temporal sequence. The potential correlation between changes in bacterial strains and the gene set alterations suggests ongoing transformations in the gut microbiota. Subsequent investigations will delve into exploring subject information and conducting functional gene analyses to unveil the underlying factors contributing to these observed results.

P1-035/W2-1

葉に棲息する共生細菌による気孔動態制御と植物の健康におけるその意義

○平田 梨佳子¹, Utami Yuniar Devi², 晝間 敬², 峯 彰¹ (1京大院・農, 2東大院・総合)

Stomatal manipulation by leaf-inhabiting bacteria and its significance in plant health

○Rikako Hirata¹, Utami Yuniar Devi², Kei Hiruma², Akira Mine¹ (1Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., 2Grad. Sch. Arts and Sci., Univ. Tokyo)

動物の皮膚や体内には多種多様な細菌が棲息しており、代謝や免疫などの調節を通じて宿主の健康に影響を与えている。植物もまた全身に膨大な数の細菌を宿している。なかでも、葉は細菌が最も多く棲息する器官である。細菌が産生する代謝物が植物の成長促進やストレス耐性に寄与するという報告もある。しかし、これらは無数の細菌のごく一部であり、大部分の存在意義は不明である。

気孔は葉の表面に存在する孔(あな)であり、植物にユニークな器官である。気孔の開き具合の調節は、植物の成長制御やストレス耐性の要となる。例えば、植物は気孔を開くことで光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを促進する一方で、乾燥時には気孔を閉じることで水分損失を防ぐ。加えて、植物は細菌を認識すると、その侵入口となる気孔を閉じるという免疫機構を備える。しかし、病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) は植物毒素コロナチンを産生し、気孔を再び開くことで植物体内に侵入して病気を引き起こす。他方、非病原性の細菌が気孔を開くかどうかは不明であった。我々は、モデル植物シロイヌナズナの葉の表面に定着する共生細菌 *Pseudomonas paralaetis* (*Ppr*) が、気孔を再開口させること、および、成長を促進することを発見した。興味深いことに、*Ppr* による気孔開口は、*Pto* が産生するコロナチンによる気孔開口とは異なるメカニズムであることが明らかとなった。以上の結果を踏まえ、気孔を介した植物と共生細菌の関わり合いと植物の健康におけるその意義について議論したい。

P1-036/W2-6

Bacterial Olympics Achieved by Microfluidic Devices

○島田 佳季¹, 吉岡 青葉², 上村 直輝², 中根 大介², 菅 哲朗¹ (1電通大・機械知能, 2電通大・基盤理工)

○Yoshiki Shimada¹, Aoba Yoshioka², Naoki Uemura², Daisuke Nakane², Tetsuo Kan¹ (1Dept. Mech. and Int. Sys. Eng., UEC, 2Dept. Eng. Sci., UEC)

Narrow and confined environments are ubiquitous in our surroundings. Both pathogenic and symbiotic bacteria pass through a limited space to reach the host cell surface, as the initial step of infection. However, the details of how a single bacterium moves in a narrow passage are still unknown. Here, we fabricated a microfluidic device that mimics the host surface using MEMS technology. The device has a large space, which is connected to a straight passage with 100 μm long. Twenty five types of widths of the passages are ranging from 0.5 to 10 μm on one chip. We confined nine bacteria, and evaluated their motility under optical microscopy quantitatively. This observation system named as Bacterial Olympics. In the wide passages, the standard strains for the research on bacterial motility ranked high, but in the narrow passage less than 1.5 μm, the ranking changed. *Vibrio fischeri* and *Campylobacter jejuni* ranked fast propulsion speed in the narrow passages. These bacteria are known to have a swimming style of flagellar wrapping, in which they wrap their flagella around their body. Our data suggests that the wrapping plays an important role in efficient movement in small spaces. The assay of Bacterial Olympic would be a useful tool for analyzing and evaluating the infection mechanism of pathogenic and symbiotic bacteria in the host's confined environment.

P1-037/DP1-03-09

歯科治療による歯周病寛解後も口腔細菌叢の dysbiosis は残存する
○山和馬, 井口 拓弥, 佐藤 惇志, 堤 康太, 柿澤 恭史 (ライオン (株)・研究開発本部)

Dysbiosis of oral microbiome persists after treatment-induced remission of periodontal disease

○Kazuma Yama, Takuya Inokuchi, Atsushi Sato, Kota Tsutsumi, Yasushi Kakizawa (R&D., Lion Corp.)

【目的】歯周病は細菌感染症であり、口腔細菌叢の乱れ (dysbiosis) が発症・進行に関わると考えられている。歯科治療後も再発しやすい疾患のため、治療前後の口腔状態と口腔細菌叢及び代謝物質の関連性を明らかにすることが再発予防に重要と考えた。そこで本研究では、歯周病罹患患者 (歯周病群) の治療前・治療完了時及びその数か月後の状態を口腔健康者 (健康群) と比較解析する臨床研究を実施した。

【方法】日吉歯科診療所に来院した健康群 22 名, 歯周病群 18 名を対象とした (UMIN000031334)。口腔検査前に唾液検体として洗口吐液を採取し凍結。融解し遠心分離後、上清を CE-MS による代謝物質分析, 沈殿物を NGS による細菌叢測定に供した。細菌叢測定は細菌の 16S rRNA 遺伝子 V1-2 領域を対象とし各サンプル 10,000 リード取得した。

【結果・考察】歯周病群は、歯科治療によってプロービング時の出血が減少するなど歯肉の状態が改善し、治療完了から数か月経過しても状態は悪化しなかったことから、歯周病は寛解したと考えられた。一方、口腔細菌叢は寛解後も健康群と有意に異なり、疾患関連細菌や硝酸塩還元細菌の存在比率も有意に異なった。また、代謝物質は寛解後も重度歯周炎罹患患者で増加検出報告のあるトレオニン酸やヒスチジンの濃度が健康群よりも高く、ピリミジン代謝関連物質にも有意な差が認められた。これら代謝物質の違いは治療後も口腔内に疾患関連細菌が潜むことを反映していると推察される。

【結論】歯科治療による歯周病症状寛解後も、dysbiosis は継続し再発リスクが高い状態にあることが示唆された。歯科治療後の再発リスクを下げるためには、dysbiosis を解消する新たな介入が必要であると考えられる。

P1-038/DP1-03-10

An intestinal mucosa-associated bacterium which attenuates colitis

○楊佳約¹, 尾花 望^{2,3}, 中藤 学⁴, 野村 暢彦³, 福田 真嗣^{1,5} (慶大・先端生命科学研, ²筑波大・医学医療系・TMRC, ³筑波大・生命環境系, ⁴神奈川産技総研, ⁵メタジェン株式会社)

○Jiayue Yang¹, Nozomu Obana^{2,3}, Gaku Nakato⁴, Nobuhiko Nomura³, Shinji Fukuda^{1,5} (Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²TMRC, Inst. Med., Univ. of Tsukuba, ³Inst. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁴KISTEC, ⁵Metagen. Inc.)

Various commensal bacteria inhabit the human intestine. In particular, intestinal mucosal bacteria are reported to affect host health through modulation of host immune system. However, knowledge of mucosa-associated bacteria is limited due to the invasiveness of conventional sampling methods. In this study, we have developed a non-invasive sampling method for mucosa-associated bacteria from stool samples. Through a murine experiment, we found that swab samples of fecal surfaces display a similar microbiome profile as mucosa-associated bacteria. With this method, we found a genus which has few literatures, inhabits the colon mucosal layer. To examine its function, we colonized the type strain to germ-free mice. The colonization of this bacterium greatly improved the survival rate and attenuated the symptoms of colitis in gnotobiotic mice. Metabolome analysis showed that taurine was significantly accumulated in the cecum content of the gnotobiotic mice. Besides, taurine supplementation significantly attenuated colitis. Deconjugation of taurine from conjugated bile acids is the major pathway of taurine production by gut microbes. In vitro assay suggested that this bacterium has high deconjugation ability to produce taurine. It is suggested that the high deconjugation ability of this bacterium contributes to the accumulation of taurine in the cecum and the attenuation of colitis.

P1-039/DP1-03-11

Gut microbiota controls the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

○池田 恵莉¹, 山口 雅也^{1,2,3,4}, 川端 重忠^{1,3} (大阪大・院歯・微生物, ²大阪大・院歯・バイオインフォ, ³大阪大・CiDER, ⁴大阪大・微研・バイオインフォ)

○Eri Ikeda¹, Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Shigetada Kawabata^{1,3} (Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³CiDER, Osaka Univ., ⁴Bioinfo, RIMD, Osaka Univ.)

Gut dysbiosis characterized by an imbalanced microbiota is closely involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Our aim was to investigate the impact of the gut microbiota on susceptibility in a mouse model of ulcerative colitis. We compared the susceptibility to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis of inbred BALB/c mice obtained from the three main distributors of laboratory animals in Japan. Clinical symptoms of the colitis and the faecal microbiota were assessed. The DSS colitis model showed differences in the susceptibility of BALB/c mice from the vendors. Analysis of the gut microbiota using 16S rRNA sequencing revealed clear separation of the gut microbial composition among mice from the vendors. Notably, the abundance of the phylum Actinobacteriota was strongly associated with disease activity. We also observed the expansion of butyrate-producing Roseburia species in mice with decreased susceptibility of the disease. Further cohousing experiments showed that variation in clinical outcomes was more correlated with the gut microbiota than mouse genetic variants among substrains from different suppliers. A BALB/c substrain was resistant to DSS-induced colitis, and the severity of DSS-induced colitis was mainly influenced by the gut microbiota. Targeting butyrate-producing bacteria could have therapeutic potential for colitis.

P1-040/DP1-03-12

Subgingival Plaque-Specific Bacteria in Severe Periodontitis Identified by Long-Read Sequencing

○馬 佳楽, 影山 伸哉, 朝川 美加李, 竹下 徹 (九大・院歯・口腔予防)

○Jiale Ma, Shinya Kageyama, Mikari Asakawa, Toru Takeshita (Sect. Prev. Public Health Dent., Grad. Sch. Dent., Kyushu Univ.)

Objective: The subgingival plaque's bacteria reside at the forefront of the periodontal pockets, playing a crucial role in the advancement of periodontal lesions. In this study, we aimed to accurately identify subgingival plaque-specific bacteria (SUBP bacteria) and further understand their distribution within other oral niches. **Methods:** We collected subgingival plaque (SUBP), supragingival plaque (SUPP) and tongue coating (TC) samples from 39 severe periodontitis patients with $\geq 20\%$ of probing sites with probing depth (PD) ≥ 4 mm. The bacterial composition of each sample was analyzed using PacBio single-molecule long-read sequencing of the full-length 16S rRNA gene and the amplicon sequence variant (ASV) approach. **Results:** Nineteen SUBP bacteria, including *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Tannerella forsythia* (*Tf*), were identified after comparing SUBP both with SUPP and TC (paired Wilcoxon test, FDR < 0.05 ; Benjamini-Hochberg). *Mogibacterium timidum*, *Tf* and *Fretibacterium fastidiosum* were highly significantly different (FDR adjusted p-values [q-values] < 0.0001). Interestingly, compared with *Tf*, the distribution of *Pg* was less significantly different between SUBP and TC. **Conclusion:** We have newly identified 19 SUBP bacteria through a high-resolution approach. Different distribution preferences of the SUBP bacteria between dental plaque and TC were precisely detected.

P1-041/DP1-03-13

皮膚細菌叢と肌健康状態との関連性

○門屋 亨介, 近藤 彩乃, 松川 彩花 (唱山女大・生活・管理栄養)

Relationship between the skin bacterial community and skin condition

○Ryosuke Kadoya, Ayano Kondo, Ayaka Matsukawa (Dept. Food and Nutrition, Sch. Life Studies, Sugiyama Jogakuen Univ.)

皮膚は体重の約 16%を占める人体最大の臓器であり、腸内と同様に約 20 種、数千億個の細菌が息しており皮膚細菌叢を形成している。これら皮膚細菌叢が皮膚の健康維持に重要な役割を担っていることが最近の研究で示唆されている。*Staphylococcus epidermidis* は皮膚のバリア機能をもつグリセリン関連物質の生成・分泌、遊離脂肪酸を分泌し肌を弱酸性に保つ、肌荒れやアトピー性皮膚炎を引き起こす黄色ブドウ球菌を退治する抗菌ペプチドの産生など皮膚を守る役割を担っている。一方、*Cutibacterium acnes* は皮脂で毛穴が詰まり嫌気環境になることで急激に増殖しニキビの原因菌となることが知られている。しかしながら、皮膚の健康状態を表すパラメーターである「普通肌」、「脂性肌」、「乾燥肌」、「混合肌」と *S. epidermidis* 等の皮膚細菌との関わりは明らかではない。本研究では皮膚常在細菌群を解析することで、皮膚健康と細菌群との関わり合いを明らかにすることを目的とする。22 才女性を対象に肌状態測定と鼻筋から細菌を収集し 16SrDNA 配列を用いた細菌叢解析を行った。すべての肌質で *S. epidermidis* は表皮細菌叢中 1%から 50%存在しており肌質間で有意差は無かった。また、表皮に存在する細菌数にも大きな変化は無かった。アルファ多様性解析では細菌属数と Chao1 に普通肌とその他の肌質との間に有意差があることを示し、ベータ多様性解析では普通肌細菌叢がクラスターを形成していることが示された。さらに、LEfSe 解析では普通肌には 8 種類の細菌属が有意に存在することが明らかになった。表皮細菌叢解析の結果、肌の健康状態を保つには *S. epidermidis* 以外の細菌も関与している可能性が示された。

P1-042/DP1-03-14

Characterization and application of lytic bacteriophage to control *T. ramosa* in microbial consortia

○Priyanka Baranwal, 宮永 一彦, 日高 侑也, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Priyanka Baranwal, Kazuhiko Miyanaga, Yuya Hidaka, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Recently, Obesity poses a significant global health risk. It has been reported that certain bacteria in the gut microbiota strongly contribute to obesity. Existing treatments have limitations, necessitating simpler interventions. Bacteriophages (phages) are gaining recognition for their directly targeting bacteria. In this study, we focused on one of the obesity-related bacteria, *T. ramosa*. Lytic phages (phiTR001, phiTR002, phiTR003) were isolated from JMU hospital sewage, with different host ranges. We evaluated phiTR001's *in vitro* and *in vivo* efficacies, noting its relatively broad host range. *In vitro* experiments demonstrated that phiTR001 specifically hindered the growth of *T. ramosa* in pure culture and in environment with other bacteria derived from mice gut, and this effect depended on multiplicity of infection (MOI). Notably, some uninfected bacterial cells, isolated during phage interactions, exhibited transient resistance to the phages. Our *in vivo* investigations showcased the remarkable efficacy of phiTR001 in eliminating *T. ramosa*, even within the mice gut environment. In conclusion, this study underscores the potential of bacteriophage intervention for controlling the targeting strain. We anticipate that administering phage cocktails with brief treatment pauses would optimize their potential to eliminate transient phage-resistant mutants.

P1-043/DP1-09-01

Characterization of the sensitive skin microbiome of Japanese women

○柴垣 奈佳子¹, 山本 まこ², 藤本 康介^{3,4}, 井元 清哉², 植松 智^{3,4} (1 (株) 資生堂・みらい開発研究所, 2東京大・医学研究所・ヒトゲノム解析センター・シーケンスデータ情報処理, 3東京大・医学研究所・ヒトゲノム解析センター・メタゲノム医学, 4大阪公立大・院・医・ゲノム免疫学/メタゲノム解析研究センター)

○Nakako Shibagaki¹, Mako Yamamoto², Kosuke Fujimoto^{3,4}, Seiya Imoto², Satoshi Uematsu^{3,4} (1Mirai Inst., Shiseido Co., Ltd., 2Div. Health Medical Intelligence, The Inst. Medical Science, The Univ. of Tokyo, 3Div. Metagenome Medicine, Human Genome Center, The Inst. Medical Science, The Univ. of Tokyo, 4Dept. Immunology and Genomics, Grad. Sch. Medicine, Osaka Met. Univ.)

Sensitive skin has recently become recognized as a dermatological condition defined by sensory perception of some stimuli that normally should not cause sensations. Among the mechanisms that possibly result in sensitive skin occurrence, increased permeability of stimulants due to impaired skin barrier function is most likely. Since the skin microbiome contributes to the skin's barrier function, we decided to examine the skin microbiome in sensitive skin (SS) and non-sensitive skin (NS). Lactic acid sting test was employed to group 44 healthy Japanese women participated into the SS and NS groups. 16S rRNA gene amplicon sequencing revealed that the skin microbiomes in the forehead (FH) samples of the SS group have unique features compared to those of the NS group, while no significant difference was observed in skin physiological measurements. Relative abundance of *Cutibacterium* in the FH microbiomes was significantly higher in SS than NS. We further conducted metagenome analysis with the samples collected from the cheek (CK), which did not show a significant difference in relative abundance of each genus between SS and NS. Genes in several metabolic pathways were, however, found enriched in either NS or SS than the other. The results indicate that there may be a functional difference in the skin microbiome between NS and SS, which may contribute to skin sensitivity.

P1-044/W2-2

複数のメタゲノム解析手法を用いた高解像度での口腔細菌叢の解析

○山口 雅也^{1,2,3,4}, 内橋 俊大⁵, 川端 重忠^{2,4} (1阪大・院歯・バイオインフォ, 2阪大・院歯・微生物, 3阪大・微研・OUBIC, 4阪大・CiDER, 5阪大・院歯・顎顔面口腔外科)

Multiple metagenomic analysis for the oral microbiome at a high resolution

○Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Toshihiro Uchihashi⁵, Shigetada Kawabata^{2,4} (1Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 2Dept. Microbiology, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., 3Bioinform. Cent., RIMD, Osaka Univ., 4CiDER, Osaka Univ., 5Dept. OMFS, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

口腔細菌叢に含まれる細菌の一部は、種や含まれる遺伝子の同定が十分になされていない。本研究では、複数のメタゲノム解析手法にて唾液中の細菌種を同定するとともに、遺伝子の分布を調べることとした。同一個人から採取した唾液検体を、微生物を不活性化させる OMNIgene 保存液または培養可能なグリセロールストックにて保存した。保存した二種類の検体について、16S rRNA 解析、メタゲノムショットガン解析、細菌シングルセル解析を行った。16S rRNA 解析の結果、両検体で微生物叢構造は類似し、レンサ球菌属が優勢であった。また、メタゲノムショットガン解析では、検体中の DNA の約 80%が非細菌由来であったのに対し、シングルセル解析では、ゲノムあたりの平均汚染率が 10.4%であった。また、シングルセル解析により、不活化サンプルでは 48 ウェル中 43 ウェル、培養可能サンプルでは 48 ウェル中 45 ウェルのゲノム配列が得られた。薬剤耐性遺伝子に関して、88 ゲノム中 4 ゲノムが β -ラクタマーゼをコードする *cfxA* を、4 ゲノムがエリスロマイシン耐性遺伝子を保有していた。テトラサイクリン耐性遺伝子は 9 ゲノムで検出された。メタゲノムショットガン解析においては、*cfxA*, *ermF*, *ermX* の完全な配列が得られたが、*tetQ* など他の耐性遺伝子は断片として検出された。さらに、既知の病原因子を探索したところ、肺炎球菌由来の病原因子がもっとも多く、13 遺伝子が検出された。さらに、Average nucleotide identity 分析より、5 ゲノムについて新種である可能性が示された。本研究により、口腔細菌叢における種や遺伝子の分布について、シングルセル解析を併用することで高解像度の結果が得られることが示唆された。

P1-045/DP1-09-09

長期継代培養が及ぼす *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィルム形成能への影響

○多田 彩乃, 今大路 治之, Emmanuel Munyeshyaka, Nafisa Tabassum, 桑原 知巳 (香川大・医・分子微生物)

Effect of long-term passage on the biofilm formation of *Fusobacterium nucleatum*

○Ayano Tada, Haruyuki Imaohji, Emmanuel Munyeshyaka, Nafisa Tabassum, Tomomi Kuwahara (Dept. Microbiol., Med., Kagawa Univ.)

【目的】口腔内では多種多様な細菌が共凝集して複雑なバイオフィルムを形成する。*Fusobacterium nucleatum* (FN) は初期定着菌と後期定着菌の橋渡しをする歯周病関連細菌であり、口腔バイオフィルム形成において重要な役割を担っている。口腔内でFNは分裂により継代を繰り返していると推測されるが、継代がFNのバイオフィルム形成能に与える影響を評価した報告はない。本研究では、*F. nucleatum* を長期間にわたって継代培養し、バイオフィルム形成能に与える影響を調べた。【方法】-80°Cで凍結保存された*F. nucleatum* ATCC25586株をBHIS寒天培地に播種し、48時間嫌気培養した。さらに、コロニーをBHIS培地へ播種し、24時間嫌気培養した。菌液の濁度(OD₆₀₀)が0.1となるよう調整し、24ウェルプレートで24時間嫌気培養して形成させたバイオフィルム量をクリスタルバイオレット染色法により定量した。また、BHIS寒天培地上のコロニーを新しい寒天培地へ160回継代し、同様の操作を3度繰り返した。【結果および考察】*Fusobacterium nucleatum* ATCC25586株は自己凝集能が高く、バイオフィルム形成量に周期的な変化が認められた。寒天培地へ播種して約20回継代するとバイオフィルム形成量が減少し、その後安定した。継代数40回以降はバイオフィルム形成量の変動が大きくなり不安定化した。以上の結果から、継代培養によりFNのバイオフィルム形成能が変動することが明らかになった。慢性歯周炎組織において、FNがどのように病態形成に関与するのかを理解するため、各継代時期のFNについてRNA-Seq解析を行い、バイオフィルム形成に関与する遺伝子群の検索を進めている。

P1-046/DP1-09-10

芽胞形成細菌の発芽誘導法の検討

○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)

Investigation of methods for inducing germination of spore-forming bacteria

○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、芽胞の発芽を誘導する様々な手法を用いて単離した菌株を整理することで、その発芽誘導法の有効性を検証した。【材料および方法】健康成人のヒト糞便材料をエタノールに浸漬することで、栄養細胞を滅菌し芽胞細胞を残す処理をした。発芽誘導物質として報告されているアミノ酸類や有機酸類、胆汁酸を添加し芽胞細胞の発芽を試みた。また、糞便材料の液体培養液を滅菌して添加する新たな発芽誘導法も同時に行った。発芽誘導後の各サンプルを種々の寒天培地を用いて嫌気条件下で培養し、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。【結果】発芽を誘導する各条件によって、計444株を単離した。そのうち、63株の新種候補株を検出した。既知種では*Clostridium* 属が大多数を占め、次いで*Bacillus* 属、*Intestinibacter* 属、“*Pseudoruminococcus*”属が続いた。また、難培養かつ酪酸産生の有用菌として知られる*Roseburia* 属や*Anaerobutyricum* 属の細菌種も分離された。新種候補株のうち37株が糞便材料の液体培養液を添加した条件において分離された。このことから、本手法は新規である芽胞形成細菌の分離に有効であることが示唆された。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。

P1-047/W3-8

Chlamydia trachomatis favors hypoxia because it suppresses methionine-related metabolites

○山口 博之¹, 李 睿語¹, 張 賽成¹, 黒岩 青空¹, 大久保 寅彦¹, Jeewan Thapa², 東 秀明³ (¹北大院・保科・病態解析, ²北大・バイオリソース部門・人獣共通感染症国際共同研究所, ³北大・感染免疫部門・人獣共通感染症国際共同研究所)

○Hiroyuki Yamaguchi¹, Ruiyu Li¹, Saicheng Zhang¹, Sora Kuroiwa¹, Torahiko Okubo¹, Jeewan Thapa², Hideaki Higashi³ (¹Fac. Health Science, Hokkaido Univ., ²Div. Bioresources, Int. Inst. Zoonosis Ctr., Hokkaido Univ., ³Div. Infection and Immunity, Int. Inst. Zoonosis Ctr., Hokkaido Univ.)

The intracellular energy parasitic bacterium *Chlamydia trachomatis* (Ct) is the leading cause of sexually transmitted infections and has been implicated in the etiology of cervical cancer. Since anaerobic glycolysis with pushing cellular proliferation can produce more ATP than under normoxia, Ct favors hypoxia rather than normoxia. However, it is unclear what role the activation of glycolysis under hypoxia plays in the growth of Ct, other than facilitating the acquisition of ATP. To understand why Ct favors hypoxia, we examined the dynamics of infected cells using glycolysis-related PCR array and metabolomic analysis. We found that, compared with the levels under normoxia, the expression of glycolysis-related genes was significantly increased under hypoxia and further promoted by infection. Meanwhile, among 194 metabolites identified, the levels of 55 metabolites were significantly decreased under hypoxia and became more pronounced by infection. Almost half were methionine-related metabolites, and the perturbation with adenosine derivatives significantly impaired the growth. Together, Ct favors a hypoxia because it suppresses methionine-related metabolites while increasing glycolysis. Non-member co-researchers: S. Otsuguro, A. Matsuda, K. Maenaka (Center for Research and Education on Drug Discovery, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

P1-048/W3-6

Extended *Vibrio cholerae* cultivation induces flagella genes mutation with prolonged culturability

○岡田 和久, Amonrattana Roobthaisong, 浜田 茂幸 (阪大・微研・日タイ感染症)

○Kazuhiisa Okada, Amonrattana Roobthaisong, Shigeyuki Hamada (RCC-ERI, RIMD, Osaka Univ.)

Understanding the survival strategies of pandemic cholera pathogens in aquatic environments is crucial for public health countermeasures. *Vibrio cholerae* undergoes a transition to a viable but non-culturable (VNC) state in response to various environmental stresses. Our study reveals that the motility defect reduces the transition to the VNC state of the organisms. In addition, organisms with impaired motility, resulting from various mutations in flagella-related genes, were predominantly obtained under the stress of long-term batch culture (M9 minimal medium supplemented with 0.2% glucose), highlighting the connection between motility and the VNC state. We found mutations occurred selectively in flagella-related genes, with other genomic regions remaining highly conserved. Longer cultivation for up to 300 days yielded additional mutations in metabolism-related genes and the loss of virulence factors (e.g., CTX phage) and large DNA regions (~35 kb), accompanying the loss of genomic integrity. Motility-defective variants with mutations in the acetate kinase gene became predominant in most of the culturable cells after long-term cultivation. Those findings provide insights into the dynamics of bacterial populations in long-term cultures under certain environmental conditions.

P1-049/DP1-02-01

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¹, 村瀬 良朗¹, 近松 絹代¹, 山田 博之¹, 青野 昭男¹, 五十嵐 ゆり子¹, 高木 明子¹, 御手洗 聡^{1,2} (1結研・抗酸菌, 2長崎大院・医歯薬・基礎抗酸菌症)

Serum albumin promotes reactivation of VBNC (viable but non-culturable) *Mycobacterium tuberculosis*

○Yuta Morishige¹, Yoshiro Murase¹, Kinuyo Chikamatsu¹, Hiroyuki Yamada¹, Akio Aono¹, Yuriko Igarashi¹, Akiko Takaki¹, Satoshi Mitarai^{1,2} (1Dept. Mycobac. Ref. Res., Res. Inst. Tubercul., JATA, 2Dept. Basic Mycobacteriol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

【背景・目的】VBNC を含む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 を用いる方法 (Yeware et al. 2019) を応用して VBNC 状態へ誘導した結核菌 H37Rv 株を、0.1% 血清アルブミンを含む Dubos 培地に 1/10 量接種し、37°C で 20 日間 5% CO₂ 培養し、コロニー形成能 (CFU/mL) を指標として再活性化能を調べた。血清アルブミンは、市販品の複数動物種を使用した。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、Adenylyl cyclase 阻害薬 SQ22536 及び Ser/Thr キナーゼ阻害薬 H89, Staurosporine, 同キナーゼ阻害活性を有する抗悪性腫瘍薬 Mitoxantrone 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 10² 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 10⁷⁻⁸ CFU/mL に増加した。興味深いことに、血清アルブミンの再活性化促進効果は動物種によって異なり、マウス及びラット血清アルブミン、卵白アルブミンでは認められなかった。また、血清アルブミンによる再活性化は Ser/Thr キナーゼ阻害薬および Mitoxantrone で阻害された。

【考察】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。また、血清アルブミンの構造的差異が再活性化に影響す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。

P1-050/DP1-02-02

Malate dehydrogenase and malate: quinone oxidoreductase works as NADH oxidation system in *C. jejuni*

○カボンゴ オーガスティン^{1,2}, Rajib Acharjee^{1,2}, Sakura Takaya^{1,2}, Ozan Gundogdu⁴, Tomoo Shiba³, Kiyoshi Kita⁵, Daniel Ken Inaoka^{1,2} (1Dept. Glob. Health, Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., 2Dept. Mol. Infect. Dyn., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., 3Grad. Sch. Sc. Tech., Kyoto Inst. Technol., 4London Sch. Hyg. Trop. Med., 5Dept. Host Defens. Biochem., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

○Augustin Kabongo^{1,2}, Rajib Acharjee^{1,2}, Sakura Takaya^{1,2}, Ozan Gundogdu⁴, Tomoo Shiba³, Kiyoshi Kita⁵, Daniel Ken Inaoka^{1,2} (1Dept. Glob. Health, Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., 2Dept. Mol. Infect. Dyn., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ., 3Grad. Sch. Sc. Tech., Kyoto Inst. Technol., 4London Sch. Hyg. Trop. Med., 5Dept. Host Defens. Biochem., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

Campylobacter jejuni possesses a complex and highly branched electron transport chain (ETC) which is characterized by the absence of the classic NADH dehydrogenases of type 1 and 2. Therefore, the mechanism of NADH oxidation remains unclear in this pathogen. However, the genes of malate dehydrogenase (CjMDH) and malate: quinone oxidoreductase (CjMQO), two enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA), are conserved in the genome of *C. jejuni*. The CjMQO catalyzes the oxidation of malate to oxaloacetate and reduces the quinone pool in the ETC while the CjMDH reversibly catalyzes the oxidation of malate to oxaloacetate. The co-presence of both enzymes could potentially be redundant or play a specific function such as an alternative NADH oxidation system. This study is undertaken to verify the later hypothesis and provide the first biochemical characteristics of these two enzymes. Thus, CjMQO and CjMDH were purified in their active form as recombinant proteins and the first report of their biochemical features is provided in this study. The reconstitution of NADH oxidation in vitro was successful using purified CjMQO and CjMDH. Moreover, the CjMDH and CjMQO were found to be active in the lysate of *C. jejuni*. Interestingly, the malate-dependent NADH oxidation was detected in the lysate of *C. jejuni* which suggests that both enzymes could act as NADH oxidation systems in vivo.

P1-051/DP1-02-03

Tolerance to oxidative stress by sulfide; quinone oxidoreductase in *Mycobacterium smegmatis*

○松尾 祐一¹, 志波 智夫², 伊豫田 健次², 中井 宇響², 太田 明菜², 北 潔^{3,4}, 稲岡 健ダニエル^{3,5} (1熊本大院・生命科学研究部・生体情報解析学, 2京都工芸繊維大院・工学科学・応用生物学, 3長崎大院・熱帯医学グローバルヘルス研究科, 4長崎大・熱帯医学研究所・感染生化学, 5長崎大・熱帯医学研究所・感染分子ダイナミックス)

○Yuichi Matsuo¹, Tomoo Shiba², Kenji Iyoda², Uta Nakai², Akina Ota², Kiyoshi Kita^{3,4}, Daniel Ken Inaoka^{3,5} (1Dept. Health Sciences, Sch. Med., Kumamoto Univ., 2Dept. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., 3Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., 4Dept. Host-Defense Biochem., Inst. of Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ., 5Dept. Molecular Infection Dynamics, Inst. of Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ.)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the etiological agent of tuberculosis, is an extremely successful pathogen that adapts to survive within the host. Hydrogen sulfide enhances the growth of Mtb by activating oxygen respiration via sulfide; quinone oxidoreductase (SQOR). However, the biochemical features of MtbSQOR are unclear. In this study, enzyme kinetics and crystal structure of MtbSQOR were revealed by using recombinant MtbSQOR. In Proteobacteria, SQOR utilizes hydrogen sulfide, quinone, and sulfur acceptor as a substrate, and flavin adenine dinucleotide as a cofactor for electron transfer. However, the sulfur acceptor was unnecessary for MtbSQOR. And MtbSQOR structure at 2.18 Å demonstrated the active center, consisting of two cysteine residues, Cys-160 and Cys-338. Moreover, ¹⁶⁰Cys-S-S₄-S-³³⁸Cys bridge was confirmed by cocrystallization with hydrogen sulfide and ubiquinone-1. These results suggest that MtbSQOR may produce cyclo-octasulfur by polysulfide of cysteine. Understanding a physiological function of MtbSQOR, it was overexpressed in *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) lacking SQOR, evaluating the tolerance of oxidative stress by hydrogen peroxide. MtbSQOR contributed to resistance to oxidative stress in *M. smegmatis*. In conclusion, Mtb may produce cyclo-octasulfur as a sulfur product and resist oxidative stress in phagosome by SQOR.

P1-052/DP1-02-07

The Role of Morphological Adaptability in *Vibrio cholerae*'s Motility and Pathogenicity

○許 駿¹, 阿部 圭吾², 児玉 年央³, Marzia Sultana⁴, 久場 恵梨香¹, 角田 志悠¹, 中村 修一², 山城 哲¹ (1琉球大・医・細菌, 2東北大・工・応用物理, 3長崎大・医・熱研, 4Infectious Diseases Division, ICDDR, B.)

○Jun Xu¹, Keigo Abe², Toshio Kodama³, Marzia Sultana⁴, Erika Kuba¹, Shiyu Tsunoda¹, Shuichi Nakamura², Tetsu Yamashiro¹ (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, 2Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 3NEKKEN, Grad. Sch. Med., Nagasaki Univ., 4Infectious Diseases Division, ICDDR, B.)

Vibrio cholerae, the causative agent of cholera, is known for its remarkable adaptability, a crucial factor in its pathogenicity and impact on global health. This study aims to understand the morphological adaptability of *V. cholerae*, focusing on the differences in motility and pathogenicity between its filamentous and comma-shaped forms in diverse viscosity environments. Utilizing the *V. cholerae* O1 El Tor strain, we induced filamentous transformation and conducted a comparative analysis with its native form. Our methods included measuring movement patterns, swimming speeds, rotation rates, kinematics, and reversal frequencies, utilizing dark-field microscopy and high-speed imaging techniques. Our results show that filamentous *V. cholerae* maintains enhanced motility in viscous environments despite a reduction in swimming speed, suggesting an evolutionary adaptation for survival in varied habitats, including the human gastrointestinal tract. Notably, filamentous cells exhibited frequent reversal behavior at mucin borders, potentially aiding in mucus layer penetration. These insights into *V. cholerae*'s morphological flexibility in response to environmental viscosity emphasize the bacterium's complex survival and infection strategies, offering crucial information for understanding cholera dynamics and developing effective control strategies.

P1-053/DP1-02-08**Distinct roles of sheath proteins in coiling and rigidity reinforcement of *Leptospira* flagella**

○小泉 信夫¹, 川本 晃大², 栗林 稔樹³, 森田 昌知¹, 中村 修一³ (1)感染研・細菌第一, 2)阪大・蛋白研, 3)東北大院・応用物理)

○Nobuo Koizumi¹, Akihiro Kawamoto², Toshiki Kuribayashi³, Masatomo Morita¹, Shuichi Nakamura³ (1)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., 2)IPR, Osaka Univ., 3)Dept. Appl. Phys., Tohoku Univ.)

The flagella of *Leptospira* spp. exhibit a coiled shape when isolated, which is indispensable for bending cell ends. Leptospiral flagella are composed of a core filament and a sheath and the sheath contains at least three proteins, FcpA, FcpB, and FlaA. In this study, we addressed the role of each sheath protein in the formation of flagella in *L. biflexa*. Cryo-electron microscopy of flagella isolated from wild type strain showed the localization of the sheath formed by FcpA and FcpB proteins at the outside of the curved flagella. The lack of FlaA2 affected the asymmetric sheath localization of FcpA and FcpB, synthesizing straight flagella isotropically covered by FcpA and FcpB. Therefore, FlaA2 is an essential protein for controlling the localization of FcpA and FcpB and then generating the curve structure of PFs. The asymmetric localization of FcpA in the FcpB-deficient mutant curved the flagella, suggesting that FcpA is a major flagellar coiling protein. Though the FcpB-deficient mutant displayed unbent cell ends, the isolated FcpB-deficient flagella maintained the curvature as much as the wild-type flagella. Linear elastic theory predicted the decrease in stiffness of the FcpB-deficient flagella, suggesting that FcpB likely acts as a wedge to reinforce the stiffness of the flagella.

P1-054/DP1-02-09**Water flow triggers adhesion of gliding bacteria to solid surfaces**

○荒木 亘, 上村 直輝, 中根 大介 (電通大・基盤理工)

○Motomu Araki, Naoki Uemura, Daisuke Nakane (Dept. Eng. Sci., UEC)

Many bacteria belonging to the phylum *Bacteroidota*, adhere to and move over surfaces in a process called gliding motility. The gliding motility is unrelated to flagellar or pili, but instead relies on a novel mechanism, where the adhesive protein are propelled along a helical track on the cell surface. However, the physiological role of the gliding motility remains unclear. Here, we constructed a flow chamber connected with a syringe pump to apply a precisely controlled fluid flow, and observed the behaviors of *Flavobacterium johnsoniae*, a standard strain for the research on the gliding motility, under an optical microscopy. The cells adhered to the surface of the chamber efficiently at the flow speed of 100 $\mu\text{m/s}$, and exhibited positive rheotaxis at the cell velocity of 1 $\mu\text{m/s}$ with their longer axis parallel to the flow direction. The cell adhesion was triggered under low nutrient condition, and the surface protein SprB functioned without proton motive force as energy source. The flow-induced surface binding was also observed in another closely related bacterium of *Robiginitalea biformata*. These results provide insights into the role of gliding motility to seek for optimal growth environments in response to mechanical forces of fluid flow.

P1-055/DP1-02-10**An outer membrane protein governs cell rigidity and swimming stability of *Leptospira interrogans***

○中村 修一¹, 阿部 圭吾¹, 高崎 寛子², 廣瀬 未果², 高部 響介³, 加藤 貴之², 小泉 信夫³ (1)東北大・院工, 2)阪大・蛋白研, 3)感染研・細菌I)

○Shuichi Nakamura¹, Keigo Abe¹, Hiroko Takazaki², Mika Hirose², Kyosuke Takabe³, Takayuki Kato², Nobuo Koizumi³ (1)Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 2)IPR, Osaka Univ., 3)Dept. Bacteriol. I, NIID)

Leptospira interrogans is the major pathogen of the worldwide zoonosis leptospirosis and exhibits motility driven by two flagella residing within the periplasmic space of a spiral cell body. *Leptospira* spp. possess many kinds of outer membrane proteins (OMPs). The roles of some OMPs have been investigated, suggesting responsibilities for binding to host cell components and immune evasion, but most have not been unveiled. Here we focused on a prominently abundant OMP LipL32 and examined its deficit effect on *L. interrogans*. The swimming speed of the ΔLipL32 strain was almost the same as the wild type, whereas the long-term diffusive locomotion of ΔLipL32 was limited. A large fluctuation of the cell body angle was observed in the ΔLipL32 swimming. We also found that ΔLipL32 reduces the rigidity of the leptospiral cell body. These results suggest that the cell rigidity of *Leptospira* depends on LipL32 and its loss affects the swimming stability. Despite the pathogen-specific protein, the association of LipL32 with the *Leptospira* pathogenicity has not been elucidated. Environmental leptospires need migration to the host and penetration through complicatedly structured skin dermis. Taken together with the past insights, LipL32-dependent swimming stability and cell rigidity might be involved in the early stages of infection, assisting in confronting difficulties for the spirochetes.

P1-056/DP1-02-11**Correlation between morphological and motile traits indicated by artificial intelligence**

○高部 響介¹, 宇川 聡一², 小泉 信夫¹, 中村 修一² (1)感染研・細菌一, 2)東北大・院工・応物)

○Kyosuke Takabe¹, Souichi Ugawa², Nobuo Koizumi¹, Shuichi Nakamura² (1)Dept. Bacteriol. I, NIID, 2)Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Leptospira spp. are members of spirochetes, and the pathogenic species cause leptospirosis. It is believed that the motility of *Leptospira* spp., mainly 'crawling', is involved in the accomplishment of infection, but its practical role as a virulence factor remains unclear. During crawling, individual cells exhibit diverse morphological traits e.g., cell length, cell end curvature, etc. A deeper understanding of the crawling mechanism will extend our countermeasures for infectious disease. However, technical difficulties of quantitative measurements of the complicated motility in a high throughput manner have hampered elucidating the crawling dynamics. Here, we applied artificial intelligence (AI) to quantitative characterization of the shape and motility of crawling leptospires in combination with high-speed live imaging. Our model trained with dark-field microscopic images of leptospires detected crawling cells from the observed populations with high accuracy, enabling us to automatically measure morphological and motile traits of multiple cells at the single-cell level. Principal component analysis indicated that the crawling ability seemed to be a positive correlation, although rather weak, especially with the cell length. We are convinced that our method will accelerate bacterial motility studies and shed lights on underlying principles in the propulsive force generation.

P1-057/W3-3

Narrow space triggers flagellar wrapping of *Helicobacter pylori*

○横濱 さらら¹, 林原 絵美子², 島田 佳季³, 菅 哲朗³, 見理 剛², 中根 大介¹ (1電通大・基盤理工, 2感染研・細菌第二部, 3電通大・機械知能)

○Sarara Yokohama¹, Emiko Rimbara², Yoshiki Shimada³, Tetsuo Kan³, Tsuyoshi Kenri², Daisuke Nakane¹ (1Dep. Eng. Sci., UEC, 2Dept. Bacteriol II, NIID, 3Dep. Mech. Intell. Syst., UEC)

Swimming motility is crucial for *Helicobacter pylori* infection. The bacterium swim by rotating flagella on one side of its helical shape to reach the gastric mucosal surfaces. However, the detailed behavior of single bacterium at the host surface has not been observed. Recently, non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) has also attracted attention in gastric disease, showing diversity in flagellar polarity and twist of helical cell shape, but their role during the infection is unknown. Here, we fabricated a 2 μm thick microfluidic device that mimics the gastric surface. When *H. pylori* and *H. heilmannii*, a type of NHPH, were confined in the device, *H. pylori* passed smoothly through the narrow space, while *H. heilmannii* formed aggregates. High-precision optical microscopy revealed that this difference was due to flagellar wrapping of *H. pylori*. Unexpectedly, the motility advantage of *H. pylori* was reversed in higher viscous solution with *H. heilmannii* swimming three times faster than *H. pylori*. In addition, 40% of *H. heilmannii* showed flagellar wrapping, which was not observed at low viscosity. These results suggest that *H. pylori* and NHPH optimize their motility in different viscous environments to avoid competition at the host surface.

P1-058/W3-1

A Gram-positive bacterium induces Quorum Sensing in a Gram-negative bacterium

○杉本 翠¹, 佐野 千佳歩¹, 永久保 利紀^{2,3}, 野村 暢彦^{2,3}, 豊福 雅典^{2,3} (1筑波大院・生命地球科学研究群, 2筑波大・生命環境系, 3筑波大・微生物サステナビリティ研究センター)

○Sui Sugimoto¹, Chikaho Sano¹, Toshiki Nagakubo^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Masanori Toyofuku^{2,3} (1Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2Fac. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3MiCS (Microbiology Research Center for Sustainability), Univ. Tsukuba)

Quorum sensing (QS) is a type of bacterial communication that is driven by signaling molecules which regulates various genes. Gram-negative bacteria use acyl-homoserine lactone (AHL) while Gram-positive bacteria mainly use peptide signals. We have isolated ST-17, a Gram-positive bacterium, from a field in University of Tsukuba, that can induce the QS response of *C. violaceum*, a Gram-negative bacterium. Genome analysis indicates that ST-17 possesses both putative AHL degradation gene and synthesis gene that is distinct from the lux family. To gain insights into the signal molecule that ST-17 produces, we constructed a strain expressing a well characterized lactonase gene *aiiA*. When this gene was expressed in ST-17, the strain could not induce the QS response in *C. violaceum* anymore. The result suggested that ST-17 produces a signaling molecule with a lactone ring. We also show that the putative lactonase in ST-17 do degrade AHL. To date, there are only few reports showing that Gram-positive bacteria can induce the AHL signaling of a Gram-negative bacterium. Our results will provide new insights into interspecies bacterial communications. In further study, we will identify genes involved in the QS of ST-17.

P1-059/DP1-08-01

A lipoprotein involved in membrane vesicle-mediated iron acquisition in *Corynebacterium glutamicum*

○藤田 真愛¹, 永久保 利紀^{2,3}, 川島 花雪¹, 野村 暢彦^{2,3}, 豊福 雅典^{2,3} (1筑波大院・生命地球科学研究群, 2筑波大・生命環境系, 3筑波大・微生物サステナビリティ研究センター)

○Mao Fujita¹, Toshiki Nagakubo^{2,3}, Kayuki Kawashima¹, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Masanori Toyofuku^{2,3} (1Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2Fac. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3MiCS (Microbiology research Center for Sustainability), Univ. Tsukuba)

Membrane vesicles (MVs), which are mainly composed of lipid bilayers and proteins, are released by bacteria and have diverse biological functions. Although MV-mediated cargo delivery has the potential in applications in the fields of medicine and biotechnology, the molecular mechanisms by which bacterial cells receive MVs have remained elusive. In this study, we used *Corynebacterium glutamicum*, a model organism of diderm mycolic acid-containing bacteria, to elucidate the mechanism of MV uptake in this bacterial group.

In our previous study, we found that MVs of *C. glutamicum* have iron adsorption activity and these MVs can transfer iron among *C. glutamicum* and related species (*Rhodococcus* and *Mycobacterium*) (Kawashima et al. Microbiology Spectrum 2023). Here, we show that in-frame deletion of a gene whose transcription level was altered upon the addition of MVs led to the limited utilization of MV-associated iron. We also conducted an immunological detection of the gene product, with a predicted lipoprotein secretion signal peptide, by western blotting, and the result suggests that it is mainly localized at lipid membrane. For mechanistic insights into the MV-mediated iron transfer, we are currently analyzing the interaction between the above gene product and MVs.

The results of this study may lead to a new MV-based methodology for controlling mycolic acid-containing bacteria.

P1-060/DP1-08-02

ボツリヌス菌・スポロゲネス菌の運動及び走化性能の解析

○西山 宗一郎, 小池 祥平, 岩橋 菜桜 (新潟薬科大・応用生命・食品安全学)

Chemotaxis and motilities of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*

○So-ichiro Nishiyama, Shohei Koike, Nao Iwahashi (Fac. App. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Med. 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、少なくともうち一部の菌種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、毒素非産生性代替菌であるスポロゲネス菌 *C. sporogenes* は、周毛性のべん毛を有し、運動や走化性を担う遺伝子群をもつ。また、走化性のセンサーである走化性受容体ホモログも 30 種前後備えている。本研究では *Clostridium* 属細菌の病原性と走化性の機能相関を見出すことを目的として、当該菌の運動や走化性能の解析を行った。まずは扱いやすいスポロゲネス菌を用い、走化性能の観察に適した培地条件を検討した。標準培地を段階希釈した軟寒天培地を用い、走化性の指標であるスウォーム（遊走）の観察に成功した。走化性候補物質を含有した寒天プラグを用いたアッセイにより、菌は数種のアミノ酸に対し誘引応答を示した。この実験条件を適用し次にボツリヌス菌の解析を行った。異なる毒素タイプの複数菌株を試し、遊走しない菌株もあったが、多くが良好なスウォーム像を呈した。並行してゲノム情報からのアプローチも行った。まずコレラ菌の既知のアミノ酸走化性受容体と、スポロゲネス菌・ボツリヌス菌の受容体で配列比較を行い、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ものをそれぞれ数種見出し、遺伝子クローニングを行った。次に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応答解析を行った。結果、数種のキメラ受容体が複数のアミノ酸への走化性応答を媒介した。以上の結果から、本研究によりスポロゲネス菌・ボツリヌス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。

P1-061/DP1-08-03**Chlamydia trachomatis が感染細胞内で利用する MAPK および PI3K-AKT 経路に付随する新たな標的分子の探索**

○黒岩 青空, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

Exploration of target molecules involved in the MAPK and PI3K-AKT pathway used by C. trachomatis

○Sora Kuroiwa, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

性感染症の主な原因菌である *Chlamydia trachomatis* は、エネルギー源の ATP を感染細胞に依存する偏性細胞内寄生性細菌である。しかし、感染細胞内で利用している情報伝達経路やその標的分子は、未だ遺伝子改変が自由にできないこともありその全容は明らかになっていない。一方、私達は、*Chlamydia trachomatis* L2/434/Bu 株 (Ct) が細胞内で増殖する際に、通常酸素環境 (21%O₂) では炎症応答に関与する MAPK 経路を、低酸素環境 (2%O₂) では解糖系の活性化と細胞の生存性の維持を司る PI3K-AKT 経路を利用していることを明らかにした (Thapa ら, *Microbes Infect*, 2020., Thapa ら, *Front Cell Infect Microbiol*, 2022.)。そこで、MAPK および PI3K-AKT 経路に関与する詳細な分子機構を明らかにするために、阻害剤パネルを用いたスクリーニングを行い、その結果から Ct が細胞内増殖の際に利用する両経路に付随する新規分子の探索を試みた。阻害剤のスクリーニングには MAPK (234 薬剤) および PI3K-AKT (319 薬剤) 阻害剤パネル (TargetMol) を使用し、両経路の阻害剤存在下における Ct の生菌数を IFU assay にて算出したところ、酸素分圧に関わらず Ct の細胞内増殖は有意に抑制された。また、その結果から得られた阻害効果のパターンを主成分分析にて可視化することで、チロシンキナーゼのアダプター分子が Ct の細胞内増殖に重要な働きをしている可能性が示唆された。そこで、両経路のすぐ上流に位置するアダプター分子 "Gab2" に着目し、ウェスタンブロッティングや siRNA によるサイレンシングにて検証したところ、興味深いことに Gab2 の細胞内発現量は、Ct 感染に伴い顕著に減少した。(非会員共同研究者: 高橋小夏, 中村徳香)

P1-062/DP1-08-04**青枯病菌 OE1-1 株において 2 つの Fur は鉄に応答して異なる作用機序ではたらく**

○館田 宇宙, 植山 竜弥, 木場 章範, 大西 浩平, 曳地 康史, 都筑 正行 (高知大・農林海洋)

Distinct iron-responsive regulation by Fur1 and Fur2 in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1

○Sora Tateda, Tatsuya Ueyama, Akinori Kiba, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Masayuki Tsuzuki (Fac. Agric. and Mar. Sci., Kochi Univ.)

350 種の植物種に萎凋症状をもたらす土壌生息性グラム陰性細菌 *Ralstonia solanacearum* species complex (青枯病菌) は、鉄欠乏の土壌環境と鉄豊富な植物体内で適切に遺伝子を発現する必要がある。これまでに、ゲノム情報を基にした系統解析から、青枯病菌は、金属結合領域を有する転写制御因子 Ferric uptake regulator (Fur) として、特徴的に 2 つの Fur のパラログ, Fur1 と Fur2 を有することを報告した。本研究では、青枯病菌 OE1-1 株の、鉄に応答した 2 つの Fur の遺伝子発現制御における使い分けの機序の解明を目的とした。二価鉄 (Fe²⁺) 存在下と非存在下それぞれで培養した fur1 遺伝子 (*fur1*) 欠損株と fur2 遺伝子 (*fur2*) 欠損株のトランスクリプトームを解析したところ、シデロフォア産生関連遺伝子の発現に関して、Fur1 が Fe²⁺ 存在下における抑制に必要であった。一方、いずれの培養でも Fur2 の影響は小さかった。シデロフォア産生を含む一部の鉄獲得に関連する遺伝子のの上流には、大腸菌において Fur が結合すると報告されている Fur box 配列が存在した。また、Fe²⁺ 存在下で上昇する、主要な菌体外多糖 EPS I や植物細胞壁分解酵素の産生に関わる一部の病原力関連遺伝子のの上流には Fur box 配列は認められなかったが、それらの発現は、Fe²⁺ 存在下において *fur1* 欠損によって有意に低下する一方、Fe²⁺ 非存在下で *fur2* 欠損によって有意に上昇した。これらの結果から、OE1-1 株において 2 つの Fur は鉄に応答して異なる作用機序を示すことが明らかとなった。すなわち、Fe²⁺ 存在下の Fur box 配列を介した Fur1 による抑制に加えて、Fe²⁺ 存在下で Fur1 が誘導に、Fe²⁺ 非存在下で Fur2 が抑制に関与する Fe²⁺ に応答した発現制御が存在した。

P1-063/DP1-08-10**Phase variable regulation of surface structures by promoter inversions in *Bacteroides vulgatus***○Emmanuel Munyeshyaka¹, 今大路 治之¹, Nafisa Tabassum¹, 多田 彩乃¹, 山崎 尚², 桑原 知巳¹ (¹香大・医・分子微生物, ²兵庫医大・生物)○Emmanuel Munyeshyaka¹, Haruyuki Imaohji¹, Nafisa Tabassum¹, Ayano Tada¹, Hisashi Yamasaki², Tomomi Kuwahara¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., ²Dept. Biology., Hyogo Med. Univ.)

Bacteroides is one of the predominant groups among human intestinal microbiota. Distinctively, this group characterized by phase variable regulation of various surface structures, such as capsular polysaccharides and outer membrane proteins. We identified the genetic loci in *B. vulgatus*, where tyrosine recombinases (Tsr) encoded by BVU2677 and BVU2684 regulate promoter inversions (ON/OFF switch) of the gene clusters that are predicted to involve in the synthesis of extracellular polysaccharides (EPS) and pili-like structures (Mfa family), respectively. The genetic deletion of either one *tsr* gene had no effect on both promoter inversions. However, simultaneous deletion of two *tsr* genes ameliorated the promoter inversions in both regions, indicating the cross-reactivity of these Tsr to the distantly located promoters. Immunostaining of the *tsr*-mutant strains with antibody against Mfa1 family of outer membrane fimbrial anchor protein encoded by BVU2679 showed that the expression of BVU2679 exclusively controlled by promoter inversions located upstream of this gene. Mutant strain expressing the fimbrial proteins promoted aggregative adhesion and proinflammatory phenotype to colonic epithelial cell. These results indicate that the phase variation of these loci associate with symbiotic/dysbiotic phenotype of *B. vulgatus*.

P1-064/DP1-08-11**ペプチドグリカン合成に関わる乳酸菌 *murE* の大腸菌へのクローニングと形質転換体の性状**

○野口 翔, 尾之上 さくら, 川原 一芳 (関東学院大・理工・生命科学)

Cloning of *murE* of PG synthesis from lactic acid bacteria to *E. coli* and characters of transformants

○Sho Noguchi, Sakura Onoue, Kazuyoshi Kawahara (Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

【目的】乳酸菌ペプチドグリカン (PG) のペプチド鎖第 3 位には、菌種によりジアミノピメリン酸 (DAP) あるいはリシン (Lys) が含まれている。また、一部の菌種にはオルニチンが含まれることも知られている。これらのジアミノ酸は PG のペプチド鎖架橋に重要であるが、なぜ近縁の菌種でこのような違いがあるのか不明である。本研究では、それぞれのジアミノ酸が各菌種に必須なのか、あるいは相互に変更が可能なのかを検討するための最初の段階として、ペプチド鎖合成時にジアミノ酸を転移する酵素の遺伝子 *murE* を乳酸菌からクローニングして、大腸菌へ導入し、生育速度などへの影響を調べた。【方法と結果】*Lactiplantibacillus plantarum* (PG : DAP 型), *Levilactobacillus brevis* (PG : Lys 型), *Fructibacillus fructivorans* (PG : Lys 型) から抽出した DNA をもとに、PCR 法により各菌株の *murE* のプロモータを含めた領域を増幅し、pUC118 に組み込み、*E. coli* DH5α 株へ導入し、形質転換体を得た。インサート DNA については塩基配列を調べ目的の遺伝子であることを確認した。これら形質転換体の生育速度を調べた結果、*L. brevis* あるいは *F. fructivorans* 由来 *murE* を導入した菌株では、生育速度に変化は見られなかったが、*L. plantarum* 由来 *murE* を導入した菌株では生育速度の減少が確認された。次に、形質転換体の細胞膜画分を SDS 処理し不溶画分を粗 PG とし、含まれるアミノ酸を N-トリフルオロアセチルブチルエステル誘導体として GC-MS で分析したところ、元株と比較してアミノ酸組成に顕著な変化は見られなかった。今後プラスミドを改良して *murE* の発現量を増やし、生育速度や PG の変化を再度調べる予定である。

P1-065/W3-2

大腸菌由来の細胞外小胞による A 群レンサ球菌の細胞分裂障害機構の解明

○河岸 優, 村瀬 一典, 中川 一路 (京大・医・微生物感染症)

Cell division defect in Group A Streptococcus caused by E. coli-derived extracellular vesicle

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

細胞外小胞 (Extracellular vesicle: EV) は細菌が細胞外へ放出する 20-400 nm の球状の構造体であり, 細菌間のコミュニケーション等において重要な役割を果たすことが知られている。先行研究において, 我々は, 大腸菌由来の EV が A 群レンサ球菌 (Group A Streptococcus; GAS) の増殖を抑制し, 隔壁の多重形成を特徴とする細胞分裂障害を引き起こすことを発見した。本研究では, この分裂障害機構を解明し, 異なる菌種間で EV が介在する生理的機能を明らかにすることを目的とする。細菌の細胞分裂はチューブリンホモログである FtsZ が細胞中央で重合し, Z-ring と呼ばれるリング状の構造体を形成することで開始する。初めに, FtsZ と mNeonGreen の融合発現株を作製し, EV 処理時における菌体の Z-ring の形成・局在について, 共焦点顕微鏡を用いて観察した。非処理細胞では, 単一の Z-ring が細胞中央に局在するのに対し, EV 処理条件では, 複数の Z-ring が近接して局在し, 多重の分裂環形成が確認された。さらに, EV 処理から細胞分裂障害が起こるまでのプロセスを明らかにするため, タイムラプス解析を行ったところ, 不完全な細胞伸長・分離を伴う細胞分裂が繰り返されていることが明らかとなった。また, d-アミノ酸蛍光プローブ HADA を用いて新しく合成される peptidoglycan (PG) を標識し, PG 合成に対する EV の影響についても観察した。非処理細胞では HADA は隔壁 PG 合成と共に取り込まれ, 表層 PG 合成の進行に伴い細胞表層全体に拡散する。一方, EV 処理細胞では, HADA は隔壁部分に蓄積し表層への局在は見られなかった。以上の結果から, EV は GAS の PG remodeling を阻害することで, 細胞分裂障害を引き起こすと考えられる。

P1-066/DP1-08-12

腸内細菌共通抗原フリッパーゼ wzxE は植物環境における大腸菌の増殖に必要である

○山口 咲季, 石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡大院・医歯薬・分子生物学)

Enterobacterial common antigen flippase wzxE is required for E. coli survival in plant environment

○Saki Yamaguchi, Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

大腸菌は糞尿を用いた有機肥料で育てられた野菜に付着し, ヒトに摂取された際に食中毒を引き起こす。大腸菌は植物へ定着できることは知られているが, 植物上での生存に必要な大腸菌の遺伝子は明らかになっていない。そこで本研究では植物環境での増殖・生存に必要な大腸菌遺伝子を同定することを目的とし, 野菜ジュースを原料とした植物環境を模倣した培地 (V8 培地) を用いて, 増殖能が低下した大腸菌遺伝子欠損株の探索を行った。その結果, 野生株と比較して V8 培地での増殖能が低下する遺伝子欠損株として $\Delta wzxE$ 株が得られた。V8 培地の主成分であるトマト果実においても, $\Delta wzxE$ 株は野生株に比べて生菌数が低下した。次に, トマト果実と V8 培地が弱酸性であることに着目し, $\Delta wzxE$ 株の pH 感受性の検討を行った。pH5.5 に調整した LB 培地で $\Delta wzxE$ 株の増殖能低下がみられたこと, ならびに, pH7.0 に調整した V8 培地では $\Delta wzxE$ 株の増殖能低下がみられなかったことから, $\Delta wzxE$ 株は低 pH へ感受性を示すことが明らかとなった。wzxE は腸内細菌共通抗原 (ECA) である多糖類を内膜の細胞質側からペリプラズム側へ転換させるフリッパーゼをコードする。ECA フリッパーゼ欠損株では ECA 中間体の蓄積が細胞死を引き起こす。そこで, wxzE に加えて ECA 中間体の合成酵素をコードする wecF を欠損させた二重欠損株を作製したところ, $\Delta wzxE$ 株の低 pH への感受性が失われた。以上の結果は, wxzE が低 pH 条件での ECA 中間体による毒性を抑えることにより, トマトなどの植物環境での大腸菌の増殖を促進していることを示唆している。

P1-067/DP1-08-13

Characterization of novel actin-like protein Mad28 involved in magnetosome positioning

○下茂 梨乃¹, 田岡 東^{2,3} (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)

○Rino Shimoshige¹, Azuma Taoka^{2,3} (1Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., 2Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., 3NanoLSI, Kanazawa Univ.)

Magnetotactic bacteria (MTB) synthesizes membrane-enclosed magnetic organelles called magnetosomes. Interestingly, actin-like cytoskeletal filaments associate with the magnetosome and organize magnetosome positioning in MTB cells. MamK is a well-characterized magnetosome-associated actin-like protein conserved in genomes of all known MTB. On the other hand, MTB belonging to phyla *Nitrospirota* and *Thermodesulfobacteriota* have another putative actin-like protein, Mad28, in addition to MamK. Mad28 has conserved motifs in the actin superfamily. However, at present, no biochemical characterization has been reported to understand the cytoskeletal properties of Mad28. In this study, we expressed *Solidesulfobrio magneticus* RS-1 Mad28 in *Escherichia coli* and purified depolymerized Mad28 using ammonium sulfate precipitation and gel filtration. According to the pelleting assay, the purified Mad28 showed polymerization activity in an ATP-dependent manner. Furthermore, we analyzed the Mad28 polymerization process using light scattering assay and high-speed atomic force microscopy. We will discuss the biochemical properties of this novel actin-like protein from MTB.

P1-068/DP1-08-14

Analysis of subcellular localization of FtsZ in bacteria with the minimum genome

○清水 大輝, 林 匡史, 塩見 大輔 (立教大・理・生命理)

○Daiki Shimizu, Masafumi Hayashi, Daisuke Shiomi (Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ.)

JCVI-syn3.0 is an artificially synthesized bacterium with a minimum genome at Craig Venter Institute. Adding 19 genes including *ftsZ* and *sepF* to JCVI-syn3.0 genome reduced the cell size to some extent uniformly and increased the growth rate. This strain was named JCVI-syn3B. Since FtsZ is involved in cell division and a main component of the Z ring formed at the division site and SepF assists the localization of FtsZ, these two genes may be involved in cell morphological change and increasing the growth rate of JCVI-syn3B. However, the role of FtsZ and SepF in JCVI-syn3B has not been clarified. In this study, FtsZ-GFP was expressed in syn3.0. However, the protein was diffused throughout the cells. Then, *ftsZ*, *sepF*, and 5 other genes of JCVI-syn3B were transferred to JCVI-syn3.0. We confirmed that the localization of FtsZ was observed as foci in this strain as same as JCVI-syn3B, meaning any of these 7 genes is involved in the localization of FtsZ. Next, to identify which of these 6 genes is important for the localization of FtsZ, we introduced the constructs in which each gene was not expressed into JCVI-syn3.0 and the subcellular localization of FtsZ was observed in each strain. Only when *sepF* was not expressed, the localization of FtsZ was diffused throughout the cells. This suggests that the minimum component for the localization of FtsZ is SepF in JCVI-syn3B.

P1-069/W3-5**Reconstitution of *Haloplasma contractile* cell wall in JCVI-syn3.0**

○笠井 大司¹, 加藤 真悟², 塩見 大輔¹ (1立教大・理・生命理, 2理研・バイオリソース・微生物材料)

○Taishi Kasai¹, Shingo Kato², Daisuke Shiomi¹ (1Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ., 2JCM. BRC. RIKEN)

Haloplasma contractile was classified in the class *Mollicutes* that generally lacks a cell wall. The *H. contractile* genome contains the division and cell wall synthesis (DCW) gene cluster, which is conserved in almost all bacteria. The existence of the cell wall of *H. contractile* has not been confirmed. In the present study, we analyzed the cell wall synthesis pathway of *H. contractile*. First, we stained the *H. contractile* with wheat germ agglutinin conjugated with Alexa Fluor-488 (WGA-488) which binds to N-acetylglucosamine in the cell wall. The cells were labeled with WGA-488, suggesting that *H. contractile* cells have a cell wall. However, the gene manipulation technique in *H. contractile* has not been established. We attempted to reconstitute the cell wall synthesis pathway in JCVI-syn3.0 which is a bacterium with a minimal genome. JCVI-syn3.0 carrying the DCW cluster was labeled with WGA-488 and the fluorescent particles appeared in the culture. These particles were thought to be cell wall precursors released from cells because the DCW cluster did not contain genes involved in the anchoring of cell wall to the cell membrane. We introduced other cell wall synthesis genes into JCVI-syn3.0. Many of these cells were labeled with WGA-488. This result suggests that the cell wall-less bacteria acquired the cell wall synthesis ability.

P1-070/DP1-08-18**The route of intrabacterial nanotransportation system for VacA in *Helicobacter pylori***

○呉 紅¹, 藤岡 良彦¹, 岩井 伯隆², 坂口 翔一¹, 鈴木 陽一¹, 中野 隆史¹ (1大阪医薬大・医・微生物学・感染制御学, 2東工大・生命理工・生命理工)

○Hong Wu¹, Yoshihiko Fujioka¹, Noritaka Iwai², Shoichi Sakaguchi¹, Youichi Suzuki¹, Takashi Nakano¹ (1Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ., 2Grad. Sch. Biosci. & Biotechnol, Tokyo Inst. of Tech.)

Helicobacter pylori possesses an intrabacterial nanotransportation system (*ibNoTS*) responsible for transporting VacA, CagA, and urease within the bacterial cytoplasm. This system is regulated by the extrabacterial environment. Although the transport routes of the system for VacA have not been extensively studied, our immunoelectron microscopy demonstrated that VacA closely localizes with MreB in the bacterium. However, in *H. pylori* treated with the MreB polymerization inhibitor A22, VacA did not localize closely to MreB compared with non-A22-treated *H. pylori*. Furthermore, A22 obstructs the transport of VacA by *ibNoTS*. Using the freezing and thawing method, we found that VacA closely localizes with the MreB filament by immunoelectron microscopy. These findings suggest a close association between the route of *ibNoTS* for VacA and the MreB filament. No such phenomena were observed in the urease transport by *ibNoTS*, whose route was found to be associated with another filament (FtsZ) as previously suggested. These results indicate that the route of *ibNoTS* for VacA differs from that for urease which previously suggested. We propose that the route of *ibNoTS* for VacA is associated with the MreB filament in *H. pylori*.

P1-071/W3-4**Exploring Another Transition State of MFS-Type Drug Efflux Transporter MdfA in the Transport Cycle**

稲葉 (井上) 理美^{1,2}, 守屋 俊夫¹, 田辺 幹雄¹ (1高エネ機構・物構研・構造生物, 2北大・先端生命)

Satomi Inaba-Inoue^{1,2}, Toshio Moriya¹, Mikio Tanabe¹ (1SBRC., IMSS, KEK, 2Fac. Adv. Life. Sci., Hokkaido Univ.)

Multidrug efflux transporters transport antimicrobial agents and toxic substances out of the cell, rendering bacteria resistant to various compounds. Major Facility Superfamily (MFS)-type multidrug efflux transporters are known to transport substrates across the membrane through at least three steps: 1) substrate binding, 2) conformational change leading to the re-orientation of the substrate binding site, and 3) substrate release. These steps are thought to be a common mechanism in all MFS-type drug efflux transporters. Although individual steps have been characterized in several genetic, biochemical, structural, and simulation experiments, the understanding of these concerted movements in the transport cycle still needs to be improved. In this study, to bridge the gap between these three steps and further understand their dynamics and interactions with membranes. We aim to obtain another conformational state of the MFS-type multidrug efflux transporter MdfA in the membrane environment that more closely mimics its natural state using antibody fragments in combination with single-particle analysis using cryo-EM.

P1-072/W3-7**Characterization of a novel pneumococcal ABC transporter involved in antibiotic efflux**

○田口 厚志^{1,4}, 藤田 純三², 田辺 幹雄³, 高谷 大輔⁴, 福澤 薫⁴, 難波 啓一², 西野 邦彦^{1,4} (1阪大・産研, 2阪大・生命機能研究, 3高エネ研・構造生物, 4阪大・薬)

○Atsushi Taguchi^{1,4}, Junso Fujita², Mikio Tanabe³, Daisuke Takaya⁴, Kaori Fukuzawa⁴, Keiichi Namba², Kunihiko Nishino^{1,4} (1SANKEN, Osaka Univ., 2Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ., 3SBRC, KEK, 4Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Multidrug efflux pumps play a major role in antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, but how Gram-positive bacteria utilize these membrane transporters remains poorly characterized. To identify membrane transporters involved in antibiotic resistance in the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, we constructed pneumococcal strains that overexpress putative efflux pumps and screened these strains against a panel of representative antibiotics. In this screen, we identified a previously uncharacterized ABC transporter that contributed to elevated resistance against a cell wall active antibiotic. Heterologous expression of this transporter in *Escherichia coli* resulted in a similar increase in resistance, suggesting that it does not require other pneumococcal proteins for its function. To understand the molecular basis for substrate transport, we reconstituted this transporter in proteoliposomes and found that the ATPase activity is not affected by the presence of the putative substrate. We succeeded in obtaining cryo-EM structures of the inward- and outward-facing conformations, which provide insight into the structural basis of substrate recognition. Together, this work advances our understanding of membrane transporters in Gram-positive bacteria.

P1-073/DP2-20-08

Static cultivation induces avirulent phase conversion in *Bordetella bronchiseptica*

○Xingyan Ma¹, Nugraga Dendi Krisna¹, 堀口 安彦^{1,2} (1阪大微研, 2阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Xingyan Ma¹, Nugraga Dendi Krisna¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (1RIMD, Osaka Univ., 2CiDER, Osaka Univ.)

Bordetella bronchiseptica, a respiratory pathogen, exhibits the phenotypic conversion between the virulent Bvg⁺ phase and the avirulent and low-nutrient demanding Bvg⁻ phase. This phase conversion, which may represent an environmental adaptation of the bacteria, is regulated by the BvgAS two-component system, or spontaneously occurs by a mutation of BvgS sensor kinase. The mutations on *bvgS* reportedly occur with a frequency of 10⁻⁶ to 10⁻³. However, in the present study, we show that ~80% of the bacteria convert from Bvg⁺ to Bvg⁻ after a 48-h static incubation but not a 48-h shaking incubation. This conversion resulted from the mutations of varied regions on *bvgS*. Bvg⁻ phase bacteria directed by the BvgAS system did not exhibit *bvgS* mutations after the static incubation. When a wild-type strain was co-cultured with a Bvg⁻ phase-locked mutant under static conditions, the former was out-competed by the latter, indicating that the Bvg⁻ phase is better adapted to static culture conditions than the Bvg⁺ phase. Furthermore, we found that a mutant strain deficient in RpoN (σ^{54}), did not generate Bvg⁻ mutants even after 48-h static cultivation. Collectively, we consider that the mutational conversion to the Bvg⁻ phase may result from their adaptation to static conditions. RpoN is likely involved in this phenomenon. We are now elucidating the role of RpoN in this phenomenon.

P1-074/DP2-20-09

Color tuning mechanism of the L/Q switch in Green- and Blue-absorbing proteorhodopsin

○錦野 達郎¹, 杉本 哲平¹, 神取 秀樹^{1,2} (1名工大・院工・工, 2名工大・オプトバイオテクノロジー)

○Tatsuro Nishikino¹, Teppei Sugimoto¹, Hideki Kandori^{1,2} (1Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Tech., 2OptoBio Tech. Res. Cent., Nagoya Inst. of Tech.)

Rhodopsin is a protein family that binds a retinal as chromophore in seven transmembrane helices. Photoisomerization of the retinal chromophore induces conformational changes in rhodopsin to perform its diverse functions. Proteorhodopsin (PR) is a light-driven proton pump found in marine bacteria. PR is classified into blue-absorbing (BPR, λ_{max} ~ 490 nm) and green-absorbing (GPR, λ_{max} ~ 525 nm) forms, which functions in deep and shallow ocean waters, respectively. BPR and GPR are discriminated by the "color switch" residue at position 105; Gln in BPR and Leu in GPR. Although Gln and Leu are hydrophilic and hydrophobic residues, respectively, absorptions of the 19 replacement mutants at L105 in GPR were correlated with the volume at position 105, not hydrophobicity (Ozaki et al. 2014). Here we applied FTIR spectroscopy to GPR, L105Q mutant GPR, and BPR to clarify the color-tuning mechanism. Light-induced difference FTIR spectra were measured at 77 K, and the obtained spectra were compared with each other. We found that distortion and hydrogen-bond of the retinal chromophore were changed by the L-to-Q mutation. Hydrophobicity around the retinal was also changed in those proteins. We will discuss the structural elements controlling their colors.

P1-075/DP2-20-10

大腸菌の細胞外アミロイド産生における GrpE の必須性の解析

○藤田 かのん¹, 奈良 萌子¹, 大瀧 琴音¹, 重盛 林太郎¹, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (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慈恵医大・アミロイド制御研)

Analysis of essentiality of GrpE in the production of extracellular amyloids in *E. coli*

○Canon Fujita¹, Moeko Nara¹, Kotone Ohtaki¹, Rintaro Shigemori¹, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Regulation, Jikei Univ. Sch. Med.)

Curliは大腸菌のバイオフィーム形成に重要な役割を果たす細胞外アミロイド線維である。Curliの主要成分であるCsgAは、翻訳後、Sec経路によってペリプラズムに輸送され、外膜に局在するCsgG輸送体によって菌体外へ分泌される。これまでに我々は、(1)分子シャペロンDnaKがCurliの産生に必須であること、(2)DnaKが細胞質でのCsgAの凝集を抑制し、ペリプラズムへの輸送を助けること、(3)DnaKと協調して働く3つのJドメインタンパク質のうちDnaKとCbpAがCurli産生において相補的に機能することを報告した (Sugimoto et al. **Commun. Biol.** 2018, Sugimoto et al. **J. Mol. Biol.** 2021)。本研究では、DnaKのヌクレオチド交換因子であるGrpEのCurli産生における必須性を検討した。

大腸菌 C600 (野生株) と DA259 (*grpE* 欠損株) を Congo Red 含有寒天培地上で培養し、Curliの産生を評価した結果、野生株のコロニーのみがアミロイド線維に特徴的な赤色を呈した。プラスミドを用いて *grpE* を相補したが、*grpE* 欠損株の Curli の産生は回復しなかったことから、*grpE* 欠損株のゲノム上に *grpE* 以外の遺伝子の変異や欠損が存在する可能性が示唆された。PCR および次世代シーケンス解析で Curli 関連遺伝子の存在の有無を調べたところ、*csgABCDEF* の欠損が判明した。そこで、*CsgABCDEF* 共発現プラスミドを *grpE* 欠損株に導入し、Curliの産生を評価した結果、Curliの産生が認められた。また、GrpEに結合できないDnaK変異体発現プラスミドを *dnaK* 欠損株に導入すると Curli の産生が回復した。以上より、DnaKはCurliの産生に必須だが、GrpEは必須ではないことが判明した。本知見はGrpE非依存的なDnaKの生理機能を示唆するものである。

P1-076/DP2-20-11

大腸菌ゲノムに存在する GrpE 遺伝子欠損時に致死性を発揮するエレメントの探索

○大瀧 琴音¹, 奈良 萌子¹, 重盛 林太郎¹, 藤田 かのん¹, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (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慈恵医大・アミロイド制御研)

Screening for lethal elements in the GrpE gene deletion in the genome of *E. coli*

○Kotone Otaki¹, Moeko Nara¹, Rintaro Shigemori¹, Canon Fujita¹, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Regulation, Jikei Univ. Sch. Med.)

分子シャペロン DnaK のヌクレオチド交換因子 GrpE は大腸菌の生存に必須とされている。しかし、大腸菌 C600 株をもとに作製された DA259 株は、例外的に *grpE* を欠損しているのに関わらず、30°C 付近の温度で生育可能である。これまでの研究により、DA259 株には *grpE* 以外の遺伝子の欠損や変異が存在し、そのことによって必須遺伝子である *grpE* を欠損しても生育できることが示唆されている。本研究では、DA259 株が欠損していると予想される *grpE* 欠損時致死性発揮エレメント (LEGEND: lethal elements in the GrpE gene deletion) を探索し、大腸菌における GrpE の必須機能の解明につなげることを目的とする。

まず、DA259 株のゲノム解析を実施し、データベースに登録されている C600 株のゲノムと比較した。その結果、DA259 株のゲノムにおいて、8カ所の欠損領域 (0.1~23 kb) と 177カ所の一塩基置換を見出した。次に、これらの欠損領域をそれぞれ PCR で増幅し、アンピシリン耐性マーカーを持つプラスミドに連結した後、DA259 株をエレクトロポレーションで形質転換した。その結果、Rac プロファージをコードする領域 (LEGEND-1) を含んだプラスミドを用いた場合に形質転換効率が著しく低いことがわかった。一方、C600 株ではこのプラスミドを用いて多くの形質転換体が得られた。また、LEGEND-1 と *grpE* を連結したプラスミドを用いた場合も DA259 株の形質転換体が多く得られた。さらに、LEGEND-1 に含まれる遺伝子を部分的に欠損させたプラスミドを用いた形質転換実験により、*racR*, *ydaG*, *ydaF*, *recT*, および *sieB* と *kilR* 間のノンコーディング領域が DA259 株において致死性を発揮する上で重要な役割を果たすことが明らかとなった。

P1-077/DP2-20-12

分子シャペロン DnaK のヌクレオチド交換因子 GrpE の大腸菌の生存に必須な細胞機能の解明

○重盛 林太郎^{1,2}, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (1慈恵医大・医・細菌, 2慈恵医大・バイオフィーム研究センター, 3慈恵医大・アミロイド制御研)

Elucidation of an essential cellular function of GrpE for survival of *E. coli*

○Rintaro Shigemori^{1,2}, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Reg., Jikei Univ. Sch. Med.)

DnaK は ATPase 活性を有し、基質タンパク質のフォールディングを担う分子シャペロンである。DnaK のヌクレオチド交換因子 GrpE は、ATP 加水分解によって生じた ADP 結合型 DnaK から ADP と基質タンパク質を解離させる。興味深いことに、DnaK は大腸菌の生存に必須ではないが、GrpE は必須である。本研究では、これまで未解明であった大腸菌における GrpE の必須機能の解明を目指した。まず、ATP 依存性プロテアーゼ ClpXP が認識する SsrA-tag 遺伝子が大腸菌 *clpP* 欠損株の *grpE* の 3'末端に挿入した株 (BW25113 $\Delta clpP$ *grpE-ssrA*) を作製した。この株を、アラビノース誘導プロモーター下流に *clpXP* を連結したプラスミド (pBAD-ClpXP) を用いて形質転換し、アラビノースの添加によって強制的に GrpE を分解する protein knockdown (PKD) 株を作製した。本株を 0.2% アラビノース添加 LB 培地で培養すると、10 分以内に細胞内 GrpE が完全に分解された。ライゼンリングの結果、0.2% アラビノース添加後 1 時間以内に PKD 株の細胞伸長が確認され、数時間から 24 時間で細胞膜が破綻して死滅する様子が観察された。一方、 $\Delta clpP$ pBAD-ClpXP 株や空ベクターを導入した $\Delta clpP$ *grpE-ssrA* 株では正常な細胞分裂が観察された。また、PKD 株に野生型 GrpE、または DnaK と相互作用できない変異型 GrpE^{G122D} を発現させたところ、どちらの場合も正常に分裂・増殖した。以上より、大腸菌は GrpE が分解されると DnaK 非依存的に細胞分裂が阻害され、続いて細胞膜の恒常性が破綻し、死滅することがわかった。現在、PKD 株をもとに GrpE が分解されても死滅しないサプレッサー変異株を取得しており、変異遺伝子と GrpE の必要性の関連性について解析中である。

P1-078/DP2-14-09

Acceptability of *Escherichia coli* for IncF plasmids encoding antimicrobial-resistance genes

○林 謙吾¹, 鈴木 匡弘¹, 土井 洋平^{1,2,3} (1藤田医科大・医・微生物, 2藤田医科大・医・感染症, 3ピッツバーグ大・医・感染症)

○Kengo Hayashi¹, Masahiro Suzuki¹, Yohei Doi^{1,2,3} (1Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., 2Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Fujita Health Univ., 3Div. Infect. Dis., Sch. Med., Pittsburgh Univ.)

Antimicrobial-susceptible (AMS) *Escherichia coli* is popular bacteria isolated from urinary tract infections and bloodstream infections. These bacteria will become antimicrobial-resistance (AMR) organisms via plasmids encoding AMR genes (R-plasmid). A major replicon type of R-plasmid in *E. coli* is IncF, and IncF plasmids containing extended-spectrum β -lactamase gene are frequently detected worldwide. In contrast, there are some *E. coli* sequence types (STs) have few AMR strains, however the mechanism for this and prevalence in clinical isolates are unclear. Investigating these processes is key to gaining insight into the acceptability and defense system associated with IncF R-plasmids in *E. coli*. As a first step, we identified *E. coli* strains defensive against the IncF R-plasmids from clinical isolates of AMS *E. coli*. Forty-eight cephem-susceptible *E. coli* strains were collected as "AMS *E. coli*", and conjugation experiments were performed using these strains as recipients and β 3914, diamino pimelic acid requiring mutant, as a donor. Calculating conjugation rates revealed 14 isolates with low rates, additionally a tendency for the inclusion of a certain ST among these isolates. These results suggest that this ST may impede IncF R-plasmids acquisition. In further study, we will analyze what causes this *E. coli* ST to reject IncF R-plasmids by transposon random mutagenesis.

P1-079/DP2-14-10

緑膿菌による Pf4 プロファージの膜小胞を用いた DNA 伝達

○奥村 春樹¹, 武縄 聡², 高野 壮太郎², 菅野 美月³, 二又 裕之^{1,3,4}, 岡本章彦², 田代 陽介^{1,3} (1静大院・総合科技, 2NIMS. MANA., 3静大院・創造, 4静大・グリーン研)

DNA transfer by *Pseudomonas aeruginosa* using membrane vesicles of Pf4 prophage

○Haruki Okumura¹, Satoshi Takenawa², Soutaro Takano², Mizuki Kanno³, Hiroyuki Futamata^{1,3,4}, Akihiro Okamoto², Yosuke Tashiro^{1,3} (1Grad. Sch. Intrgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2NIMS. MANA., 3Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 4Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

細菌は脂質膜で構成された 20-400 nm の微粒子である膜小胞を放出する。膜小胞は、バイオフィーム形成、細胞間コミュニケーションなど、様々な生物学的機能を有している。近年、膜小胞内に内包される DNA が注目されており、遺伝子水平伝播への寄与が示唆されているものの、その詳細は不明である。我々はこれまでに緑膿菌 PAO1 株の膜小胞内に着目し一粒子解析を行ったところ、線状プロファージの一種である Pf4 ファージの DNA が膜小胞内に存在することを見出した。そこで、Pf4 ファージが進化の過程で膜小胞を用いて宿主域を拡張したと仮説し、本研究では膜小胞を介した Pf4 ファージの遺伝子水平伝播の検証と機構解明を目的とした。PAO1 野生株から膜小胞を抽出しリアルタイム PCR を行ったところ、膜小胞内部に Pf4 DNA が検出された。Pf4 ファージは PAO1 株にプロファージとして存在し、外皮タンパク質を用いて環境中に放出され、PAO1 の内膜から伸長する繊毛 (Pili) の先端に Pf4 ファージが結合し、細菌への感染を開始する。本研究では、PAO1 株から Pf4 領域と繊毛の主要タンパク質 (PiliA) を欠損した変異株 ($\Delta pilA\Delta Pf4$) を作製し、Pf4 ファージの感染を阻害することをブランクアッセイ法により証明した上で、Pf4 ファージが膜小胞を介して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、 $\Delta pilA\Delta Pf4$ に PAO1 野生株から抽出した膜小胞を添加して培養した結果、Pf4 DNA が受容菌内で検出された。以上の結果から、Pf4 はファージ外殻だけではなく膜小胞を媒体としても遺伝子水平伝播を行うことが示された。

P1-080/DP2-14-11

細胞膜状態変化が促進する膜小胞を介した遺伝子水平伝播

○江里 聡一郎¹, 菅野 美月², 二又 裕之^{1,2,3}, 田代 陽介^{1,2} (1静大院・総合科技, 2静大院・創造, 3静大・グリーン研)

Horizontal gene transfer through membrane vesicles facilitated by changes in cellular membrane state

○Soichiro Eri¹, Mizuki Kanno², Hiroyuki Futamata^{1,2,3}, Yosuke Tashiro^{1,2} (1Grad. Sch. Intrgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 3Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

遺伝子水平伝播 (Horizontal gene transfer: HGT) は細菌の環境に対する適応や進化において重要な役割を担っている。現在 HGT の種類としては形質転換、形質導入、接合伝達が広く認識されているが、上記 3 種に次ぐ第 4 の機構として、細菌が放出する細胞外微粒子である膜小胞を介した HGT が注目されている。膜小胞を介した伝達は特に実環境中での HGT の理解に重要であると考えられているが、細菌が膜小胞を取り込むメカニズムやそれに関わる重要な因子は未だに解明されていない。そこで、受容菌の膜の状態が膜小胞の取り込みに大きく寄与しているとの仮説を立て、膜の状態と膜小胞の取り込みの関係性から小胞伝達の機構解明を目的とした。本研究では、抗生物質の耐性遺伝子または *gfp* 遺伝子をマーカーとし、膜小胞を介した HGT の検証を行った。大腸菌 BW25113 株においては、二重膜小胞を形成し膜小胞内のプラスミドのコピー数が増加すると言われている *nlpI* 欠損株を用いた。BW25113 $\Delta nlpI$ /pEGFP (アンビシリン: Amp 耐性) から得た膜小胞を外膜 (OM)・ペプチドグリカン (PG)・内膜 (IM) の架構に関わる TolA をコードする遺伝子を欠損させた BW25113 $\Delta tolA::Km$ (カナマイシン: Km 耐性) に添加し、CaCl₂ を含む液体培地で静置培養を行い、Amp, Km 添加培地で選択したところ蛍光のコロニーが得られ HGT が示された。以上の結果から CaCl₂ による細胞膜の透過性の向上や OM・PG・IM の架構欠損による膜の湾曲性の増加が膜小胞を介した HGT に関与することが示唆された。

P1-081/DP2-14-12

Evolutionary process of *Streptococcus dysgalactiae* genome, with host switching

○村瀬 典一, 柘植 亮佑, 野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路 (京都大・医・微生物)

○Kazunori Murase, Ryosuke Tsuge, Atsuko Minowa-Nozawa, Takashi Nozawa, 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 further classified into the two subspecies; *equisimilis* (SDSE), and *dysgalactiae* (SDSD). Especially in the SDSE, this subspecies often causes necrotizing fasciitis and bacteremia, 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 729 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* intra-specific evolutionary processes with host switching.

P1-082/DP2-14-13

プラスミドが接合伝達する細菌を塩基配列の特徴から予測する

○徳田 真穂¹, 敦賀 俊太², 前田 壮³, 山崎 凜³, 水口 千穂⁴, 野尻 秀昭⁴, 金原 和秀^{1,2,3}, 新谷 政己^{1,2,3,5} (静大院・創造, ²静大院・総合科技, ³静大・工, ⁴東大院・農生科, ⁵静大・グリーン研)

Predicting the bacteria acquired the plasmid by conjugative transfer based on nucleotide sequences

○Maho Tokuda¹, Shunta Tsuruga², So Maeda³, Rin Yamazaki³, Chiho Minakuchi⁴, Hideaki Nojiri⁴, Kazuhide Kimbara^{1,2,3}, Masaki Shintani^{1,2,3,5} (¹Grad. Sch. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Shizuoka Univ., ³Fac. Eng. Shizuoka Univ., ⁴Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, ⁵Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは、接合伝達による水平伝播を介して、遺伝子の伝播に伴って急速な細菌の進化や、環境への適応を可能にする。そのため、環境中でのプラスミドの接合伝達現象は重要である。しかし、どの細菌がどのプラスミドを受け取るのか、という情報を網羅的に得ることは困難である。そこで、本研究ではまず、接合実験によって、全塩基配列が既知のプラスミド・細菌間での接合伝達の可否の情報を収集した。その後、プラスミドと染色体のゲノム配列から、プラスミドを受け取ることのできる細菌を予測できるかどうかを検証した。接合実験には、塩基配列読みの異なる14種類のプラスミドをそれぞれ保持する供与菌と、5門10綱42科に分類される、染色体配列が読解済みかつ培養可能な125株の細菌を1種類ずつ受容菌として用いた。1750通りの接合実験により、プラスミドを受け取った767の「接合完了体」と受け取らなかった983の「非接合完了体」に分別した。次に、プラスミドと受容菌染色体の塩基配列を用いて、*k*-mer組成 (*k*連続塩基の出現頻度, *k*=2,3,4) の類似度を算出したところ、プラスミドと染色体の類似度は、「接合完了体」の方が「非接合完了体」よりも有意に高かった。さらに、宿主域未知のプラスミド pYKAS102 について、14種類のプラスミドの接合実験の結果と、塩基組成の情報の双方を用いたランダムフォレストによる予測を行った。並行して、125株との接合実験によって接合伝達の可否を同定した。その結果、79% (99/125株) の受容菌に対する接合伝達の可否と予測結果が一致した。以上の結果より、プラスミドと細菌染色体の塩基配列情報を用いて、プラスミドを受け取る細菌を予測可能であると示唆された。

P1-083/DP2-14-14

Upstream genetic structures of AMR genes and its utilization for presuming AMR plasmids

○平井 到¹, 屋宜 宣慶² (¹琉球大・医・保・病原体検査学, ²琉球大・医・保・生理機能検査学)

○Itaru Hirai¹, Nobuyoshi Yagi² (¹Lab. Microbiol., Sch. Health Sci., Fac. Med., Univ. of the Ryukyus, ²Lab. Clin. Physiol., Sch. Health Sci., Fac. Med., Univ. of the Ryukyus)

There are many modifications on plasmids during their transportation. Especially, region(s) where AMR genes are crowded and in row(s) could often be altered by insertions, deletions, recombinations, etc. These make it difficult to presume plasmid(s) by using ORF of AMR genes. Previously, we established upstream genetic structure (UGS) analysis to classify *bla*_{CTX-M} based on their locations. In this study, we evaluated whether the UGS analysis could be applicable to presume plasmid(s) harboring AMR genes. Total of 9,048 plasmid sequences were subjected to in silico UGS analysis to characterize UGSs of the top 30 detected AMR genes. Our in silico UGS analysis indicated that there were many insertions by Insertion Sequence (IS) species and other AMR gene(s), and that UGSs could be used for classification of AMR genes other than *bla*_{CTX-M}. We selected four plasmid sequences and extracted UGSs and ORFs of all AMR genes in the four plasmid sequences and run the BLAST search using ORFs or UGSs of the AMR genes. Consequently, the BLAST search indicated that utilization of the UGSs of the AMR genes were advantageous to presume AMR plasmid sequences than the BLAST search using ORFs as search keys. Taken together, our results suggested the UGSs of AMR genes can be used as search keys to presume AMR plasmid sequences in addition to classification of AMR genes based on their locations.

P1-084/DP2-14-15

Neisseria gonorrhoeae の分子型別解析推移と耐性遺伝子の動向

○大濱 侑季¹, 志牟田 健¹, 森田 昌知¹, 吉田 愛¹, 高橋 英之¹, 安田 満², 大西 真³, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細1, ²札医大・医・感制・臨檢, ³沖縄衛研)

The Temporal Trends of Molecular Typing and Resistance Gene Dynamics in *Neisseria gonorrhoeae*

○Yuki Ohama¹, Ken Shimuta¹, Masatomo Morita¹, Ai Yoshida¹, Hideyuki Takahashi¹, Mitsuru Yasuda², Makoto Ohnishi³, Yukihiko Akeda¹ (¹Dept. Bact. 1., NIID, ²SMU Med, Dept. Infection Control & Clinical Lab Med., ³OPHE-IDRC)

淋菌感染症は *Neisseria gonorrhoeae* を原因菌として尿道炎や子宮頸管炎を主徴とする。Ceftriaxone (CTRX) が第一選択薬として使用されているが、2009年に国内で初めて CTRX 耐性淋菌 (*penA*-60, ST1903) が分離されたことから、臨床サンプルから分離された淋菌を用いた動向調査を行っている。今回、2016年から2023年に分離された淋菌における遺伝子型と薬剤耐性因子の変遷を明らかにすることを目的として全ゲノム解析を実施した。日本国内から収集した淋菌感染症が疑われる臨床検体から、セアーマーチン寒天培地で培養後、淋菌1,711株を分離し、MiSeqを用いて全ゲノム解析を実施した。得られた全ゲノム情報を用いて CTRX 耐性に関与する *penA* 遺伝子のモザイク変異を明らかにするとともに、分子タイプングとして MLST を実施した。また、全ての株で寒天平板希釈法にて4薬剤 (Cefixime, Ciprofloxacin, Azithromycin, CTRX) の薬剤感受性試験を実施した。結果、4薬剤全てに感受性である390株中246株 (64%) は、2019年まで最も分離頻度が高かった ST9362 であった。PBP2 をコードする *penA* の遺伝子タイプは、全ての ST9362 でβラクタム剤感受性の非モザイク型 *penA*-2 であった。一方、2019年以降は ST1588 が増加傾向であり、91%がβラクタム剤耐性のモザイク型 *penA*-10 を保有していた。同様に近年増加傾向にある ST13841 は全株モザイク型 *penA*-101 を保有し、また、ST13142 においても全株モザイク型 *penA*-34 を保有していた。本研究では、国内で分離された淋菌株の新たな耐性クローンの出現は認められなかったが、モザイク型 *penA* が増加傾向であるため、今後、全ゲノム情報を基盤とした系統解析や伝播経路の解析を行う予定である。

P1-085/DP2-14-16

腸管出血性大腸菌の病原性調節遺伝子の発現を制御する小分子RNAの網羅的解析

○須藤 直樹¹, 岡田 信彦², 三戸部 治郎¹ (¹杏林大・医・感染症学, ²北里大・薬・微生物学)

Comprehensive analysis of small RNAs that control the expression of the virulence regulator in EHEC

○Naoki Sudo¹, Nobuhiko Okada², Jiro Mitobe¹ (¹Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Kyorin Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Kitasato Univ.)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の多くは 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三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 によって一括的に制御され、*ler* の発現は多くの転写因子により制御されることが知られているが、*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) が知られており、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。これらの結果は、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を示唆する。

P1-086/DP2-14-17

病原性真菌 *Candida albicans* の核相変換関連遺伝子 (*SPS1*) の適切な転写量は正常な増殖に必要である

○菅野 雅美, 岩口 伸一 (奈良女子大・理・生物科学)

Appropriate transcription of *SPS1* of *Candida albicans* are necessary to normal growth

○Miyabi Sugano, Shinichi Iwaguchi (Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

ヒトの日見感染症の起原菌である *Candida albicans* は、通常は 2 倍体で存在しているが多倍体化する株の存在も確認されており、多倍体化を引き起こす原因として *SPS* (Suppressor of ploidy-shift) 遺伝子の変異の可能性が考えられている。多倍体化した表現型 (*Sps*⁻) を示す STN21 株と核相が一定である表現型 (*Sps*⁺) を示す STN22 株を比較すると、STN21 株では ORF6813 の転写量が上方制御されていた。この ORF6813 を *SPS1* 遺伝子と名付けた。STN21 株 (*Sps*⁻) 由来の *SPS1* をもつプラスミドを STN22 株 (*Sps*⁺) に形質転換すると表現型が *Sps*⁺ から *Sps*⁻ に変化し、形態異常、生育異常を引き起こした。そのため *SPS1* の転写量増加は多倍体化の原因の一つであり、細胞機能に影響する遺伝子であると考えられた。本研究では *SPS1* の転写が細胞機能に及ぼす影響を調べるため、*SPS1* 遺伝子破壊株 (KO)、プロモーター (MAL) 置換株の作製をおこなった。KO 株は野生型に比べ、増殖速度の遅延、細胞の巨大化、細胞塊形成、多核化、偽菌糸様細胞などが観察された。そのため細胞増殖と酵母型細胞の形成に必要な遺伝子であることが示唆された。プロモーターを MAL2p に置換した株では、*SPS1* の発現を抑制・促進どちらの場合でも増殖速度の遅延や多極出芽した細胞塊が見られた。そのため、*SPS1* の発現量は過剰であっても抑制されても生育異常が生じ、細胞恒常性に関与する遺伝子であることが示唆された。

P1-087/DP2-14-18

国内流行型の溶血性レンサ球菌 SDSE が有する病原因子の探索

○小倉 康平^{1,2}, 木ノ嶋 航司³, 北村 仁美³, 岡本 成史^{2,3}, 秋山 徹⁴ (京都大・農・食品生物, ²金沢大・新学術, ³金沢大・医薬保・保健学, ⁴国立国際医療研究センター・研究所)

Virulence factors of hemolytic streptococci SDSE strains prevalent in Japan

○Kohei Ogura^{1,2}, Koji Kinoshima³, Hitomi Kitamura³, Shigefumi Okamoto^{2,3}, Toru Akiyama⁴ (¹Div. Food Sci. Biotech., Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., ²Inst. Front. Sci. Init., Kanazawa Univ., ³Fac. Health Sci., Inst. Med. Pham. Health Sci., Kanazawa Univ., ⁴Res. Insit., NCGM)

【背景と目的】β溶血性レンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) 感染症は、*S. pyogenes* と同様に発症後死亡あるいは予後不良となる感染例が非常に多い一方で、糖尿病等の基礎疾患保持患者ならびに高齢者での症例が *S. pyogenes* と比較して顕著に多い。SDSE は、*S. pyogenes. pyogenes* とは異なる固有の病原性発現機構を発揮すること、すなわち未知のものを含めた病原因子群の発現制御機構が存在することが示されている。本研究では、本邦で分離頻度が高い 2 つのグループ Clonal Complex (CC) 17 型ならびに 25 型の SDSE を対象として、各グループの病原発現機構を明らかにすることを目的とした。【結果と考察】CC17 型は、ヒト血清含有培地で高い接着性を示し、また一部のグラム陰性細菌に対して増殖抑制能を有していた。トランスクリプトーム解析の結果、CC17 型は他の型に見られないリプレッサーを保持していることが示された。次に CC25 型には、全ゲノムの Average Nucleotide Identity が 99.8% と高い同一性を示す一方で溶血活性が大きく異なる SDSE ペアが存在した。トランスクリプトーム解析の結果、2 ペア間で発現量が異なる機能未知タンパク質が病原性レギュレーターとして機能する可能性が考えられた。*本研究課題は、2022 年度科研費先進ゲノム支援のサポートにより実施しました。ご担当いただいた九州大学 林哲也先生、前野慎太郎先生 (当時) に感謝申し上げます。*

P1-088/DP2-14-19

New regulatory network via ArcAB and quorum sensing system of *Vibrio cholerae* biofilm formation

○JantCres Caigoy¹, 成谷 宏文², 島本 敏¹, 智群^{3,4}, 島本 整¹ (¹広島大・院・統合生命科学, ²十文字学園女子大・人間生活・食品開発, ³広島大・院・生物園科学, ⁴丸善製薬株式会社)

○JantCres Caigoy¹, Hirofumi Nariya², Toshi Shimamoto¹, Zhiqun Yan^{3,4}, Tadashi Shimamoto¹ (¹Grad. Sch. Int. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Grad. Sch. Human Life Sci. Jumonji Univ., ³Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ., ⁴Res. Cent. Maruzen Pharm. Co. Ltd)

Vibrio cholerae utilizes the ArcAB system in response to shifts in respiratory conditions. Previously, we found that HapR mutations have significant effect on its biofilm formation under different oxygen conditions. This led us to speculate that ArcAB and quorum sensing system are playing a role in anoxic biofilm formation. We selected strains that produce robust biofilms under anoxia, constructed their respective isogenic *arcA* and *arcB* deletion mutants, and then performed the biofilm assay. Regulon analysis of putative ArcA-binding sites in the *hapR* promoter, followed by gel shift assay between phosphorylated ArcA (P-ArcA) and *hapR* promoter was also done. Then, gene expression of *hapR* and *hapA*, along with other biofilm-associated genes were evaluated. Results revealed that deletion of either *arcA* or *arcB* led to a significant decrease in the biofilms of intact HapR strains. Whereas variable biofilm formation was observed in HapR-deficient strains. Gel shift assay then showed direct binding of P-ArcA to the *hapR* promoter. Significant increase in *hapR* and *hapA* expression and significant reduction in biofilm-associated genes expression were observed in the *arcA* mutants of intact HapR strains. In this study, we have shown that P-ArcA promotes anoxic biofilm formation by repressing *hapR* transcription, a new regulatory network in the biofilm formation of the pathogenic *V. cholerae*.

P1-089/DP2-17-01

ArcB/ArcA 二成分制御系による *Vibrio alginolyticus* 遊走制御機構の解析

○藤井 萌¹, 横田 憲治², 美間 健彦¹ (愛媛県立医療技術大・保健科学・臨床検査・微生物検査, ²岡山大・院保健)

Regulation of motility by ArcB/ArcA two-component regulatory system in *Vibrio alginolyticus*

○Moe Fujii¹, Kenji Yokota², Takehiko Mima¹ (¹Microbiol., Dept. Med. Techn., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., ²Okayama Univ. Grad. Sch. Health Sci.)

VarS/VarA 二成分制御系は, small RNA (sRNA) の転写調節を介して標的遺伝子の翻訳を制御する. 細菌は VarS/VarA 系が調節する sRNA を複数コピー保有するが, それらは冗長なコピーと考えられている. 我々は, *Vibrio alginolyticus* の VarS/VarA 系が調節する 4 つの sRNA のうちの 1 つ (sRNA1) の転写が, ArcB/ArcA 二成分制御系によって調節されることを明らかとした. ArcB/ArcA 系は嫌気環境での遺伝子の発現をグローバルに調節するが, その一つに遊走能がある. 本研究では, *V. alginolyticus* の ArcB/ArcA 系の遊走制御機構を解析した. 野生株と比較し, arcA 欠失株および arcB 欠失株は遊走能が低下した. また, arcA 相補株は野生株と同程度の遊走能を示した. 以上より, ArcB/ArcA 系が遊走能を制御することが明らかとなった. 鞭毛を構成するタンパク質である FlgB 遺伝子の発現量を qRT-PCR により調べた結果, 野生株と比較し, arcA 欠失株および arcB 欠失株で低下した. ArcA の flgB プロモーター領域の DNA 断片への結合を Electrophoretic mobility shift assay により確認した結果, バンドのシフトが観察された. これより, ArcA は flgB プロモーター領域に結合し, その転写を直接制御すると考えられる. これまでに, sRNA を欠失させると遊走能が低下することが明らかとなっている. 今後は ArcB/ArcA 系の遊走能の制御における, sRNA の関与について検討したい.

P1-090/DP2-17-02

トランスクリプトーム解析データを基にした肺炎球菌のモジュールの同定

広瀬 雄二郎¹, 〇田 敏生¹, 池田 恵莉¹, 大野 誠之¹, 山口 雅也^{1,2,3,4}, 川端 重忠^{1,3} (¹阪大・院菌・微生物, ²阪大・院菌・バイオインフォ, ³阪大・CiDER, ⁴阪大・微研・バイオインフォ)

Identification of pneumococcal modulons based on transcriptome datasets

Yujiro Hirose¹, 〇Toshiki Tabuchi¹, Eri Ikeda¹, Masayuki Ono¹, Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Shigetada Kawabata^{1,3} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³CiDER, Osaka Univ., ⁴OUBIC, RIMD, Osaka Univ.)

肺炎球菌は肺炎や中耳炎の主たる起炎菌であり, 髄膜炎や敗血症などの致死性が高い疾患を引き起こすこともある. 肺炎球菌はさまざまな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, 肺炎球菌における転写制御因子は 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, 肺炎球菌における 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, 肺炎球菌のモジュール (複数の転写制御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) を同定した. さらに, 得られた 47 個のモジュール情報と, データベースのレギュロン情報または過去のトランスクリプトーム解析で報告されているレギュロン情報とを照合し, モジュールの制御に寄与する転写制御因子を統計的に算出した. 47 個のモジュールのうち 28 個に属する遺伝子群が, 既知のレギュロンが有する遺伝子群と有意に重複した. 47 個のモジュールがそれぞれ有する遺伝子の clusters of orthologous groups 情報に基づき, 各モジュールの有する主要な機能を評価したところ, 代謝に関連するモジュールが 55% を占めた. 興味深いことに, 脂質の合成遺伝子群と pneumolysin をコードする遺伝子がともに挙動することを示すモジュールや, 糖鎖の取り込みおよび利用とバクテリオシンが運動することを示唆するモジュールが確認された. このように, 本研究において同定した肺炎球菌における 47 個のモジュール情報を精査すれば, これまでに報告されたことのない組み合わせの遺伝子が共発現する可能性を見出せる.

P1-091/DP2-17-10

Engineering a safety-enhanced synthetic phage capable of efficiently eliminating MRSA

○Minh Huong Nguyen¹, 氣駕 恒太郎^{1,2}, Veeranarayanan Srivani¹, XinEe Tan¹, Justin Edrian Cocuangco Revilla¹, 渡邊 真弥¹, 宮永 一彦¹, 相羽 由詞¹, 笹原 鉄平¹, 崔 龍洙¹ (¹自治医科大・医・細菌学, ²国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Minh Huong Nguyen¹, Kotaro Kiga^{1,2}, Veeranarayanan Srivani¹, XinEe Tan¹, Justin Edrian Cocuangco Revilla¹, Shinya Watanabe¹, Kazuhiko Miyana¹, Yoshifumi Aiba¹, Tepei Sasahara¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriology, Dept. Infection and Immunity, Jichi Medical Univ., ²Research Center for Drug and Vaccine Development, National Inst. Infectious Diseases)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) stands as the most prevalent drug-resistant bacteria in clinical setting. However, new antibiotic development is stagnant, necessitating innovations to fight drug-resistant bacteria. With limited antibacterial agents against MRSA, the exploration of engineered phages as therapeutic agents emerges as a promising avenue for treating MRSA infections. Phage engineering offers the potential to create synthetic phages with distinct bactericidal mechanisms, fostering effective bacterial control and advancing antimicrobial therapy. However, ensuring biocontainment is imperative for safe application of phage therapy. Here, using synthetic and non-proliferative phage construction methods, we developed a phage formulation with potent bactericidal activity while remaining biologically contained as an alternative approach to combat MRSA. We first created a genome-reduced phage, allowing the loading of large therapeutic cargoes. By unlinking essential parts of the synthetic genome, we established a biocontainment mechanism to prevent engineered phage proliferation. The release of bactericidal agent enabled killing of infected and neighboring cells, leading to mass elimination of MRSA. This engineering strategy provides a platform to synthesize phages with improved bactericidal activity and biological safety compared to existing preparations.

P1-092/DP2-17-11

接合伝達を利用した納豆菌遺伝子組換え系の確立と利用

○須田 和奏¹, 板谷 光泰², 朝井 計¹ (¹東京農大・バイオ, ²信州大・物質化学)

Gene recombination system for *Bacillus subtilis natto* by conjugation

○Wakana Suda¹, Mitsuhiro Itaya², Kei Asai¹ (¹Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., ²Dept. Materials Chem., Shinshu Univ.)

【背景・目的】納豆菌は, 研究・産業面で有用な細菌だが, 形質転換効率が低いこと, トランスポゾンによるランダムな遺伝子破壊が生じることが育種や研究の障壁である. 当研究室では, ヘルパープラスミド pLS20 依存的な接合伝達性プラスミド pCJ を作製し, 納豆菌と同属亜種でグラム陽性モデル細菌である枯草菌を供与体とし, pCJ を移送する接合伝達系である“pCJ 移送系”を開発し, 納豆菌の実験室株である BEST195 株に pCJ を導入した. (昨年度大会にて報告) これらの背景から, 納豆菌の育種や研究のさらなる促進を目指し, pCJ 移送系を利用した納豆菌の遺伝子組換え系の確立とその利用を目的とした. 【方法・結果】当研究室により納豆菌のトランスポゾンの転移抑制能を有することが示唆されている遺伝子 BSNT10618 を, 相同組み換えによるテトラサイクリン (tet) 耐性遺伝子の挿入により破壊するカセットを pCJ にクローニングし, 接合伝達により納豆菌へ導入することで接合伝達体を得た. pCJ は複製タンパク質が温度感受性であり, 高温ではプラスミドとして維持できないため, tet を添加し高温で接合伝達体を培養することで, ゲノムへの組換え体を取得した. 【結果・考察】接合伝達を利用した納豆菌の遺伝子組換え系を構築した. 接合伝達体には, プラスミドの完全長が移送されたクローンと, 部分的な欠落が生じたクローンが混在していた. この欠落は納豆菌ゲノムとの相同領域を含む領域に生じているため, 宿主ゲノムとの相同配列の有無が接合伝達プラスミドの安定性に寄与していると考えられる. 現在, 遺伝子破壊株を用いたトランスポゾンの転移抑制能評価に取り組んでおり, その結果についても合わせて報告したい.

P1-093/DP2-17-12

枯草菌細胞中でのセグメント細菌の運動性・走化性系の完全再構築

○朝井 計¹, 田中 滉起¹, 小椋 義俊², 桑原 知巳³ (1東農大・バイオ, 2久留米大・医・感染症, 3香川大・医・分子微生物)

Reconstitution of flagella biosynthesis of Segmented filamentous bacteria in *Bacillus subtilis*

○Kei Asai¹, Kouki Tanaka¹, Yoshitoshi Ogura², Tomomi Kuwahara³ (1Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agricul., 2Dept. Infect. Med., Kurume Univ. Sch. Med., 3Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ.)

Segmented filamentous bacteria (SFB) は哺乳類の腸管内に存在し、免疫活性化への関与が示唆される有用腸内細菌である。数種の SFB の全ゲノム塩基配列が解読されているが、難培養性のため遺伝子機能の解析が困難である。我々は SFB に近縁の、DNA 組み込みの許容力が高く、遺伝学的解析が容易なモデル土壌細菌 *Bacillus subtilis* (枯草菌) を土台として、枯草菌のゲノムへマウス SFB ゲノムを導入し、その機能解析を試みている。鞭毛のフラジェリンは宿主の自然免疫系を活性化することが知られていて、マウス SFB は 4 つのフラジェリン遺伝子をもつ。また、SFB は腸管定着の際に遊走することが想定されるが、無菌マウスの腸内において SFB の鞭毛は観察されていない。そこで、これらを腸管外で観察するために、走化性、運動性に関わる全遺伝子クラスターを枯草菌に導入、再構築し、解析することを目的とした。SFB の鞭毛形成遺伝子群は総全長約 60kb、50 以上の遺伝子が含まれる、5 つの遺伝子クラスターからなっている。これらのクラスターを大規模 DNA 導入法を用いて枯草菌ゲノムに連結しながら一括導入した。一括導入株で枯草菌の運動性に顕著な変化はなかった。枯草菌の鞭毛遺伝子群は SigD シグマ因子で一括制御されていて、その相同遺伝子として SFB には FliA がある。SFB の全遺伝子クラスターを持つ株で FliA を過剰発現すると、枯草菌の運動性は部分的に阻害された。枯草菌の鞭毛形成遺伝子が、SFB の遺伝子の発現や機能に影響を及ぼしていると考え、枯草菌鞭毛遺伝子の一括破壊を試みている。

P1-094/DP2-17-13

Campylobacter jejuni の phase variation によって生じるパリアントを安定化したライブラリーの作成と評価

○山本 章治¹, 李 謙一¹, 窪村 亜希子¹, 伊豫田 淳¹, 明田 幸宏¹, 相川 知宏², 岡村 雅史², 北条 史³, 大崎 敬子⁴, 三戸部 治郎⁴ (1感染症・細菌第一, 2帯畜大・基礎獣医・応用獣医, 3杏林大院・医・実験動物施設, 4杏林大・医・感染症学)

Constructions and evaluations of *Campylobacter jejuni* phase-locked variant libraries

○Shouji Yamamoto¹, Ken-ichi Lee¹, Akiko Kubomura¹, Sunao Iyoda¹, Yukihiko Akeda¹, Chihiro Aikawa², Masashi Okamura², Fuhito Hojo³, Takako Osaki⁴, Jiro Mitobe⁴ (1Dept. Bac. I., Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dep. Vet. Med., Div. Vet. Sci., Obihiro Univ. Agr. Vet. Med., 3Inst. Laboratory Animals, Graduate Sch. Med., Kyorin Univ., 4Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med.)

細菌性食中毒とギラン・バレー症候群の主要な起因菌であるカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) のゲノムは高変異性のリピート配列 polyG/C が挿入された遺伝子を多数コードしており、polyG/C のリピート数の変動に伴ってフレームシフト変異が可逆的に生じる。その結果、野生型の蛋白質が発現する phase (ON) と発現しない phase (OFF) がランダムに切り替わる phase variation (PV) が起こり、一つの個体から組合せ論的に無数のパリアントが作られる。例えばゲノムあたり 30 個の polyG/C 遺伝子を有する株の場合、理論的に最大 $2^{30}=10$ 億種類のパリアントを生じる。それらの PV パリアントは潜在的に疾病のリスクをはらんでいるものの、著しい多様性と不安定性が研究を困難にしている。そこで我々は *C. jejuni* の PV を安定化するためのゲノム編集法を確立し、第 95 回日本細菌学会総会シンポジウムで報告した。リピート数の変動は連続した塩基における DNA 複製のエラーによって生じるため、自然形質転換能を利用したゲノム編集を行い、リピート配列を中断させることによりその変動をロックする。その結果、遺伝子の発現が ON もしくは OFF のどちらかの phase にロックされ、表現型が安定化する。本研究ではマルチサイクル型のゲノム編集法を用いて *C. jejuni* (81-176 株と NCTC11168 株) のゲノムにコードされた全 polyG/C 遺伝子をランダムに異なる phase にロックし、安定かつ多様な PV パリアントからなるライブラリーを作成したので、その概要とともに活用例についても紹介させて頂きたい。*本研究は食品安全委員会食品健康影響評価技術研究 (課題番号 JPCAFSC20222205) および AMED (課題番号 JP21fk0108611j0201) の支援を受けた。

P1-095/DP2-17-14

Zombie cells produced from the minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B

○小田 七星¹, 木山 花¹, 宮田 真人^{1,2} (1大阪公大・院理, 2大阪公大・複合先端)

○Nanase Oda¹, Hana Kiyama¹, Makoto Miyata^{1,2} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

The goal of this study is to elucidate the role of the genome in maintaining cell life. Thus, we produce zombie cells by removing their genome and analyze changes during the process of cell recovery caused by transplanting another genome. We focused on the minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B (syn3B), capable of genome transplantation. Syn3B is a life form that has a chemically synthesized minimal genome composed only of essential genes for survival. As current genome transplantation into syn3B is done with keeping the original genome, we attempted to produce zombie cells by inducing restriction enzymes. When we tried three restriction enzymes derived from closely related species in syn3B, the number of reproducible cells decreased to 0.02% by one restriction enzyme. Then, most cells decreased their size and DNA content to 48% and 2%, respectively. Furthermore, we observed no significant changes in cell membranes and protein profiles. These results suggest that zombie cells were successfully produced from syn3B. The surviving cells showed mutations in the inducible restriction enzyme system. Next, we will achieve 100% zombification, by expressing additional restriction enzymes, and then resurrection from them.

P1-096/DP2-17-15

大腸菌トキシン-アンチトキシン系がファージ増殖に与える影響

○劉 可, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Effect of *Escherichia coli* toxin-antitoxin systems on phage propagation

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

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、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の毒性を阻害する。TA は、トキシンとアンチトキシンの性状や作用により 8 種類 (Type I-VIII) に分類されるが、Type I と Type II の TA がファージ防御に関わることはすでに報告されている。ファージが感染すると、アンチトキシンが分解されることでトキシンが活性化し、感染菌の増殖が阻害される。その結果、感染菌内で産生される子孫ファージ数が減少し、不稔感染が引き起こされる。昨年の大会では、大腸菌 O157:H7 株がもつ ECs3274-ECs3275 が type II の TA に属し、ECs3275 トキシンが生存に必要な遺伝子の発現を抑制することを報告した。今回、ECs3274-ECs3275 がファージ増殖に与える影響を検討した。ECs3274-ECs3275 の過剰発現により、O157 株に感染する PP01 ファージのブランク形成効率が約 2 分の 1 に減少した。また、ファージ感染後、ECs3275 は安定に存在したが ECs3274 は速やかに分解され消失した。以上の結果より、既知の Type II の TA と同様に、ファージ感染後に ECs3274 アンチトキシンが消失することで ECs3275 トキシンが活性化し、感染菌の増殖を阻害して不稔感染を引き起こす可能性が示唆された。現在、大腸菌 K12 株にコードされる Type IV と Type V、Type VIII の TA がファージ防御に関与する可能性について検討している。本大会では、ECs3274-ECs3275 の結果と併せて報告する。

P1-097/DP2-17-16

大腸菌の抗ファージ因子群 *AbpA-AbpB* の活性化機構

○滝田 彩耶, 佐々木 隆臣, 新谷 優之介, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Activation of the *AbpA-AbpB* phage defense system in *Escherichia coli*

○Saya Takita, Takaomi Sasaki, Yunosuke Shintani, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Science and Engineering, Saitama Univ.)

細菌はファージ感染から逃れるために、制限修飾系や CRISPR-Cas 系、トキシノーアノチトキシン系など、さまざまな防御機構を発達させてきた。我々は、大腸菌の機能未知遺伝子群 *abpA-abpB* が広範な DNA ファージの増殖を抑えることを見出した。両遺伝子はオペロンを形成し、抗ファージ作用には DNA スクレアーゼドメインをもつ *AbpA* と RNA ヘリケースドメインを持つ *AbpB* の両者が必要である。最近、*AbpA* と *AbpB* (以下、*AbpAB*) がファージ感染により活性化して、感染菌の増殖を阻害することで、菌内で産生される子ファージ数を減少させ、不稔感染を引き起こすことが明らかになった。本研究では、*AbpAB* の活性化機構の解明を目的とした。ファージの単鎖 DNA 結合タンパク質 *Gp32* と *AbpAB* を共発現させると、大腸菌の増殖が速やかに停止した。また、DNA 結合能を失った *Gp32* では増殖停止は見られなかった。さらに、*Gp32* 欠損ファージは *AbpAB* の抗ファージ作用を回避して増殖した。これらの結果は、単鎖 DNA に結合した *Gp32* が *AbpAB* を活性化することを示している。興味深いことに、*AbpAB* 発現菌に対して DNA 損傷剤を処理した場合や DNA 修復酵素 *RecBCD* を欠損させた場合、ファージが感染していないにも関わらず、*AbpAB* は活性化して菌の増殖を停止させた。我々は、ファージ感染後に形成される DNA-*Gp32* 複合体や、DNA 複製や修復の中断により形成される DNA-タンパク質複合体が *AbpAB* を活性化するのではないかと考えている。現在、この可能性を検証するために、*Gp32* と *AbpAB* の相互作用の必要性や大腸菌の DNA 修復に関わる DNA ポリメラーゼ I の関与などを調べている。

P1-098/DP1-04-06

Biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans* associates with genes expression regulated by *Hfq*

○大貝 悠一, 松本 愛理, 中田 匡宣 (鹿児島大・歯・口腔微生物学)

○Yuichi Oogai, Airi Matsumoto, Masanobu Nakata (Dept. Oral-Microbiol., Sch. Med. and Dent., Kagoshima Univ.)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a Gram-negative bacterium that colonizes the human oral cavity and causes periodontitis. The bacterium can form biofilm on periodontal tissue and occasionally causes systemic diseases, such as endocarditis. *Hfq* is an RNA-binding protein that mediates small non-coding RNA and mRNA base pairing. The base pairing associated with the regulation of several genes involved in metabolisms, stress responses, virulence. In this study, we investigated the effect of *Hfq* on biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans*. The inactivation of *hfq* reduced mass of biofilm on a polystyrene plate. Furthermore, the *hfq* mutant showed increased transcription of *dspB* and decreased transcription of *emaA* compared to wild-type strain. The *dspB* gene encodes dispersin B, an enzyme that catalyses poly-N-acetylglucosamine hydrolysis, and dispersin B has been reported to function as a factor that contributes to detachment of cells from biofilm. The oligomeric autotransporter EmaA mediates the interaction between *A. actinomycetemcomitans* and collagen. Additionally, we found that the inactivation of *emaA* showed drastically reduced biofilm mass. These results suggest that biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans* is modulated in part by *Hfq*-mediated regulation of dispersin B and EmaA expression.

P1-099/DP1-04-07

Identification of *Clostridium perfringens* FbpA binding site to dermatopontin

○松永 望, 遠藤 晃範, 櫃本 泰雄, 片山 誠一 (岡山理大・理・臨床生命)

○Nozomu Matsunaga, Akiba Endo, Yasuo Hitsumoto, Seiichi Katayama (Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

Fibronectin (Fn) is an approximately 450 kDa glycoprotein that is comprised of 12 type I, 2 type II, and 15-17 type III modules. Fibrillation of Fn is important in the wound healing process. Dermato-pontin (DPT), a 22 kDa non-collagenous extracellular matrix protein, interacts with Fn type III₁₂₋₁₄ (III₁₂₋₁₄), leading to a change in Fn conformation and promoting Fn fibrillation. Furthermore, a region called DP-4 (PHGQVVAVRS, 11 residues) in DPT is known to mainly promote Fn fibrillation.

On the other hand, we previously reported that *Clostridium perfringens* fibronectin-binding proteins A and B (FbpA and FbpB) bound to DPT, resulting in the inhibition of Fn-fibrillation.

Here we found the interaction of DP-4 with FbpA and FbpB by enzyme-linked avidin-biotin complex (ELABC) and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (competitive ELISA), and identified FbpA binding site (NEKILSRFSELSNEEKELIDINKITDPLHI and IGDNTEVAFVSALCKTSNPEQGTYSR SIGFD) to DPT by several assays (ELABC, competitive ELISA, ligand blotting, and Fn-fibrillation assay) using FbpA Overlapping peptide (split FbpA into 20-30 residues each).

P1-100/DP1-04-08

Colocalization of GAPDH and autolysin on the *Clostridium perfringens* cell surface

○青野 りよ^{1,2}, 松永 望¹, 櫃本 泰雄¹, 片山 誠一¹ (¹岡山理科大・理・臨床生命科学科, ²香川県立保健医療大・臨床検査)

○Riyo Aono^{1,2}, Nozomu Matsunaga¹, Yasuo Hitsumoto¹, Seiichi Katayama¹ (¹Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. of Sci., ²Dept. Med. Tech., Kagawa Pref. Univ. of Health Sci.)

Clostridium perfringens, the cause of gas gangrene and food poisoning, is known to have the peptidoglycan-associated fibronectin-binding proteins including FbpC (CPE0625; 56kDa), FbpD (CPE0630; 45 kDa), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, CPE1304; 40 kDa). GAPDH, one of the glycolytic enzymes, is expressed on some bacterial cell surface including *C. perfringens*. In *Staphylococcus aureus*, it is thought that the interaction of GAPDH with autolysin could occur by back-binding of the excreted GAPDH to the autolysin. We found that *C. perfringens* autolysin (Acp, CPE1231) worked as an Fn receptor and that rGAPDH bound to rAcp. In this work, we investigated the interaction of Acp with GAPDH on the *C. perfringens* cell surface. Each anti-GAPDH antibody and anti-AcpCD antibody, labelled fluorescently, was incubated with fixed *C. perfringens* cells growth up to early-log phase, and then the cells were visualized with Confocal Laser Scanning Microscope. Both GAPDH and Acp displayed at the mid-cell region and at the septal division site. Neither GAPDH nor Acp were detected on the acp null mutant (strain 13 *acp::erm*) cells. The Acp-GAPDH complex bound to Fn in zone at septal division site. These results suggested that GAPDH might be expressed on the cell surface by binding to Acp and that the Acp-GAPDH complex might function as an Fn receptor.

P1-101/DP1-04-09

ETEC colonization factor CS6 binds to β -actin and myosin-9 on epithelial cells

○Alafate Ayibieke, 西 宇希, 濱端 崇 (国際医療研究センター・研究所・感染症制御)

○Alafate Ayibieke, Takaki Nishi, Takashi Hamabata (Dept. Infect. Dis., RI., NCGM)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the leading causes of diarrhea in young children in underdeveloped nations and the primary cause of travelers' diarrhea among visitors to these areas. The virulence of ETEC is attributed to its heat-stable and heat-labile toxins, as well as colonization factors (CFs). CS6 is one of the most prevalent CFs among the more than 25 identified CFs in ETEC. Previously, we demonstrated that CS6 is not only capable of cell adhesion but also of invading epithelial cells. Although it has been shown that CS6 binds to crude mucin and sulfatide, the cell surface receptors for CS6 are still not fully understood. In this study, to identify cell surface proteins that interact with CS6, we constructed a plasmid encoding a histidine-tagged CssB subunit of CS6. We then performed a pulldown assay using the tagged CssB as bait to isolate CssB-binding proteins from the cell lysates of INT407 and Caco-2 cells. Subsequent analysis of the isolated proteins using SDS-PAGE and nanoLC-MS/MS led to the identification of β -actin and myosin-9 as potential receptors for CS6. Given that both proteins are present on the cell surface, it is possible that they are involved in ETEC CS6-mediated cell adhesion and invasion, which requires further investigation.

P1-102/DP1-04-10

腔常在乳酸桿菌の腔粘膜定着機構の解明

○岡岡 桐佳, 伊藤 雅洋, 田端 里帆, 三木 剛志, 羽田 健, 岡田 信彦 (北里大・薬・微生物)

Clarification of the colonization mechanism of vaginal *Lactobacillus* on the vaginal Mucosa

○Kirika Yoshioka, Masahiro Ito, Riho Tabata, Tsuyoshi Miki, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada (Dept. Microbiol., Sch. Pha., Kitasato Univ.)

【目的】 ヒト成年期の女性生殖器には主に乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) が最優勢菌として常在しており, 病原微生物の増殖を抑えるなどその存在は有益であると考えられてきた。しかしながら近年, 日本人女性の約 30% が該当する *L. iners* を最優勢菌として有する女性では, *L. crispatus* と比較し月経時に細菌叢が大きく変化し, 細菌性陰症起因細菌が最優勢である細菌叢へと変遷しやすいと報告されている。本研究では, ヒト腔上皮における *L. iners* および *L. crispatus* 定着機構の解明を試みた。

【方法】 *L. iners* HM-704 および *L. crispatus* HM-637 を MRS 液体培地にて 24 時間静置培養した。培養後, 菌体の表層タンパク質を CBB 染色にて確認し, それぞれの細菌種において認められた特徴的なタンパク質を nano LC/MSMS 解析にて同定した。また, 培養後の菌体をヒト腔上皮細胞 VK2/E6E7 に感染後, 培地を細胞培養用培地または羊脱繊維血と交換した。一定時間培養後, 腔上皮細胞に付着する細菌数を計測した。

【結果・考察】 *L. iners* および *L. crispatus* の菌体表層タンパク質を解析したところ, それぞれにおいて細菌種特異的なタンパク質が同定され, これらが腔粘膜での定着に関与する可能性が考えられた。*L. iners* のみに認められたタンパク質は, 生体環境条件により局在が変化しやすいことが示唆され, *L. iners* の腔上皮細胞への付着数は *L. crispatus* とは異なり, 血液により減少すると示唆された。したがって, *L. iners* の特徴的な表層タンパク質の局在の変化が細菌叢の変遷のしやすさと関連があると推察された。

P1-103/DP1-04-11

肺炎球菌の炎症誘導能に対するリポタンパク質シグナルペプチダーゼの作用解析

○土門 久哲^{1,2}, 平山 悟¹, 磯野 俊仁¹, 齋藤 瑠都¹, 柳原 克紀³, 寺尾 豊^{1,2} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・高口研セ, 3長崎大・院医歯・病態解析)

The role of lipoprotein signal peptidase in the innate immune stimulatory activity of pneumococci

○Hisanori Doman^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Toshihito Isono¹, Rui Saito¹, Katsunori Yanagihara³, Yutaka Terao^{1,2} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Dept. Lab. Med., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci.)

【目的】 *Streptococcus pneumoniae* は, 細菌性肺炎において高頻度に分離されるグラム陽性球菌である。宿主細胞は主に Toll-like receptor 2 (TLR2) を介してリポタンパク質を認識し, 炎症性サイトカインを産生する。本研究では, *S. pneumoniae* リポタンパク質の成熟に必要なリポタンパク質シグナルペプチダーゼ LspA の遺伝子欠失株を作製し, その炎症誘導能を解析した。

【方法】 *S. pneumoniae* NU4471 株 (野生株) および同株由来 *lspA* 遺伝子欠失株 (Δ *lspA* 株) を増殖定常期まで培養し, Triton X-114 二層抽出法および BCA 法を用いて, 各菌株におけるリポタンパク質の産生量を測定した。続いて, ヒト TLR2 を強制発現させた HEK293 (HEK-TLR2) 細胞培養系に, 各菌株の培養上清, 破碎上清もしくはエタノール処理した死菌体を添加して一定時間培養し, 転写因子 NF- κ B の活性化に伴い上清中に分泌されるアルカリフォスファターゼ活性を測定した。さらに, THP-1 細胞に各菌株サンプルを添加して培養後, 上清中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA で定量した。

【結果】 Δ *lspA* 株では, 野生株と比較して有意にリポタンパク質産生量が少なかった。また, Δ *lspA* 株培養上清, 破碎上清および死菌体の全てでは, 野生株とそれぞれ比較し, HEK-TLR2 細胞におけるアルカリフォスファターゼ誘導能が低かった。同様に, Δ *lspA* 株サンプルは, 野生株と比較し, THP-1 細胞に対する TNF- α および IL-6 誘導能が低かった。

【考察】 LspA はリポタンパク質を産生させて TLR2 を活性化し, 次の炎症性サイトカインを増加させることが明らかとなった。

P1-104/DP1-04-12

Mycobacterium avium complex 由来 D アミノ酸によるマクロファージの遺伝子発現の変化

○多田 納豊¹, 宗像 達夫¹, 澤井 円香¹, 八木 秀樹², 佐野 千晶³, 富岡 治明⁴ (1国際医療福祉大・福岡薬, 2国際医療福祉大・薬, 3島根大・医・地域医療支援, 4島根大・医)

Alteration of gene expression in macrophages by D-amino acids from *Mycobacterium avium* complex

○Yutaka Tatano¹, Tatsuo Munakata¹, Madoka Sawai¹, Hideki Yagi², Chiaki Sano³, Haruaki Tomioka⁴ (1Dept. Pharm. Sci., Sch. Pharm. Fukuoka., IUHW., 2Dept. Pharm. Sci., Sch. Pharm., IUHW., 3Dept. Community. Med. Mgt., Fac. Med., Shimane Univ., 4Fac. Med., Shimane Univ.)

【目的】 非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症の予防および治療効果を上げるためには, NTM と宿主との相互作用についての解明が重要となる。しかしながら, 病原菌が産生する D-AA と宿主における感染防御機構との関連性は不明であるため, *Mycobacterium avium* complex (MAC) が産生する D-AA がマクロファージ (M ϕ) の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的として種々の検討を行った。

【方法】 MAC 菌株として *M. intracellulare* N260 株を供試した。網羅的遺伝子発現解析は, 各種 D-AA について 100 μ M 存在下で 4 日間培養した Raw264.7 細胞から精製した RNA を用いて, RNAseq 解析にて行った。RNAseq 解析は Veritas 社 (シーケンス) および cBio 社 (発現量比較解析) に委託した。

【結果・考察】 MAC での産生が認められた 5 種類の D-AA を添加し 4 日間培養した M ϕ (RAW264.7 細胞) から RNA を精製し RNAseq 解析を行った。その結果, 脂肪酸代謝関連の遺伝子発現の増加とコラーゲンを主とする細胞外マトリックス形成に関わる遺伝子の発現減少や, 細胞傷害応答遺伝子の増加と細胞外マトリックス形成関連遺伝子, イオンチャネルやトランスポーターの発現減少など, 添加した D-AA 毎に様々な遺伝子の発現変動が認められた。特に, ペプチドグリカン構成する D-AA は, マクロファージによるコラーゲン形成関連遺伝子の制御に働いている可能性が示唆された。

P1-105/DP1-04-13

Investigation of LCV-mitochondria communication machinery through Rab32 function

○生田 紘夢, 新崎 恒平 (東薬大・生命科学・分子細胞生物学)

○Hiromu Oide, Kohei Arasaki (Dept. Mol. Cell Biol., Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm and Life Sci.)

After internalization human host cells, *Legionella pneumophila* (*L.p.*) secretes bacterial proteins called *Legionella* effectors into host cytosol for establishment of specialized infectious niche termed *Legionella*-containing vacuole (LCV). Although several works reported that LCV may contact mitochondria, molecular machinery of this contact has been obscured. To examine this, we have focused on host GTPase, Rab32 because Rab32 is recruited to the LCV and regulates mitochondrial morphology though its mitochondria-associated ER membrane distribution. Here we show that silencing of Rab32 inhibits *L.p.* growth and causes dissociation of LCV-mitochondria proximity, suggesting that Rab32 regulates LCV-mitochondria communication. We next tried to identify the *Legionella* effector that is required for recruitment of Rab32 to the LCV. To do this, we examined whether host Rab32-GEF (HPS1/HPS4 complex) are recruited to the LCV because GEF is necessary for activation of Rab protein and found that HPS4 is specifically recruited to the LCV. Furthermore, we could successfully identify *Legionella* effector(s) that has responsible for recruitment of HPS4 to the LCV. Because HPS4 forms a tight complex with HPS1 in host cells, our identified effector(s) may have functions for dissociation of HPS4 with HPS1 and recruitment of dissociated HPS4 to the LCV and we are currently examining this possibility.

P1-106

Legionella pneumophila-utilizes Rab33B function through the multiple bacterial proteins

○新崎 恒平¹, 松尾 帆乃香¹, 久堀 智子², 永井 宏樹^{2,3} (1東京薬大・生命, 2岐阜大・医・病原体制御, 3岐阜大・COMIT)

○Kohei Arasaki¹, Honoka Matsuo¹, Tomoko Kubori², Hiroki Nagai^{2,3} (1Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., 2Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., 3COMIT, Gifu Univ.)

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) is known to modulate host membrane trafficking. After internalization into the host, *L. pneumophila* creates specialized infectious niche called *Legionella*-containing vacuole (LCV) and regulates the distribution of LCV through a bacterial secretion protein, *Legionella* effector. We previously reported that host GTPase, Rab33B is recruited to the LCV and promotes the trafficking of LCV to the host ER. Additionally, phosphoribosyl-ubiquitination (PR-UB) of Rab33B in which it is canalized by SidE family *Legionella* effectors is necessary for the recruitment of Rab33B to the LCV. In this work, we identified two *Legionella* effectors, Lpg2518/Lpg2520 as another molecule for the recruitment of Rab33B to the LCV. In general, Rab-GDI activity (removal of Rab-GDI from Rab proteins to recruit them to target membrane) is required for the recruitment of Rab proteins to the target membrane and we demonstrated that Lpg2518/Lpg2520 have Rab-GDI activity against Rab33B. Furthermore, biochemical experiment revealed that Lpg2518/Lpg2520 preferentially associate with PR-ubiquitinated Rab33B. These data suggest that PR-UB of Rab33B is a signature for targeting of Rab33B to Lpg2518/Lpg2520. We are currently examining whether Lpg2518/Lpg2520 have another activity such as GEF (exchanging nucleotide state of Rab proteins from GDP to GTP for them activation).

P1-107/DP1-04-15

Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の C 末端側ドメインの機能解析

○倉田 寧々¹, 竹内 祥子¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹ (1大阪医薬大・薬・感染制御, 2大阪医薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of C-terminal side domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Nene Kurata¹, Shoko Takeuchi¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (1Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., 2Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。基礎疾患を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り死亡する。我々は本菌の臨床分離株は実験動物においても重篤な全身症状を示し死に至らしめることを明らかにしてきた。ビブリオ属細菌の Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素は複数のドメインを有しており、本毒素が細胞内に侵入した後にシステインプロテアーゼドメインが各ドメインに自己切断することにより機能的に働いていると考えられているが、各ドメインの機能や本毒素の細胞内への侵入経路は明らかとなっていない。そこで、本毒素の機能的ドメインの役割を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて MARTX 毒素自身が自己切断する C 末端側の 3 つのドメインの欠損株を作製するために、欠損部位の上流域と下流域の塩基配列を pDM4 に挿入し、組換えプラスミドを作製し、大腸菌 SM10 λ pir 株を形質転換した。大腸菌 SM10 λ pir 形質転換株から M2799 株に接合伝達し、セクションを行い、欠損株を作製した。同様に、機能的ドメインすべての欠損株も作製した。各種細胞に対する本菌および欠損株の細胞傷害活性を測定し、比較検討した。【結果と考察】本菌の C 末端側の 3 つのドメインの欠損株とすべての機能的ドメインの欠損株を作製した。得られた欠損株の DNA 配列を解析し、どちらもインフレームで目的遺伝子が欠損していることが確認された。現在、両欠損株を野生株の各種細胞に対する細胞傷害活性を測定し、MARTX 毒素の各ドメインの機能を解析している。

P1-108/DP1-10-01

Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の N 末端側ドメインの機能解析

○佐々木 舞¹, 竹内 祥子¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹ (1大阪医薬大・薬・感染制御, 2大阪医薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of N-terminal side domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Mai Sasaki¹, Shoko Takeuchi¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (1Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., 2Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。肝臓などに基礎疾患を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り死亡する。我々は本菌の臨床分離株は実験動物においても重篤な全身症状を示し死に至らしめるが、環境分離株の致死活性は非常に低いことを明らかにしてきた。ビブリオ属細菌の Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素は複数のドメインを有しており、本毒素が細胞内に侵入した後にシステインプロテアーゼドメインが各ドメインに自己切断することにより機能的に働いていると考えられているが、各ドメインの機能や本毒素の細胞内への侵入経路は明らかとなっていない。そこで、本毒素の機能を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて MARTX 毒素自身が自己切断する N 末端側の 2 つのドメインの欠損株を作製するために、N 末端側の 2 つのドメインの上流域と下流域の塩基配列を pDM4 に挿入し、組換えプラスミドを作製し、大腸菌 SM10 λ pir 株を形質転換した。大腸菌 SM10 λ pir 形質転換株から M2799 株に接合伝達し、セクションを行い、欠損株を作製した。各種細胞に対する本菌および N 末端側の 2 つの機能的ドメインの欠損株の細胞傷害活性を測定し、比較検討した。【結果と考察】本菌の N 末端側の 2 つのドメインの欠損株を作製した。得られた欠損株の DNA 配列を解析し、インフレームで目的遺伝子が欠損していることが確認された。現在、欠損株を野生株の各種細胞に対する細胞傷害活性を測定し N 末端側の 2 つのドメインの機能を解析している。

P1-109/DP1-10-02

***Vibrio vulnificus* の致死性毒素 MARTX 毒素の機能的ドメインの解析**

○能祖 由梨奈¹, 杉村 陽菜¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹ (1大阪医大薬大・薬・感染制御, 2大阪医大薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of functional domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Yurina Noso¹, Hina Sugimura¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (1Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., 2Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は魚介類の摂取や海水の創傷部暴露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。アルコール中毒者、糖尿病患者、肝機能に重篤な障害を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り、敗血症に陥るとその致死率は70%以上報告されている。我々は、本菌の臨床分離株は、実験動物の感染実験においても重篤な全身症状を示し死に至らしめるが、環境分離株の致死活性は非常に低いことを見出した。また、本菌の病原性には Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素が重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。そこで、本菌の細胞死誘導における MARTX 毒素の各機能的ドメインの役割を明らかにするために実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて実験を行った。各種細胞に対する本菌および毒素の欠損株の細胞傷害活性を測定した。また、MARTX 毒素の遺伝子をクローニングし、大腸菌により発現させ、MARTX 毒素のシステインプロテアーゼドメインによる自己切断後、SDS-PAGE を行い、アミノ酸シーケンサーを用いて自己切断部位の同定を行った。同定された2つの自己切断ドメインを各種培養細胞に発現させ、MARTX 毒素の各ドメインの機能を解析した。

【結果と考察】本菌の MARTX 毒素の機能的ドメインの一つであるシステインプロテアーゼドメインが自己切断する部位を *in vitro* で確認したところ MARTX 毒素に存在する5つのドメインドメインすべてを切断するのではなく、2か所で切断しN末端側2つのドメインとC末端側3つのドメインになることが明らかとなった。現在は、HeLa 細胞や 293FT 細胞に自己切断される2つのドメインを発現させ、両ドメインの機能解析を行っている。

P1-110/DP1-10-03

Negative transcriptional regulator of *V. parahaemolyticus* type III secretion system 2

○Sarunporn Tandhavanant^{1,2}, Hiroyuki Terashima¹, Dhira Saraswati Anggramukti³, Hirota Hiyoshi¹, Narisara Chantratita², Tetsuya Iida³, Shigeaki Matsuda³, Toshio Kodama¹ (1Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ., 2Dept. Microbiology and Immunology, Fac. Tropical Medicine, Mahidol Univ., 3Dept. Bacterial Infections, Research Inst. Microbial Diseases, Osaka Univ.)

Many pathogenic bacteria have mechanisms to regulate gene expression in response to host cell contact to establish infection. Here, we show that *Vibrio parahaemolyticus*, a causative agent of foodborne gastroenteritis, has a host cell contact-dependent regulatory mechanism for virulence gene expression. T3SS2, an essential virulence for acute gastroenteritis encoded by Vp-PAI, recognizes host cell contact by sensing intracellular K⁺ levels and switches its own secretory substrates by gatekeepers. Mutant deficient in the gatekeeper is unable to switch substrates and lock the secretory state into host cell contact. Transcriptome of T3SS2 gatekeeper mutants showed that the genes encoded by Vp-PAI were upregulated in a T3SS2 secretory activity-dependent manner, implying the presence of a negative regulator secreted by T3SS2. Comparative proteomic analyses identified a T3SS2 secretory substrate, VtrN, which negatively regulates Vp-PAI transcription. VtrN secretion was promoted under conditions that mimic host cell contact. *vtrN* gene deletion upregulated Vp-PAI expression independently of T3SS2 secretory activity. Furthermore, VtrN interacted with VtrB, a transcription factor of Vp-PAI, and repressed its activity. Thus, *V. parahaemolyticus* has a mechanism to upregulate virulence gene expression in response to host-cell contact by utilizing the host-cell recognition mechanism of T3SS2.

P1-111/DP1-10-04

***Porphyromonas gingivalis* 感染における PLC を介した細胞内カルシウム流入による歯周組織炎症への影響**

○中山 真彰^{1,2}, 内藤 真理子³, 中山 浩次³, 大原 直也^{1,2} (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)

The influence of PLC-mediated intracellular calcium influx in periodontitis during *Pg* infection

○Masaaki Nakayama^{1,2}, Mariko Naito³, Koji Nakayama³, Naoya Ohara^{1,2} (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* の病原因子ジンジパ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、ジンジパインによる 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、ジンジパインによる COX2 発現と PGE2 産生に対する PLC の関与を調べた。またジンジパインによる 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パインによる 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。

P1-112/DP1-10-05

Gingipain from *Porphyromonas gingivalis* promotes inflammation in human microglia cells

○藤井 望加¹, 山崎 裕¹, 長谷部 晃², 李 智媛² (1北大・院・歯・口腔健康科学・高齢者歯科学, 2北大・院・歯・口腔病態学・口腔分子微生物学)

○Mika Fujii¹, Yutaka Yamazaki¹, Akira Hasebe², Ji-Won Lee² (1Gerodontology, Dept. Oral Health Science, Fac. Dental Medicine, Hokkaido Univ., 2Microbiology, Dept. Oral Pathobiological Science, Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ.)

Evidence of a correlation between chronic periodontitis and an increased risk of dementia has been growing, with inflammation response associated with *Porphyromonas gingivalis* recognized as a potential risk factor for transitioning to Alzheimer's disease (AD). While gingipains produced by *P. gingivalis* have been identified in the brains of AD patients, a direct causal relationship has not been conclusively proven. In our study, we investigated the impact of gingipain on brain cell function by conducting *in vitro* experiments with brain-resident microglia. Treatment of HMC3 cells with recombinant Arg-gingipain (Rgp) resulted in a significant increase in the gene expression of inflammatory responses, including IL-1b, IL-6 and TNF-α, as well as observed elevated cytokine levels measured by ELISA. Employing pH sensing probe (pHrodo Red) and fluorescence-conjugated β-amyloid for phagocytosis analysis revealed that gingipain induced notable changes in membrane ruffling and morphological alterations in microglia cells. Our findings affirm the significant role of Rgp as a mediator in the inflammatory cascade of human microglia cells.

P1-114/DP1-10-07

***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¹, 長宗 秀明^{1,2}, 友安 俊文^{1,2}, 田端 厚之^{1,2} (1徳島大院・創成科学・生物資源学, 2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 Yamamori¹, Hideaki Nagamune^{1,2}, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Atsushi Tabata^{1,2} (1Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., 2Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】 アンギノサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒトの口腔内常在性の日和見レンサ球菌である。この AGS の構成菌種の中で、*S. anginosus* と *S. constellatus* の β 溶血株がペプチド溶血毒素 Streptolysin S (SLS) を産生するが、この SLS に対する宿主細胞の応答反応は明らかにされていない。また、近年では臨床現場において口腔以外の感染症や疾患から AGS が分離されており、本菌群と異所性感染との関連が注目されている。そこで本研究では、AGS の血中移行を想定して、ヒト由来免疫細胞における SLS に対する宿主応答メカニズムについて検討した。

【方法】 *S. anginosus* subsp. *anginosus* NCTC 10713^T (基準株) と基準株由来 SLS 遺伝子欠失株 (Δ saqAs) を被検菌とし、ヒト血清アルブミン存在条件下で培養した菌液から培養上清を調製した。培養上清を用いたヒト単球系細胞株 THP-1 における細胞障害性の検討や、炎症性サイトカインに着目した遺伝子及びタンパク質発現変動の解析を行った。

【結果・考察】 SLS を含む培養上清を作用させた THP-1 細胞では、細胞膜障害に伴う細胞内 Ca²⁺の上昇と複数の炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇が確認された。この SLS 依存的なサイトカイン遺伝子の発現上昇は、Ca²⁺のキレートにより有意に抑制された。また、SLS 依存的なサイトカインの発現には、ERK などの MAPK シグナル伝達経路が関与していた。以上の結果から、SLS の作用に伴うシグナル伝達は、Ca²⁺の細胞内流入を起点として、MAPK 経路の活性化により免疫応答が誘導されることが明らかになった。現在、異所性感染の原因菌として注目されている AGS、特に SLS を産生する β 溶血性菌種の病原性を理解するため、さらに検討を進めている。

P1-115/DP2-16-03

肺炎球菌に対して誘導される階層性オートファジーから明らかになったユニークな Atg8 パラログの機能解析

○佐久間 智理^{1,2}, 小川 道永¹, 栗石 早矢佳¹, 明田 幸宏¹ (1感染研・細胞・農研機構・生物研)

Functional analysis of Atg8 paralogs in pneumococci-induced hierarchical autophagy

○Chisato Sakuma^{1,2}, Michinaga Ogawa¹, Sayaka Shizukuishi¹, Yukihiko Akeda¹ (1Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., 2Nat. Inst. Agrobiol. Sci, NARO)

肺炎球菌は鼻咽頭に常在し、ときとして急性中耳炎や副鼻腔炎などの上気道感染症を引き起こす。さらに、小児や高齢者ではしばしば肺炎や菌血症・髄膜炎といった侵襲性肺炎球菌感染症の起原菌となり、その侵入門戸は小児では鼻咽頭上皮、高齢者では肺胞上皮であると考えられている。これらの上皮細胞は物理的な一次バリアとして機能していると考えられているが、上皮細胞に侵入した肺炎球菌と宿主細胞との相互作用については不明な点が多く残されている。現在までに我々は、肺炎球菌を感染させて1時間後の細胞で、肺炎球菌を包む非典型的な一重膜オートファジーである conjugation of Atg8s to single membranes (CASM) が誘導されること、CASM は殺菌力を持たずに終息すること、そして感染2時間後に典型的な殺菌性のオートファジーであるゼノファジーが誘導されることを報告してきた。今回我々は、肺炎球菌感染特有の階層的オートファジー誘導メカニズムを明らかにするために、Atg8 パラログ (LC3A/B/GBRP/GBRPL1/GATE16) に着目した。Atg8 パラログは典型的なオートファジーにおいて機能することが知られているが、ファミリー分子間で相補的に働くため、個別の機能については不明な点が多く残されている。各 Atg8 パラログの局在の経時変化やノックダウンによる階層的オートファジーへの影響を解析した結果、興味深い知見を得たので報告する。

P1-116/DP2-16-04

承認薬ライブラリーのスクリーニングによる Chlamydia trachomatis が細胞内で利用する新たな標的分子の探索

○Saicheng Zhang, Ruiyu Li, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学研究院)

Search for new target molecules used by Chlamydia trachomatis by screening approved drug libraries

○Saicheng Zhang, Ruiyu Li, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci. Hokkaido Univ.)

【目的】 Chlamydia trachomatis (Ct) は、不妊や子宮頸癌の危険因子である。私達は Ct が PI3K-AKT や p38MAPK を用い、癌細胞と同様に低酸素に適応していることを発見した。利用する伝達経路に共通性があるのであれば Ct の標的分子は癌創薬に結びつく。そこで Ct 増殖の阻害効果を指標に既存薬ライブラリーをスクリーニングし KEGG 情報から標的経路と分子を絞り込みその妥当性について検証した。【方法】 既存薬: LTT バイオ (1,241 医薬品) と北大創薬研 (3,200 医薬品) から提供された。菌株と細胞: GFP 発現 Ct (L2/434/Bu 株) と Hep-2 を用いた。スクリーニング: 既存薬存在下で感染細胞を通常酸素 (21%O₂) と低酸素 (2%O₂) で 48 時間培養し封入体数を指標に薬効を評価した。KEGG: ヒット既存薬が作用するホモ・サビエンス (hsa) の全ての経路に関わる遺伝子を出現頻度を考慮し 'Weighting value' として表し 26 種類の has シグナル情報伝達経路で、その総計 'Annotation density' を比較した。標的分子の検証: Ct を Hep-2 細胞に感染させ H-89 (PKA 阻害剤), メチレンブルー (MB) (PKG 阻害剤) 及び 666-15 (CREB 阻害剤) の存在下で通常酸素と低酸素で 48 時間培養し封入体数を算定した。【結果と考察】 既存薬スクリーニングで7種類の薬がヒットし22の経路と3,623個の遺伝子が同定された。また hsa04024 cAMP-PKA と hsa04022 cGMP-PKG 経路が新規に同定された。阻害剤が酸素依存的に Ct の増殖を抑制した。これらの結果より、CtL2 の細胞内増殖は、酸素分圧依存的に PKA, PKG 及び CREB を要求することが示唆された。

P1-117/DP2-16-08

Functional analysis of ribD involved in immune escape of Francisella tularensis

○柴田 健輔^{1,2,3}, 高木 啓司¹, 清水 隆⁴, 度会 雅久⁴ (1山口大・医・ゲノム機能分子解析学, 2九州大・医・眼病態イメージング, 3大阪大・微研・分子免疫制御, 4山口大・獣医)

○Kensuke Shibata^{1,2,3}, Keishi Takagi¹, Takashi Shimizu⁴, Masahisa Watarai⁴ (1Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Yamaguchi Univ., 2Dept. Ocular Pathology and Imaging Science, Sch. Med., Kyushu Univ., 3Dept. Mol. Immunol., Sch. Med., Research Inst. Microbial Diseases, Osaka Univ., 4Joint Fac. Veterinary Medicine, Yamaguchi Univ.)

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells play protective roles against infection with an intracellular pathogen *Francisella tularensis* through recognition of a bacterial metabolite 5-OP-RU derived from vitamin B2 synthetic pathway. Recently, we have shown that, compared with a free-living strain *Francisella tularensis* subsp. *novicida* (FN), an intracellular pathogen *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (FT) escapes from MAIT cell-mediated acquired immunity by five amino acid mutations (I59T, V61A, G62V, H80C, and Q254R) in ribD, which is an enzyme essential for 5-OP-RU synthesis. In this study, we aimed to identify the amino acids involved in escaping from MAIT cell-mediated acquired immunity. First, we compared 23573 sequences of bacterial ribD deposited in NCBI and found that H80C alteration was unique in the FT strain. To predict the impact of the mutation in 3D structure of ribD, analysis was performed by applications of Artificial Intelligence techniques. H80C mutation was located at the zinc-binding site of ribD. Crude metabolites from the FN strain with H80C mutation lowered agonist activity to MAIT cells as compared with those from the FN strain. These results suggest that H80C mutation in FT is involved in escaping from MAIT cell-mediated acquired immunity. This finding provides us useful information for vaccine development targeting bacterial metabolites.

P1-118/DP2-16-09**硬ダニ媒介性回帰熱群ボレリア菌の感染初期における表面抗原変換メカニズムの検索**

○竹内友陽¹, 佐藤 梢², 川端 寛樹², 高野 愛¹ (¹山口大・獣・獣疫医学,²感染研・細菌第一)

Surface antigen conversion at the early stages of infection in relapsing fever borreliosis

○Tomohi Takeuchi¹, Kozue Sato², Hiroki Kawabata², Ai Takano¹ (¹Dept. Vet. Med., Joint Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ., ²Dept. Bac-I, NIID)

回帰熱は、ボレリア菌が引き起こす再発性の発熱を特徴とした急性の感染症であり、軟ダニであるヒメダニが媒介する古典的回帰熱の他、硬ダニであるマダニによって媒介される新興回帰熱が近年報告されている。*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。本菌による新興回帰熱では、明確な回帰性の発熱を伴わないことが多いが、その原因は不明である。古典的回帰熱では、抗体からの攻撃を回避するために菌の表面抗原遺伝子 *vlp/vsp* が組換えを起こすことで菌表面の抗原性が変化した結果、再発性の菌血症を生じ患者は発熱する。我々のこれまでの解析により、*B. miyamotoi* でも *vlp/vsp* が発現しており、組換えが生じていることがマウスを用いた感染実験で明らかとなってきた。しかしながら、この組換えはマウスで抗体産生が始まる7日前後よりも早い5日の段階で起こっていた他、抗体産生が見られない SCID マウスでも感染後10日以降で遺伝子組換えが起こることが明らかとなった。血液中からの菌体の排除は免疫正常マウスでは10日前後で見られる一方、SCID マウスでは30日以降も血液中から菌が検出され、菌の排除が行われないことも明らかとなった。以上の結果から、*B. miyamotoi* で見られる表面抗原遺伝子 *vlp/vsp* の組換えのトリガーは、これまで古典的回帰熱で報告されてきた抗体産生による体内からの排除とは異なる可能性も考えられた。今後、免疫不全マウスの系統を検討し、組換えメカニズムの解明を目指す。

P1-119/DP2-16-10**Pathogenic *Leptospira* induces lipolysis in the murine adipocytes in vitro and in vivo**

○尾鶴 亮, 吉村 芳修, 藤木 正太郎, 石井 一成, 清水 章文, 栗原 悠介, 桑原 俊太郎, 廣松 賢治 (福岡大・医・微生物免疫)

○Ryo Ozuru, Michinobu Yoshimura, Shotaro Fujiki, Kazunari Ishii, Akinori Shimizu, Yusuke Kurihara, Shuntaro Kuwahara, Kenji Hiromatsu (Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Fukuoka Univ.)

We previously reported that pathogenic *Leptospira* colonizes the subcutaneous adipose tissue neighboring the injection sites (Ozuru et al. PLOS ONE. 2017). Because the primary carbon sources of leptospirae are fatty acids and glycerol, which are the components of triglycerides, this seems a reasonable strategy. In this study, we investigated the interaction between pathogenic *Leptospira* and adipocytes in vitro and in vivo.

Differentiated 3T3-L1 adipocytes (the murine-derived adipose progenitor cell line and ten days after adipogenesis induction) cocultured with *L. interrogans* serovar Manilae strain L495 showed a significant decrease in triglycerides (an increase in lipolysis) without cell damages. Surprisingly, no glycerol was detected with lipolysis at all time points. Similar lipolysis occurred in a mouse infection model, indicating that percutaneously infected *Leptospira* affects lipid metabolism in mice. *Leptospira* enumeration showed a delayed proliferation with adipocytes compared to without. This suggests that, although adipocytes were inhibiting *Leptospira* proliferation as a defense mechanism initially, *Leptospira* finally seems to proliferate by obtaining their carbon sources. Future studies will focus on

1. identifying the causative factors of pathogenic *Leptospira* that promote lipolysis and
2. the detailed immune response and changes in lipid metabolism in the host.

P1-120/DP2-16-11**Co-infection of *C. pneumoniae* and *P. gingivalis* exacerbates aspiration pneumonia**

○内記 良一¹, 中西 祥吾², 加藤 綾香³, 荒井 領¹, 岩瀬 智彦¹, 梅村 正幸⁴, 三谷 章雄², 長谷川 義明¹ (¹愛知学院大・歯・徹, ²愛知学院大・歯・歯周, ³愛知学院大・歯・小児歯, ⁴琉球大・熱生研・感染防御)

○Yoshikazu Naiki¹, Shogo Nakanishi², Ayaka Kato³, Ryo Arai¹, Tomohiko Iwase¹, Masayuki Umemura⁴, Akio Mitani², Yoshiaki Hasegawa¹ (¹Dept. Microbiol. Sch. Dent. Aichi Gakuin Univ., ²Dept. Periodont. Sch. Dent. Aichi Gakuin Univ., ³Dept. Pediatric. Sch. Dent. Aichi Gakuin Univ., ⁴Trop. Biosphere Res. Cent., Univ. Ryukyus)

Background: *C. pneumoniae* (C.p.) is a major causative agent of pneumonia and has recently been linked to the progression of atherosclerosis. *P. gingivalis* (P.g.) is known for its contribution to periodontal disease but has also emerged as a potential risk factor for aspiration pneumonia. This study investigated their combined impact on aspiration pneumonia and its potential role in exacerbating the disease. **Methods:** We examined C.p. and P.g. effects on xenophagy (a cellular process eliminating pathogens) in HEp-2 cells. We assessed inflammatory markers and the expression of proteins involved in xenophagy regulation. To investigate the effects of co-infection on lung inflammation and disease progression, we created a mouse model of aspiration pneumonia to investigate the in vivo effects of co-infection with C.p. and P.g. **Results:** C.p. initially induced xenophagy, but later suppressed it via TRAF6-Beclin1 interaction and Beclin1 ubiquitination. P.g. potentially inhibited xenophagosome formation and facilitated the growth of C.p. infection. Co-infection significantly increased GAPR1 protein expression and TNF- α production compared to single infections, suggesting a heightened inflammatory response. **Conclusion:** Our findings suggest that co-infection with C.p. and P.g. may exacerbate aspiration pneumonia by manipulating xenophagy and promoting inflammation.

P1-121/DP2-16-12**Inflammatory responses in the intestinal mucosa of mice infected with *Helicobacter mastomyrinus***

○保木 陸¹, 宮内 綾乃¹, 吉沢 隆浩², 嶋田 新², 大沢 一貴³, 増山 律子¹, 山中 仁木² (¹立命館大院・食マネ, ²信州大・基礎研セ, ³長崎大院・医歯薬)

○Riku Yasuki¹, Ayano Miyauchi¹, Takahiro Yoshizawa², Shin Shimada², Kazutaka Ohsawa³, Ritsuko Masuyama¹, Hitoki Yamanaka² (¹Grad. Sch. Gastron. Manag., Ritsumeikan Univ., ²Res. Ctr. Adv. Sci. Technol., Shinshu Univ., ³Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

Helicobacter mastomyrinus is frequently detected in laboratory mice kept in Japan, though, only few informations on the pathogenicity are reported. We have demonstrated the pathogenic responses of the liver caused by the infection of the isolates in the last annual meeting. In the next step, we investigated the immune responses in cecum and colon of infected mice. *H. mastomyrinus* isolates were orally infected to BALB/c mice (male, 5-6 weeks old). At 24 weeks post infection, the RNAs were extracted from the splenocytes and the lamina propria mononuclear cells of both cecum and colon, and the real time PCR were performed to quantify the expressions of cytokine mRNAs. Moreover, the pathological changes of cecum and colon were examined by histologically. The expression levels of cytokine mRNAs such as inflammatory, Th1, Th2, Th17, and Treg cytokines were significantly higher in the colon of infected mice than control mice, whereas the expressions in the spleen and cecum of infected mice were detected as the comparable or the lower levels than control mice. In infected mice, the infiltration of many granulocytes and lymphocytes and epithelial hyperplasia were observed in the mucosa of cecum and colon. These results indicate that *H. mastomyrinus* translocate to the liver via the invasion into the mucosa of cecum and colon in mice, resulting in the inflammatory responses in those tissues.

P1-122/DP2-16-13

感染時に発現している肺炎球菌プラスミノゲン結合タンパク質の解析

○平山 悟¹, 日吉 巧^{1,2,3}, 安井 惟人^{1,3}, 土門 久哲^{1,2}, 寺尾 豊^{1,2} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・高口研セ, 3新潟大・院医歯・歯周)

Plasminogen-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* expressed during infection

○Satoru Hirayama¹, Takumi Hiyoshi^{1,2,3}, Yoshihito Yasui^{1,3}, Hisanori Domon^{1,2}, Yutaka Terao^{1,2} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Div. Periodontol., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

Streptococcus pneumoniae による細菌性肺炎の発症メカニズム解析のため、同菌感染マウスの肺胞洗浄液のプロテオーム解析を行い、*in vivo* で感染時に発現しているタンパク質を15種同定した。この中で感染関連の機能が未解明な TpiA, ClpC, UvrC について組換え体を作製し、機能解析を推進した。

宿主分子との相互作用を解析したところ、これら3種はプラスミノゲン (Plg) と結合した。TpiA, ClpC, UvrC それぞれの添加により、活性化因子による Plg からプラスミンへの変換を有意に促進した。*S. pneumoniae* の培養上清および菌体表面層画分を解析すると、自己溶菌酵素欠失株では野生株と比較して TpiA, ClpC, UvrC の発現量が少なかった。TpiA と Plg の結合はリジンアナログの添加により阻害されたため、リジン残基の関与が示唆された。そこで、TpiA に含まれる全リジン残基をそれぞれアラニンへ置換したところ、C 末端リジン残基の置換体では Plg 結合性およびプラスミンへの変換促進性が有意に小さかった。

以上の結果より、細胞内タンパク質 TpiA, ClpC, UvrC は自己溶菌により菌体外へ放出され、菌体表面層において宿主 Plg と結合しプラスミンへの変換を促進することが示唆された。このメカニズムにより宿主プロテアーゼを菌体に結合させ、宿主組織侵入に寄与すると推察される。*S. pneumoniae* の Plg 結合タンパク質は、TpiA, ClpC, UvrC および我々が別に解析した SufC の他に9種が報告されている。その中で α -エノラーゼ、伸長因子 Tu, GAPDH は上述のプロテオーム解析でも検出できている。そこで、全13種の Plg 結合タンパク質について、*S. pneumoniae* の増殖フェーズや Plg の有無による mRNA 転写量の変化を解析している。

P1-123/DP2-16-14

肺炎球菌 SufC は自己溶菌によって菌体外へ放出され宿主プラスミノゲンと結合する

○安井 惟人^{1,2}, 平山 悟¹, 磯野 俊仁¹, 日吉 巧^{1,2,3}, 土門 久哲^{1,3}, 寺尾 豊^{1,3} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・歯周, 3新潟大・院医歯・高口研セ)

Pneumococcal protein SufC is released extracellularly by autolysis and binds to host plasminogen

○Yoshihito Yasui^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Toshihito Isono¹, Takumi Hiyoshi^{1,2,3}, Hisanori Domon^{1,3}, Yutaka Terao^{1,3} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2Div. Periodontol., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

【背景と目的】*Streptococcus pneumoniae* の病原因子は、主に *in vitro* で同定されてきた。本研究では、*S. pneumoniae* 感染モデルマウスの *in vivo* サンプルを対象とし、感染時に生体内で発現する同菌の分子を質量分析法にて同定し機能解析を行った。

【方法と結果】*S. pneumoniae* 感染マウスの気管支肺胞洗浄液をプロテオーム解析し、*in vivo* で発現している *S. pneumoniae* のタンパク質群を同定した。その中から、菌体内で Fe-S クラスターの生合成に関与する ATPase である SufC を選択し、*Brevibacillus* 発現系を用いて SufC の組換え体を作製した。ELISA 解析において、SufC はヒトプラスミノゲンと有意に結合した。Biacore 解析によって、SufC とプラスミノゲンの結合は濃度依存的であることが示された。プラスミノゲンは組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) によってプラスミンに変換されるが、この変換が SufC の添加量依存的に促進された。*S. pneumoniae* の自己溶菌酵素オートリシンの遺伝子欠失株を用いて菌体表面層画分の SufC を Western blot 法で検出すると、野生株と比較して欠失株では SufC 量が少なかった。

【考察】*S. pneumoniae* の菌体内で ATPase として機能する SufC は、マウス感染時に肺胞内で発現する。次いで、オートリシン依存的な自己溶菌により菌体外へ放出され、菌体表面層にも局在することが明らかになった。さらに、SufC はプラスミノゲンと結合し、tPA によるプラスミンへの変換を促進することが示された。以上より、*S. pneumoniae* は宿主への感染や宿主内での生存のため、宿主プロテアーゼのプラスミンを SufC 介在的に活用する可能性が推察された。

P1-124/DP2-16-15

胃癌患者の胃内より分離した硝酸塩還元菌のピロリ菌共感染マウスへの影響

○小松原 万里奈¹, 山本 由弥子², 内山 淳平², 松下 治², 後藤 和義¹, 渡辺 朱理³, 横田 憲治¹ (1岡山大・保健学研究科, 2岡山大・医歯薬研究科・病原細菌, 3徳島大・医歯薬学・口腔機能管理学)

Effects of nitrate-reducing bacteria from the gastric cancer patients in *H. pylori* co-infected mice

○Marina Komatsubara¹, Yumiko Yamamoto², Jumpei Uchiyama², Osamu Matsushita², Kazuyoshi Gotoh¹, Akari Watanabe³, Kenji Yokota¹ (1Grad. Sch. Health Science, Okayama Univ., 2Dept. Path. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., 3Oral Health Care and Rehabilitation, Inst. Biomed. Sci. Tokushima Univ.)

【目的】*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は胃癌の重要なリスク因子である一方、感染者に占める胃癌患者の割合は1~3%と少ないため、近年、発癌には他のリスク因子が必要であると考えられている。我々はその因子の一つとして、胃内で増殖する硝酸塩還元菌に着目して研究を進めており、これまでに、胃の病態の進展に伴って胃から検出される菌に占める硝酸塩還元菌の割合が高くなること、胃癌患者由来の硝酸塩還元菌が胃炎患者由来のものより高い還元能を有することを明らかにしてきた。また、ピロリ菌感染宿主の細胞性免疫低下は胃癌発症リスクの指標として有用であることも判明した。これより、本研究ではピロリ菌と胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の共感染が胃癌のリスク因子となり得るか検討した。【方法】ピロリ菌と IL-10 を投与したマウスをピロリ菌単独投与群と *E. coli* 投与群、*K. pneumoniae* 投与群、*S. paratyphi* 投与群に分けた。血清のピロリ菌抗体価 (総 IgG, IgG1, IgG2) および脾臓リンパ球の培養上清サイトカイン (IL-1beta, IL-6, IL-2, IL-4) を ELISA 法、脾臓リンパ球の mRNA (IL-4, IL-12, IFN- γ) を RT-PCR 法、転写因子 (STAT4, T-bet, STAT6, GATA3) をウエスタンブロット法で測定し、胃粘膜の HE 染色像を観察した。【結果と考察】硝酸塩還元菌投与群はピロリ菌単独投与群と比較して総 IgG および IgG1/IgG2 比が高い値を示した。また、*K. pneumoniae* 投与群において IL-12, IFN- γ の低下および STAT6 の発現が認められた。このことから、ピロリ菌と硝酸塩還元菌の共感染は免疫を液性免疫に傾け、特に *K. pneumoniae* の共感染においてその傾向が強く現れることが示唆された。

P1-125/DP2-16-16

Analysis of Vi capsular polysaccharide on an alternative *Salmonella* Typhi mouse infection model

○T. Hoan Pham^{1,2}, 日吉 大貴², 児玉 年央² (1Grad. Sch. Biomedical Sciences, Nagasaki Univ., 2Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ.)

○T. Hoan Pham^{1,2}, Hirotsuka Hiyoshi², Toshio Kodama² (1Grad. Sch. Biomedical Sciences, Nagasaki Univ., 2Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ.)

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) is a causal agent of typhoid fever, concerned a global health issue. Due to *S. Typhi* is strictly human pathogen, the lack of animal models hampers research into pathogenesis and vaccine. Vi capsular polysaccharide (Vi-antigen) produced by *viaB* locus is a virulence and protective factor of *S. Typhi*. To better understand a functional role of Vi-antigen in disease progression, we attempted to make an alternative *S. Typhi* mouse infection model using *S. Paratyphi C*, another typhoidal *Salmonella* serovar, which carrying 99.9% identical Vi-antigen of *S. Typhi*. First, we deleted *S. Paratyphi C* *fepE* gene to imitate wild type *S. Typhi* outer membrane structure, and the *fepE* mutant strain was infected with mice that showed systemic infection with substantial bacterial burdens in spleen and liver up to 14 days post-infection (p.i.). Next, a *viaB* locus-knockout strain (*fepE* *tvIB-vexE*) was generated to analyse a function of Vi-antigen in the pathogenesis, leading to a significant decrease in bacterial numbers in the organs compared to the parental strain (*fepE*). The capacity of Vi-antigen to evade host defences was diminished by 2 days p.i., highlighting its role in the early stage of systemic dissemination of *S. Typhi*. Continual research employing this model aims to reveal *S. Typhi* pathogenic mechanisms and vaccine assessment.

P1-126/DP2-19-01**Catheter-associated biofilm infection of non-tuberculosis mycobacteria in mice**

○山本 健太郎¹, 辻村 祐佑¹, 鳥越 祥太^{1,2}, 阿戸 学¹ (1国立感染症研・感染制御, 2国立感染症研・安管)

○Kentaro Yamamoto¹, Yusuke Tsujimura¹, Shota Torigoe^{1,2}, Manabu Ato¹ (1Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, 2Mgmt. Dept. Biosafety, Lab. Anim., and Pathog. Bank, NIID)

Non-tuberculosis mycobacterial (NTM) diseases are steadily increasing in prevalence and mortality worldwide. *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare*, the two major pathogens of NTM diseases, are resistant to antibiotics, and chlorine, which requires their ability to survive in natural environments and disinfected municipal water. They can also form biofilms on artificial surfaces to provide a protective barrier and habitat for bacilli. This study develops a mouse model of catheter-associated systemic disseminated disease caused by *M. intracellulare* that reproduces the pathophysiology of catheter-associated infections observed in patients undergoing peritoneal dialysis. In addition, the bioluminescence system enabled noninvasive visualization of the amount and distribution of bacilli in vivo and conveniently examine the efficacy of antimicrobials. Furthermore, the cellulose-based biofilms, which were extensively formed in the tissue surrounding the catheter insertion site, reduced drug therapy effectiveness. Overall, this study provides insights into the cause of the drug resistance of NTM and may guide the development of new therapies for NTM diseases.

P1-127/DP2-19-12**病原真菌 *Trichosporon asahii* の Hog1 を介するストレス抵抗性機構**

○松本 靖彦, 杉山 悠, 長町 多恵, 吉川 麻美, 杉田 隆 (明薬大・微生物)

Hog1-mediated stress tolerance in the pathogenic fungus *Trichosporon asahii*

○Yasuhiko Matsumoto, Yu Sugiyama, Tae Nagamachi, Asami Yoshikawa, Takashi Sugita (Dept. Microbiol., Meiji Pharm Univ.)

病原真菌である *Trichosporon asahii* は、酵母および菌糸・分節型分生子を形成する二形性の真菌であり、好中球が減少した患者に対して重篤な深在性真菌症を引き起こすことがある。近年、*T. asahii* の遺伝子欠損株を樹立するための遺伝子組換え技術と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おり、カルシニューリン経路が *T. asahii* のカイコに対する病原性に関与することが示されている。

Hog1 タンパク質は、細胞内の様々なリン酸化経路を担う Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである。*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、Hog1 タンパク質は浸透圧ストレスなどの様々なストレス抵抗性に関与する。しかし、*T. asahii* のストレス抵抗性や病原性に Hog1 タンパク質が寄与するか不明である。

本研究で我々は、*T. asahii* における Hog1 タンパク質をコードする遺伝子 (*hog1* 遺伝子) の欠損株を作製した。*hog1* 遺伝子欠損株は、親株より 40°C という高温ストレスに感受性であった。また、細胞膜ストレス、酸化ストレス、DNA 傷害化合物および抗真菌薬アムホテリシン B に対しても *hog1* 遺伝子欠損株は感受性を示した。さらに、*hog1* 遺伝子欠損株はカイコに対する病原性が低下していた。以上の結果は、Hog1 タンパク質を介するシグナル伝達経路が *T. asahii* のストレス抵抗性を担うことを示唆している。

P1-128/DP2-19-13**Mislocalization of the mechanosensor Piezo during leptospiral infection of epithelial cells**

○Isabel Sebastian, 山城 哲, Claudia Toma (琉大・医院・細菌)

○Isabel Sebastian, Tetsu Yamashiro, Claudia Toma (Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. of the Ryukyus)

Piezo is a mechanosensor channel located in the plasma membrane which is required to preserve epithelial barrier function through extrusion of cells in crowding areas or cell division in sparse regions. We have reported that *Leptospira interrogans* induces E-cadherin (E-cad) endocytosis and actin cytoskeleton perturbation to disassemble the apical junctional complex (AJC) allowing bacterial paracellular migration through the epithelial monolayer. Piezo is functionally tethered to the actin cytoskeleton via the E-cad/β-catenin complex, whose perturbation impairs Piezo-mediated responses. The aim of this study is to clarify if *L. interrogans* can also alter the function of Piezo1 as a homeostatic sensor.

Renal proximal tubule epithelial cells were infected with *L. interrogans* and the disassembly of the AJC was monitored by measurement of the transepithelial electrical resistance. Immunofluorescence analysis showed that Piezo was displaced from the plasma membrane in infected cells. A combination of lysosomal and proteasomal inhibitors, which prevented E-cad endocytosis, also inhibited the leptospiral induced-mislocalization of Piezo.

Our results suggested that induction of E-cad endocytosis by *L. interrogans* affects force transmission and signal transduction between the plasma membrane and the cytoskeleton which are critical for the maintenance of the epithelial barrier integrity.

P1-129/DP2-19-14**マイコプラズマの D アミノ酸産生にかかわるラセマーゼについての検討**

○山本 武司¹, 奥野 未来¹, 土谷 祐一², 星子 裕貴¹, 山本 奈々絵², 今井 有未¹, 小椋 義俊¹ (1久留米大・医・感染医学, 2九大病院・薬剤部)

The investigation of racemase involved in D-amino acid production by *Metamycoplasma hominis*

○Takeshi Yamamoto¹, Miki Okuno¹, Yuichi Tsuchiya², Yuki Hoshiko¹, Nanae Yamamoto², Yumi Imai¹, Yoshitoshi Ogura¹ (1Dept. Infect. Med., Sch. Med., Kurume Univ., 2Dept. Pharmacy., Kyushu Univ. Hosp.)

D アミノ酸はアミノ酸の光学異性体の一つであり、L アミノ酸とは異なりヒト生体内ではごく少量しか存在しないとされている。しかしながら細菌において D アミノ酸は細胞壁構成アミノ酸として普遍的に存在しており、近年では菌体外に放出される D アミノ酸が細菌-細菌間あるいは細菌-宿主間相互作用において重要な役割を担っていることが明らかとなっている。一方、細胞壁を持たないマイコプラズマではこれまで D アミノ酸の産生は確認されておらず、その産生に関わる D アミノ酸ラセマーゼについても十分な評価が行われていない。そこで本研究では過去に D アミノ酸ラセマーゼについての報告があった *M. hominis* に着目し、同遺伝子のマイコプラズマにおける位置づけの解析と D アミノ酸産生における役割の評価を行った。まず D/L 体を分離するためのラベル化後、LC-MS/MS を用いて D アミノ酸産生の評価を行った。その結果、D アミノ酸ラセマーゼをコードする *orr* 遺伝子陽性株では D-lysine と D-arginine が培養上清並びに菌体中に観察された。このことから *M. hominis* は D アミノ酸を産生することが明らかとなった。また公開データベース上のマイコプラズマについて *orr* 遺伝子の保有状況を確認したところ、同遺伝子は *Metamycoplasma* 属のマイコプラズマに広く保存されていることが確認された。また、同属において株間で *orr* 遺伝子の保有状況に差がある種は *M. hominis* のみであった。D アミノ酸には感染/定着のニッチの獲得に重要な働きがある一方で、宿主免疫機構を刺激する働きが一部報告されている。このことから *M. hominis* は病原体としての進化の過程で同遺伝子の保有状況に変化が生じていることが示唆された。

P1-130/DP2-19-15

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宿主感染関連遺伝子群の解析

○阪口 義彦¹, 武 晃², 後藤 和義³, 山本 由弥子³, 幸田 知子⁴, 向本 雅都⁴, 竹原 正也¹, 林 哲也⁵, 小熊 恵二³, 永浜 政博¹ (1徳島文理大・薬, 2北里大・医, 3岡山大・学術研究院, 4大阪公大院・獣医, 5九大院・医)

Analysis of host infection-related genes of bacteriophages encoding botulinum toxin types C and D

○Yoshihiko Sakaguchi¹, Akira Take², Kazuyoshi Gotoh³, Yumiko Yamamoto³, Tomoko Kohda⁴, Masafumi Mukamoto⁴, Masaya Takehara¹, Tetsuya Hayashi⁵, Keiji Oguma³, Masahiro Nagahama¹ (1Facul. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ., 2Kitasato Univ. Sch. Med., 3Dept. Med., Lab. Sci., Grad. Sch. Heal. Sci., Okayama Univ., 4Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 5Facul. 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。このうちC型とD型毒素遺伝子のみ、バクテリオファージ(ファージ)によりボツリヌス無毒株に伝播される。我々は、ファージの感染サイクルの全容を明らかにするため、まずはC型とD型毒素遺伝子を伝播するファージ(c-468, c-6813, d-1873, d-4947, d-sa)のゲノム構造の比較解析を行った。また、ゲノム上の種々の遺伝子産物の機能についても解析した。C型毒素を伝播するファージ(c-st)において、ゲノムサイズは185,681 bpで、C型毒素を含む198個のタンパク質コード領域(ORF)が同定された。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し、ボツリヌス毒素の産生能力を獲得することが明らかとなった(偽溶原化)。このことから、培養条件によってボツリヌス毒素産生性が消失する現象との関連性が推察された。偽溶原化において、*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、複数のC型およびD型ファージ株で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C型またはD型毒素遺伝子、溶原化関連遺伝子群が共通して保存されていた。しかしながら、種々のファージゲノム配列を比較すると、c-stはc-468とは類似していたが、他のファージとは大きく異なっていた。また、c-stの溶原化に必須とされる溶菌酵素関連遺伝子を同定し、その遺伝子産物のボツリヌス無毒株に対する溶菌活性および結合性を解析している。詳細については、本学会総会にて発表する。

P1-131/DP2-19-16

Streptococcus pneumoniae infection induced kidney specific depletion of sulfur metabolites in mice

Rahman Azizur, 張 田力, 津々木 博康, 豊元 柊弥, 澤 智裕 (熊本大・院生命科学・微生物学)

Rahman Azizur, Tianli Zhang, Hiroyasu Tsutsuki, Touya Toyomoto, 〇Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kumamoto Univ.)

Streptococcus pneumoniae infection is a leading cause of community-acquired pneumonia. Its invasive infection causes severe diseases such as bacteremia and meningitis, and also associates with several complications including kidney injury. Detail mechanisms how bacterial infection causes systemic complications remains largely unknown. Host derived low molecular weight (LMW)-sulfur metabolites such as glutathione (GSH) and its supersulfide derivative glutathione persulfide (GSSH) play important roles in regulating cellular redox homeostasis and energy metabolisms. We examined whether bacterial infection influenced LMW-sulfur metabolites in infected hosts. Male ddY mice were infected with S. pneumoniae D39 strain intraperitoneally at 10 cfu/mouse. Remarkable numbers of bacteria were detected in blood at 3 h after infection, followed by other organs including liver, kidney, spleen, and lung. In this model, all infected mice died within 30 h. Quantitative analyses of LMW-sulfur metabolites by tandem mass spectrometry revealed that GSH and GSSH were depleted in kidney at 6 h after infection, whereas no such depletion was noted for other organs. Serum creatinine test suggested the occurrence of kidney injury in infected mice. These data warrant further investigation to clarify the causal relationship between S. pneumoniae infection and kidney injury in view of GSH and GSSH depletion.

P1-132/DP1-05-06

Tannerella forsythia induces inflammasome activation by triggering both NLRP3 and Caspase-4

○Chenwei Hsu, 岡野 徳壽, 鈴木 敏彦 (東京医科歯科大・医歯・細菌感染)

○Chenwei Hsu, Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki (Dept. Bact. Pathogenesis, TMDU)

Periodontitis is chronic inflammatory disease infected by periodontal bacteria like *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*). This disease causes the production of inflammatory cytokines, such as Interleukin (IL)-1 or TNF α . The production is significant in forming the pathology of periodontitis. However, the mechanism of the cytokine production is unclear. Among inflammatory cytokines, IL-1 is produced by the particular signaling pathway because this cytokine lacks the signal sequence for spontaneous secretion. The expressed pro-IL-1 is proteolytically processed by activated caspase-1 and converted as mature cytokines. The inflammasome regulates the caspase-1 activation. Our research explores the inflammasome activation elicited by *T. forsythia* during macrophages infection. This study provides that the Type IX secretion system that is one of the bacterial protein secretion systems in *T. forsythia* can enhance inflammasome activation. We also found that caspase-4 cleavage, leading to activate inflammasome, is controlled by Nod like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) in the infection. These data elucidate the molecular mechanism underlying *T. forsythia* triggers inflammasome activation.

P1-133/DP1-05-07

結核菌感染マクロファージで活性化する2つのNF- κ Bサブファミリー

○篠原 明莉¹, 堀口 安彦², 岡 真優子³ (1京都府大・農学食科学・食環境安全学, 2阪大微研・分子細菌学, 3京都府大院・生命環境科・食環境安全学)

Two sub-families of NF- κ B are activated in macrophages infected with *M. bovis* BCG

○Akari Shinohara¹, Yasuhiko Horiguchi², Mayuko Osada-Oka³ (1Food Hyg. Health., Agric. Food. Sci., Kyoto Pref. Univ., 2Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., 3Food Hyg. Env. Health., Grad. Sch. Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

結核は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)の感染により形成される肺肉芽腫を特徴とする。肉芽腫には結核菌を貪食したマクロファージ(M ϕ)が集積し、宿主の殺菌作用から逃れた一部の結核菌がM ϕ 内に持続潜伏感染している。M ϕ の結核菌排除には、転写因子NF- κ Bにより誘導される複数の炎症性因子が関わっており、NF- κ Bのp65によって誘導される腫瘍壊死因子(TNF- α)および誘導型NO合成酵素(iNOS)がよく知られている。我々は、マウス肺結核肉芽腫にNF- κ Bのp100の発現を捉えた。これまで結核菌感染M ϕ でのp100の転写活性は報告がなかったことから、本研究では結核菌感染M ϕ におけるp65とp100の役割を比較した。ウシ型結核菌(*M. bovis* BCG)を感染させたマウスM ϕ (RAW264.7)では、p65とp100のリソ酸化の亢進(すなわち活性化)が認められた。そこで、M ϕ p65欠損株(Δ p65), p100欠損株(Δ p100), p65およびp100欠損株(Δ p65/ Δ p100)を作製した。BCGの感染は Δ p65株でリン酸化p100(p-p100)を、 Δ p100株でp-p65をM ϕ 野生株(WT)と同程度に増大させ、p65またはp100欠損は互いの活性化に影響しなかった。次に、BCG感染時の炎症性因子のmRNA発現をWTと比較したところ、*Tnf- α* mRNA発現は、WTに比べて Δ p100株で約55%に抑制され、 Δ p65株で全く発現しなかった。*iNOS* mRNA発現は、WTに比べて Δ p65株および Δ p100株で共に約80%に抑制され、 Δ p65/ Δ p100株では全く発現しなかった。また*Il-1 β* mRNA発現は、WTに比べて Δ p100株で約10%にまで抑制されたが、 Δ p65株では約60%に抑制された。よって結核菌感染M ϕ では、NF- κ Bのp65に加えて、p100が炎症性因子誘導に大きく寄与することが明らかとなった。

P1-134/DP1-05-08

好気条件で膜小胞を産生する乳酸菌の選抜

○稲垣 日奈子¹, 菅野 美月², 二又 裕之^{1,2,3}, 田代 陽介^{1,2} (1静大院・総合科技, 2静大院・創造, 3静大・グリーン研)

Selection of a lactic acid bacterium that produces membrane vesicles under aerobic conditions

○Hinako Inagaki¹, Mizuki Kanno², Hiroyuki Futamata^{1,2,3}, Yosuke Tashiro^{1,2} (1Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 2Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., 3Res. Inst. Green. Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

細菌は直径 20 - 400 nm のリボソーム様球状構造体である膜小胞 (Membrane vesicles; MVs) を放出する。膜小胞はタンパク質、脂質、核酸など細菌由来の物質を保持し、それらを輸送することにより細菌-細菌間および細菌-宿主相互作用に深く関与している。また膜小胞は抗原提示細胞に取り込まれやすいサイズであり、免疫調節機能を有していることから、ワクチンや薬物送達への医療応用に向けた研究が加速化している。現在主な研究対象であるグラム陰性菌由来の膜小胞は、炎症の要因となりうるリボ多糖を保有している。そのため、より安全性が高く生体に有益な効果をもたらす乳酸菌の膜小胞をカスタマイズすることができれば、医療応用に有望なツールとなりうる。乳酸菌などのグラム陽性菌は一般的にグラム陰性菌に比べて膜小胞形成量が少ないことから、本研究では好気条件でも膜小胞を高生産する乳酸菌株の探索を試みた。乳酸菌ライブラリ 86 株より好気条件下で 1 次スクリーニングを行い、培養上清中のリン脂質濃度が高い株が一株選抜され、16SrRNA 解析の結果 *Leuconostoc pseudomesenteroides* であった。透過電子顕微鏡観察ならびにナノ粒子トラッキング解析を行ったところ、放出された膜小胞の直径は約 20 - 400 nm に分布していた。また SDS-PAGE の結果、特定のタンパク質が優先的に膜小胞に含有されていた。さらに本菌が好気条件下で産生する膜小胞はマクロファージのサイトカイン IL-6 の放出を誘発することが示された。以上により、本研究では医療応用に向け膜小胞デザイン候補となりうる乳酸菌株を特定した。現在選抜した乳酸菌の全ゲノム解読と膜小胞構成タンパク質の同定を試みている。

P1-135/DP1-05-09

低コピープラスミドにクローニングされたパルミチン酸転移酵素遺伝子による大腸菌リポド A の改変

○野中 優希, 野口 翔, 田中 恵理, 尾之上 さくら, 川原 一芳 (関東学院大・理工・生命)

Modification of *E. coli* lipid A using palmitoyltransferase genes cloned in low-copy number plasmids

○Yuki Nonaka, Sho Noguchi, Eri Tanaka, Sakura Onoue, Kazuyoshi Kawahara (Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

【目的】LPS が示す免疫活性の強さはリポド A を構成する脂肪酸の鎖長、結合位置、および分岐構造に依存している。分岐構造は生合成の後半で脂肪酸転移酵素によって形成されるが、我々はこれまで大腸菌に他菌種の脂肪酸転移酵素遺伝子を導入することでリポド A の構造を改変してきた。遺伝子のクローニングと導入には pUC 系プラスミドを使用してきたが、形質転換で導入したプラスミドが容易に脱落するという問題点が見られた。この原因としてプラスミドのコピー数の多さが考えられたため、不和合性が異なり共存可能な低コピープラスミドに、異なるパルミチン酸 (C_{16:0}) 転移酵素遺伝子を組み込む方法、および 2 つの遺伝子を 1 つのプラスミドに同時に組み込む方法によりリポド A の改変を試みた。【方法と結果】LPS の抽出は 45% 熱フェノール法で行い、GLC で脂肪酸を定量した。リポド A の質量分析は MALDI-TOF MS で行った。C. jejuni 由来 *lpxJ* (3'位の分岐を形成) を組み込んだ pACYC177-tet-*lpxJ* をあらかじめ大腸菌変異株 KGU0377 株¹⁾に導入し、さらにサルモネラ由来 *pagP* (2 位の分岐を形成) を組み込んだ pBR322 を導入したところ、2 目目のプラスミド導入による C_{16:0} 量の変化はほとんどなく、pBR322 が脱落する傾向が見られた。次に *lpxJ* と *pagP* を 1 つの pACYC177-tet に組み込み、KGU0377 株に導入したところ、プラスミドは安定に存在し、C_{16:0} 量が増加した。C_{16:0} を 2 分子持つリポド A は検出されたが少量であった。今後は、目的の構造を持つリポド A の産生量を上げるために、プラスミドの改良を行う予定である。1) Sugawara, T. et al., Microbiol. Immunol., 62, 497-506 (2018).

P1-136/DP1-05-10

大腸菌外膜小胞に包まれた抗原タンパク質による抗体産生誘導

○富永 龍之介^{1,2}, 安部 公博¹, 中村 知世^{2,3}, 西野 智彦^{2,3}, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹, 中尾 龍馬¹ (1感染研・細菌1, 2工科大院・バイオニクス, 3工科大・応生)

Induction of antibody production by antigen proteins encapsulated in *E. coli* outer membrane vesicles

○Ryunosuke Tominaga^{1,2}, Kimihiro Abe¹, Tomoyo Nakamura^{2,3}, Tomohiko Nishino^{2,3}, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiko Akeda¹, Ryoma Nakao¹ (1Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., 2Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., 3Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

【背景と目的】タンパク質の抗体取得においては、通常、精製したタンパク質を抗原として使用するが、今回、大腸菌の培養上清から抗原を封入した外膜小胞を回収し、これを動物に免疫することで新たな抗体作製方法を確立できるのではないかと考えた。本研究では、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* のペリプラズムタンパク質である PGN_1513 をモデル抗原として、大腸菌のマルトース結合タンパク (MBP) 融合タンパク質としてペリプラズム領域で発現させ、その培養上清から外膜小胞を回収した。これをマウスに免疫して抗体産生を誘導できるか検討した。

【方法】PGN_1513 に、MBP タグを付加させた発現ベクターを大腸菌に導入し、菌体へ浸透圧ショックを加えた後に回収したペリプラズム画分をアフィニティ精製したタンパク質、および培養上清から回収した外膜小胞を得て、それぞれ BALB/c マウスの皮下に 3 週間おきに計 3 回免疫を行った。免疫後血清中の抗体産生を ELISA とウエスタンブロットにより評価した。

【結果と考察】MBP 融合 PGN_1513 は、外膜小胞の主要なタンパク質として内封されることが確認された。外膜小胞の免疫によって得られる血清中の抗体産生量は、精製タンパク質による場合と同等かそれ以上であり、抗原を封入した外膜小胞の高い免疫原性が確認された。この方法はタンパク質の精製を行わずに、容易に抗体を取得する手法としての利用が期待できると考えられた。今後、免疫計画の最適化、異なる抗原、異なる大腸菌株の外膜小胞による免疫原性の検討などを行う予定である。

P1-137/DP1-05-11

キチン由来オリゴ糖による、カイコの Immune Priming の誘導

○三上 雄大¹, 田淵 史晃², 石井 雅樹³, 宮下 惇嗣² (1帝京大院・医療技術・臨床検査, 2帝京大・医真菌・抗真菌免疫生物, 3武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Induction of Immune Priming in the silkworm, *Bombyx mori*, by chitin-derived oligosaccharide

○Kazuhiro Mikami¹, Fumiaki Tabuchi², Masaki Ishii³, Atsushi Miyashita² (1Dept. Med. Tech., Grad. Sch. Clinical Lab Sci., Teikyo Univ., 2Lab. Antifungal Immunobiol., Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ., 3Lab. Mol. Cell Biol., Sch. Pharm., Musashino Univ.)

昆虫は Immune priming と呼ばれる、自然免疫機構の活性化によって感染症に対する抵抗性を獲得する事が知られている。我々はこれまでに、菌体成分の投与により、カイコの Immune priming が誘導されることを示した。しかしながら、単一の分子により本現象が誘導された例は現在までに報告されていない。

本研究ではまず、免疫細胞を刺激することが知られている PMA により、カイコの Immune priming が誘導されるかを検討した。その結果、0.5 ng の PMA をカイコに投与しても 4 種の病原菌 (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae*) に対するカイコの感染抵抗性の誘導は見られなかった。

次に、植物やマウスの感染抵抗性を誘導する事が報告されている Chitohexaose (GN6) をカイコに投与し、Immune priming が誘導されるかを検討した。その結果、GN6 を前投与されたカイコは、*P. aeruginosa* 及び *Candida albicans* に対して感染抵抗性を示した。この時、カイコの *P. aeruginosa* 感染抵抗性を誘導するために必要な GN6 の 50% 有効量 (ED₅₀ 値) は 0.54 μg/larva であった。一方、*S. aureus*, *A. fumigatus*, 及び *R. oryzae* に対しては GN6 を投与されたカイコは感染抵抗性を示さなかった。

さらに、GN6 を投与したカイコの体液中に、抗菌ペプチドであるセクロロピンが経時的に誘導されることが明らかとなった。

以上の結果は、キチン由来のオリゴ糖が、PMA では作用しない経路を介して、カイコの自然免疫応答を活性化し、カイコの感染症に対する抵抗性を誘導することを示唆している。

本研究は、生研支援センター「オープンイノベーション研究・実用化推進事業」(JPJ011937) の支援を受けて行った。

P1-138/DP1-05-12

自然免疫系を介して感染抵抗性を付与する植物精油の探索

○丸山 奈保^{1,2}, 宮下 惇嗣¹ (1帝京大・医真菌研, 2帝京平成大・健康メディカル・健康栄養)

Search for essential oils that confer infection resistance through the innate immune system

○Naho Maruyama^{1,2}, Atsushi Miyashita¹ (1Teikyo Univ. Inst. Medical Mycology, 2Dept. Health and Dietetics, Teikyo Heisei Univ.)

植物精油は、古くから抗菌作用や抗炎症作用、免疫調整作用を持つとして利用されてきた。我々は、精油やその成分であるテルペノイド類が自然免疫担当細胞（好中球、マクロファージ）の機能を調節する作用を有することを報告している。他方では、自然免疫システムに依存した生体防御の仕組みを構築しているカイコを用い、病原体由来成分や乳酸菌など多様な化合物群が、カイコの自然免疫を刺激し、*P. aeruginosa* や *C. albicans* に対する感染抵抗性を導くことを見出している。しかしながら、精油が動物個体レベルで自然免疫の増強により感染抵抗性を導くことの検証については、未だ知見が乏しい。そこで本研究では、カイコを用い、自然免疫システムを介して感染抵抗性を付与する精油の探索を行った。

カイコにレモングラス油およびゼラニウム油を混ぜた餌を与え、約17時間後に病原性微生物を感染させ、27°Cで飼育し生存時間を観察した。その結果、上記の餌を与えられたカイコは *P. aeruginosa* や *C. albicans* 感染に対する抵抗性は示さなかったものの、糸状菌である *R. oryzae* 感染時の生存時間の延長が認められた。これらの結果は、精油成分の中に、カイコに対する感染抵抗性を付与する物質が存在することを示唆している。今後、精油や投与経路の違いにより、様々な病原性微生物への感染抵抗性に差が生じるかを調べるとともに、作用機序についても検討を行う予定である。

P1-139/DP1-05-13

キメラ毒素を基にした神経細胞特異的抗体送達キャリアーの開発およびげっ歯類モデルにおける活性評価

○宮下 慎一郎, 金澤 あかね, 大野 倫太郎, 根根 義昌 (東京農大・生物産業・食香粧化学)

Delivering of antibodies into neuron by chimeric-toxin: a follow-up study in rodent models

○Shin-Ichiro Miyashita, Akane Kanazawa, Rintaro Ohno, Yoshimasa Sagane (Dept. Food Aroma Cosme. Chem., Fac. Bio-ind., Tokyo NODAI)

ボツリヌス中毒は弛緩性筋肉麻痺を特徴とする重篤な症状を引き起こす可能性のある疾患である。*Clostridium botulinum* が産生するボツリヌス神経毒素 (BoNT, A-G型) は三つのドメイン (LC-H_N-H_C) から構成される。まず受容体結合ドメイン (H_C) が神経細胞の受容体に特異的に結合し、チャネル形成ドメイン (H_N) がエンドソーム膜から細胞質内へ酵素活性ドメイン (LC) を送達する。LCは神経伝達物質の放出に関与するSNARE蛋白質を切断することで神経麻痺を引き起こす。我々は神経細胞内のLCを中和するための抗体送達キャリアーとして無毒化キメラ毒素を開発した。キメラ毒素は、BoNT由来のH_CおよびBoNT-like毒素であるX型BoNT由来の不活性LCとH_Nから構成される (⁶¹BoNT/XA; ⁶¹LCH_N/X-H_C/A)。本研究では、BoNT-like毒素であるBoNT/EnあるいはPMP1のLCH_Nドメインを用いた新規キメラ毒素を作製し、そのVHH抗体送達活性とマウスに対する毒性を評価した。その結果、VHH-⁶¹BoNT/XAがBoNT/Aに対してマウスに毒性を示さず、かつ最も高い抗体送達活性を示した。VHH-⁶¹BoNT/XAはラット Digit Abduction score assay およびモルモット Bioassay においてボツリヌス中毒症状を緩和することが示された。今後は、神経変性疾患の病原蛋白質を標的とした抗体あるいはペプチド送達について検証する予定である。

P1-140/DP1-05-14

サルモネラワクチンにより誘導される菌排除機構の解析

○中山 ももこ¹, 江口 正浩¹, 小川 洋介² (1農研機構・動衛研・動物感染症研究領域・細菌グループ, 2農研機構・動衛研・衛生管理研究領域・病理生産病グループ)

Salmonella eliminating mechanism introduced by vaccination

○Momoko Nakayama¹, Masahiro Eguchi¹, Yohsuke Ogawa² (1National Inst. Animal Health, NARO, 2National Inst. Animal Health, NARO)

Salmonella 属菌による家畜のサルモネラ症が畜産分野に与える被害は甚大であり、また、畜産物を介して食中毒の原因となることから、その予防法のさらなる発展が望まれている。過去に、当研究室は *Salmonella* 属菌経口感染の防御には *Salmonella* 属菌分泌タンパク質 SseJ と O 抗原の両者が必要であることを示した。さらに、SseJ と O 抗原接種マウスにおける宿主免疫応答を解析し、経口感染の防御には液性及び細胞性免疫の両者が関与することを明らかにした。しかし、液性及び細胞性免疫応答に続く宿主細胞による菌の排除機構については解明できていない。そこで、本研究では菌の排除機構に関する解析を実施した。はじめに、BALB/c マウスに O 抗原として *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) の死菌を免疫し、脾臓細胞の反応をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、顆粒球様細胞集団の増加が認められ、当該細胞集団には CD11b の発現状態が異なる少なくとも2種の細胞が含まれていた。そこで、STの死菌を免疫したBALB/c マウスにSTを経口感染させ、当該細胞集団の反応を解析すると、経口感染により集団内でCD11b中等度発現細胞の比率が増加することが判明した。本CD11b中等度発現細胞はマウス好中球あるいはマクロファージマーカーであるLy-6C及びCD11cを発現しておらず、現在、顆粒球及び単球に関するより詳細な表面抗原の解析を継続しており、さらに感染時の細胞の活性化について検討するために炎症性サイトカイン分泌能を中心に解析中である。

P1-141/DP1-05-15

結核菌感染マウス肺における乾酪壊死を伴う肉芽腫の単細胞 RNA シークエンス

○瀬戸 真太郎, 土方 美奈子, 慶長 直人 (結核研究所・生体防御部)

Single cell RNA sequencing of necrotic granulomas in active tuberculosis mouse model

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

生体に結核菌が感染すると、感染局所で肉芽腫を形成して、感染結核菌を拡散させないように封じ込める。しかし、肉芽腫内で結核菌の増殖が制御できない場合、感染マクロファージは泡沫化して細胞死が起こり、乾酪壊死を形成する。このことは、泡沫化マクロファージが肉芽腫内での感染結核菌のリザーバーであることを示唆する。ヒト結核の肉芽腫は乾酪壊死を伴う肉芽腫が特徴であるが、一般的なマウスでは結核菌を感染させても乾酪壊死を伴う肉芽腫は形成されない。近年、C3HeB/FeJ マウスでは感染肺に乾酪壊死を伴う肉芽腫が形成されることが明らかになっている。本研究では、本マウスモデルを用いて乾酪壊死を伴う肉芽腫の単細胞 RNA シークエンスを行った。遺伝子発現の特徴から、乾酪壊死を伴うマウス結核肉芽腫は好中球、マクロファージなどの貪食細胞のほか、 $\gamma\delta$ T細胞を含むT細胞、NK細胞、B細胞、樹状細胞、形質細胞様樹状細胞などから構成されていた。 $\gamma\delta$ T細胞はIL-17を発現する細胞が多くを占め、CD4 T細胞の画分にはナイーブT細胞が含まれていた。次にマクロファージ画分について解析した。泡沫化マクロファージのマーカー遺伝子であるPlin2遺伝子の発現が他画分よりも有意に増加しているマクロファージ画分を決定して、この画分で発現増加している複数の遺伝子を同定した。これらの遺伝子から、免疫染色によって泡沫化マクロファージで特異的に発現しているタンパク質を見出した。本研究結果から、詳細な遺伝子発現解析によって、結核菌増殖の場と封じ込める場の両方の特徴を持つ肉芽腫の結核病態における意義を明らかにすることができる。

P1-142/DP1-05-16**Impact of lactoferrin on the interaction between vaginal *Lactobacillus crispatus* and vaginal mucosa**

○伊藤 雅洋, 田端 里帆, 三木 剛志, 羽田 健, 岡田 信彦 (北里大・薬・微生物)

○Masahiro Ito, Riho Tabata, Tsuyoshi Miki, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada (Dept. Microbiol., Sch. Pha., Kitasato Univ.)

Human lactoferrin (hLf) is present in human vaginal mucus, and its concentration increases as serum estrogen levels increase. The human vagina is mainly dominated by lactobacilli and their presence, particularly *L. crispatus*, is highly correlated with low bacterial diversity and overall female reproductive tract health. Here, we report that hLf significantly enhanced the adhesion ability of *L. crispatus* to vaginal epithelial cells, but not other vaginal *Lactobacillus* species. This increase of the adhesion ability of *L. crispatus* decreased when hLf or CD14 was inhibited, suggesting that hLf and CD14 are key components of the adhesion of *L. crispatus* to the vaginal mucosa. The increase of adhesion ability to vaginal epithelial cells significantly increased the production of anti-microbial peptide human β -defensin 2 along with JNK phosphorylation. Our findings indicate that lactoferrin acts as a kind of selective prebiotics for *L. crispatus* and further enhances its host-protective effects on the vaginal mucosa.

P1-143/DP1-05-17**A standardized evaluation method for bacterial UV sensitivity using light-emitting diodes**

○石田 快¹, 斧田 優志^{1,3}, 石川 寧子¹, 相澤 俊彦³, 山内 繁晴³, 藤川 康夫³, 田中 智毅³, 上番 増 喬^{1,2}, 馬渡 一論^{1,2}, 高橋 章^{1,2} (1徳大院・医歯薬学・微生物防除, 2徳大院・医歯薬学・予防環境栄養, 3日亜化学工業 (株))

○Kai Ishida¹, Yushi Onoda^{1,3}, Yasuko Ishikawa¹, Toshihiko Aizawa³, Shigeharu Yamauchi³, Yasuo Fujikawa³, Tomotake Tanaka³, Takashi Uebanso^{1,2}, Kazuaki Mawatari^{1,2}, Akira Takahashi^{1,2} (1Dept. Microbiol. Cont., Inst. Biomed Sci., Tokushima Univ., 2Dept. Prev Environ Nutr., Inst. Biomed Sci., Tokushima Univ., 3Nichia Corp.)

UV light has different biological effects depending on wavelength. And the properties of light that can be used in living spaces have been diversified due to the development of light emitting diodes (LEDs). Therefore, it is important to examine the biological effect for UV irradiation using evaluation method suitable for LED optical characteristics and the unified light irradiation method. In this study, we analyzed bacterial photo-inactivation using unified UV-LED device. A unified irradiance device with LEDs of 250 to 365 nm developed and quantified optical characteristics. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Salmonella enterica* and *Enterococcus faecalis* were used for these experiments. The UV irradiation effects were evaluated using colony forming units. We established the unified UV irradiation conditions from device validity investigations. The results of 280 nm UV irradiation for bacteria showed that it was required for 4-35 mJ/cm² to inactivate -1 log. The wavelength dependence of 13 LEDs showed a strong wavelength dependence of the inactivation effect at wavelengths from 250 nm to 300 nm. These results were considered to be important knowledge for the development of sanitation management method by photo-inactivation.

P1-144/DP1-11-01**Fungal UV sensitivity is characteristically wavelength dependent due to melanin accumulation**

○斧田 優志^{1,3}, 石田 快¹, 長橋 美晴^{1,2}, 山下 路代^{1,2}, 相澤 俊彦³, 山内 繁晴³, 藤川 康夫³, 田中 智毅³, 馬渡 一論^{1,2}, 高橋 章^{1,2} (1徳大院・医歯薬学・微生物防除, 2徳大院・医歯薬学・予防環境栄養, 3日亜化学工業 (株))

○Yushi Onoda^{1,3}, Kai Ishida¹, Miharu Nagahashi^{1,2}, Michiyo Yamashita^{1,2}, Toshihiko Aizawa³, Shigeharu Yamauchi³, Yasuo Fujikawa³, Tomotake Tanaka³, Kazuaki Mawatari^{1,2}, Akira Takahashi^{1,2} (1Dept. Microbiol. Cont., Inst. Biomed Sci., Tokushima Univ., 2Dept. Prev Environ Nutr., Inst. Biomed Sci., Tokushima Univ., 3Nichia Corp.)

Fungi pose a serious threat to public health and can grow under stress conditions by accumulating melanin. Although UV irradiation is effective in pathogen inactivation, there are still few reports about the fungal UV sensitivity and wavelength dependence of inactivation. In this study, we used a LED device that can irradiate highly uniform and collimated light to accurately evaluate the UV sensitivity and the wavelength of UV with the highest effect in fungi. An irradiation device considering LED optical characteristics was developed and 13 LEDs with different peak wavelengths from 250 to 365 nm were used to evaluate wavelength dependence of the inactivation effect. Fungi of 6 species were used. Spores with low melanin accumulation was created by a melanin biosynthesis inhibitor to evaluate the effect of melanin accumulation on UV sensitivity. Inactivation effect showed strong wavelength dependence peaking at 270 nm. UV sensitivity was enhanced in fungi with low melanin accumulation, suggesting a UV protection effect of melanin. The absorption spectrum of the extracted melanin showed greater absorption at shorter wavelengths, and the inactivation effect actually decreased. In general, the wavelength dependence of the inactivation effect is expected to be similar to the absorption spectrum of DNA, but the fungi showed different tendency due to the protection by melanin.

P1-145/DP1-11-02***Clostridioides difficile* 由来メンブレンベシクルを用いた宿主免疫調節**

○勇 陽太郎¹, 奥田 真由¹, 尾花 望^{2,4}, 野村 暢彦^{3,4} (1筑波大・理工情報生命・生命地球科学, 2筑波大・医学医療系・TMRC, 3筑波大・生命環境系, 4筑波大・MICS)

Host immunomodulation using membrane vesicles derived from *Clostridioides difficile*

○Yotaro Isamu¹, Mayu Okuda¹, Nozomu Obana^{2,4}, Nobuhiko Nomura^{3,4} (1Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci. Univ. Tsukuba, 2TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, 3Fac. Life Environ., Sci. Univ. Tsukuba, 4MICS, Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞を能動的に産生し、細胞外に放出する。MV は多様な菌体由来成分を積載し、宿主免疫調節能を有することが知られている。当研究室の先行研究より、MV の鼻腔接種によって、MV 由来菌特異的な腸管分泌型 IgA 抗体の産生が誘導されることが明らかになった。本研究では、*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) に着目して、*C. difficile* 由来の MV を用いた宿主免疫調節系を確立し、MV の免疫が CDI の予防効果を有するかどうかを検証することを目的とした。いくつかのグラム陽性菌ではホリンエンドリシン (HE) 遺伝子の発現が MV 産生を誘導することが知られている。そこで、*C. difficile* の HE 誘導発現株を構築し、様々な培地条件において HE 発現が MV 産生に与える影響を検証した。その結果、HE が *C. difficile* においても MV 産生を促進する因子であること、培養条件や HE 発現誘導によって MV の構成物や粒径が変化することが明らかになった。次に、MV の接種による宿主免疫誘導能と *C. difficile* に対する宿主保護効果を評価するため、各培養条件由来 MV をマウスの鼻腔に接種し、*C. difficile* を感染させた。感染試験の結果、特定の MV 接種群において体重減少および下痢症状が改善し、腸管中の *C. difficile* 芽胞量の速やかな減少が確認された。これより MV 鼻腔接種が *C. difficile* の腸管定着を抑制することが示唆された。これまでに *C. difficile* が MV 産生能を有することは示されているものの、その生産機構については報告例がない。本研究によって *C. difficile* の MV 産生機構の一端が明らかになるとともに、MV の鼻腔免疫が CDI の重篤化を予防する可能性が示された。

P1-146/DP1-11-03

Designing New-Age Peptide Vaccines Using Bacteriophages

○Srivani Veeranarayanan, 菅野 貴史, 怡 劉, トゥ ミヤツ, ティティアナンバコーン カネート, 相羽 由詞, タン シンイー, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Srivani Veeranarayanan, Takashi Sugano, Liu Yi, Myat Thu, Kanate Thitiananpakorn, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Bacteriophage, apart from conventional phage therapy, have been in use as tailored scaffolds to suit applications such as drug delivery, gene delivery, vaccine vectors, diagnostics etc. via genetic, physical and chemical modifications. One such technique is to use well-established phage display technique to display antigens derived from pathogens in order to develop vaccine platforms. Here, as a proof-of-concept study, we designed & evaluated the immune-cell targeted phage particles displaying short epitope from ovalbumin in terms of their ability to induce antigen-specific immune response *in vitro* with positive outcome. In addition, we also designed multi-epitope phage vaccine candidates using *in silico* reverse vaccinology tools. This multi-epitope design is very useful to bring in a synergistic immune response against any complex pathogen. Given the distinctive aspects of phages, such as stability, easy-amenability to engineering, cost-effective bulk scaling, etc. the phage-based vaccine modality is an attractive and apt platform to meet global vaccine expectancies.

P1-147/DP1-11-04

Phage Capsid Vaccines for *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*): Purification & Concentration Strategies

○Myat Thu, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitiananpakorn, 相羽 由詞, XinEe Tan, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Myat Thu, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitiananpakorn, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Tuberculosis (TB), declared a public health emergency by World Health Organization (WHO), remains a lethal concern extending beyond infectious disease. It is imperative to urgently develop a TB vaccine to safeguard both adolescents and adults. Phage capsid vaccines surpass traditional methods, offering flexibility in presenting antigens for enhanced immunogenicity against diverse pathogens. In our study, we developed *M.tb* antigen-displaying phage, testing its effectiveness in conferring preventive immunity against *M.tb* infection by displaying six highly antigenic peptides from *M.tb* on the capsid of an engineered phage. This study focuses on achieving stable, pure, and high phage titers using simple purification and concentration strategies. Using the broth propagation, we achieved peak titers of 10^9 to 10^{11} PFU/ml for our engineered phage. Phage lysates were purified with 0.2 μ m filters and Amicon 100KDa units to remove bacterial impurities and toxins. Subsequently, purified phages were concentrated using ultracentrifugation, resulting in stable, concentrated samples without compromising titers. In the next step, we assessed the *in vitro* immunological response to our peptide-displayed phage particles. Current results suggest ongoing research is poised to further elucidate the efficacy and practical applications of phage capsid-based vaccine against *M.tb* in an animal model.

P1-148/DP1-11-05

Nasal *Staphylococcus aureus* membrane vesicles induces mucosal IgA responses without adjuvant

○龍澤 智美, 齋藤 真規, 桑原 紀子, 小林 良喜, 泉福 英信 (日大・松戸歯・感染免疫)

○Tomomi Hashizume-Takizawa, Masanori Saito, Noriko Shinozaki-Kuwahara, Ryoki Kobayashi, Hidenobu Senpuku (Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

Membrane vesicles (MVs) released from *Staphylococcus aureus* contain various molecules including pathogenic factors. Previous study showed that *S. aureus* MVs had antigenicity and induced MV-specific antibody responses in systemic compartment. Further, *S. aureus* MVs exhibited self-adjuvancity since *S. aureus* MVs include various molecules that stimulate innate immunity. Thus, in this study, we explored the potential of *S. aureus* MVs applicable to mucosal vaccine. BALB/c mice were nasally immunized with *S. aureus* MVs or *S. aureus* MVs plus hydroxyapatite as adjuvant or *S. aureus* MVs plus poly I:C 0, 3, 5 weeks after the first immunization. Saliva and serum samples were taken at 3, 5, 7 weeks after the first immunization. As a result, nasal immunization of mice with *S. aureus* MVs induced *S. aureus* MV-specific secretory IgA antibody responses in saliva. In contrast, co-administration of *S. aureus* MVs and hydroxyapatite or poly I:C failed to induce *S. aureus* MV-specific salivary SIgA responses. Similarly, *S. aureus* MV-specific serum IgG responses were induced only in mice given *S. aureus* MV alone. Thus, our results showed that the antigenicity of *S. aureus* MVs were reduced by co-administration of adjuvants. These results suggested that various molecules contained in *S. aureus* MV help each other to exert antigenicity.

P1-149/DP1-11-14

ボツリヌス菌感染防御を担う腸内細菌の同定

○小林 伸英¹, 鳥海 広暉², 込山 星河², 長谷 耕二², 藤永 由佳子¹ (¹金沢大・医・細菌学, ²慶應大・薬・生化学)

Identification of the intestinal bacteria that protect against Clostridium botulinum infection

○Nobuhide Kobayashi¹, Hiroki Toriumi², Seiga Komiyama², Koji Hase², Yukako Fujinaga¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Kanazawa Univ., ²Divi. Biochem., Fac. Pharm., Keio Univ.)

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) はグラム陽性の偏性嫌気性細菌で、ボツリヌス神経毒素を産生する。乳児ボツリヌス症は、生後およそ1歳未満の乳児において、経口摂取された本菌芽胞が腸管に定着、毒素を産生することにより発症し、致死的な神経麻痺症状を呈する。本菌は芽胞の状態では土壌などの環境中に広く存在するが、健康成人が本菌に感染することはない。抗菌薬を大量投与された成人において本菌が感染する事例があること、無菌マウスや抗菌薬処理マウスは成獣であっても感染感受性であることから、成人の持つ腸内細菌叢は本菌に対して定着抵抗性を有すると考えられている。しかしながら、感染防御に寄与する具体的な腸内細菌は明らかとなっていない。そこで本研究は、ボツリヌス菌感染防御を担う腸内細菌を同定することを目的とした。我々は、異なる日齢の新生仔 SPF マウスの腸内細菌叢を移植した成獣無菌マウスおよび種々の抗菌薬を投与した成獣 SPF マウスに対してボツリヌス菌 (A型 62A株) 芽胞の感染実験を行い、感染感受性および耐性マウスの腸内細菌叢の構成を明らかにした。その結果、ボツリヌス菌感染耐性となるマウスの腸内細菌叢に共通して存在する腸内細菌群を同定した。この腸内細菌群を成獣 SPF マウスまたは成人糞便から分離し、無菌マウスに移植したところ、ボツリヌス菌に対する完全な感染耐性が付与されたことから、当該菌群が感染防御効果を有することが明らかとなった。さらに、成人由来の当該菌群から感染防御効果を有するヒト腸内細菌の単離に成功した。以上の結果から、同定した細菌群が成長に伴い腸管に定着することによりボツリヌス菌感染耐性が得られることが示唆される。

P1-150/DP1-11-15**Neutralization mechanism of human monoclonal antibodies against type B botulinum neurotoxin**

○松村 拓大, 北村 真悠, 阿松 翔, 山口 アキ, 小林 伸英, 藤永 由佳子 (金沢大・医・細菌)

○Takuhiro Matsumura, Mayu Kitamura, Sho Amatsu, Aki Yamaguchi, Nobuhide Kobayashi, Yukako Fujinaga (Dept. Bacteriol., Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

Botulism is a deadly neuroparalytic condition caused by botulinum neurotoxin (BoNT) produced by *Clostridium botulinum* and related species. Toxin-neutralizing antibodies are the most effective treatments for BoNT intoxication. We generated human monoclonal antibodies neutralizing type B botulinum neurotoxin (BoNT/B), designated M2 and M4. The combination of these antibodies exhibited a strong neutralizing effect against BoNT/B cells. In this study, we analyzed the mechanisms of action of these antibodies in vitro. M4 binds to the C terminal of the heavy chain (binding domain) and inhibits BoNT/B binding to neuronal PC12 cells. Although M2 recognizes the light (L) chain (metalloprotease domain), it did not inhibit substrate (VAMP2) cleavage in the cleavage assay. M2 also changed the localization of BoNT/B from the cytosol to the cell surface in PC12 cells, suggesting that M2 inhibits the translocation of the L chain from synaptic vesicles. These results indicate that M2 and M4 inhibit the different processes of BoNT/B individually, and that multistep inhibition is important for the synergistic effect of the combination of monoclonal antibodies. These findings may facilitate the development of effective therapeutic antibodies against BoNTs.

P1-151/DP1-11-16**RabGAP1L 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・医・微生物感染症学)

○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 RabGAP1L (RAB GTPase activating protein 1-like) as both a negative and a positive regulator of endocytosis and exocytosis via endocytic recycling, respectively. RabGAP1L inhibited endolysosomal trafficking and subsequent autophagy induction during GAS infection. Additionally, GAS that invaded into cells was trafficked to Rab11A-positive recycling endosomes, and released from infected cells. RabGAP1L facilitated this exocytic process via endocytic recycling, and GAS was expelled into the extracellular space. RabGAP1L is therefore a vital host factor that determines the fate of GAS in invaded cells.

P1-152/DP1-11-17**微生物感染症病態を反映するヒトオステオポン領域の解析**

○松葉 隆司¹, 植原 結¹, 鋤崎 佳奈¹, 服部 俊夫² (1九州医療科学大・薬・動物生命, 2吉備国際大・健康福祉研)

Analysis of OPN fragments reflecting the pathology in microbiological infection

○Takashi Matsuba¹, Yui Uehara¹, Kana Sukizaki¹, Toshio Hattori² (1Animal Pharm. Sc., Sch. Pharm., Univ. Kyushu Med. Sci., 2Inst. Health Welf., Kibi Int. Univ)

結核などの感染症において、血漿中のオステオポンチン (OPN) 量の変動は、治療効果判定や重症化の指標となる可能性が示唆されている。血漿中には、生体内の分解酵素による OPN 切断断片も含まれ、断片依存性に抗体反応性が異なる可能性があると考えられる。しかしながら、どの部位で切断された OPN 断片が、感染症での病態を推し量る抗体反応性として重要なのか詳細は明らかでない。市販品のなかには、捕捉用抗体および検出用抗体の抗原認識部位が明らかとされていない OPN ELISA 測定キットがある。とくにポリクローナル抗体による検出系では、抗原認識部位依存性に反応性が異なる可能性を考慮すると測定結果の解釈が難しい。本研究では、N-末端側あるいはC-末端側の長さが異なる OPN 遺伝子を PCR 法により増幅、組換えタンパク発現ベクターに挿入後、形質転換した組換え大腸菌から発現させた OPN タンパクを、ELISA 測定し反応性の比較解析を行った。OPN 変異タンパクの反応性は、N-末端側からのアミノ酸 31 番目以降の欠損により著明な反応性が減少が認められ、捕捉用抗体の認識領域の特定ができた。一方、C-末端側からの欠損でも、欠損領域依存性の反応性減少が認められる領域が絞り込めてきた。現在、さらに詳細な解析を進めている。

P1-153/DP1-06-14**Isolation and Characterization of Broad-Host-Range Prophages Against MRSA**

○Tergel Nayanjin, XinEe Tan, Anujin Batbold, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 宮永 一彦, 笹原 鉄平, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitianapakorn, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Tergel Nayanjin, XinEe Tan, Anujin Batbold, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Teppei Sasahara, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitianapakorn, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Antimicrobial resistance poses a formidable global health challenge, exacerbated by the emergence of multidrug-resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Conventional antibiotic treatments prove ineffective in these cases, driving interest in alternative solutions like phage therapy. In our laboratory, we've explored the application of CRISPR-Cas13a-loaded phage capsid as a novel antimicrobial agent targeting MRSA. However, similar to other phage-based methods, our approach encounters limitations due to its inability to infect a diverse range of *S. aureus* strains. Therefore, it is crucial to identify novel prophages with a broader host range to enhance the applicability of the antimicrobial agent. To address this, we induced 138 crude phage solutions using Mitomycin C from our collection of *S. aureus* clinical strains. When tested against 64 target MRSA strains, 56 of the phage solutions exhibited varying degrees of host range, ranging from 1.6% to 81.3%. The top 5 phage solutions with the broadest host range showed an expanded infectivity (39.1 to 81.3%), compared to our previously isolated phages. In this study, we successfully isolated a few candidate phage solutions with broader host ranges, showcasing their versatility for use in combination to achieve enhanced antimicrobial effectiveness.

P1-154/DP1-06-15

Regulation of Staphylococcus aureus growth by Pseudomonas aeruginosa extracellular vesicles

○Phawinee Subsomwong¹, 石合 崇人¹, 成田 浩司², 中根 明夫^{3,4}, 浅野 クリスナ^{1,3} (1Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 2Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 3Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 4Hirosaki Univ. Health Welf.)

○Phawinee Subsomwong¹, Takahito Ishiai¹, Kouji Narita², Akio Nakane^{3,4}, Krisana Asano^{1,3} (1Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 2Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 3Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 4Hirosaki Univ. Health Welf.)

Pseudomonas aeruginosa (Pa) and *Staphylococcus aureus* (Sa) commonly coexist in chronic wounds. Although the exoproducts of Pa have been observed to affect growth and pathogenicity of Sa, the detailed mechanism, particularly by Pa-derived extracellular vesicles (PaEVs), is unknown. In this study, we revealed the inhibitory effect of PaEVs on Sa growth. We found that PaEVs inhibited Sa growth independently of the pyocyanin component and iron chelation, and showed no bactericidal activity. Differences in protein profile of Sa between PaEV-treated and non-treated groups were analyzed by LC-MS/MS. We found a significant decrease in lactate dehydrogenase 2 and formate acetyltransferase enzymes in the pyruvate fermentation pathway after treating Sa with PaEVs. Additionally, the inhibitory effect of PaEVs was abolished in the presence of pyruvate or oxygen. Furthermore, proteomic analysis of PaEVs identified three candidate lytic enzymes including Lap aminopeptidase, Las protease, and RlpA endolytic peptidoglycan transglycosylase that have the potential to affect the pyruvate metabolic enzymes in Sa. Elucidation of this molecular mechanism is thought to be useful for controlling Sa infections in the future. In conclusion, this study demonstrated that PaEVs downregulate the pyruvate metabolic enzymes, resulting in an inhibition of Sa growth.

P1-155/DP1-06-16

Antimicrobial Activity of Bahia Propolis and its Fractionation Effects on Oral Bacteria

○瀧川 博樹¹, 真下 千穂¹, 池上 志穂², 八巻 礼訓², 円山 由郷¹, 南部 隆之¹, 沖永 敏則¹ (1大歯大・歯・細菌, 2株式会社山田養蜂場・健康科学研究所)

○Hiroki Takigawa¹, Chiho Mashimo¹, Shiho Ikegami², Ayanori Yamaki², Hugo Maruyama¹, Takayuki Nambu¹, Toshinori Okinaga¹ (1Dept. Bact., Sch. Dent., Osaka Dent Univ., 2Yamada Bee Company Health Science Labo.)

Propolis is a resinous mixture composed of plant-derived substances and bee saliva collected by bees. We have previously reported the antimicrobial activity of ethanol-extracted propolis (EEP) from the state of Bahia, Brazil, against oral bacteria, particularly periodontal pathogenic bacteria. In this study, we fractionated the antimicrobial compounds of Bahia EEP provided by Yamada Bee Company, Inc., and investigated the impact of these fractions on *Actinomyces oris* (*A. oris*), an early dental plaque-forming bacterium, and *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), a periodontal pathogen. Five fractions from Bahia EEP were prepared using HPLC, and antibacterial activity against both bacteria was observed in fraction 5. Subsequently, seven sub-fractions (5a-g) were obtained from fraction 5, and experiments revealed that only sub-fraction 5e inhibited the growth of *A. oris* and *P. gingivalis*. To identify the active components within sub-fraction 5e, three additional sub-fractions were created. One sub-fraction showed a noticeable effect on the growth of both *A. oris* and *P. gingivalis*. These results suggest the presence of antimicrobial components in propolis from Bahia, Brazil. The ongoing work involves the identification of these specific components.

P1-156/DP1-06-17

Antimycobacterial activities of tanshinones and speculations on their mechanism of action

○森 茂太郎¹, 田村 敏生², 前田 百美², 塚本 裕美子², 阿戸 学², 見理 剛¹ (1感染研・細菌第二部, 2感染研・ハンセン病研究センター・感染制御部)

○Shigetaru Mori¹, Toshiki Tamura², Yumi Maeda², Yumiko Tsukamoto², Manabu Ato², Tsuyoshi Kenri¹ (1Dept. Bacteriology II, NIID, 2Dept. Mycobacteriology, LRC, NIID)

In this study, we screened a natural compound library for anti-tuberculosis activity and discovered that tanshinones (tanshinone I, tanshinone IIA, dihydrotanshinone I, dihydroisotanshinone I, and cryptotanshinone) exhibited potent antituberculosis activity. Tanshinones are natural compounds isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and classified as abietane diterpenoids. Tanshinones exhibited antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, which are resistant to existing anti-tuberculosis drugs, and against non-tuberculous mycobacteria. In addition, dihydrotanshinone I and dihydroisotanshinone I showed the most potent antitubercular activity against *M. tuberculosis* H37Rv strain in macrophages. Furthermore, tanshinone showed an additive effect when used in combination with rifampicin. Next, strains with reduced susceptibility to tanshinone were generated and their genomes were analyzed to identify the site of the mutation. The results showed that the gene responsible for cell wall biosynthesis was mutated, suggesting that the cell walls are targets for the mechanism of action of the compound. On the other hand, mutations were also found in the genes encoding MmpL5 and its regulators, suggesting the presence of intracellular targets of tanshinones. These findings are expected to lead to the development of anti-tuberculosis drugs with novel mechanisms of action.

P1-157/DP1-12-01

アゾール系抗真菌薬の皮膚糸状菌 Cyp51 アイソザイム選択性

○石井 雅樹¹, 山田 剛², 大畑 慎也¹ (1武蔵野大・薬・分子細胞生物, 2帝京大学・医真菌研究センター)

Dermatophyte Cyp51 isozyme selectivity of azole antifungal agents

○Masaki Ishii¹, Tsuyoshi Yamada², Shinya Ohata¹ (1Research Inst. Pharmaceutical Sciences, Fac. Pharmacy, Musashino Univ., 2Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ.)

アゾール系抗真菌薬は、最も主要な抗真菌薬クラスであり、最も存在量の多いステロールであるエルゴステロールの合成経路の律速酵素ステロール脱メチル化酵素 Cyp51 を阻害する。 *Trichophyton rubrum* は最も高頻度に分離される皮膚糸状菌症の原因真菌で、ゲノム上に Cyp51A と Cyp51B という二つの Cyp51 アイソザイムをコードしている。 *T. rubrum* の臨床的重要性に反して、その治療薬標的である Cyp51 の菌糸成長や薬剤耐性への寄与はほとんど知られていない。本研究では、本菌の二つの Cyp51 アイソザイムをそれぞれ欠損した株を作出した。 Cyp51B 欠損株は親株に比べ菌糸成長が顕著に抑制された一方、 Cyp51A 欠損株では菌糸成長の抑制は観察されなかった。野生株における *cyp51A* mRNA 量は、アゾール系薬処理により顕著に増加した一方、 *cyp51B* mRNA 量の増加は見られず、 Cyp51A がアゾール系薬誘導性 Cyp51 アイソザイムであることが示唆された。 Cyp51A 欠損株は、アゾール系薬のほとんどに対して親株に比べ感受性が上昇した。一方、 Cyp51B 欠損株は、アゾール系の農薬プロクロラズに対して 8 倍高い感受性を示し、他の薬剤の MIC の変化は 2 倍以下であった。このことから、アゾール系抗真菌薬には、 Cyp51 アイソザイムに対する選択性が存在すること、 Cyp51A が多くのアゾール薬に対する自然耐性に寄与度が大きいことが示唆された。

P1-158/DP1-12-02**Optimized synthesis of CRISPR-Cas13a antimicrobial capsid against MRSA**

○島守 祐月¹, XinEe Tan¹, 李 峰宇¹, 西川 裕太郎^{1,2}, Batbold Anujin¹, Nayanjin Tergel¹, 氣 駕 恒太郎^{1,3}, 渡邊 真弥¹, 下條 誉幸², 崔 龍洙¹ (自治医大・医・感染免疫・細菌学, ²栄研化学(株)・研究開発・応用技術, ³感染研・ワクチン開発)

○Yuzuki Shimamori¹, XinEe Tan¹, Feng-Yu Li¹, Yutaro Nishikawa^{1,2}, Batbold Anujin¹, Nayanjin Tergel¹, Kotaro Kiga^{1,3}, Shinya Watanabe¹, Takayuki Shimoyoi², Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriology, Dept. Inf. & Imm., Sch. Med., JMU., ²EIKEN CHEMICAL CO.,LTD., ³RCDVD, NIID)

In response to the escalating global threat of antimicrobial resistance, our laboratory has previously engineered an unconventional antibacterial agent, termed antibacterial capsids (AB-Capsids), utilizing phage-based technology to target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). However, a notable challenge arose during the packaging process, as both AB-Capsids and wild-type phages were being produced. To address this issue, the phagemid packaging system was optimized by strategically incorporating silent mutations, effectively minimizing contamination risks without compromising packaging efficiency. The study identified the indispensable role of phage packaging genes, particularly terL-terS, in efficient phagemid packaging, and demonstrated that the elimination of homologous sequences curtailed wild-type phage contamination. The optimized phagemid-LSAB (mosaic) exhibited sequence-specific killing, efficiently eliminating MRSA strains carrying target antibiotic-resistant genes. While acknowledging the need for further exploration across bacterial species and in vivo validation, this refined phagemid packaging system represents a significant advancement in the development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials. It sheds light on potential solutions in the ongoing battle against bacterial infections.

P1-159/DP1-12-03**Development of chelator based novel MBL inhibitors to combat carbapenem resistance bacteria**

○豊元 柊弥, 張 田力, 上 釜 綾夏, 津々木 博康, 澤 智裕 (熊本大院・生命科学・微生物学)

○Touya Toyomoto, Tianli Zhang, Ayaka Uegama, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ)

Metallo- β -lactamase (MBL), such as an IMP-1, is a zinc dependent β -lactam hydrolyzing enzyme. Expression of MBL provides carbapenem resistance, and therefore, considered as promising drug targets. We previously found that polycarboxylation of amoxicillin remarkably enhanced their antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that express IMP-1. We hypothesized that metal chelating capability of multiple carboxyl groups might inhibit MBL activity. Here, we synthesized novel compounds by conjugating polycarboxylic diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) into amino groups of β -lactams and evaluated their antimicrobial activities against MBL-expressing bacteria. Among examined, DTPA conjugated 7-aminodescarboxycephalosporanic acid (DTPA-ADCA) treatment significantly reduced minimum inhibitory concentration of meropenem against IMP-1 expressing *K.pneumoniae*, *E.coli*, *C.amalonaticus* and *C.freundii*. In an in vivo models, co-treatment of meropenem and DTPA-ADCA treatment completely rescued mice from lethal infection of meropenem resistant *K.pneumoniae*. Furthermore, co-treatment of meropenem and DTPA-ADCA resulted in almost complete eradication of bacteria in blood, liver, and spleen. These observations warrant further investigation of chelate-conjugated β -lactams as new MBL inhibitors to treat carbapenem resistant bacterial infection.

P1-160/DP1-12-04**抗ブドウ球菌エンドライシンのリンカー領域が機能に与える影響**

宗友 荘介¹, ○内山 淳平², 内山 伊代², Wanganuttara Thamonwan², 津久井 利広³, 萩谷 英大⁴, 山本 由弥子², 神田 秀幸¹, 松下 治² (岡山大・院医歯薬・公衆衛生, ²岡山大・院医歯薬・病原細菌, ³日本全薬工業(株), ⁴岡山大学病院・感染症内科)

Functional impact by linker region of a staphylococcal endolysin

Sosuke Munetomo¹, ○Jumpei Uchiyama², Iyo Uchiyama², Wanganuttara Thamonwan², Toshihiro Tsukui³, Hideharu Hagiya⁴, Yumiko Yamamoto², Hideyuki Kanda¹, Osamu Matsushita² (¹Dept. Pub. Heal., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ³Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., ⁴Dept. Infect. Dis., Okayama Univ. Hosp.)

【背景】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、実臨床において今なお重要な薬剤耐性菌である。エンドライシンは、ファージ由来のペプチドグリカン (PGN) 分解酵素であり、MRSA 感染症の新規治療薬として期待される。その構造は、PGN 分解ドメインがリンカーで PGN 結合ドメインと連結している。近年、複数のドメインから成るタンパク質の機能においてリンカーの重要性が注目されている。本研究では、高機能な抗ブドウ球菌エンドライシンの作出を目的に、新規エンドライシン ORF93 を使用して、リンカー短縮による機能への影響を検討した。

【方法】リンカー短縮変異体を設計し、AlphaFold2 で立体構造を予測した。大腸菌タンパク質発現系により、組換えタンパク質を作製し、アフィニティ精製した。生産量、抗菌スペクトル、溶菌活性、冷所保存性を検討した。

【結果と考察】ORF93 および 4 種類のリンカー変異体 (リンカーを 5 アミノ酸ずつ削除: ORF93- $\Delta 05 \cdot 10 \cdot 15 \cdot 20$) を設計した。1) 予測立体構造は、ORF93- $\Delta 20$ のみ、他のエンドライシンと比較して、ドメイン間の空隙が特に小さかった。2) 生産量は ORF93- $\Delta 15$ が最も多く、ORF93 の約 2.3 倍多かった ($p < 0.05$)。ORF93- $\Delta 20$ は発現できなかったため、以降の検討から除外した。3) 抗菌スペクトルは、ORF93 とリンカー変異体のいずれもブドウ球菌属に限定して抗菌作用を示し、スペクトルの差は認めなかった。4) 溶菌活性は ORF93- $\Delta 15$ が最も高く、ORF93 の約 2.2 倍高かった ($p < 0.01$)。5) 冷所保存性は、現在検討中である。以上から、リンカーの長さを適切に選択することで、高機能な抗ブドウ球菌エンドライシンを作出できる可能性が示唆された。

P1-161/DP1-12-05**Antibacterial activity screening of Thai medicinal plant extracts using resazurin microtiter assay**

○Nitchatorn Sungsirin^{1,2}, Tanit Boonsiri², Saengthip Ngoenprong³, Faesah Ayohsae³, Oraya Dokkham³, Sriwan Sriuan³, Busaba Matrakool³, Tassanee Saovana³, Sudaluck Thunyaharn³ (¹Dept. Microbiology, Fac. Medicine, Shimane Univ., ²Dept. Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, ³Fac. Allied Health Sciences, Nakhonratchasima College)

This study investigates the antibacterial activities of ethanolic extracts from 30 Thai medicinal plants, using the resazurin microtiter assay (REMA) to assess their effectiveness against 12 bacterial strains. Of the tested extracts, 21 demonstrated antibacterial activities against at least one strain. Interestingly, the pomegranate rind (*Punica granatum*) exhibited significant inhibitory effects on various antibiotic-resistant strains, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), multidrug-resistant (MDR) *Salmonella*, colistin-resistant organism (CoRO) *Klebsiella pneumoniae*, and pandrug-resistant (PDR) *Pseudomonas aeruginosa*. Additionally, the white lotus flower (*Nymphaea lotus*) and temple tree flower (*Plumeria obtusa*) showed promising results against ESBL Enterobacteriaceae, CRE, vancomycin-resistant Enterococci (VRE), MDR *Salmonella*, CoRO *K. pneumoniae*, and PDR *P. aeruginosa*. Remarkably, inhibitory effect of pomegranate rind on MRSA was significantly higher than that of gentamicin. Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the pomegranate rind against MRSA were less than 2 mg/mL. These findings indicated the potential of Thai medicinal plants as sources of novel antibacterial agents, particularly against drug-resistant bacteria.

P1-162/DP1-12-06

多剤耐性菌を標的とした新規抗菌ペプチドフォルダマーの開発

○三澤 隆史¹, 伊藤 貴仁^{1,2}, 倉島 恵愛¹, 山崎 聖司³, 西野 邦彦³, 出水 庸介^{1,2} (国立衛研・有機化学部, ²横浜市大・生命医科, ³阪大産研)

Development of antimicrobial peptide foldamers as therapeutics for multi-drug resistant bacteria

○Takashi Misawa¹, Takahito Ito^{1,2}, Megumi Kurashima¹, Seiji Yamasaki³, Kunihiko Nishino³, Yosuke Demizu^{1,2} (National Inst. Health Sciences, ²Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., ³SANKEN, Osaka Univ.)

既存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ける問題となっている。近年、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) ヘリカル構造の形成と2) カチオン性残基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、既知のAMPsであるMagainin 2 (Mag2) をリードとした構造展開を行い、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抗菌活性を示す1を見出している。また、抗菌ペプチドの抗菌活性発現に重要なヘリカル構造およびカチオン性アミノ酸に着目し、(1) ペプチド1にヘリカル構造を安定化する2-アミノイソ酪酸 (Aib) を導入した2が優れた抗菌活性を示すこと、(2) ペプチド2のLys残基を非天然アミノ酸のOrnやDabで置換しても活性が保持されることを明らかにした。さらに、非天然アミノ酸を導入したこと化学安定性が向上することを見出している。本研究ではこれまでの構造活性相関解析を基に、更なる活性向上、溶血性との分離、化学的安定性の向上を目指した。カチオン性官能基を有する置換アミノ酸であるApiを導入したペプチドをデザイン・合成し、二次構造解析、グラム陽性菌およびグラム陰性菌あるいは多剤耐性緑膿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。Apiを導入したペプチドはヘリカル構造を維持し、グラム陽性菌および陰性菌、さらには多剤耐性緑膿菌に対して抗菌活性を示した。また、非天然アミノ酸であるApiを含むペプチドは、分解酵素への抵抗性を示すことを明らかにした。

P1-163/DP1-12-07

Streptococcus mutans に対する抗菌ペプチドと抗菌剤の併用処理によるアプローチ

○中村 亮介, 本田 みちよ (明大院・理工研・応用化学)

Approaches for S. mutans by co-treatment with antimicrobial peptides and antimicrobial agents

○Ryosuke Nakamura, Michiyo Honda (Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech., Meiji Univ.)

【緒言】一般的なう蝕の治療には抗菌剤による単剤療法が適応されるが、薬剤に耐性を持つ菌株の出現が多数報告されている。そこで我々は、作用機序に富み、薬剤耐性を生み出しにくい抗菌ペプチド (AMP) と抗菌剤の併用に着目した。併用薬剤にε-ポリ-L-リジン (PLL) と3-methyl-4-isopropylphenol (IPMP) を選択し、う蝕の主要病原菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に薬剤を単独または併用で処理した時の抗菌効果を調査した。【実験】はじめに、*S. mutans* に対する PLL と IPMP の抗菌薬感受性試験を行った。次に、*S. mutans* に2つの薬剤を併用処理した時の抗菌効果を調査した。さらに、異なる薬剤処理条件下において、蛍光標識した PLL の局在を顕微鏡により観察した。【結果】PLL と IPMP はいずれも単独で *S. mutans* に対し濃度依存的に抗菌性を発現した。また、併用処理は、単独処理よりも高い抗菌効果を持つことを確認した。さらに、単独では十分な抗菌効果を発現しなかった低濃度の PLL でも、IPMP との併用により、高い抗菌性を示すことを明らかにした。また、顕微鏡による観察から、薬剤の併用により多くの PLL が細胞内に局在することを確認した。これらの結果は、IPMP が PLL の細菌内部への透過性を促進し、抗菌効果を亢進させた可能性を示した。【結論】PLL と IPMP の併用は、低濃度の PLL においても *S. mutans* に対する抗菌効果を大幅に向上させたことから、異なる作用機序をもつ薬剤の併用がう蝕予防において有効なアプローチとなると期待できる。

P1-164/DP1-12-08

Establishing phagemid packaging system to generate antimicrobials against MDR Staphylococcus aureus

Feng-Yu Li¹, OXinEe Tan¹, 島守 祐月¹, 氣駕 恒太郎^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 相羽 由詞¹, 宮永 一彦¹, Kanate Thitiananpakorn¹, 西川 裕太郎^{1,3}, Longzhu Cui¹ (自治医大・医・感染免疫, ²国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター, ³栄研化学 (株))

Feng-Yu Li¹, OXinEe Tan¹, Yuzuki Shimamori¹, Kotaro Kiga^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Yoshifumi Aiba¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Yutaro Nishikawa^{1,3}, Longzhu Cui¹ (Dept. Infect. Immun., Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Research Center for Drug and Vaccine Development, National Inst. Infectious Diseases, ³EIKEN CHEMICAL CO.,LTD.)

Alternative strategies to combat multidrug-resistant (MDR) pathogens has become imperative due to the increasing prevalence of antibiotic resistance. In response to this global health threat, we proposed a phagemid-based packaging system to generate CRISPR-Cas13a-loaded antibacterial capsids (AB-capsids) for targeted therapy against MDR Staphylococcus aureus. This system is optimized with regard to the yield and purity of generated AB-capsids. AB-capsids yield was found to positively correlate with phagemid copy number. A 7.65-fold increase in phagemid copy number resulted in 1.54-fold increase in generated AB-capsids. Phagemids carrying terL-terS-rinA-rinB (phage-encoded packaging site genes) consistently showed high packaging efficiency, and generation of AB-capsids using lysogenized hosts with terL-terS deletion bring about a comparatively lower level of wild-type phages contamination with minimal compromise on AB-capsids yield. Finally, specific bactericidal activity of 9 AB-capsids generated through the optimized packaging technology were evaluated against MDR S. aureus strains. The generated AB-capsids selectively eliminate S. aureus strains carrying target gene, while sparing non-target strains. We anticipated our phagemid-based packaging system a promising avenue for the development of sequence-specific bactericidal agents against antibiotic-resistant S. aureus.

P1-165/DP1-12-09

植物由来成分を含む新規培地を用いて分離した細菌による真菌感染症治療効果

○田淵 史晃¹, 三上 雄大², 石井 雅樹³, 宮下 惇嗣¹ (帝京大・医真菌・抗真菌免疫生物, ²帝京大院・医療技術・臨床検査, ³武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Antifungal activity of bacteria isolated using a novel medium containing plant-derived components

○Fumiaki Tabuchi¹, Kazuhiro Mikami², Masaki Ishii³, Atsushi Miyashita¹ (Lab. Antifungal Immunobiol., Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ., ²Dept. Med. Tech., Grad. Sch. Clinical Lab. Sci., Teikyo Univ., ³Lab. Mol. Cell Biol., Sch. Pharm., Musashino Univ.)

我々の周りの環境中には多様な微生物生態系が築かれている。これまで土壌中などの細菌は、主に汎用性の栄養培地を用いることにより分離されてきた。しかしながら、いまだ多くの環境細菌は人工培地を用いて培養できていないことから、新しい培地による培養方法が必要とされている。本研究では、植物由来成分を含む新規の培地を製作することで、環境サンプルからの細菌培養を試みた。

まず、環境中から採集した土壌サンプルを YME および植物成分寒天培地に塗抹し、培養したところ、両培地上に形態や大きさの異なるコロニーが多数生育した。

次に、YME および植物成分寒天培地上に生育した、それぞれ 57 株および 51 株のコロニーの 16S rRNA 遺伝子配列をシーケンズ解析した。その結果、YME 寒天培地から得られた株は、*Bacillus* 属 (もしくは *Priestia* 属) の細菌が多くを占めた。一方、植物成分寒天培地からは、*Streptomyces* 属の放線菌、*Rhizobium* 属の根粒細菌が多く得られた他、データベース上に記載の無い細菌も分離された。

さらに、本方法により培養した土壌細菌の培養液を有機溶媒抽出したサンプルに対し、*Rhizopus oryzae* 感染カイコに対する治療活性を指標としたスクリーニングを実施したところ、*R. oryzae* 感染カイコを延命させる株を見出した。

以上の結果は、土壌サンプル中の微生物を植物成分培地で培養することで、YME などの汎用性栄養培地とは異なる相の微生物群を得られることを示唆している。さらに、本法により、真菌感染症に対して有効な代謝産物を産生する株を取得できることを示唆している。

本研究は生研支援センター「オープンイノベーション研究・実用化推進事業 (JPJ011937) の支援を受けて行った。

P1-166/DP2-15-10

多剤耐性大腸菌に対するファージセラピーの検討

○遠山 茉奈¹, 大橋 春香¹, 中村 暢宏^{1,2}, 藤木 純平¹, 岩野 英知¹ (1)酪農学園大・獣医・生化学, (2)国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

Investigation of phage therapy against multidrug-resistant *Escherichia coli*

○Mana Tohyama¹, Haruka Ohashi¹, Tomohiro Nakamura^{1,2}, Jumpei Fujiki¹, Hidetomo Iwano¹ (1)Dept. Biochemistry, Sch. Veterinary, Rakuno Gakuen Univ., (2)Reserach Center for Drug and Vaccine Development, National Inst. Infectious Diseases)

抗生物質の不適切な使用により薬剤耐性菌が世界的に増加しており、効果的な対策を講じなければ 2050 年には年間死亡者数が 1000 万人を超える予測され、深刻な状況となっている。また、このような薬剤耐性菌の現状は獣医療においても同様であり、抗生物質だけに頼らない新たな治療法が求められており、バクテリオファージを利用したファージ療法が注目されている。そこで本研究では、再発を繰り返す難治性の大腸菌膀胱炎の猫に対して有効なファージを分離しファージカクテルの検討を行った。犬、猫の膀胱炎から分離された大腸菌臨床分離株と約 100 種類の下水を用い、23 株のファージを分離した。分離されたファージを用い、大腸菌臨床分離株 45 株に対して EOP, killing assay を行い、ファージの感染・溶菌性を比較した。宿主域が広い有用なファージのファージ耐性菌株を作成し、そのゲノム解析よりファージの受容体を特定し、ファージカクテルの設計を行った。

OmpA や LPS などファージ認識部位が異なる株を組み合わせたカクテルはそれぞれ単体で用いるより溶菌効果が高く、細菌のファージ耐性化に再増殖を抑制していた。大腸菌では LPS 認識ファージがファージカクテルの設計においては主軸となるが、LPS 合成酵素の変異を引き起こしやすく耐性化しやすい。そのため LPS 認識ファージだけではなく、膜タンパク認識ファージなどとカクテル化することでファージ耐性化を防ぐ効果が高いと考えられた。今後は認識部位や溶菌機序の異なるファージをさらに分離し、よりファージ耐性化に対応でき、溶菌効果の高いファージカクテルを構築していきたい。

P1-167/DP2-15-11

Isolation and characterization of broad host range bacteriophages infecting *Acinetobacter baumannii*

○Maniruzzaman, Adeline Yeo SyinLian, 相羽 由詞, Minh Huong Nguyen, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, XinEe Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Maniruzzaman, Adeline Yeo SyinLian, Yoshifumi Aiba, Minh Huong Nguyen, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyanaaga, XinEe Tan, Tepei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Multidrug-resistant *Acinetobacter* (MDRA) poses significant challenges in healthcare settings, contributing to the global public health concern of antimicrobial resistance (AMR). Our laboratory initiated a project to develop antimicrobial capsid (AB-Capsid) against *A. baumannii* by incorporating the CRISPR-Cas13a system into *A. baumannii* phage. To achieve this goal, a broad host range phage is required. The aim of this study is to isolate broad host range phages and characterize them both morphologically and genetically. A total of 144 *A. baumannii* strains were used for phage induction using Mitomycin C. By screening various concentration of Mitomycin C ranging from 0.5 to 12 µg/mL, we optimized the induction conditions. Then, 864 crude phage solutions were obtained. The host range of the crude phage solutions was evaluated using 144 *A. baumannii* clinical and MDRA strains. Eight broad-host-range phages were identified, exhibiting infection rates ranging from 23.5% to 35.2%. These phages were morphologically and genetically characterized by TEM and whole genome sequencing respectively. Isolated phage has the morphology of siphovirus family and the genome sequence revealed that one of the phages is a prophage carrying an integrase gene within its 28,091 bp long genome. The isolated prophage is intended to serve as a candidate CRISPR-Cas13a vector in future to develop AB-Capsid.

P1-168/DP2-15-12

岐阜県伊自良川上流域における基質拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分布

○中坪 知輝¹, 杉山 美千代², 浅井 鉄夫^{1,2} (1)岐阜大・院・共同獣医・応用獣医学, (2)岐阜大・院・連合獣医・応用獣医学)

Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the Ijira River

○Tomoki Nakatsubo¹, Michiyo Sugiyama², Tetsuo Asai^{1,2} (1)Dept. Appl. Vet. Sci., Jnt. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ., (2)Dept. Appl. Vet. Sci., Unit. Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌による環境汚染の低減は重要な課題である。本研究では岐阜県を流れる伊自良川の上流域における河川内での ESBL 産生大腸菌汚染の実態を明らかにすることを目的として、ESBL 産生大腸菌の分布調査を実施した。伊自良川横にある食鳥処理施設の排水路が本流に合流する地点を 0m とし、上流 100m から下流 7000m にかけての 13 地点で 1 回、同区間の 13 ヶ所の流入口で 3 回採水をおこなった。水サンプルからセフォタキシム含有の DHL・TBX 培地を用いて大腸菌を分離し、ダブルディスク法によりスクリーニングした。ESBL 産生疑い株は同定後、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による系統解析に基づき選定した株について全ゲノムシーケンスにより血清型、ST 型および耐性遺伝子を特定した。本流由来 ESBL 産生大腸菌は 13 地点中下流 500m ~2500m 間の 5 地点で分離され、13 PFGE 型に分類された。流入口由来 ESBL 産生大腸菌は 13 ヶ所中 4 ヶ所の流入口から分離され、9 PFGE 型に分類された。流入口 3 では全 3 回の採水で ESBL 産生大腸菌が分離され、下流 500m 地点より上流に位置する流入口のうち ESBL 産生大腸菌が分離されたのは流入口 1 と 3 であった。流入口 3 で分離された 6 PFGE 型の ESBL 産生大腸菌のうち 2 PFGE 型は本流で分離され、O1:H15-ST2003-*bla*_{CTX-M-14} は耐性遺伝子型が一致したが、O25:H4-ST131-*bla*_{CTX-M-27} は一致しなかった。また、5 PFGE 型の ESBL 産生大腸菌が本流内の複数地点で分離され、そのうち O25:H4-ST131-*bla*_{CTX-M-27}, O9a:H25-ST58-*bla*_{CTX-M-27}, O174:H7-ST9479-*bla*_{CTX-M-55} は河川中を 2000m に渡って汚染していることが示唆された。

P1-169/DP2-15-13

Achromobacter xylosoxidans 基準株の薬剤耐性における RND 型多剤排出ポンプの役割

○菅野 瑞軌, 水澤 笑子, 目崎 彩実, 鴨志田 剛, 森田 雄二 (明治薬大・薬・感染制御)

Roles of RND multidrug efflux pumps on drug resistance of *Achromobacter xylosoxidans* type strain

○Mizuki Sugano, Emiko Mizusawa, Ayami Mezaki, Go Kamoshida, Yuji Morita (Dept. Infection Control Science., Sch. Pharm. Sci., Meiji Pharmaceutical Univ.)

【目的】ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌群 (NFGNRs) は、多くの抗菌薬に自然耐性を示すが、一部の菌種を除き薬剤耐性機構の詳細は、依然として不明である。そこで *Achromobacter xylosoxidans* 基準株の薬剤耐性における resistance nodulation cell division (RND) 型多剤排出ポンプの役割を分子遺伝学的に評価した。

【方法】*A. xylosoxidans* 基準株から、緑膿菌 PAO1 の抗菌薬耐性に関与する RND 型多剤排出系遺伝子に関する一連の遺伝子破壊株を相同組換え法により構築した。薬剤感受性は微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) により評価した。

【結果】*A. xylosoxidans* 基準株は、緑膿菌 PAO1 と比較して、ペニシリン系やカルバペネム系以外の、多くの系統の抗菌薬に低い感受性を示した。2 つの RND 遺伝子 (*axyB* と *axyY*) のいずれかの遺伝子または両遺伝子の欠失した変異株は、基準株と比較して、調べたすべての抗菌薬に高い感受性を示した。RND 型多剤排出ポンプ阻害剤 PAβN (Phenylalanyl arginyl β-naphthylamide) の併用による *A. xylosoxidans* 基準株の薬剤感受性上昇は、一部の薬剤に限定的であったが、イソキノリンアルカロイドの Berberine 併用時は、多くの抗菌薬 (特にアミノグリコシド) で感受性上昇が観察された。しかしながらその活性は、*axyY* 欠失株では消失した。更に、*axyY* の推定リプレッサー遺伝子 (*axyZ*) に、*axyY* 発現上昇に関与するミスセンス変異が観察された。

【考察】*A. xylosoxidans* 基準株の薬剤耐性に、RND 型多剤排出ポンプが関与することが示された。薬剤耐性機構の解析の進んでいる、緑膿菌などの NFGNRs と比較することで、NFGNRs の薬剤耐性機構の共通性と多様性の一端が明らかになった。

P1-170/DP2-15-14

Emergence of ciprofloxacin and penicillin resistant meningococcal isolates in Japan

○高橋 英之¹, 森田 昌知¹, 神谷 元², 福住 宗久³, 安田 満⁴, 大濱 侑季¹, 志牟田 健^{1,2}, 大西 真¹, 齋藤 良一⁵, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細菌1, (2)感染研・感染症疫学センター, (3)感染研・実地疫学研究センター, (4)札幌医大・感染制御・臨床検査医学, (5)東京医科歯科大・医歯学・分子病原体検査学)

○Hideyuki Takahashi¹, Masatomo Morita¹, Hajime Kamiya², Munehisa Fukusumi³, Mitsuru Yasuda⁴, Yuki Ohama¹, Ken Shimuta^{1,2}, Makoto Ohnishi¹, Ryoichi Saitoh⁵, Yukihiko Akeda¹ (1)Dept. Bacteriol 1, Nat. Inst. Infect. Dis., (2)Infect. Dis. Survei. Center, Nat. Inst. Infect. Dis., (3)Center Field Epi. Intel. Res. Pro. Develop., Nat. Inst. Infect. Dis., (4)Dept. Infect. Cont. Lab. Med., Sch. Med., Sapporo Univ., (5)Dept. Mol. Microbiol., Sch. Med. & Dent. Sci., Tokyo Med. & Dent. Univ.)

Since the antibiotic susceptibilities of *Neisseria meningitidis* isolates obtained in Japan remained unclear, 290 *N. meningitidis* isolates in Japan between 2003 and 2020 were examined for the sensitivities to eight antibiotics (azithromycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, chloramphenicol, meropenem and minocycline, penicillin and rifampicin). All isolates were susceptible to chloramphenicol, ceftriaxone, meropenem and rifampicin while two were resistant to azithromycin. Penicillin- and ciprofloxacin-resistant and -intermediate isolates (PCG^R, CIP^R, PCG^I and CIP^I, respectively) were also identified. Based on our previous findings from whole genome sequence analysis, approximately 40% of PCG^I were associated with ST-11026 and cc2057 meningococci, both of which were unique to Japan. Moreover, the majority of ST-11026 meningococci were CIP^R or CIPI. Sensitivities to PCG and CIP were closely associated with genetic features, which indicated that, at least for Japanese meningococcal isolates, PCG^{R/I} or CIP^{I/R} would be less likely to be horizontally conferred from other neisserial genomes by transferring of the genes responsible (*penA* and *gyrA* genes, respectively), but rather that ancestral *N. meningitidis* strains conferring PCG^{R/I} or CIP^{I/R} phenotypes clonally disseminated in Japan.

P1-171/DP2-15-15

IMP-6 保有菌の細菌学的・遺伝学的特徴の解析

○山口 晃一^{1,2}, 中野 竜一¹, 中野 章代¹, 鈴木 由希¹, 小川 美保², 坂田 竜二², 矢野 寿一¹ (1)奈良県立医科大・微生物感染症学, (2)株式会社ビー・エム・エル 細菌検査部)

Phenotypic and genetic characteristics of *bla*_{IMP-6} harbouring Enterobacteriaceae

○Koichi Yamaguchi^{1,2}, Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Miho Ogawa², Ryuji Sakata², Hisakazu Yano¹ (1)Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., (2)Dept. Bacteriol., BML Inc.)

【目的】カルバペネマーゼ産生腸内細菌目は、本邦では分離頻度が低いものの IMP 型が多くを占める。西日本では特に IMP-6 保有株が多く、そのほとんどが CTX-M-2 β-ラクタマーゼを同時保有して広域に耐性を示す。その特徴として接合伝達能が高く、菌種菌株を越えて拡散している。本研究では本邦で分離された IMP-6 保有株の細菌学的・遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】対象は本邦の 76 医療機関より分離された IMP-6 保有株 220 株とした。菌種同定は MALDI TOF-MS にて行った。薬剤感受性は CLSI に準拠した寒天平板希釈法にて測定した。耐性遺伝子の型別は PCR 法と DNA シーケンシングにて決定した。Inc グループは PCR 法にて決定した。耐性遺伝子の伝達性は大腸菌 J53 株を受容株として接合伝達実験にて評価した。遺伝子構造は Miseq (イルミナ), MinION (ナノポア) による次世代シーケンシング解析とサンガー法にて決定した。

【結果】CTX-M-2 グループ保有株が 203 株あり、IncN プラスミド上に IMP-6 と CTX-M-2 とを同時保有し、その多くが接合伝達した。CTX-M-2 グループ非保有株は 17 株あり、保有するプラスミドの Inc グループが多様であった。このうち接合伝達しなかった株が 11 株あり、10 株がプラスミド上に IMP-6 のみ保有していたが、他 1 株が IMP-6 と CTX-M-27 とを同時保有していた。接合伝達した株が 6 株あり、いずれも IncN プラスミド上に IMP-6 のみ保有しており、CTX-M-2 グループ保有株のプラスミド構造に類似していた。

【結論】これまで IMP-6 保有株は CTX-M-2 グループ同時保有株が多く報告されてきたが、本研究では CTX-M-2 グループ非保有株が少数ながら含まれ、異なる特徴を持つことが明らかになった。

P1-172/DP2-15-16

Genomic insights into an Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O4:H12 co-carrying *mcr-5* and *bla*_{SHV-12}

○Christian Xedzro¹, Toshi Shimamoto¹, Liansheng Yu², Yo Sugawara², Motoyuki Sugai², Tadashi Shimamoto¹ (1)Lab. Food Microbiol. Hyg., Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., (2)Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis.)

Escherichia coli, a predominant facultative anaerobe of the human gut flora, includes both commensal and pathogenic strains. A multidrug-resistant extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* (160-11H1) was isolated from chicken meat in 2009 in Japan. The entire genome was sequenced using Illumina MiSeq and Nanopore platforms and *de novo* assembled using unicycler. Bioinformatic analyses were carried out using tools from the Center for Genomic Epidemiology. The genome size was calculated at 5,031,330 bp, with 5,140 features. Mobile colistin resistance gene, *mcr-5*, and an ESBL gene, *bla*_{SHV-12}, encoding resistance to clinically important antimicrobials including colistin (MIC, 8 μg/mL) and extended-spectrum cephalosporins (MIC, >32 μg/mL) were detected. The *mcr-5* was in an operon with Tn3 family transposase adjacent to ChrB domain protein and uncharacterized MFS-type transporter on a conjugatively transferable plasmid of IncFII backbone. The *bla*_{SHV-12} gene was inserted downstream of TniA putative transposon located on IncFIA:FIB:FIC plasmid. The strain was of Sequence Type ST10, CH type *fumC11/fimH54*, serotype O4:H12, and phylogroup A, and carried several virulence genes associated with heat survival, colonization, fitness, and conjugation. A One Health surveillance program is necessary to examine the impact of drug-resistant microbial contamination on human health.

P1-173/DP2-15-17

グラム陽性乳房炎原因菌の薬剤耐性化機構の解析

○横尾 和¹, 島本 敏¹, 鈴木 直樹², 島本 整¹ (1)広島大・統合生命科学・食品衛生微生物, (2)広島大・統合生命科学・陸域フィールド科学)

Analysis of the antimicrobial resistance mechanism in Gram-positive mastitis-causing bacteria

○Kazumi Yokoo¹, Toshi Shimamoto¹, Naoki Suzuki², Tadashi Shimamoto¹ (1)Dept. Microbiology for Food Safety., Sch. Integrated Sciences for Life., Hiroshima Univ., (2)Dept. Terrestrial Field Science., Sch. Integrated Sciences for Life, Hiroshima Univ.)

【目的】牛乳房炎は乳牛に最も頻発する疾患であり、経済的な損失をもたらすとともに公衆衛生上の問題となっている。牛乳房炎には伝染性乳房炎と環境性乳房炎があり、伝染性乳房炎の原因菌の一つとして黄色ブドウ球菌があげられる。また、環境性乳房炎の原因菌にコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS)、バチルス属菌、腸球菌などのグラム陽性菌があり、食中毒原因菌も含まれるため、継続的な監視が必要である。牛乳房炎の予防および治療に抗生物質を使用するが、不適切な抗生物質の使用は薬剤耐性菌の発生を促す恐れがある。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含む多剤耐性菌の増加が世界的に問題となっている。本研究では、ワンヘルスの概念に基づき、酪農場における乳房炎原因菌の病原性因子および薬剤耐性化機構の解析を目的とした。【方法】広島県内のフリーバーン牛舎の酪農場から 2 か月に 1 回サンプリングを実施し、ブドウ球菌、バチルス属菌、腸球菌選択培地を用いて乳房炎原因菌を分離した。そして、PCR 法を利用して種の同定および薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子の検出を行った。【結果と考察】これまでに 505 株を分離し、*Staphylococcus* 分離株の 8.7% (14/161) が *mecA* を持っていた。また、乳房炎を発症した乳牛から CNS が 5 株分離され、そのうち 2 株は *mecA* および *blaZ* を保有していることが分かった。薬剤耐性菌がサンプリングポイント全体で分離され、特に堆肥、子牛の餌、水路で頻りに検出された。一方で 5 月および 7 月では薬剤耐性遺伝子が非常に多く検出されたが、それ以降は減少傾向であった。

P1-174/DP2-18-01

イミペネム中等度耐性 *Bacteroides thetaiotaomicron* のドラフトゲノム解析

○後藤 隆次, 林 将大, 田中 香お里 (岐阜大・糖鎖生命コア研・嫌気性菌)

Draft genome sequencing of the imipenem-intermediate resistant *Bacteroides thetaiotaomicron*

○Takatsugu Goto, Masahiro Hayashi, Kaori Tanaka (Div. Anaerobe Res., Inst. for Glyco-core Res., Gifu Univ.)

【目的】 *Bacteroides* 属 (特に *B. fragilis*) のカルバペネム高度耐性機構は盛んに研究されているが、本属のカルバペネム中等度耐性を呈する菌株 (non-fragilis 含む) も 2~3% 存在し、時に臨床的に問題となる。本研究で我々は、*Bacteroides thetaiotaomicron* GAI 02073 株のドラフトゲノム解析を行い、過去に我々が報告した中等度耐性 *B. fragilis* GAI 92214 株の全ゲノム配列間との比較ゲノム解析を行い、中等度耐性株に共通する遺伝子領域や耐性責任因子の推定を目指す。

【方法】 *B. thetaiotaomicron* GAI 02073 株の薬剤感受性試験を行ったところ、imipenem, meropenem の MIC 値は順に、4~4.8, 1 (μg/mL) であり、本株は imipenem に中等度耐性を示した。本株のゲノム DNA ライブラリーを調製後、PacBio Sequel IIe にて塩基配列決定を行った。アセンブル、遺伝子予測には、順に Flye 2.8.3, Prokka 1.14.5 を使用した。

【結果・考察】 ゲノム解析により、リード数 41,500 reads, 平均長 6,445 bp, 総塩基数 267,474,543 bp, ≥Q30 値 98.7% の配列データを得た。アセンブルにより 7 本の contig が得られ、N50 値, GC 含量, Genome coverage は、順に 4,793,208 bp, 43.1%, 38 であった。これらの contig 内における CDS, rRNA, tRNA の合計は、順に 5,887, 15, 76 であった。本解析で得られた contig の合計長 (計 7,112,075 bp) が本菌株で既報の全ゲノム株の染色体長より長く、今後、contig の重複や位置確認を要する。現在、GAI 92214 株等との比較ゲノム解析を行い、中等度耐性株に特有の領域や耐性因子の推定を試みている。

P1-175/DP2-18-02

細菌のシステインによるストレプトマイシンの付加体形成

○小野 勝彦¹, 新留 琢郎², 赤池 孝章³, 澤 智裕¹ (¹熊本大・生命科学・微生物, ²熊本大・自然科学・生命材料, ³東北大・医・環境保健医)

Adduct formation between cysteine and streptomycin in bacteria

○Katsuhiko Ono¹, Takuro Niidome², Takaaki Akaike³, Tomohiro Sawa¹ (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ²Facul. Adv. Sci. Tech., Kumamoto Univ., ³Dept. Envir. Health Sci. Mol. Toxicol., Grad. Sch. Med., Tohoku Univ.)

【目的】 細菌の産生するシステインやシステインパースルフィドは、βラクタム系抗菌剤と反応することで、抗菌活性を失った反応産物を形成することが報告されている。このことからシステインやシステインパースルフィドは薬剤耐性に寄与していることが考えられる。しかしながら、βラクタム系以外の抗菌剤に対する反応性や耐性機構への関与について不明な点が多く残されている。そこで本研究では、アミノグリコシド系抗菌剤に対するシステインやシステインパースルフィドの反応性や薬剤耐性への関与を検討した。【方法】 システイン, システインパースルフィドとアミノグリコシド系抗菌剤の反応生成物の解析には、高速液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いた。さらにそれら反応産物の抗菌活性はディスク法で検定した。細菌や細菌培養上清からの反応産物の解析には質量分析計を用いて定量した。【結果】 システイン, システインパースルフィドのアミノグリコシド系抗菌剤であるストレプトマイシンとカナマイシンに対する効果を検討したところ、ストレプトマイシンはシステインにより抗菌活性を失うことを見出した。一方、カナマイシンに対して不活性化反応は見られなかった。さらにシステインとストレプトマイシンの反応産物の同定を試みたところ、1:1 で反応したシステイン-ストレプトマイシン付加体が産生していることがわかった。ストレプトマイシンを処理した細菌からの付加体産物の検出を試みたところ、細菌内のみならず培養上清からも付加体産物を検出した。【考察】 細菌の産生するシステインは、βラクタム系抗菌剤のみならず、ストレプトマイシンに対する薬剤耐性にも寄与していることが考えられる。

P1-176/DP2-18-03

臨床分離細菌由来メタロ-β-ラクタマーゼの菌体外排出

○上釜 綾夏, 豊元 柁弥, 津々木 博康, 澤 智裕 (熊本大院・生命科学・微生物学)

Extracellular release of metallo-beta-lactamases from clinically isolated gram-negative bacteria

○Ayaka Uegama, Touya Toyomoto, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ.)

【背景】 メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、カルバペネム耐性を強力に誘導する酵素であり、ペリプラズムに局在する。MBL の 1 つである NDM-1 は膜親和性ドメインを持つことで外膜小胞を介して菌体外に分泌され、薬剤耐性に寄与する。しかしながら、IMP-1 や VIM-2 等の可溶性 MBL の機構については不明な点が多い。そこで本研究では、可溶性 MBL の菌体外排出について検討を進めた。

【方法】 IMP-1 および VIM-2 の組換えタンパク質を作製し、ウサギへの免疫により抗血清を得た。得られた抗血清を用いたウェスタンブロット法にて、IMP-1 または VIM-2 産生が確認されている臨床分離細菌 (緑膿菌, 肺炎桿菌, 大腸菌) の菌体内および培養上清中のこれら酵素を検出した。また、培養上清中の IMP-1 および VIM-2 が野生株大腸菌の β-ラクタム感受性に影響を与えるかを検討した。

【結果】 ウェスタンブロットの結果から、緑膿菌由来の IMP-1 および VIM-2 が菌体外に大量に分泌されていること、それが外膜小胞を介さない機構であることが示唆された。また、IMP-1 を含む培養上清を野生株大腸菌と共培養すると、野生株大腸菌の β-ラクタム感受性が顕著に低下した。

【今後の展望】 これらの結果から、IMP-1 および VIM-2 産生菌は、自身のカルバペネム耐性のみならず、共存する感受性菌に対して、カルバペネムへの感受性を低下させる可能性が示唆された。今後、これら酵素の菌体外排出機構を明らかにするとともに、感染宿主での IMP-1 や VIM-2 の検出法や、これを標的とした治療法の構築を進めていきたい。

P1-177/DP2-18-04

呉医療センターから分離されたバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の細菌学的特性

○小林 秀丈¹, 首藤 毅², 嶋田 徳光², 新開 美香², 吉野 弘絵², 前田 龍人², 高田 正弘², 清家 総史¹, 佐和 章弘³, 山中 浩泰¹ (¹広島国際大・薬・分子微生物学, ²呉医療センター中国がんセンター, ³広島国際大・薬・医療薬学研究センター)

Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) Isolated from Kure Medical Center

○Hidetomo Kobayashi¹, Takeshi Sudo², Norimitsu Shimada², Mika Shingai², Hiroe Yoshino², Ryuto Maeda², Masahiro Takada², Soshi Seike¹, Akihiro Sawa¹, Hiroyasu Yamanaka¹ (¹Lab. Mol. Microbiol. Sci., Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., ²Nat. Hosp. Org. Kure Med. Cent. and Chugoku Cancer Cent., ³Res. Cent. for Pharm. Health Care and Sci., Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ.)

薬剤耐性菌の増加は全世界的に大きな課題となっており、特にバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の出現は、抗生物質治療の選択肢を限定し、感染管理の難易度を一層高めている。これら耐性菌は、治療不可能な感染症を引き起こすリスクを増大させ、医療提供体制に重大な影響を及ぼす。そこで、本研究では、広島県呉市に位置する病床数 700 床の大規模病院である呉医療センターから分離された VRE の細菌学的特性、分布、耐性メカニズム、および遺伝的多様性を明らかにし、院内でのその拡散パターンを解明することを目的とした。

2021 年から 3 年間に分離された VRE について、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を実施した。その結果、30 株 (76.9%) が高い遺伝的類似性を示し、これらは近縁株であると推測された。さらに、van 遺伝子型について決定した結果、全ての分離株が vanA 遺伝子を保有しており、バンコマイシンに加え他の複数の抗生物質に対する耐性を示すことが確認された。また、Multilocus sequence typing (MLST) による型別も実施した結果、これら近縁株は広島県内で流行している ST80 系統と同型であることが判明した。

今後、ST80 系統が呉医療センターに持ち込まれた経路を推定し、地域内での VRE の監視と管理に重要な情報を提供することを目指す。特に、遺伝的分析を通じて得られた知見は、感染症対策の立案において貢献することが期待される。本研究は、医療施設内だけでなく、将来的に地域社会全体での薬剤耐性菌の監視や制御に向けた取り組みに貢献するものと考えている。

P1-178/DP2-18-05

環境性乳房炎の原因となる大腸菌群の薬剤耐性化機構の解析

○島本 敏¹, 鈴木 直樹², 島本 整¹ (1)広島大・院・統合生命・食品衛生微生物, (2)広島大・院・統合生命・陸域フィールド科学)

Analysis of the antimicrobial resistance mechanism of coliform bacteria causing mastitis

○Toshi Shimamoto¹, Naoki Suzuki², Tadashi Shimamoto¹ (1)Dept. Microbiol. Food Safety, Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ., (2)Dept. Terrestrial Field Sci., Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ.)

【目的】乳房炎は乳牛の疾病の中で最も多く発生し、酪農業に経済的な損失をもたらすとともに公衆衛生上の問題となっている。特に大腸菌群を原因菌とする環境性乳房炎は他の細菌による乳房炎と比較して重症化しやすく、制御が必要である。乳房炎の予防および治療のために抗菌薬を使用するが、不適切な抗菌薬の使用は薬剤耐性菌の発生を促し乳房炎の治療を困難にする恐れがある。本研究では、ワンヘルスの概念に基づき、酪農場における乳房炎原因菌の薬剤耐性化機構の解析を目的とした。

【方法】広島県内の戻し堆肥フリーバーン牛舎の酪農場から定期的にサンプリングを実施し、大腸菌群を分離した。そして、分離菌株について multiplex PCR 法を利用した種の同定および薬剤耐性遺伝子の検出を行った。

【結果と考察】大腸菌およびアンピシリン耐性大腸菌は、いずれも夏場に多く、気温の低下とともに減少したが、大腸菌以外の大腸菌群には、大きな季節変動は認められなかった。4 回のサンプリングで大腸菌 658 株、肺炎桿菌 179 株を含む計 1,444 株を分離し、乳房炎を発症した乳牛から大腸菌 2 株、肺炎桿菌 1 株を分離した。薬剤耐性菌は水路、飲水、堆肥、牛床、餌などを含むサンプリングポイント全体で分離された。薬剤耐性遺伝子として、大腸菌では *bla*_{TEM}、肺炎桿菌では *bla*_{SHV} が高頻度に検出され、*bla*_{CTX-M} やテトラサイクリン耐性遺伝子も両者から高頻度に検出された。この結果は、本酪農場で用いられる抗菌薬の選択圧による影響であることが示唆された。

【謝辞】本研究は、公益財団法人 全国競馬・畜産振興会 畜産振興事業の助成を受けた。

P1-179/DP2-18-06

観光地に生息する野生のシカから分離された薬剤耐性大腸菌の分子遺伝学的解析

○中野 章代¹, 中野 竜一¹, 鈴木 由希¹, 堀内 沙央里¹, 山口 晃一¹, 坂田 竜二², 小川 美保², 矢野 寿一¹ (1)奈良医大・医・微生物感染症, (2)BML・細菌検査)

Genetic characteristics of drug-resistant *Escherichia coli* isolated from wild deer

○Akiyo Nakano¹, Ryuichi Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Saori Horiuchi¹, Koichi Yamaguchi¹, Ryuji Sakata², Miho Ogawa², Hisakazu Yano¹ (1)Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., (2)Dept. Bacteriol., BML, Inc.)

【目的】野生動物がヒトと密接に関わりを持つことで、人獣共通感染症や薬剤耐性菌の授受が懸念される。ワンヘルスの概念からも野生動物が保有する薬剤耐性菌を把握することは重要である。本研究では、ヒトと接する機会がある観光地に生息する野生のシカから分離した大腸菌の薬剤耐性状況と分子遺伝学的特徴を解析した。

【方法】2018 年 10 月～2024 年 1 月に北海道湖畔（阿寒湖、屈斜路湖、支笏湖）、奈良公園、広島県宮島、鹿児島県久根島に生息する野生のシカ糞便 284 検体を採取した。DHL 寒天培地に塗抹し MALDI-TOF MS で大腸菌と同定された 1 検体 1 株を対象とした。CLSI に準拠した薬剤感受性試験による耐性率算出、シーケンス解析による耐性遺伝子とゲノム型の決定、PFGE 解析とゲノム解析 (MiSeq, MinION) による同源性解析を行った。

【結果】分離した大腸菌はどの地域もアンピシリンに高い耐性を示し、カルバペネムやキノロン系薬には全て感性であった。耐性率に地域差はあるが全ての地域から第 3 世代セファロスポリン系薬 (3GC) 耐性株が分離され、その多くが CTX-M 型遺伝子を保有していた。ゲノム型は地域により異なる傾向であった。特に奈良公園では CTX-M-15 保有大腸菌 ST3580 が 69 株 (50%) と優位で、PFGE のバンドは全て同じであった。いずれも接合伝達能はなく CTX-M-15 遺伝子は染色体上にコードされていた。次いで CTX-M-14 保有大腸菌が 12 株あり、ST は多種に分かれたがいずれも接合伝達可能で CTX-M-14 遺伝子はプラスミド IncI1-Ia 上にコードされていた。

【結論】観光地に生息する野生のシカは、3GC 耐性大腸菌を保有していた。耐性率やゲノム型は生息地により異なり、独自のクローンの拡がりが見られた。

P1-180/DP2-18-07

Serratia marcescens における 2 成分制御系 SarRS を介した消毒薬耐性機構の解析

○百留 孝士郎^{1,2}, 谷重 萌¹, 安岡 里帆¹, 近藤 有馬², 森田 大地², 小川 和加野³, 熊谷 孝則², 黒田 照夫² (1)広島大・薬, (2)広島大・医系科学・微生物医薬品, (3)第一薬科大・薬・免疫薬品)

Analysis of disinfectant resistance mechanism via two-component system SarRS in *Serratia marcescens*

○Koshiro Hyakutome^{1,2}, Moyu Tanishige¹, Riho Yasuoka¹, Yuma Kondo², Daichi Morita², Wakano Ogawa³, Takanori Kumagai², Teruo Kuroda² (1)Sch. Pharm., Hiroshima Univ., (2)Dept. Microbiol. Med., Sch. Med. Sci., Hiroshima Univ., (3)Dept. Microbiol. & Bioche. Daiichi Univ. of Pharm.)

Serratia marcescens は院内感染の原因菌の一つであり、本菌が複数の抗菌物質に対して高い自然耐性、獲得耐性を持つことからその感染症は重篤化しやすいといわれている。近年では、消毒薬に耐性化し、院内感染を引き起こした例も報告されている。しかし、*S. marcescens* の消毒薬耐性機構については未だ不明な点も多い。私たちはこれまでに、継代培養により分離した消毒薬 Chlorhexidine (CHX) 高度耐性株において RND 型多剤排出ポンプ *SdeXY-OmsA* の発現が上昇し、全ゲノムシーケンスの結果から 5 つの遺伝子が CHX 耐性に関与していることを明らかにした。このうち、新規 2 成分制御系の sensor kinase である *SarS* の変異が、response regulator である *SarR* を介してこの発現上昇に深く寄与することも見出している。今回は *SarR* についての解析結果を報告する。C 末端に His-tag を付与した *SarR* は、大腸菌 KAM32 を用いて大量発現させた後、Ni-NTA 樹脂を用いて精製した。ゲルシフトアッセイは Electrophoretic Mobility Shift Assay Kit (Invitrogen) を用いて行った。精製した *SarR* を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、推定 *sdeP* プロモーター領域 (開始コドンから約 100 bp 上流) と推定 *sarR* プロモーター領域 (開始コドンから約 300bp 上流) のそれぞれに *SarR* が特異的に結合することが示された。この結合により *SarR* が *sdePQ-omsA* の発現上昇を行っていることが強く示唆されるとともに、自己の発現を制御していることが強く示唆された。現在、*SarR* の結合部位が *S. marcescens* のゲノム上のどこに存在するかを網羅的に解析中である。

P1-181/DP2-18-08

ワンヘルスアプローチに基づくヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性調査

○四宮 博人, 浅野 由紀子, 平井 真太郎, 福口 優桂, 大塚 有加 (愛媛県立衛生環境研究所)

AMR surveillance of human and food-derived *Escherichia coli* strains based on the one health approach

○Hiroto Shinomiya, Yukiko Asano, Shintarou Hirai, Yuka Fukuguchi, Yuka Otsuka (Ehime Pref. Inst. Pub. Health Environ. Sci.)

In the issue of drug resistance (AMR), a one-health approach encompassing environment-animal-food-human, etc. is important. We have conducted drug susceptibility testing (18 drugs) of various *Escherichia coli* isolated from humans and foods between 2015 and 2022 to clarify the drug resistance status in Japan. Among 2611 human *E. coli* strains, 915 (35.0%) strains were resistant to one or more drugs. The resistance rates by category were 29.1% for EHEC strains, 68.6% for diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC, and 62.4% for other *E. coli* strains. The percentage of multidrug-resistant *E. coli* strains that were resistant to six or more drugs was 1.7% for EHEC strains, 9.4% for diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC, and 29.1% for other *E. coli* strains. On the other hand, 92 of 165 food-derived (beef, chicken, etc.) strains (55.8%) were resistant to one or more drugs, with EHEC strains accounting for 27.8%, diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC for 64.6%, and other *E. coli* strains for 56.6%. Moreover, resistance profiles to various antimicrobial agents differ significantly among EHEC strains, diarrheagenic *E. coli* strains other than EHEC, and other *E. coli* strains, suggesting the possibility that the selection pressure for antimicrobial agents varies depending on the habitat of different *E. coli* taxa. (共同研究者: 23 地衛研の研究協力者)

P1-182/DP2-18-09

家畜および畜産農家の鼻前庭から分離された薬剤耐性グラム陽性球菌の性状解析

谷口 琉星¹, ○中野 竜一¹, 中野 章代¹, 鈴木 由希¹, 斧 康雄², 矢野 寿一¹
(¹奈良医大・医・微生物感染症, ²帝京平成大)

Characteristics of drug-resistant gram-positive cocci nasal carriage in livestock and farmers

Ryusei Taniguchi¹, ○Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Yasuo Ono², Hisakazu Yano¹ (¹Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara. Med. Univ., ²Teikyo Heisei. Univ.)

【目的】医療現場においてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌など薬剤耐性菌の制御は世界的にも重要な問題となっている。これら薬剤耐性菌は臨床のみならず動物やヒトからも分離されるため、One Health の概念に基づき包括的に解析することが求められている。本研究では家畜と畜産農家の鼻前庭から分離される薬剤耐性菌に注目し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】2013~2015年に63畜舎の家畜(ウシ105頭, ブタ67頭)ならびにその畜産農家61人から収集した鼻前庭ぬぐい液233検体を対象とした。マニット食塩寒天培地に培養された菌株について、質量分析器(MALDI-TOF-MS)により菌種を同定した。薬剤感受性について寒天平板希釈法により決定した。耐性遺伝子 *mecA* の保有状況についてPCR法により決定した。

【結果】家畜(ウシ由来15菌種, ブタ由来8菌種)と畜産農家(12菌種)から *Mammaliococcus* もしくは *Staphylococcus* が同定された。いずれも *Mammaliococcus sciuri* が最多であり、ウシで52株(49.5%), ブタで45株(67.1%), 畜産農家で18株(29.5%)分離された。*M. sciuri* の Cefoxitine に対する MIC₉₀ はウシで8 µg/ml, ブタで16 µg/ml, 畜産農家で8 µg/ml と高値だった。このうち *mecA* 保有株はウシで14株(26.9%), ブタで36株(80.0%), 畜産農家で5株(27.8%)であった。また、畜産農家では *Staphylococcus aureus* が16株(26.2%)分離され、すべてメチシリン感受性黄色ブドウ球菌だった。

【結論】家畜、農家ともに鼻前庭常在菌は *M. sciuri* が多数を占めており、同菌株を共有している可能性が推測された。特にブタからの分離株は *mecA* 保有率が高かった。

P1-183/DP2-18-10

本邦医療機関の排水より分離された薬剤耐性大腸菌の分子遺伝学的特徴

○鈴木 由希¹, 中野 竜一¹, 中野 章代¹, 野村 泰充¹, 堀内 沙央里¹, 朝田 智子¹, 山口 晃一¹, 齊藤 開², 渡邊 真子³, 矢野 寿一¹ (奈良医大・医・微生物感染症学, ²自治医科大学附属さいたま医療センター, ³深谷赤十字病院)

Molecular characteristics of drug resistant *Escherichia coli* isolated from hospital sewage in Japan

○Yuki Suzuki¹, Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yasumitsu Nomura¹, Saori Horiuchi¹, Tomoko Asada¹, Koichi Yamaguchi¹, Kai Saito², Mako Watanabe³, Hisakazu Yano¹ (¹Dept. Microbiology and Infectious Diseases, Nara Medical Univ., ²Jichi Medical University Saitama Medical Center, ³Fukaya Red Cross Hospital)

【目的】近年、薬剤耐性菌対策の一環として環境排水のモニタリングや処理方法が注目されている。しかし、排水中の薬剤耐性菌の実態やヒト由来分離株との関連性、ヒトへのリスクについては不明な点が多い。今回私たちは、医療機関の排水から分離された薬剤耐性大腸菌について分子遺伝学的特徴を明らかにした。

【方法】2020年7月から2022年4月の期間に、本邦の医療機関一か所より排水を1回/月、計21回採取し、mSuper CARBATMと第3世代セファロsporin含有DHL寒天培地にて薬剤耐性菌を選択培養した。コロニー形態と薬剤感受性パターンの異なる株を選択し、質量分析(MALDI-TOF MS)により菌種を同定した。耐性遺伝子(ESBL, カルバペナーゼ)の型別はPCRとDNAシークエンシングにより、薬剤感受性はCLSIに準拠した寒天平板希釈法により決定した。ゲノム型はMLST解析を実施した。

【結果】採取した病院排水21サンプルより、計2,345株のグラム陰性桿菌が分離された。ESBL産生大腸菌は51株あり、薬剤感受性はCTX 8->256 µg/ml, IPM ≤0.06-0.5 µg/mlであった。遺伝子解析の結果、CTX-M-27が19株と最も多く、CTX-M-14が14株、CTX-M-15が9株、他CTX-M-3やCTX-M-55産生株が分離された。MLST解析の結果、ST131が29株と最も多く検出された。ほかST1193, ST38, ST167などヒトからも分離されるSTを含め多様なゲノム型が検出された。

【結論】病院排水中のESBL, カルバペナーゼ産生大腸菌の存在が明らかになり、ヒト臨床より報告の多いCTX-M-27やCTX-M-14を産生するST131が排水からも検出された。ヒト臨床分離株との関連性について調査が必要だと思われた。

P1-184/DP2-18-11

Viruses encode tRNA and harbor anti-retron to evade bacterial immunity

○アザム アアハエルマン¹, 千原 康太郎¹, 近藤 恒平², 中村 暢宏¹, 小島 新二郎¹, ニエ ウェンハン¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈¹, 崔 龍洙³, 氣 駕 恒太郎^{1,3} (¹国立感染症研・治ワク, ²国立感染症研・AMRセンター, ³自治医科大学・医・細菌学)

○Aa Haeruman Azam¹, Kotaro Chihara¹, Kohei Kondo², Tomohiro Nakamura¹, Shinjiro Ojima¹, Wenhan Nie¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita¹, Longzhu Cui³, Kotaro Kiga^{1,3} (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ³Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Retrons are bacterial retroelements encoding reverse transcriptase, which can produce multicopy single-stranded DNA (msDNA) and serve as anti-phage defense systems. Nevertheless, our understanding of how phages evade retrons remains limited. We showed that tRNA and retron anti-defense (Rad) inhibit retron-Eco7 and various other retrons, respectively. The effector protein of retron-Eco7, PtuAB, degraded tRNA-Tyr leading to abortive infection; however, phage countervailed retron-Eco7 by supplying tRNA-Tyr. Rad inhibited retron function by degrading msrsmg RNA, the precursor of msDNA. In subsequent analyses, we showed that phage-derived tRNA neutralizes the tRNA-degrading defense system (PrrC170). Emphasizing the use of phage-derived tRNA to evade anti-phage defense represents a general strategy used by phages. We demonstrate that viruses utilize two strategies, anti-defense (e.g., Rad) and defense cancellation (e.g., tRNA), to overcome bacterial defenses. The identification of anti-defense proteins and tRNA defense-canceling functions illuminates the prospect of engineering phages with enhanced capabilities to circumvent bacterial defenses, thereby potentially augmenting their efficacy as therapeutic agents.

P1-185/DP2-18-12

結核菌異物排出系複合体のコンポーネント間相互作用

○川端 美希子¹, 山本 健太郎², 田島 寛隆^{3,4}, 阿戸 学², 川岸 郁朗^{1,3,4} (法政大・院理工・生命機能, ²国立感染症研・感染制御, ³法政大・生命科学・生命機能, ⁴法政大・ナノテクセンター)

Direct interaction of xenobiotic efflux components MmpL5 and MmpS5 in Mycobacterium tuberculosis

○Mikiko Kawabata¹, Kentaro Yamamoto², Hirota Tajima^{3,4}, Manabu Ato², Ikuro Kawagishi^{1,3,4} (¹Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., ²Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, ³Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., ⁴Res. Cen. Micro-Nano Tech., Hosei Univ.)

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は結核の原因となる抗酸菌である。抗酸菌はグラム陽性菌に分類されるが、ペプチドグリカン層(PG)の外側にミコール酸を主成分とする外膜様構造(mycomembrane)をもつ特殊な細菌群である。近年、複数薬剤に耐性を持つ多剤耐性結核菌が世界的に公衆衛生上の問題となっている。多剤耐性化の原因の一つとして、異物排出系の発現亢進が挙げられる。結核菌は異物排出系内膜チャネルであるMmpLを13種類もち、そのうちMmpL5は抗酸菌に使用される抗生物質であるベダキリンとクロファジミンに対する薬剤耐性に関与する。MmpL5は膜タンパク質MmpS5と共に機能することが示唆されているが、これらの結合の詳細や排出メカニズムは分かっていない。本研究では、MmpL5とMmpS5の直接的な相互作用について検証した。まずMmpS5のベリプラズムドメイン、MmpL5全長を発現する系を構築した。MmpS5のフラグメントとMmpL5含む膜小胞を用いて超遠心によるプルダウンアッセイを行ったところ、MmpS5がMmpL5と直接結合することを示す結果が得られた。次に、MmpL5-S5の推定輸送基質による結合への影響を検証するため、抗生物質存在下でプルダウンアッセイを行った。また、MmpS5存在下でMmpL5-GFPの膜上の側方拡散が制限されることを利用して、*in vivo*でMmpL5-S5間の結合に関与するアミノ酸残基を特定するための系を構築した。現在、非病原性の抗酸菌である *M. smegmatis* に MmpL5-GFP と一残基変異を導入した MmpS5 を発現させ、全反射蛍光顕微鏡による一分子観察を行っている。

P1-186/DP2-18-13

本邦医療機関の排水より分離されたカルバペネマーゼ産生 *Delftia tsuruhatensis* 3 株の解析

○藤倉 裕^{1,2,3}, 鈴木 由希¹, 中野 竜一¹, 中野 章代¹, 野村 泰充¹, 堀内 沙央里¹, 山口 晃一¹, 笠原 敬³, 矢野 寿一¹ (1奈良医大・医・微生物感染症, 2尼崎総合医療センター・感染症内科, 3奈良県立医科大・感染症内科学)

Genetic analysis of three carbapenemase-producing *Delftia tsuruhatensis* from hospital sewage

○Hiroyuki Fujikura^{1,2,3}, Yuki Suzuki¹, Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yasumitsu Nomura¹, Saori Horiuchi¹, Koichi Yamaguchi¹, Kei Kasahara³, Hisakazu Yano¹ (1Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., 2Dept. Infect. Dis., Amagasaki Gen. Med. Ctr., 3Dept. Infect. Dis., Nara Med. Univ.)

【背景】カルバペネマーゼ産生菌は、人だけでなく環境にも広がっていることが知られている。*Delftia tsuruhatensis* は環境中に存在するグラム陰性桿菌で、ヒトに感染を起こすことは稀だが、特に免疫不全者や血管内デバイスを留置している患者において致死的な感染症を引き起こしうる。また、通常カルバペネムに感性であり、カルバペネマーゼ産生株の報告も稀である。今回、医療機関の排水から分離された3株のカルバペネマーゼ産生 *D. tsuruhatensis* について解析したの報告する。【方法】本邦医療機関の排水より分離され、質量分析装置により *Delftia acidovorans* として同定された3株 (NW967, NW1561, NW1562) を対象とした。菌種の同定は ANI により、薬剤感受性は CLSI に準じた寒天平板希釈法にて決定した。ゲノム解析として、次世代シーケンサーを用いて DNA 塩基配列を決定し、遺伝子構造を解析した。【結果】ANI 解析の結果、3株は全て *D. tsuruhatensis* であった。3株の MIC は、IPM が 1-8µg/ml, MEPM が 4-8µg/ml で、全て mCIM 陽性であった。ゲノム解析の結果、NW967, NW1561 の2株は IMP-1 を、NW1562 は GES-24 を保有しており、IMP-1 はそれぞれ約 21 と 27kbp の、GES-24 は約 65kbp のプラスミド上のクラス 1 インテグロン内にコードしていた。3株のプラスミド構造はそれぞれ異なっていた。【結論】病院排水からカルバペネマーゼ産生 *D. tsuruhatensis* を検出した。今後、環境中の薬剤耐性菌とヒトから検出した臨床検体との関連性を検討する必要がある。

P1-187/DP2-18-14

鶏肉を汚染する AmpC/ESBL 産生および mcr 保有コリスチン耐性大腸菌の比較解析

○中山 達哉¹, 大畑 奈月¹, 山口 貴弘², 陳内 理生³, 久米田 裕子⁴, 長谷 篤⁵ (1広島大・統合生研, 2大安研・微生物部, 3神奈川衛研・微生物部, 4大工大・微制研, 5帝塚山大・現代生活)

Comparative analysis of AmpC/ESBL-producing and colistin-resistant *Escherichia coli* in chicken meat

○Tatsuya Nakayama¹, Natsuki Ohata¹, Takahiro Yamaguchi², Michio Jinnai³, Yuko Kumeda⁴, Atsushi Hase⁵ (1Grad. Sch. Int. Sci. Life, Hiroshima Univ., 2Dept. Microbio., Osaka Inst. Pub. Health, 3Div. Microbiol., Kanagawa Pref. Inst. Pub. Health, 4Res. Cent. Microorg. Cont., Osaka Met. Univ., 5Fac. Contemp. Human Life Sci., Tezukayama Univ.)

プラスミドを介した薬剤耐性菌の蔓延は公衆衛生上の懸念事項であり、特に食品における本菌汚染はヒト耐性菌保菌へと繋がることから注視されている。我々の先行研究から、鶏肉は食品の中でも耐性菌汚染率が高いこと、さらに国内産と比較してベトナム産鶏肉では、AmpC 型/基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生 (ESBL-EC) 及び mcr 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌 (COL-EC) による汚染率が高いことを明らかにしてきた。しかしながら、コリスチン耐性 ESBL-EC (COL-ESBL-EC) の実態は明らかではない。そこで、本研究では、ベトナム産鶏肉から COL-ESBL-EC の汚染率を明らかにし、ESBL-EC 及び COL-EC との比較により、薬剤耐性傾向を明らかにすることを目的とした。ベトナム産鶏肉 60 検体から 25g を切除し、225mL 緩衝ペプトン水にて 37°C 24 時間、増菌培養し、抗菌剤を含む CHROMagar ECC 及び MacConkey 寒天培地に画線塗抹した。分離した結果、鶏肉 66.7% から COL-ESBL-EC、78.3% から ESBL-EC 及び 43.3% から COL-EC が分離された。blaCTX-M の検出・同定した結果から COL-ESBL-EC 及び ESBL-EC では、blaCTX-M-55/TEM, blaCTX-M-55, blaCMY-2, blaCTX-M-65 が優勢であった。また、mcr 遺伝子を検出した結果、COL-ESBL-EC 及び COL-EC とともに、全株で mcr-1 を保有していた。さらに、薬剤感受性試験の結果、COL-ESBL-EC 及び ESBL-EC の多くはキノロン、ホスホマイシン (FOS) に耐性を示すとともに、COL-ESBL-EC, ESBL-EC, COL-EC の順で多剤耐性傾向を示していた。本結果から、AmpC/ESBL 関連遺伝子とキノロン、FOS 耐性遺伝子は同じ耐性プラスミドにコードされ、耐性プラスミド獲得によって、同時に耐性を獲得していると示唆された。

P1-188/DP2-18-15

プラスミド上にあるインテグロンの遺伝子構造に着目した新規薬剤耐性遺伝子の検索

○津田 裕介¹, 法月 千尋², 荒川 宜親³ (1京大・附病院・検査部, 2修文大・医療科学・臨床検査, 3藤田医科大・医・細菌学)

Search for novel antimicrobial resistance genes by analyzing genetic structure of integrons

○Yusuke Tsuda¹, Chihiro Norizuki², Yoshichika Arakawa³ (1Div. Clinic. Labo., Kyoto Univ. Hosp., Kyoto Univ., 2Dept. Med. Tech., Med. Sci., Shubun Univ., 3Dept. Bacteriol., Med., Fujita Health Univ.)

プラスミド上のインテグロン中には多くの薬剤耐性遺伝子があり、細菌の生存戦略に寄与している。また、インテグロン中には機能不明な遺伝子 hypothetical protein (HP) も多く含まれているが、インテグロンに存在する新規薬剤耐性遺伝子の機能解析はゲノム解析単独では困難である。本研究では、インテグロン中の薬剤耐性遺伝子の構成に着目した遺伝子構造の比較により HP の機能推定の解析を行うことで、新規の薬剤耐性遺伝子候補を探索した。

まず、公共データベースに登録されていた大腸菌由来の 36,427 のプラスミド配列から、3,359 のインテグロンを抽出した。インテグロン中にある全ての遺伝子について Prokka でアノテーションを行った。配列情報からインテグロン中の HP を抽出したところ、1,857, 215 種類が検出された。ここから 10 kDa 以上の 1,461, 136 種類の HP を選択し、blastp (e-value 0.01 以下) により機能的な遺伝子の候補が全く検出されない HP を抽出し、アミノ酸配列の相同性により整理したところ、651, 68 種類の真の HP が検出された。

次に、intI1 を中心にインテグロン中の遺伝子構造の整理を行った。その結果、複数の薬剤耐性遺伝子を持つインテグロンと遺伝子構造が類似した真の HP (*hypol*) を含むインテグロンを特定した。この *hypol* は真の HP のうち最も検出数が多かった (205/651, 31.4%)。また、*hypol* の上流には大腸菌内で詳細な機能が不明な遺伝子 (*geneA*) が含まれていることがわかった。現在、*hypol* と *geneA* が新規薬剤耐性遺伝子である可能性があると考え、機能解析を行っている。

P1-189/DP2-18-16

緑膿菌のアズトレオナム耐性における MexAB-OprM およびその制御因子の役割

○林 光太¹, 野島 瑠莉¹, 大西 杏¹, 鴨志田 剛¹, 河村 好章², 森田 雄二¹ (1明治薬大・薬・感染制御, 2愛知学院大・薬・微生物)

Role of the MexAB-OprM and its regulators in aztreonam resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

○Kota Hayashi¹, Ruri Nozima¹, Anne Ohnishi¹, Go Kamoshida¹, Yoshiaki Kawamura², Yuji Morita¹ (1Dept. Infection Control Science., Sch. Pharm. Meiji Pharmaceutical Univ., 2Dept. Microbiol., Sch. Med., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 は、IMP-1 型メタロ β-ラクタマーゼ (MBL) を有し、調べる限りすべての β-ラクタム薬に耐性を示す。IMP-1 型 MBL は、モノバクタム系であるアズトレオナムに低親和性を示すため、NCGM2.S1 のアズトレオナム獲得耐性は他の系によると予想される。そこで NCGM2.S1 における MexAB-OprM とその制御因子の役割に焦点を当てた。【方法】緑膿菌の遺伝子組換え体の構築は、スクロース感受性遺伝子 *sacB* を含む suicide vector を用いた相同組換え法により行った。薬剤感受性は微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 MIC により評価した。【結果】NCGM2.S1 から IMP-1 型 MBL, AmpC β-ラクタマーゼ, MexAB に関して一連の欠損株を作成したところ、MexAB 欠損株のみアズトレオナム感受性が上昇した。NCGM2.S1 由来の MexAB 欠損株と薬剤感受性 PAO1 由来の MexAB 欠損株ではアズトレオナム MIC は同程度だった。MexAB-OprM 制御因子 *nalD* の機能解析を試みたところ、NCGM2.S1 の *nalD* を PAO1 の *nalD* に置換した変異体 (NCGM2.S1 *nalDPAO1*) は、NCGM2.S1 と比較してアズトレオナムに高感受性であったが、PAO1 株と比較して低感受性であった。【考察】MexR, NaIC, NaID は、それぞれ MexAB-OprM の産生を負に制御している。つまりこれらの変異は MexAB-OprM の産生上昇を引き起こす。NCGM2.S1 の NaID は PAO1 の *NaID* と比較して 6 アミノ酸残基を欠いており、NCGM2.S1 は少なくとも *nalD* 変異によりアズトレオナム耐性が亢進した株であることが示された。しかしながら、NCGM2.S1 *nalDPAO1* はアズトレオナム耐性であり、NCGM2.S1 の耐性獲得には、他の因子の関与が予想される。現在 MexR や NaIC に関して解析を進めている。

P1-190/DP2-18-17

Effects of dual therapy with betamethasone and josamycin in NC/Nga mouse model of atopic dermatitis

○松井 勝彦, 村中 円香, 山口 徒佳, 前田 真奈美 (明治薬大・臨床免疫)

○Katsuhiko Matsui, Madoka Muranaka, Tomoka Yamaguchi, Manami Maeda (Dept. Clin. Immunol., Meiji Pharmaceut. Univ.)

Objective: The present study was designed to evaluate the effectiveness of combination therapy with betamethasone and josamycin for atopic dermatitis (AD). **Methods:** Betamethasone (0.1%) and josamycin (0.1%) were topically administered to NC/Nga mice with severe AD-like skin lesions. Skin severity scores, histological changes in skin lesions, and serum IgE levels were assessed as indicators of therapeutic efficacy. **Results:** Topical treatment with both drugs suppressed the skin severity score to a greater degree than betamethasone alone. This was associated with a reduction of epidermal thickening, a reduced density of dermal cellular infiltration, a decreased mast cell count in the dermis, and a reduced serum IgE level. In addition, both drugs in combination markedly reduced the expression of IFN- γ and IL-4 in auricular lymph node cells, as well as the *Staphylococcus aureus* count on the lesioned skin. **Conclusion:** These results show that simultaneous topical application of both drugs can ameliorate severe AD-like skin lesions in NC/Nga mice. It is suggested that combination therapy with betamethasone and josamycin would be beneficial for control of severe AD lesions colonized by *S. aureus* by inhibiting the development of both Th1 and Th2 cells and also through elimination of superficially located *S. aureus*.

P1-191/DP2-21-01

非抗菌性エリスロマイシン誘導体による免疫調節作用の解析

○齋藤 瑠都^{1,2}, 土門 久哲^{1,3}, 日吉 巧^{1,3}, 池田 朱里^{4,5}, 廣瀬 友靖^{4,5}, 砂塚 敏明^{4,5}, 寺尾 豊^{1,3} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・う蝕, 3新潟大・院医歯・高口研, 4北里大・大村研, 5北里大・院・感染制御)

Molecular Analysis of Immunomodulatory Effects of Non-antimicrobial Erythromycin Derivatives

○Rui Saito^{1,2}, Hisanori Doman^{1,3}, Takumi Hiyoshi^{1,3}, Akari Ikeda^{4,5}, Tomoyasu Hirose^{4,5}, Toshiaki Sunazuka^{4,5}, Yutaka Terao^{1,3} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch., Med. Dent. Sci., 2Div. Cariol. Oper. Dent. Endo., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 4Omura Inst., Kitasato Univ., 5Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ.)

【背景と目的】マクロライド系薬に対する薬剤耐性が拡大し、使用量削減が求められている。一方、マクロライド系薬が併せ持つ免疫調節作用はさまざまな炎症性疾患に有効であると報告されている。そこで本研究では、抗菌作用の無いエリスロマイシン (EM) 誘導体を開発し、その免疫調節作用について解析した。**【方法と結果】**マクロライド感受性 *Staphylococcus aureus* N1LS6 株に 37 種類の EM 誘導体を添加して培養し、非抗菌性の誘導体を選別した。次に、非抗菌性誘導体と LPS を THP-1 細胞に混合添加して培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA にて測定した。その結果、誘導体 EM982 と LPS を混合添加した群では、LPS 単独添加群と比べて、TNF- α , IL-6, IL-8 および IL-10 の濃度が有意に低かった。続いて、Toll-like receptor (TLR) 4 を発現させた HEK293 細胞に EM982 と LPS を混合添加して培養し、NF- κ B および AP-1 の活性化に伴って分泌されるアルカリフォスファターゼの活性を測定した。その結果、EM982 添加群では、LPS 単独添加群と比較して、アルカリフォスファターゼ活性が有意に低かった。さらに、TLR4 シグナル伝達分子に及ぼす EM982 の影響を real-time PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析した。その結果、EM982 添加群では、LPS 単独添加群と比較して、NF- κ B の上流で機能する IKK β および I κ B α のリン酸化レベルが低かった。**【考察と結論】**EM982 は TLR4 シグナル伝達分子 IKK β および I κ B α のリン酸化を阻害し、NF- κ B の活性化を抑制することで、炎症性および抗炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。また、EM982 は抗菌作用を欠き、薬剤耐性菌を生じさせる懸念が少ないことも示唆された。

P1-192/DP2-21-02

ディフィシル菌の溶菌酵素 CD3380 の生化学的解析

○関谷 洋志¹, 高橋 瑞稀¹, 岡崎 留佳¹, 神鳥 成弘², 玉井 栄治¹ (1松山大・薬・感染症学, 2香川大・医・研基セ)

Analysis of lytic enzyme CD3380 of *Clostridioides difficile*

○Hiroshi Sekiya¹, Mizuki Takahashi¹, Rui Okazaki¹, Shigehiro Kamitori², Eiji Tamai¹ (1Dept., Infect. Disease., Pharma., Matsuyama Univ., 2Res. Faci. Cent. Sci. & Tec. Facul. Med., Kagawa 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加水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エンドペプチダーゼと推定される溶菌酵素 CD3380 の生化学的性質を明らかにすることを旨とした。

【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 CD3380 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 (CD3380_CD2) 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】Signal peptide を除いた全領域を持つ CD3380 はディフィシル菌に対して溶菌活性を示さなかった。一方、触媒ドメインのみの CD3380_CD2 は、強い溶菌活性を示した。そこで、CD3380_CD2 の生化学的性質を調べた結果、pH7.0, 0 mM NaCl の条件下で最も溶菌活性が高く、NaCl 濃度が高くなると活性の低下がみられた。また、ノーバイ菌などに対して弱い溶菌活性を示し、枯草菌には比較的強い溶菌活性を示した。しかし、調べた全てのディフィシル菌株に対して高い溶菌活性を示していることからディフィシル菌に特異的に作用すると考えられた。一方、溶菌活性と菌との結合の有無に相関性はみられなかった。

P1-193/DP2-21-03

尿路感染症原因菌 *Actinotignum* spp. の各種抗菌薬に対する感受性評価および系統解析

○富田 純子, 久綱 僚, 森 亮太, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

Antimicrobial susceptibility survey and phylogenetic analysis of *Actinotignum* spp.

○Junko Tomida, Ryo Kutsuna, Ryota Mori, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】グラム陽性嫌気性桿菌である *Actinotignum* 属菌種は、尿路感染症からの分離が多く報告されており、その他には菌血症、感染性心内膜炎、軟部組織感染症等からの分離報告もある。*Actinotignum* 属菌種は、質量分析や生化学性状試験による識別が難しいことから、臨床現場において同定が困難な菌群として認識されている。また、本属菌種による感染症では、各抗菌薬のブレイクポイントや治療法が十分に策定されていないことが問題となっている。そこで、本研究では *Actinotignum* 属菌種の各種抗菌薬に対する MIC データを収集し、薬剤感受性および耐性の傾向を明らかにした。

【方法】*Actinotignum* 属の基準株および臨床分離株 72 株について、ブルセラ培地を用いた Etest により MIC を測定した。抗菌薬は各系統 15 薬剤について評価した。また、16S rRNA およびハウスキーピング遺伝子を PCR にて増幅後、塩基配列を決定し比較した。

【結果および考察】*Actinotignum* 属は現在 4 菌種存在するが、16S rRNA 遺伝子の相同性が高く、菌種を識別するためには他の遺伝子による解析が必要であった。MIC 測定の結果、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系薬剤の MIC₉₀ は 0.1 μ g/mL 以下であり、感受性を示した。アミノグリコシド系、マクロライド系、リンコマイシン系薬剤には一部の株が耐性を示した。シプロフロキサシンには 45% の株が耐性を示し、メトロニダゾールはすべての株が耐性であった。耐性機構について調べたところ、キノロン系薬剤への耐性には *gyrA* 遺伝子の変異が、マクロライド系薬剤への耐性には *erm* (X) 遺伝子の関与が示唆された。

P1-194/DP2-21-04

ファージの尾繊維先端と大腸菌ポーリンの相互作用

○寺崎 陽香, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Interaction between the tip of long tail fiber of PP01 phage and a porin of *Escherichia coli*

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

近年、多剤耐性菌の蔓延を背景にファージ療法が注目されている。我々は、ファージの宿主認識を分子レベルで理解し、その成果をファージ療法へ応用することを目指している。O157株に感染するPP01ファージは、尾繊維先端に位置するGp38を用いて、大腸菌ポーリンである外膜タンパク質C (OmpC) に吸着する。これまでの解析により、Gp38の230番目のTyrが、OmpCの細胞外領域に位置する303番目から306番目の4アミノ酸Gly-Val-Ile-Asnと相互作用する可能性が示唆されている。本研究ではまず、Gp38におけるTyr230の必要性を検討した。Tyr230を欠失したGp38を持つPP01は、O157株のOmpCを発現する大腸菌で増殖できなかった。興味深いことに、PP01はTyr230をAlaに置換しても増殖できたが、Proに置換すると増殖不能になった。Proへの置換は主鎖の構造に変化を与えるため、Tyr230の主鎖がOmpCとの相互作用に必要であることがわかった。次に、OmpCのGly-Val-Ile-Asnの必要性を検討した。各アミノ酸を欠失、またはAlaやProに置換したOmpCを発現させて、PP01の増殖と吸着を調べた。Asn306を欠失またはProに置換したOmpC発現株ではPP01は増殖も吸着もできなかった。よって、PP01の吸着にはAsn306の主鎖が必要であることがわかった。以上の結果より、Gp38のTyr230の主鎖とOmpCのAsn306の主鎖が相互作用する可能性が示唆された。我々はさらに、Tyr230以外に、Gp38の147番目から170番目の領域がOmpCとの相互作用に必要であることを見出した。吸着のレセプター分子が異なるPP01と類縁ファージの間でこの領域を比較したところ、他の領域に比べて相同性が著しく低かった。よって、この領域は宿主認識に関わることが示唆される。

P1-195/DP2-21-05

Isolation and characterization of lytic phages against colibactin-producing *Escherichia coli*

○日高 侑也¹, Kanate Thitianapakorn¹, XinEe Tan¹, 相羽 由詞¹, 宮永一彦¹, 笹原 鉄平^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 崔 龍洙¹ (自治医大・医・細菌, ²自治医大・医・臨床感染)

○Yuya Hidaka¹, Kanate Thitianapakorn¹, XinEe Tan¹, Yoshifumi Aiba¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Teppei Sasahara^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Gut dysbiosis has been implicated in various diseases, yet addressing disease-causing bacteria remains a formidable challenge. Conventional techniques lack specificity in eliminating target bacteria, complicating the understanding of their role in disease and presenting significant obstacles to developing pharmaceutical agents. To address this issue, our focus was on the specific elimination of the colibactin-producing *Escherichia coli* (*pks*⁺ *E. coli*), associated with colorectal cancer, from the gut by utilizing phages with specific lytic activity. Initially, a wild-type phage (ΦEC75_05) was isolated from sewage at Jichi Medical University Hospital, classified as belonging to the genus *Felixovirus*, and demonstrated lytic activity against 38 out of 56 *pks*⁺ *E. coli* strains. Subsequently, we assessed the efficacy of ΦEC75_05 using the tetracycline-resistant *pks*⁺ *E. coli* 75 strain *in vitro*. ΦEC75_05 selectively inhibited the growth of *pks*⁺ *E. coli* 75 strain in both pure culture and mouse feces suspension, with the extent of inhibition depending on the multiplicity of infection (MOI). Ongoing efforts involve the development of an animal gut infection model using mice and the continuous assessment of ΦEC75_05 efficacy against *pks*⁺ *E. coli* 75 strain in the mouse gut.

P1-196/DP1-04-16

A water-in-oil droplet-based method for detecting and isolating infectious bacteriophage particles

○星野 美羽¹, 大田 悠里^{2,3}, 陶山 哲志², 森下 祐至³, 常田 聡⁴, 野田 尚宏^{1,2,4} (東大院・新領域・メディカル情報生命, ²産総研・バイオメディカル, ³(株) オンチップ・バイオテクノロジーズ, ⁴早大院・先進理工・生命医科)

○Miu Hoshino¹, Yuri Ota^{2,3}, Tetsushi Suyama², Yuji Morishita³, Satoshi Tsuneda⁴, Naohiro Noda^{1,2,4} (¹Dept. CBMS, Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, ²Biomed. Res. Inst., Natl. Inst. of Adv. Sci. & Tech. (AIST), ³On-chip Biotechnologies Co., Ltd., ⁴Dept. Adv. Sci. & Eng., Grad. Sch. Adv. Sci. & Eng., Waseda Univ.)

Bacteriophages (phages) have been isolated and studied mainly using plaque assay, where phages and host cells are mixed into molten soft agar, which is then poured over an agarose plate and incubated. While this method can produce visible plaques in areas where virulent phage is extant, it is lacking in throughput and prone to fluctuations in experimental procedures. To improve the robustness and stability of phage screening, we develop a phage screening method employing water-in-oil (w/o) droplets, which are minuscule drops of aqueous solution dispersed in oil. In this system, fluorescent staining of progeny phage within w/o droplets differentiates droplets with and without virulent phage. YOYO-1, a cell-impermeant nucleic acid intercalating dye, was used for this purpose. To demonstrate this proof-of-concept, we generated w/o droplets containing T2 phage and *Escherichia coli* and attempted to recover phage from individual droplets based on YOYO-1 fluorescence. As a result, we successfully recovered phage from droplets ruptured and upscaled following isolation into 96-well plates. Phage recovery rates from fluorescent droplets were approximately 35%. In contrast, non-fluorescent droplets had a 0% phage recovery rate. This shows that the existence of a virulent phage within a droplet will consistently result in the elevation of droplet fluorescence intensity in our model.

P1-197/DP2-21-14

膜小胞修飾銀ナノ粒子を用いた細胞内寄生菌に対する抗菌活性

○徐 薇, 吉井 僚祐, 丸山 紗代, 新留 琢郎 (熊大・先端科学研究部)

Antimicrobial activity of bacterial membrane vesicles-coated silver nanoparticles

○Wei Xu, Ryosuke Yoshii, Sayo Maruyama, Takuro Niidome (FAST, Kumamoto Univ.)

サルモネラ菌は食中毒菌として知られ、腸管上皮細胞やマクロファージ内に寄生し、増殖する。ニューキノロン系抗生物質のような抗菌薬が主に治療に使用されるが、細胞浸透性や安定性が低いため細胞内寄生菌に対して効果が乏しい。そこで、我々は細菌が分泌する膜小胞(MV)に着目した。MVには、細菌由来膜タンパク質やシグナル伝達物質が含まれ、細菌間あるいは細菌-宿主間に情報伝達などの役割を持つ。そこで、サルモネラ菌が産生するMVに何かしら細胞認識する物質が存在すれば、細胞選択的な薬物送達ができるのではないかと着想した。一方、抗菌剤として銀ナノ粒子が多く使用されている。しかし、その分散安定性が低いことも指摘されている。そこで本研究では、銀ナノ粒子にMVを用いて表面修飾し、銀ナノ粒子の安定性とマクロファージへの取り込み効率を向上させ、細胞内に寄生するサルモネラ菌を効果的に殺菌することを検証した。

P1-198/DP2-19-17

大腸がんの腸内マイクロバイオームにおける真菌叢の関与

○林 瑤大¹, 内野 祥徳¹, 後藤 雄一¹, 湯田 彩花¹, 比地岡 浩志¹, 杉浦 剛², 奥井 達雄¹ (1)鹿児島大・院・医歯・顎顔面機能再建学・顎顔面疾患制御学, ²東北大・院・歯・病態マネジメント歯学・顎顔面口腔腫瘍外科学)

Involvement of the fungal flora in the colonic microbiota of the colorectal cancer

○Yodai Hayashi¹, Yoshinori Uchino¹, Yuichi Goto¹, Sayaka Yuda¹, Hiroshi Hijioka¹, Tsuyoshi Sugiura², Tatsuo Okui¹ (1)Dept. Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science, Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation, Kagoshima Univ., ²Div. Oral and Maxillofacial Oncology and Surgical Sciences, Div. Oral and Maxillofacial Reconstructive Surgery, Tohoku Univ.)

【緒言】大腸がん患者は近年著明な増加傾向を示し、その死亡者数は男性3位、女性1位である。次世代シーケンスの発展により、大腸がんの発生や進展に腸内細菌叢の関与が示されつつある。一方、その他の消化器系疾患において、近年真菌叢の関与が報告されるようになり、口腔においても口腔潜在的悪性疾患に対する真菌の関与がクローズアップされている。しかし、大腸がんにおける真菌叢の関与は未だ不明である。われわれは口腔内の真菌が腸へ供給され、大腸がんの発生に影響を与えている可能性を検討したので報告する。【対象と方法】対象は鹿児島大学病院消化器外科にて大腸がんと診断された52名(疾患群)と健常者51名(対照群)の中から、Qiime2解析においてSample depthが500以上の検体(疾患群15名、対照群15名)とした。被験者より唾液と便を採取し、次世代シーケンサーによりITS領域で真菌叢の解析を行った。【結果】対照群と比較して疾患群の便ではα多様性が有意に低下した。唾液にて、ANCOM解析とWilcoxon検定の両方において、Agaricomycetesが健常者群と疾患群の間に有意差をみとめた。また、ヒートマップ解析において疾患群の唾液では主にMalassezia restricta、便では不特定の真菌種が健常者群と比較して増加傾向にあった。今回の結果より、口腔や皮膚に常在する真菌が大腸がんに関与している可能性が指摘された。【結語】大腸マイクロバイオームにおいて口腔や皮膚に常在する真菌が認められ、疾患群ではMalasseziaを始めとした特定の真菌の存在量に変化を認めた。

P1-199

Physalins suppress the expression of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*

山口 隼平¹, ○高屋 明子^{1,2} (1)千葉大・院薬・感染制御学, ²千葉大・真菌セ)

Junpei Yamaguchi¹, ○Akiko Takaya^{1,2} (1)Dep. Infect. Cont. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ., ²MMRC, Chiba Univ.)

The virulence of *Staphylococcus aureus* depends on the expression of many toxins and other factors controlled by the quorum sensing system (QS), encoded on the virulence accessory gene regulator (*agr*) locus on its genome. In this study, we identified four physalins as novel Agr-QS suppressors. Biological analysis and *in vitro* protein-DNA binding assays suggested that these physalins suppress gene expression related to the Agr-QS system by inhibiting the binding of the key response regulator AgrA to the *agr* promoters. On the other hand, five physalins did not reduce bacterial Agr-QS activity but inhibited AgrA binding to DNA *in vitro*. As a result of the docking simulation, the direction in which physalin interacts with the DNA binding site of AgrA was classified into three docking states. Furthermore, 100-ns molecular dynamics simulations revealed that the hydrogen bond formed between the carbonyl oxygen at C-15 of physalins and L186 of AgrA functions as an anchor, sustaining the interaction between the carbonyl oxygen at C-1 of physalins and N201 of AgrA. Taking these findings together, it is suggested that physalins inhibit the interaction of AgrA with the *agr* promoters by stable binding to the DNA binding site of AgrA, resulting in a suppression in Agr-QS function of *S. aureus*.

P2-001/DP1-01-09

国内流通食品における *Listeria monocytogenes* 汚染状況

○岡田 由美子¹, 都丸 亜希子¹, 西田 智子¹, 山本 詩織^{1,2}, 下島 優香子³ (1)国立衛研・食管, ²鎌倉女子大・家政・管理栄養, ³東洋大・食環境科学・食環境科学)

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan

○Yumiko Okada¹, Akiko Tomaru¹, Tomoko Nishida¹, Shiori Yamamoto^{1,2}, Yukako Shimojima³ (1)Div. Biomed. Food Res., Nat. Inst. Health Sci., ²Dept. Nutr. Diet., Kamakura Women's Univ., ³Dept. Food Life Sci., F. Food Nutr. Sci., Toyo Univ.)

【背景・目的】*Listeria monocytogenes* (リステリア)は主に食品を介してヒトに髄膜炎や敗血症、流死産を引き起こす。国内リステリア症例数は不明だが、院内感染データベース JANIS を用いた調査では、2016年の菌血症患者は220例あり、2011年の98例から大幅に増加した(Kusama)。国内症例の原因食品はほぼ同定されていないが、欧米では患者及び食品由来株のゲノム解析により集団事例及びその原因食品の同定を実施し、冷凍野菜やバックサラダ等、野菜類を原因とする事例が数多く検出されている。一方、国内で流通している野菜加工品の本菌汚染実態は不明な点が多い。本研究では、国内で流通している冷凍野菜及び野菜の浅漬けにおけるリステリアの汚染実態を調べた。【方法】2023~2024年に購入した冷凍野菜46検体(枝豆21、コーン12、ミックスベジタブル9、アボカド4)及び浅漬け16検体(白菜5、ナス3、大根・カブ3、ミックス4、キャベツ1)について、ISO 11290-1:2017(定性法)及び2(定量法)に従ってリステリアを分離した。【結果・考察】冷凍野菜46検体中4検体(8.7%)がリステリア陽性であり、全て枝豆であった。他の冷凍野菜類はリステリア陰性であったが、2020~2021年に行った先行研究では冷凍コーンは陽性率8.7%で(2023年本学会)、汚染率の低下が認められた。浅漬け16検体中3検体(18.8%)が陽性であり、2検体がナスの浅漬け、1検体は白菜及び小松菜等のミックスであった。枝豆4検体とナス浅漬け1検体の汚染レベルは定量法の下限値(10 cfu/g)未滿、ナス浅漬け及びミックス漬け各1検体では20 cfu/gであった。今後、分離菌株の分子疫学的解析により国内患者分離株等との比較を行う。

P2-002/DP1-01-10

Differential angiogenic properties and phylogenetic characteristics of *Bartonella henselae* strains

近藤 由佳¹, 鈴木 匡弘¹, 佐藤 真伍², 丸山 総一², 土井 洋平^{1,3}, ○塚本 健太郎⁴ (1)藤田医大・医・微生物, ²日大・生物資源・獣医公衆衛生, ³藤田医大・医・感染症, ⁴阪大・微研・人獣共通細菌)

Yuka Kondo¹, Masahiro Suzuki¹, Shingo Sato², Soichi Maruyama², Yohei Doi^{1,3}, ○Kentaro Tsukamoto⁴ (1)Dept. Microbiol., Fujita Health Univ. Sch. Med., ²Dept. Vet. Med., Coll. Bioresource Sci., Nihon Univ., ³Dept. Infect. Dis., Fujita Health Univ. Sch. Med., ⁴Dept. Bact. Zoonoses, RIMD, Osaka Univ.)

Bartonella henselae, the etiological agent of cat-scratch disease, causes bacillary angiomatosis in immunocompromised individuals by inducing angiogenesis. Previously, we identified BafA as a determinant responsible for *Bartonella*-induced angiogenesis. In this study, we explored the correlation between the phylogenetic clades of *B. henselae* strains and variations in their proliferative capacity against vascular endothelial cells (ECs).

Thirteen *B. henselae* strains were used to inoculate ECs. The strains induced differential proliferation of ECs. All the strains possessed the *bafA* gene, and the encoded BafA proteins were categorized into two variants based on their amino acid sequences, both of which exhibited comparable dose-dependent proliferation of ECs. Distinct amounts of BafA were detected within the culture supernatants of individual strains, eliciting variable proliferative effects on ECs. Based on whole genome sequencing of all strains, clusters identified through core genome SNP analysis fully correlated with the variant type of BafA in each strain.

In conclusion, *B. henselae* strains showed distinct proliferative potential against ECs. Their heterogeneous ability to proliferate ECs, despite possessing identical BafA sequences, implies the existence of yet unidentified mechanisms in *Bartonella*-induced angiogenesis.

P2-003/DP1-01-11

Mannheimia haemolytica の莢膜合成遺伝子群の多様性に基づく血清型別 PCR 法の開発

○井口 純¹, 奥野 未来², 小椋 義俊², 星野尾 歌織³, 上野 勇一³, 高松 大輔³ (1宮崎大・農・畜産草地, 2久留米大・医・感染, 3農研機構・動衛研)

Development of PCR-based serotyping method for *Mannheimia haemolytica*

○Atsushi Iguchi¹, Miki Okuno², Yoshitoshi Ogura², Kaori Hoshino³, Yuichi Kuno³, Daisuke Takamatsu³ (1Fac. Agr., Miyazaki Univ., 2Dept. Infect. Med., Kuremo Univ. Sch. Med., 3Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO)

Mannheimia haemolytica (Mh: マンヘミア・ヘモリチカ, グラム陰性桿菌)はウシの上部気道の常在菌であるが, 長距離輸送や飼養環境によるストレス感作などに伴って増殖し, 牛呼吸器症候群 (BRDC: Bovine Respiratory Disease Complex)の原因となる。BRDC 発症牛の一部は死亡することがあるため, その予防や対策が必要となる。Mh は莢膜に多様性があり, これまでに 12 種類の血清型 (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16, A17) が認められている。流行型である A1, A2, A6 に対する PCR 検査法は開発されているが, その他の型に対する検査法は確立されておらず, それらの分布や特徴については不明な点が多い。本研究ではすべての血清型株のゲノム配列 (2.4~2.6 Mbp) を用いて, 系統的關係と莢膜合成遺伝子群の整理を行った。さらに, それぞれの莢膜合成遺伝子群上に血清型を特異的に判定できる PCR プライマーを設計し, すべての血清型を効率的に判定できる 2 種類のマルチプレックス PCR キットを開発した。現在, Mh 野生株を用いた実用評価を行っており, 本会ではその成果も踏まえて報告したい。

P2-004/DP1-01-12

A novel *Filobacterium* sp. detected in deposited 16S rRNA metagenome data of rhesus macaque

○池 郁生 (理研BRC)

○Fumio Ike (RIKEN BRC)

Archive of metagenomic 16S rRNA genes read by next-generation sequencing (NGS) is a wealth of unidentified bacterial resources. *Filobacterium* spp., formerly known as CAR bacillus, is a Gram-stain-negative filamentous rod that colonizes various animals' ciliated respiratory epithelium. Here, we report reanalyses of the deposited metagenomic data of rhesus macaques' bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the detection of *Filobacterium* sp. by using human-originated 16S rRNA sequences of *Filobacterium* sp. as the queries. **Materials and methods:** The deposited PRJNA800766 SRA data from healthy rhesus macaques was filtered to 16S rRNA gene amplicons and BALF specimens. Then, NCBI BLASTn was used to pick out sequences similar to the human-originated *Filobacterium* sp. 16S rRNA sequence (JQ745859 listed in SILVA SSU r138.1) from each Run data. **Results and Discussion:** BLASTn search of 68 BALF Run data of rhesus macaques against JQ745859 revealed that 15 Run data (15/68) had sequences higher than 97% identity for both paired-ends. In one of these Run data, all its top 500 significant alignments exhibited more than 97.0% identity to JQ745859. Similar results were obtained by using other human-originated rRNA sequences as queries. These results suggest that a novel *Filobacterium* sp. similar to its human type constitutes a part of rhesus macaque's normal lower respiratory microbiome.

P2-005/DP1-01-13

分離元の異なるバンコマイシン耐性腸球菌株間の vanB 遺伝子を含む Tn1549/5382 領域の塩基配列の比較

○中山 孝子, 菊池 俊, 蜂巢 友嗣, 安藤 直史, 中村 正樹, 植田 菜月, 岸澤 充 (千葉県衛研・細菌)

Comparison of Tn1549/5382 containing vanB gene among VRE strains from different sources

○Takako Nakayama, Takashi Kikuchi, Yushi Hachisu, Naoshi Ando, Masaki Nakamura, Natsuki Ueda, Mitsuru Kishizawa (Div. Bact., Chiba Pref. Inst. Pub. Health)

【背景】国内で問題になる主なバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は VanA 型, VanB 型だが Mobile genetic elements (MGEs) 上にバンコマイシン耐性遺伝子が存在し菌株間, 菌種間をまたいで遺伝子を伝達することがわかっている。2022 年に千葉県内の一部地域の患者より分離された VRE 47 株は全て vanB 遺伝子保有の *Enterococcus faecium* と同定された。これらの菌株の MGEs である約 34kbp の Tn1549/5382 を解析し, PFGE の結果と比較したので報告する。【方法】リファレンス配列を基に Tn1549/5382 を構成する orf13 及びインテグラーゼ遺伝子上にプライマーを設計した。2022 年に千葉県で分離された VanB 型 VRE 3 株から抽出した DNA を鋳型とし, vanB 遺伝子を含む Tn1549/5382 領域を増幅した。分離株の内訳は PFGE で一致した 2 株及び異なる由来を示した 1 株を用いた。PCR 増幅産物を精製し, MiSeq を用いて塩基配列を獲得した。得られた塩基配列のデータをリファレンス配列 (GenBank Accession No. AF192329, KR066794, LRAQ01000090) と比較した。【結果と考察】解析に使用した 3 株のうち PFGE で同一由来株であった 2 株は Tn1549/5382 の塩基配列が同一であった。一方 PFGE で異なる由来を示した 1 株は他の 2 株の塩基配列と比較して 1 つの SNV が存在し, さらに 1 つの IS が挿入されていた。SNV は vanB 遺伝子上に存在しトレオニンがセリンへ変異していた。挿入されていた IS は韓国で初めて報告され国内でも検出報告のある *ISEnfa3* であり, vanX 遺伝子より下流に挿入されていた。一方, リファレンス配列と千葉県分離株の Tn1549/5382 を比較すると, 千葉県の 3 株は非常に類似しており, 関連が疑われる結果となった。

P2-006/DP1-01-14

国産食肉および家畜から分離した薬剤耐性大腸菌の系統解析

○河原 隆二¹, 山口 貴弘¹, 若林 友騎¹, 松本 悠希², 元岡 大祐², 中村 昇太², 中山 達哉³, 山本 容正⁴, 川津 健太郎¹ (1大安研・微・細菌課, 2大阪大・微研・感染症メタゲノム, 3広大・統合生命科学, 4岐大・連合創薬医療情報)

Phylogenetic analysis of drug-resistant *Escherichia coli* isolated from domestic meat and livestock

○Ryuji Kawahara¹, Takahiro Yamaguchi¹, Yuki Wakabayashi¹, Yuki Matsumoto², Daisuke Motooka², Shota Nakamura², Tatsuya Nakayama³, Yoshimasa Yamamoto⁴, Kentaro Kawatsu¹ (1Div. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health, 2Dept. Infect. Metagenomics, RIMD, Osaka Univ., 3Integ. Sci. Life, Hiroshima Univ., 4Drug Discov. Med. Info. Sci., Gifu Univ.)

「薬剤耐性菌 (ARB)」は, ヒトの感染症の難治化や畜水産業の経済被害等を引き起こす世界規模の問題であり, ヒト, 環境, 畜産の各分野における多角的な種々の取り組みが求められている。畜産においても抗菌薬が大量に使用され, ARB が食肉や家畜から検出されており, さらにヒト由来 ARB と共通の薬剤耐性遺伝子が検出されることも多いことから, 畜産-ヒト間でなんらかの伝播が生じている可能性が指摘されている。そこで本研究では, 2020-2022 年に国内の食肉および家畜から分離した ESBL や AmpC 等を保有する薬剤耐性大腸菌 287 株から得た全ゲノムデータを用いて系統解析を実施し, ヒト病原性大腸菌との関連性について検討した。解析には, DNBSEQ-G400 (MGI 社) で得た各菌株の全ゲノムデータから Unicycler により構築したドラフトゲノムを用いた。各菌株のゲノムを 104 株の代表的な大腸菌ゲノム (Microbial Genomics 2023;9:000959) とともに pmlst にてデータベース化し, core genome MLST に基づいた系統樹解析を行なった。菌株の多くが牛をはじめとする家畜に関連した大腸菌に分類されたが, 主に鶏肉および鶏から分離された約 27% の菌株がヒトと関連するとされる系統に分類され, 主に ST69, ST117, ST362 で構成されていた。これらの系統の大腸菌にはヒトへの病原性があると報告されているものが含まれており, 食肉等を介してヒトへ薬剤耐性の拡散や健康上のリスクとなりうることを示唆された。

P2-007/DP1-01-15

***Streptococcus mutans* コラーゲン結合アドヘジン *cnm* の遺伝子多様性とその結合能の解析**

○米澤 英雄, 菊池 有一郎, 国分 栄仁, 石原 和幸 (東京歯大・微生物)

Genetic diversity and binding ability of *Streptococcus mutans* collagen binding adhesin Cnm

○Hideo Yonezawa, Yuichiro Kikuchi, Eitoyo Kokubu, Kazuyuki Ishihara (Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Col.)

【目的】 *Streptococcus mutans* はう蝕の主要な病原体であることが知られているが、近年感染性心内膜炎、特に脳出血を引き起こす原因細菌であることが注目されている。この発症に関わる因子としてコラーゲン結合アドヘジン (Cnm) が挙げられる。Cnm を保有する *S. mutans* は20%程度といわれ、こうした *S. mutans* を口腔内に保菌すると脳出血などの全身疾患のリスクとなることが明らかとされた。今回研究室保有 *S. mutans* Cnm 保有株において遺伝子多様性と、遺伝子配列の違いがコラーゲン結合能に影響を及ぼしているかについて検討した。【方法】 *S. mutans* 46 株の Cnm 陽性株の *cnm* とその上流領域の遺伝子配列を決定した。コラーゲン結合能は、I 型コラーゲンを固相化した plate に生菌を作用させることで検討を行った。Cnm 領域内の違いが認められる配列は、遺伝子配列を置換した変異株を作製してそのコラーゲン結合能への影響について検討した。【結果・考察】 Cnm 陽性 46 株のうち 2 株でコラーゲンへの結合を示さない株が認められた。これらは *cnm* 内の DNA 挿入および欠失によるフレームシフトが原因であった。また変異を解消した変異株ではコラーゲン結合能が回復したことから、制御因子等他の因子は関与していないことが推測された。Cnm 内のコラーゲン結合ドメイン 遺伝子配列は、2 つのクラスターに分けることが出来たものの、その結合能、リピート配列の量には差が認められなかった。一方で血清型の比較および *cnm* 上流領域の遺伝子配列の解析から、クラスター 2 に属する株はゲノム安定性が保持されている可能性が示唆された。

P2-008/DP1-01-16

Development of multiplex PCR for virulence-associated genes in *Bacillus cereus sensu lato*

○岡本 陽 (愛教大・養教)

○Akira Okamoto (Sch. Health Sciences, Aichi Univ. Edu.)

Background: Several species belonging to the genus *Bacillus* are pathogens to organisms, including humans. Although microbiological, biochemical, or molecular methods have been developed, the phylogenetic classification results of pathogenic isolates may sometimes be misidentified. Several genes have been noted as virulence factors of *B. cereus*, but there is no consensus on a toxin that makes the isolate harmful. In order to assess the pathogenicity of isolates, it is necessary to know what genetic patterns are possessed. We developed a multiplex PCR to five genes, *hbl*, *nhe*, *panC*, *cytK*, and *ces*, to quickly evaluate pathogenicity.

Methods: Primer pairs for PCR targeting each toxin gene were prepared to detect the *hbl*, *panC*, and *cytK* inheritance concerning previous studies. In addition, considering the interference of mobility in electrophoresis and the Tm value, we designed primer pairs to detect the *nheC* and the *ces* genes. Strains already known to harbor these genes were used as a positive control of the multiplex PCR method.

Results: It was confirmed that the gene patterns were detected by electrophoresis using each strain as a template. Based on this study, we will detect the gene patterns of *Bacillus* sp. isolated from various environments, including clinical settings, to efficiently screen environments inhabited by potential pathogens and conduct potential risk assessments.

P2-009/DP1-07-06

国内ウシおよびヒト由来腸管出血性大腸菌の全ゲノム配列および志賀毒素ファージの比較解析○李 謙一¹, 伊藤田 淳¹, 泉谷 秀昌¹, 名塚 岳宏², 楠本 正博³, 秋庭 正人⁴, 菅原 庸⁵, 菅井 基行⁵, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細1, ²さいたま市・食肉衛生検査, ³農研機構・動衛研, ⁴酪農大・獣医細菌, ⁵感染研・AMR)**Comparative genomics of whole genome and Shiga toxin phase of EHEC from bovine and human**○Ken-ichi Lee¹, Sunao Iyoda¹, Hidemasa Izumiya¹, Takehiro Nazuka², Masahiro Kusumoto³, Masato Akiba⁴, Yo Sugawara⁵, Motoyuki Sugai⁵, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Meat Hygiene Inspect., Saitama City, ³Natl. Inst. Animal Health, NARO, ⁴Vet. Bacteriol., Rakuno Univ., ⁵AMR Center, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、国内で年間3,000名以上の感染者が継続して報告されている。EHEC の自然宿主はウシなどの反芻類であり、ウシなどの反芻類からヒトにいたるまでの伝播経路を明確にすることが EHEC 感染症の制御のためには重要である。また、EHEC の主な病原性因子である志賀毒素 (Stx) は染色体上のプロファージ領域にコードされており、水平伝播するとされている。そこで、EHEC および Stx ファージの伝播動態の理解のために、国内ウシおよびヒト由来株の志賀毒素 (Stx) ファージの塩基配列を決定し、比較解析を行った。【材料および方法】2000年から2020年に全国で分離されたウシ由来 EHEC 計 185 株 (O113, O157, O26 等) について、HiSeqX (Illumina) で WGS を解読した。感染研・細菌第一部で WGS 解読を行った約 10,000 株のヒト由来から、10 か所以内の SNP を有する株を抽出した。また一部の株 (22 株) については、MinION (Oxford Nanopore) によって Stx ファージの全長配列を決定し、ウシおよびヒト由来株間での比較を行った。【結果および考察】WGS 解析を行ったウシ由来株のうち、18 株 (O157, 15 株; O103, 2 株; O26, 1 株) で、ヒト由来株と 10 か所以内の SNP となる株が見出された。Stx ファージ配列の比較からは、近縁な Stx ファージ (average nucleotide identity > 99%) が OX21:H19 および OUT:H2 間、および O111:H8 および O156:H25 間で見出された。これらの菌株は系統的に大きく離れており、Stx ファージが系統を越えて水平伝播していることが示唆された。これらの結果から、ウシはヒトに感染する EHEC クロームを保有するとともに Stx ファージのリザーバーでもある可能性が示された。

P2-010/DP1-07-07

Epidemiological shifts in and impact of COVID-19 on streptococcal toxic shock syndrome○池辺 忠義¹, 山口 貴弘², 奥野 ルミ³, 大塚 仁⁴, 溝腰 朗人⁵, 池田 佳歩⁵, 渡邊 奈々子⁵, 伊達 佳美⁵, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細1, ²大安研・微生物部, ³都健安研・微生物部, ⁴山口県環保センター・保健科学部, ⁵溶血レンサ球菌レファレンスセンター)○Tadayoshi Ikebe¹, Takahiro Yamaguchi², Rumi Okuno³, Hitoshi Otsuka⁴, Akito Mizokoshi⁵, Kaho Ikeda⁵, Nanako Watanabe⁵, Yoshimi Date⁵, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept. Bacterol. I, NIID, ²Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, ³Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, ⁴Dept. Pub. Health Sci., Yamaguchi Pref. Inst. Pub. Health & Env., ⁵The Working Group for Beta-Hemolytic Streptococci in Japan)

Streptococcal toxic shock syndrome (STSS) is caused by group A *Streptococcus* (GAS; *Streptococcus pyogenes*) strains. In Japan, the number of STSS cases has decreased during COVID-19 pandemic; however, the underlying reason remains unclear. Moreover, information on distribution and prevalence of specific *emm* types in STSS cases is scarce. Hence, we investigated the reason for the decreased number of STSS cases in Japan.

We genotyped *emm* of 526 GAS isolates obtained from 526 patients with STSS between 2019 and 2022. The distributions of *emm* types in each year were compared. The *emm1* type was predominant, with the highest proportion in 2019, which decreased after 2020 following the onset of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Strains isolated during the pandemic correlated with strains associated with skin infection, whereas those isolated during the pre-pandemic period correlated with strains associated with both throat and skin infections. The decrease in the annual number of STSS cases during the COVID-19 pandemic could be due to a decreased proportion of strains associated with pharyngeal infections.

Potential associations between pandemic and STSS numbers with respect to public health measures, such as wearing masks and changes in healthcare-seeking behavior, may have affected the number of GAS-induced infections.

P2-011/DP1-07-08

鹿児島県内土壌中の破傷風菌の分布調査

○大岡 唯祐¹, 志多田 千恵², 山本 隆敏², 坂本 智代美², 堀場 千尋³, 黒田 誠³, 西順一郎¹, 高橋 元秀² (¹鹿児島大・医歯学・微生物, ²熊本保健科学大・生物毒素・抗毒素共同研究講座, ³国立感染症・病原体ゲノム解析研究センター)

Characterization of *Clostridium tetani* detected from the soil in Kagoshima prefecture

○Tadasuke Ooka¹, Chie Shitada², Takatoshi Yamamoto², Chiyomi Sakamoto², Chihiro Horiba³, Makoto Kuroda³, Junichiro Nishi¹, Motohide Takahashi² (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., ²Tox. Biol. Res. Lab., Kumamoto Heal. Sci. Univ., ³Pathogen Genomics Center, NIID)

【背景・目的】全国の破傷風患者は年間100例以上の報告がある。破傷風トキソイドの定期予防接種が開始された1968年以前に生まれた人は、ワクチン接種の機会を逸し、中和抗体価も低い。そのため50歳以上の患者報告件数が特に多く、全体の90%以上を占めている。我々は2023年に報告した熊本県内土壌中の破傷風菌分布調査で感染リスクを科学的に証明し、ゲノム多様性や毒素産生性が異なる菌株を特定、薬剤耐性菌の存在も明らかにした。今回は隣県の鹿児島県内の土壌から破傷風菌分離を試み、分離菌の遺伝的多様性や過去に報告された菌の性状と比較検討した。

【方法】県内の土壌10か所を任意に選び、1か所につき地表面と10cm下層の2検体を採取した。クックドミート培地に添加後、80°C、60°Cの処理後および非加熱の条件で37°C培養した。分離同定方法は、1)細菌学的検査：各培養菌液は血液寒天培地に接種し37°Cで嫌気培養後、培地表面を遊走した先端をグラム染色し、特徴的なフィラメント状の長桿菌を確認した。2)遺伝学的検査：PCRによる破傷風毒素遺伝子を確認した。3)生化学的検査：Rapid ID 32A Api キットを用いて菌の同定を実施した。

【結果・考察】本土、奄美大島それぞれ5ヶ所から16株(3ヶ所)と11株(3ヶ所)を分離同定した。全体の陽性率は60.0%、分離率は45.0%であり、熊本県の調査に比べて両者ともやや低い値であった(陽性率71.7%、分離率57.1%)。分離率の比較では、本土と奄美大島で検出率に大きな差はなかった。分離した菌株のゲノム解析と奄美大島以外の諸島の土壌中の破傷風菌分布調査は継続中である。

P2-012/DP1-07-09

Genetic analysis of coagulase-negative staphylococci colonizing healthy adults

○廣瀬 弥奈¹, Meiji Soe Aung², 小林 宣道² (¹北医療大・歯・小児歯, ²札幌大・医・衛生)

○Mina Hirose¹, Meiji Soe Aung², Nobumichi Kobayashi² (¹Dept. Ped. Dent., Div. Oral Growth and Development, Sch. Dent., Health Sciences Univ. Hokkaido, ²Dept. Hygiene, Sch. Med. Sapporo Med. Univ.)

Objective: Antimicrobial resistance and pathogenic traits of coagulase-negative staphylococci (CoNS) colonizing healthy adults were analyzed to understand their potential risk of infection.

Methods: Saliva and hand swabs were collected from 444 university students who consented, and cultured on selective agar plate. Bacterial species were identified by 16S rRNA gene sequence, and genes associated with virulence of *S. capitis* were analyzed by PCR and sequencing. Antimicrobial susceptibility was measured by broth microdilution test.

Results: CoNS were recovered from 158 subjects (221 isolates), and classified into 18 species, with *S. capitis*/*S. caprae* being the most common (39%), followed by *S. warneri* (19%), *S. epidermidis* (16%). *mecA* was detected in 11 isolates that were mostly *S. epidermidis*, showing multiple drug resistance. Arginine catabolic mobile element (ACME) was detected in only *S. capitis* and *S. epidermidis* in more than half of isolates. Among *S. capitis*, any virulence factors associated with NRCS-A clone (*nsr*, *ebh*, *tarJ*) were found in 69% (59/86), with 5 isolates harboring all the three genes. An *S. capitis* isolate with *mecA* had *ebh* and *tarJ*, and showed multiple drug resistance.

Conclusion: ACME and the virulence traits of the NRCS-A clone were revealed to be prevalent among *S. capitis* colonizing healthy individuals.

P2-013/DP1-07-02

Genomic characteristics and drug susceptibility of *Helicobacter suis* from humans, monkeys, and pigs

○林原 絵美子¹, 鈴木 仁人², 青木 沙恵¹, 松井 英則¹, 柴山 恵吾³, 見理 剛¹ (¹感染研・細菌第二部, ²感染研・薬剤耐性研究センター, ³名古屋大・医・細菌学)

○Emiko Rimbara¹, Masato Suzuki², Sae Aoki¹, Hidenori Matsui¹, Keigo Shibayama³, Tsuyoshi Kenri¹ (¹Dept. Bacteriol. II, Nat. Inst. Infect. Dis., ²Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis., ³Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

Helicobacter suis infecting pigs and monkeys is known to infect human stomach and cause gastric diseases. In this study, genomic characteristics and drug resistance of difficult-to-culture *H. suis* isolates from patients were compared with those of isolates from monkeys and pigs. Whole genome sequences of 49 human and pig isolates were determined so far; 13 draft genome sequences of pigs and monkeys isolates obtained from NCBI were also included in the analysis. Phylogenetic analysis showed all human isolates belonged to the clade as the pig isolates, that were genetically distinct from the monkey isolates. Furthermore, the genetic background of human isolates tended to be related to the graphical region of the patients' residence, though further analysis is needed to confirm this trend. Antimicrobial MICs of human isolates were similar to pig isolates, although one human isolate showed a high MIC for clarithromycin and harbored A to G mutation in 23S rRNA position, known to contribute to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. The results obtained in this study will provide valuable information for understanding the transmission route as well as the eradication strategies of *H. suis* infection in human.

Non-member collaborators: Kengo Tokunaga, Toshihisa Tsukadaira, Akira Takeda, Sohachi Nanjo, Naoko Kitazawa, Daisuke Chinda, Makoto Sasaki, Katsuhiko Mabe

P2-014/DP1-07-10

Characteristics of Staphylococcaceae in Retail Meat Products in Hokkaido: A One Health Perspective

○漆原 範子¹, アウン メイジソウ¹, 川口谷 充代¹, 大橋 伸英^{1,2}, 小林 宣道¹ (¹札幌医科大学・医・衛生, ²札幌医科大学・医・口腔外科)

○Noriko Urushibara¹, Meiji Soe Aung¹, Mitsuyo Kawaguchiya¹, Nobuhide Ohashi^{1,2}, Nobumichi Kobayashi¹ (¹Dept. Hygiene, Sch. Med., Sapporo Med. Univ., ²Dept. Oral Surgery, Sch. Med., Sapporo Med. Univ.)

This study investigates bacteria population in retail meat products and potential public health risks associated with food consumption, focusing on grained chicken and pork from retail outlets in Sapporo City. A total of 207 colonies (133 chicken, 74 pork) were recovered from Mannitol salt agar plate. Sequence analysis of the 16S rRNA V1-V4 region identified 6 *S. aureus*, 189 Non-*aureus* staphylococci and mammaliococci, 5 *Macroccoccus*, and other miscellaneous strains (n=7). The most prevalent species group¹⁾ in chicken was Simulans (40/133), while Saprophyticus group dominated in pork (28/74). Antibiotic resistance profiles of the 200 Staphylococcaceae, except for seven classified as 'others,' were distinct from those found in healthcare settings. Anti-Fosfomycin resistance was the most prevalent (n=25, 12.5%), followed by anti-Erythromycin resistance (n=13, 6.5%). Resistance rates against other antimicrobials were below 5%. Six *S. aureus* isolates were identified in chicken products, belonging to the avian-associated lineage: ST5-t3478 (n=3), ST5-t242 (n=2), single locus variant of ST15-t084 (n=1). The three ST5-t3478 isolates, additionally, harbored chicken-specific mobile genetic elements. Variation in microbial composition and antibiotic resistance profiles suggests no direct bacterial transmission between retail meat products and humans.

¹⁾Lamers RP et al, *BMC Evol Biol*, 2012

P2-015/DP1-07-11

埼玉県内の下水における ESBL 産生大腸菌および MRSA の分離状況

○村井 美代¹, 村山 浩基¹, 滝野 景¹, 菅原 庸², 于連升², 鹿山 鎮男², 久恒 順三², 岸井 共志¹ (1)埼玉県立大院・保健医療福祉, 2)感染研・AMR 研究センター)

Survey of ESBL-producing *Escherichia coli* and MRSA from wastewater in Saitama, Japan

○Miyo Murai¹, Hiroki Murayama¹, Hikari Takino¹, Yo Sugawara², Liansheng Yu², Shizuo Kayama², Junzo Hisatsune², Kozue Kishii¹ (1)Dept. Health Soc. Serv., Grad. Sch. Saitama Pref. Univ., 2)AMR-RC, NIID)

【緒言】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や基質拡張型 β ラクターマーゼ産生大腸菌 (ESBL-Ec) の臨床分離率は、依然高い割合で推移している。その一因に、薬剤耐性菌の保菌が市中の健常者の中での広まりがある。我々は健康人における薬剤耐性細菌の保菌状況の一端を探るため、下水流入水中の細菌に占める薬剤耐性菌の割合を、ESBL-Ec と MRSA を指標に継続的に調査している。今回は 2023 年の 8 月末から 9 月にかけて、埼玉県内の 4 ヶ所の下水処理場から採取した下水流入水における薬剤耐性菌分離率の比較を行った。併せて、分離された薬剤耐性細菌 clone の分布に地域差があるのか検討する。【方法】下水流入水を、大腸菌及び黄色ブドウ球菌の選択培地 TBX 培地および X-SA 培地に接種し 37°C で一晚培養した。増殖した大腸菌および黄色ブドウ球菌を示す青色コロニー 100 個程度を、CTX 5µg/ml 添加 TBX または CFX 含有 X-MRSA に穿刺し、翌日増殖した菌株を ESBL-Ec または MRSA とした。得られた菌株は同定の後、PCR で ESBL 型別または *mecA* の保有と SCC*mec* 型、TSST-1、PVL 等の遺伝子を確認した。現在全ゲノム配列決定中である。【結果と考察】下水中の菌濃度は、大腸菌が平均 5.7×10⁴ CFU/ml、黄色ブドウ球菌が平均 1.0×10² CFU/ml で、両菌とも最大で 6 倍差の流域人口による違いは見られなかった。ESBL-Ec 率は平均 3.82% で処理場間に差はなく、MRSA 率は平均 13.4% だったが、採取施設により 3.8~35.2% とばらついた。ESBL 遺伝子型は CTX-M-9G が多数を占めたが、1カ所では CTX-M-1G の割合が半数を占めた。MRSA で TSST-1 や PVL の保有株は、処理人口の多い施設に集中する傾向があった。全ゲノム配列が得られ次第、詳細な clonality について解析する。

P2-016/DP1-07-16

Prevalence and characteristics of *Escherichia fergusonii* isolated from farm animals in Japan

○桃木 杏奈¹, 玉村 雪乃¹, 新井 暢夫¹, 岩田 剛敏¹, 渡部 綾子¹, 楠本 正博^{1,2} (1)農研機構・動衛研, 2)大阪公立大院・獣医)

○Anna Momoki¹, Yukino Tamamura-Andoh¹, Nobuo Arai¹, Taketoshi lwata¹, Ayako Watanabe-Yanai¹, Masahiro Kusumoto^{1,2} (1)Natl. Inst. Anim. Health, NARO., 2)Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Escherichia fergusonii was proposed as a new bacterial species in 1985 and has been isolated from cases of human and animal infections. The multidrug-resistant strains with plasmids similar to those found in *E. coli* and *Salmonella enterica* have also been reported, and there is concern about the potential health hazards to humans and animals caused by *E. fergusonii*. In this study, we collected 3,998 fecal samples obtained from healthy farm animals (1,592, 1,843, and 563 from cattle, swine, and chicken, respectively) in Japan and analyzed a total of 1,213 *E. fergusonii* isolates for virulence genes and antimicrobial susceptibilities. The prevalence of *E. fergusonii* in cattle, swine, and chicken were 16.9% (269/1,592), 36.8% (679/1,843), and 41.0% (231/563), respectively. The gene encoding EAST1 was found in one (0.4%) cattle, 15 (2.2%) swine, and 12 (4.7%) chicken isolates, suggesting that virulence factor-producing *E. fergusonii* is potentially present in farm animals. *E. fergusonii* isolates were more resistant to ampicillin, streptomycin, and tetracycline (the resistance rates were 6.3%-58.9%, 8.1%-54.5%, and 17.6%-55.7%, respectively) than to other antimicrobial agents in each animal, and the distribution of *E. fergusonii* resistance was similar to that of *E. coli* isolated from the same fecal samples.

P2-017/DP1-07-12

新興下痢症原因菌 *Escherichia albertii* における道内ヒト由来株と野鳥由来株の比較

○佐藤 凛¹, 伊藤 政彦², 柝淵 貴洋³, 櫻井 由絵⁴, 池田 徹也¹ (1)北海道立衛生研究所・細菌, 2)札幌臨床検査センター, 3)北海道社会事業協会富良野病院, 4)道総研畜試)

Comparison of human- and bird-derived strains of *Escherichia albertii* in Hokkaido

○Rin Satoh¹, Masahiko Ito², Takahiro Kinebuchi³, Yosie Sakurai⁴, Tetsuya Ikeda¹ (1)Div. Bacterial., Hokkaido Inst. Public Health, 2)Sapporo Clinical Laboratory Inc., 3)Furano Hosp., Hokkaido Institutional Society, 4)Natl. Inst. of Animal Industry., Hokkaido Research Organization)

【背景】*Escherichia albertii* は、2003 年に *Escherichia* 属の新菌種として発表された比較的新しい腸管病原菌である。*E. albertii* は出血性大腸炎など重篤な症状を引き起こす可能性が指摘されており、公衆衛生上、重要視されつつある。本菌はべん毛が無く非運動性とされてきたが、低浸透圧下ではべん毛を産生し運動性を示し、腸管上皮細胞内へ侵入するようになることが報告されている。また、鳥類は自然界での重要な保菌動物と考えられており、これまでも野鳥からの分離報告があったが、ヒト由来株との比較はほとんどされていない。そこで本研究では、北海道内で分離されたヒト由来及び野鳥由来 *E. albertii* を対象とし、株の由来による運動性の違いを解析することを目的とした。【方法】北海道内で 2008 年 8 月から 2024 年 1 月にかけて分離された *E. albertii* 220 株 (ヒト由来株 131 株、野鳥由来株 89 株) を調査に供した。供試菌株を 10 倍希釈 TSB に接種して 20°C で 18~24 時間、深底シャーレで静置培養した後、顕微鏡で生菌観察を行い、運動性を確認した。また、一部の菌株については SNVs (一塩基多型) 解析を行うことで、分離株同士の関連性についても調査した。【結果と考察】ヒト由来株は他の細菌感染症と同様に夏季 (7~8 月) の分離が多い傾向にあった。ヒト由来株の運動性陽性率 (67.9%) は野鳥由来株の運動性陽性率 (39.3%) より有意に高かった (χ^2 検定, $p < 0.01$)。SNVs 解析では、4 つのクラスターに分けられた。いずれのクラスターにも野鳥株とヒト株が混在し、運動性株と非運動性株も混在しており、特定の系統にだけ非運動性株が見られるわけではないことが明らかになった。

P2-018/DP1-07-17

尿路感染症による血流感染から分離された ESBL 産性大腸菌の遺伝学的性質

○田中 真由子¹, 須田 智也¹, 近藤 恒平², Aa Haeruman Azam³, Minh Le Nhat², 八代 龍⁴, 丹治 保典⁵, 氣賀 恒太郎³, 松田 剛明^{1,5}, 花輪 智子¹ (杏林大・医・総合医療学, 2)国立感染研・AMR センター, 3)国立感染研・治ワク, 4)国立感染研・ハンセン病研究センター, 5)杏林大・医・救急医学)

Genetic Characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections

○Mayuko Tanaka¹, Tomoya Suda¹, Kohei Kondo², Aa Haeruman Azam³, Minh Le Nhat², Ryu Yashiro⁴, Yasunori Tanji⁵, Kotaro Kiga³, Takeaki Matsuda^{1,5}, Tomoko Hanawa¹ (1)Dept. Gen. Med., Kyorin Univ. Sch. Med., 2)AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., 3)Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 4)Leprosy Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., 5)Dept. Traum. Crit. Care Med., Kyorin Univ. Sch. Med.)

【背景・目的】基質拡張型 β-ラクタマーゼ産性大腸菌 (ESBL-Ec) の臨床分離株の解析は、AMR 対策に重要となる。本研究では尿路感染症による血流感染から分離された ESBL-Ec の遺伝学的性質を明らかにすることを目的とした。【材料・方法】ESBL-Ec は、2017-22 年に杏林大学医学部付属病院救急科および救急総合診療科を受診した尿路感染症の患者血液由来の 46 株を用いた。ST131 の検出には Cica Geneus *E. coli* POT KIT (関東化学) を用い、Phylogroup は Clermont らの方法 (Clermont et al, 2019) で決定した。MLST、血清型、fimH 型はゲノム情報より解析した。また、病原性関連遺伝子 (VAGs) は、PCR 法と in silico 解析で検出した。敗血症の判定はカルテ情報を行った。【結果・考察】今回用いた 46 株の phylogroup 内訳は、B2 が 43 株、D が 3 株であった。ST131 は 38 株検出され、non-ST131 の株については ST1193, 38 が各 3 株、ST95, 73 が各 1 株であった。ST131 からランダムに抽出した 15 株のうち 11 株は、世界的に流行している ST131-B2-O25:H4-fimH30 であった。PCR で検出した尿路病原性大腸菌 (UPEC) に代表的な 15 種の VAGs 保有数は、phylogroup D で少ない傾向がみられたが、in silico 解析の結果では ST131 では分泌システム関連遺伝子が少ないなど、non-ST131 の株と比較して VAGs が有意に少なかった。一方、non-ST131 が分離された症例の 68% が敗血症を引き起こしていたのに対し、ST131 では 21% であり有意に少なかった。以上の結果から、UPEC に特徴的な VAGs のレパートリーは、MLST より異なっていることが示唆され、さらに重症化と関連する可能性が考えられた。今後、オープンデータのゲノム情報を含めて詳細に解析する予定である。

P2-019/DP1-07-18

Pathogenicity of the novel *Helicobacter* spp. infecting the stomach of dogs and cats in Japan

○青木 沙恵¹, 鈴木 仁人², 松井 英則¹, 森 茂太郎¹, 柴山 恵吾³, 見理 剛¹, 林原 絵美子¹ (¹感染研・細菌第2部, ²感染研・AMRセンター, ³名古屋大・医・分子病原細菌学)

○Sae Aoki¹, Masato Suzuki², Hidenori Matsui¹, Shigetaru Mori¹, Keigo Shibayama³, Tsuyoshi Kenri¹, Emiko Rimbara¹ (¹Dept. Bacteriol. II, NIID, ²Antimicrobial. Resist. Res. Cent., NIID, ³Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

Helicobacter pylori is the most prevalent gastric *Helicobacter* species infecting human, while gastric *Helicobacter* species infecting dogs and cats, such as *Helicobacter ailurogastricus*, are also known to infect human and cause gastric diseases. By survey of cats and dogs visiting veterinary clinic, we isolated three novel *Helicobacter* species strains: NHP19-003, NHP19-012, and NHP21-005. An analysis based on *ureAB* genes amplified from DNA of gastric biopsies indicated that 85% of dogs and 33% of cats were infected with one of the three novel species. To assess the pathogenicity of gastric *Helicobacter* species infecting dogs and cats, *in vivo* and *in vitro* infection experiments were conducted. In mice infection experiments, the number of T cells infiltrating the gastric mucosa differed among strains, particularly in mice infected with *H. ailurogastricus* NHP21-4376 strain from human and the novel *Helicobacter* species strain NHP21-005 from a cat. In cell infection experiments, differences in cytotoxicity between strains were also observed. An additional experiment is currently ongoing and its results will be presented at the meeting. Further investigation is needed to verify the pathogenic difference among gastric non-*H. pylori* *Helicobacter* species infecting dogs, cats and humans.

Non-member collaborators; Wan-Ying Du, Sachiyo Nomura, Taisuke Nakagawa, Yuko Goto-Koshino, Koichi Ohno

P2-020/DP1-07-19

大阪で分離した *emm1* 型 A 群溶血性レンサ球菌からの M1UK 株の検出について

○山口 貴弘^{1,2}, 安楽 正輝¹, 山本 香織¹, 土井 健司¹, 原田 哲也¹, 河原 隆二¹, 池辺 忠義², 河合 高生¹ (¹大安研・微生物部, ²感染研・細菌第一部)

Detection of M1UK from *emm1* type group A *Streptococcus pyogenes* isolated in Osaka

○Takahiro Yamaguchi^{1,2}, Masaki Anraku¹, Kaori Yamamoto¹, Takeshi Doi¹, Tetsuya Harada¹, Ryuji Kawahara¹, Tadayoshi Ikebe², Takao Kawai¹ (¹Div. Microbiol., Osaka Inst. Public Health, ²Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

M タンパク 遺伝子 *emm1* 型の溶血性レンサ球菌 (GAS) は GAS の中でも、病原性が強いと言われてきた。この *emm1* 型 GAS がより高病原性となった「M1_{UK} 株」が、2015 年頃から英国、デンマーク、米国、カナダ、オーストラリアなど世界各国で相次いで報告され、さらに日本国内でも検出されることが報告された。日本国内の M1_{UK} 株の実態を把握するため、本発表では過去に大阪府の GAS による侵襲性および非侵襲性症例から分離した *emm1* 型 GAS について、M1_{UK} 株の鑑別を実施した。実験に供した株は 2015 年 1 月から 2024 年 1 月にかけて大阪府で収集した *emm1* 型の 74 株を使用した。鑑別法は、国立感染症研究所の A 群溶血性レンサ球菌検査マニュアルに記載されているコンベンショナル PCR 法を用いて実施した。その結果、侵襲性感染症由来の 3 株 (2018 年, 2019 年, 2020 年にそれぞれ 1 株) が M1_{UK} 株であることが明らかとなった。一方で咽頭炎などの非侵襲性感染症由来分離株では M1_{UK} 株は検出されなかった。この結果から、大阪においても M1_{UK} 株が存在することが明らかとなった。現在、コロナ禍も落ち着いてきたことに伴って、例年以上に GAS 感染症が流行している。M1_{UK} 株のリスクや流行状況を把握するためにも、侵襲性および非侵襲性由来の GAS を解析することが重要である。特に大阪では、今後インバウンドの増加が見込まれ、海外から M1_{UK} 株がさらに流入する恐れもあることから、菌株解析を継続して実施する必要があると考えられた。

P2-021/DP2-13-07

2023 年に富山県内で発生したウエルシュ菌食中毒事例における NGS を用いた SNP 解析

○齋藤 和輝¹, 木全 恵子¹, 磯部 順子¹, 金谷 潤一¹, 池田 佳歩¹, 前西 絵美¹, 竹内 崇², 松崎 千春³, 大石 和徳¹ (¹富山衛研・細菌部, ²富山県生活衛生課, ³富山県高岡厚生センター射水支所)

Analysis of the foodborne outbreak of *Clostridium perfringens* in Toyama prefecture, 2023

○Kazuki Saito¹, Keiko Kimata¹, Junko Isobe¹, Jun-ichi Kanatani¹, Kaho Ikeda¹, Emi Maenishi¹, Takashi Takeuchi², Chiharu Matsuzaki³, Kazunori Oishi¹ (¹Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health, ²Environmental Health Division in Toyama Prefecture, ³Public Health Center of Imizu, Toyama Prefecture)

【背景および目的】2023 年 1 月 12 日に富山県内の宿泊施設利用者が消化器症状を呈していることが判明した。病原体検索の結果、患者 12 名、カレーおよび無症状の従業員 1 名から *Clostridium perfringens* が分離された。感染源調査のため、これら分離株について解析を実施した。加えて、次世代シーケンサー (NGS) を用いた一塩基多型 (SNP) 解析がパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) に代わる手法として有用かを検討した。【方法】患者由来 56 株、従業員由来 5 株、カレー由来 24 株について、下痢原性エンテロトキシン遺伝子 (*cpe*) の有無の解析、主要毒素遺伝子による型別および遺伝子型別 (PFGE) を実施した。*cpe* 陰性株については新規エンテロトキシン遺伝子 (*becA/becB*) の有無を解析した。分離株のゲノム DNA を用いて SNP 解析を行った。【結果および考察】患者およびカレー分離株は *cpe* 陽性、毒素型 A 型であり、PFGE パターンが一致した。喫食状況と合わせてカレーが原因食品と特定された。従業員分離株は *cpe*, *bec* 陰性であり、患者およびカレー分離株とは PFGE パターンが異なった。SNP 解析の結果、患者およびカレー分離株間では 1 SNP、従業員分離株からは 1,427 SNPs が検出された。そのため、患者およびカレー分離株は同一であり、これらと従業員分離株の関連は低いと考えられた。PFGE および SNP 解析で同様の結果が得られたため、*C. perfringens* による食中毒事例において、SNP 解析は PFGE に代わる菌株の同一性を解析する手法として有用であることが考えられた。

P2-022/DP2-13-08

感染症における呼吸オミックス解析法の確立

○緒方 星陵¹, 松永 哲郎¹, ジョンミンキョン¹, 守田 匡伸¹, 魏 范研², 本橋 ほづみ³, 赤池 孝章¹ (¹東北大院・医・環境医学, ²東北大・加齢医学・モドミクス医学, ³東北大・加齢医学・遺伝子発現制御)

Breath omics analysis for infectious diseases

○Seiryu Ogata¹, Tetsuro Matsunaga¹, Minkyung Jung¹, Masanobu Morita¹, Fan-Yan Wei², Hozumi Motohashi³, Takaaki Akaike¹ (¹Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., ²Dept. Modomics Biol. Med., IDAC, Tohoku Univ., ³Dept. Gene Exp. Regul., IDAC, Tohoku Univ.)

【背景】新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) はその感染経路として、エアロゾル感染が知られており、呼吸エアロゾルを用いた高感度・高精度な検査法の確立は重要な課題である。呼吸は、無接触・無侵襲に採取が可能であり、呼吸凝縮液を対象とした「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、COVID-19 患者と新型コロナウイルス感染動物モデルの呼吸凝縮液を用いて、ウイルス検出および感染に伴う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】COVID-19 患者を対象に呼吸凝縮液を採取し、新型コロナウイルスの qPCR 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、患者から回収した呼吸凝縮液の硫黄代謝物解析の結果、健康人と比較し、二硫化水素 (HSSH) や三硫化水素 (HSSSH) などの有意な増加が見られた。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、呼吸凝縮液の回収法を新規に構築した。本手法を用いて、新型コロナウイルス感染ハムスターの呼吸凝縮液の解析を行った結果、qPCR とプロテオーム解析の両方でウイルスが検出された。また、呼吸中の硫黄代謝物解析において、HSSH や HSSSH などの濃度が、ウイルス増殖と肺炎進行の時間依存的に有意に上昇しその回復に伴って減少した。

【結論】本研究から、呼吸オミックスは、COVID-19 の無侵襲なモニタリング法として有用であることが示された。本手法は、今後 COVID-19 のみならず、インフルエンザや結核、病原細菌などの様々な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。

P2-023/DP2-13-09**Mechanisms of excretion of bacterial-specific modified nucleosides in urine**

○山村 遼介¹, 永芳 友^{1,2}, 西口 菜世^{1,2}, 富澤 一仁¹ (1熊本大・医・分子生理, 2熊本大学病院・腎臓内科)

○Ryosuke Yamamura¹, Yu Nagayoshi^{1,2}, Kayo Nishiguchi^{1,2}, Kazuhito Tomizawa¹ (1Dept. Mol. Physiol., Fac. Lif. Sci., Kumamoto Univ., 2Dept. Nephrol., Fac. Lif. Sci., Kumamoto Univ.)

RNAs are essential molecules for protein synthesis. Recently, various post-transcriptional chemical modifications are reported in RNA, especially transfer RNA. Interestingly, the types of these chemical modifications are different between mammals and bacteria. We have found that modified nucleosides, the metabolites of modified RNA, are not reused in cytosol and excreted to extracellular spaces, especially urine. From these backgrounds, we make the hypothesis that bacterial-specific modified nucleotides are excreted into urine of patients with bacterial infection. First, we analyzed bacteria-specific modified nucleotides by mass spectrometry using extracted RNA from 12 bacterial strains including gram-positive and negative bacteria. We found that 2-methyladenosine (m2A) was detected from all strains. Next, we performed co-culture experiment with bacteria and macrophages, and m2A was detected from phagosomes of macrophages. Finally, we analyzed modified nucleotides in urine samples from patients with bacterial or viral infections. As a result, urinary m2A was significantly elevated in patients with bacterial infections. These results suggest that m2A could be a novel diagnostic marker for bacterial infections.

P2-024/DP2-13-10***Clostridioides difficile* 培養法の改良**

○妹尾 充敏, 見理 剛 (感染研・細2)

Improvement of culture method for *Clostridioides difficile*

○Mitsutoshi Senoh, Tsuyoshi Kenri (Dept. Bacteriol. II, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【目的】*Clostridioides difficile* の引き起こす感染症 (CDI) の症状は、軽度の下痢から消化管穿孔まで多岐にわたる。また、死亡例の報告も稀ではないため、CDI 対策は急務であると考えられる。CDI の診断には細菌学的検査が必須であり、詳細に解析するためには菌分離が重要となる。本菌の分離には選択培地が用いられることが多いが、実際の菌数より少なく検出されている可能性がある。また、開発途上国では選択培地が入手困難な場合もある。本研究では、選択培地などの特殊な培地を使用しない分離法の開発を試みた。

【方法】本菌の分離にはアルコール処理が用いられることから、無処理、アルコール処理、本研究で開発した新たな方法の3種類の方法を比較した。培地は、BHI 寒天培地、変法 GAM 培地などを使用した。選択性の確認のため、*Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* などを用いた。形態の違いを確認するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。

【結果・考察】開発した新たな方法の特徴を調べるため、まず、本菌の純培養液を用いて、無処理、アルコール処理、新たな方法の3種類を比較した。その結果、栄養型菌では、無処理のコロニー数に比べ、アルコール処理は顕著に減少したが、新たな方法では著しく増加した。この増加現象は、芽胞化が進んだ培養液を用いても同様に観察された。次に、無処理、アルコール処理、新たな方法で処理した菌の形態を SEM および TEM を用いて観察したが、コロニー数の増加を裏付けられるような違いは観察されなかった。現在、遺伝子の発現に違いがあるか調べるため、解析を進めている。

P2-025/DP2-13-11**ボツリヌス神経毒素の新規 *in vitro* 検出法の開発**

○油谷 雅広, 見理 剛, 妹尾 充敏 (感染研・細2)

Development of a novel *in vitro* detection method for botulinum neurotoxin

○Masahiro Yutani, Tsuyoshi Kenri, Mitsutoshi Senoh (Dept. Bacteriol. II, Natl. Inst. Infect. Dis.)

ボツリヌス症の検査において、ボツリヌス毒素の検出には、検体を投与されたマウスが弛緩性麻痺を呈するかを調べるマウス法が用いられている。マウス法は感度・特異性がともに高く、ボツリヌス毒素検出のゴールドスタンダードとなっている。しかし、検査に動物実験を伴うこと、マウスへの投与に一定の習熟度を要することから、検査そのものや検査機関内での技術継承が困難となることがある。また、動物実験に関する3Rsへの対応の観点からも、*in vitro* で実施できる代替試験法の開発が望まれる。本研究では、ボツリヌス毒素の基質であるSNAREタンパク質を組み込んだ新規リコンビナントタンパク質を作製してボツリヌス毒素検出系の構築を進めており、その開発状況について報告する。

P2-026/DP2-13-12**PMA-PCR によるピロリ菌 VBNC の評価**

○北条 史¹, 三戸部 治郎², 神谷 茂³, 大崎 敬子² (1杏林大院・医・実験動物施設, 2杏林大・医・感染症学, 3ミヤリサン製薬 (株)・中央研究所)

Evaluation of VBNC-*Helicobacter pylori* by PMA-PCR

○Fuhito Hojo¹, Jiro Mitobe², Shigeru Kamiya³, Takako Osaki² (1Inst. Lab. Animals, Grad. Sch. Med, Kyorin Univ., 2Dept. Infect. Dis., Kyorin Univ. Sch. Med., 3Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd.)

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は胃・十二指腸潰瘍の起因菌とされる微好気性グラム陰性螺旋状菌である。本菌の感染経路は経口感染が主とされているが、糞便からの分離培養には至っておらず、全容は解明されていない。本菌のココイドはVBNC (Viable But Non-Culturable) 状態にあると考えられており、この生態が糞便からの分離培養ができない一因となっている可能性がある。ココイドを含むVBNC-*H. pylori* の定量化のために、培養法によらないピロリ菌の生菌数算定法の確立が不可欠である本研究では *H. pylori* に対するPMA (Propidium monoazide) PCR を用いた生菌選択的定量PCR法を検討した。PMAは光反応性かつ細胞膜不透過性のDNA修飾色素であり、死菌DNAに作用して生菌DNAのみPCRを行うことができる。生菌におけるqPCRではPMA処理・未処理に関わらず同じCt値を示し、PMAは *H. pylori* 生菌DNAの増幅を阻害しないことが分かった。一方で加熱処理死菌におけるPMA-qPCRでは通常のqPCRと比較するとCt値にして10以上の差が認められ、1000分の1程度しか増幅されなかった。これによりPMA-PCRによって死菌DNAを増幅させず、生菌DNAのみを選択的に増幅させることができることがわかった。PMA-qPCRによる菌数算定の結果 3.34×10^6 CFU 相当であったが、生菌サンプルを培養法によって菌数算定したところ 2.88×10^6 CFU となり、培養法とほぼ同じ結果となった。本法によりピロリ菌を生菌選択的に定量化することができた。これにより糞便中の培養できないピロリ菌を検出できる可能性がある。

P2-027/DP2-13-16

Comparative analysis of *Leptotrichia* sp. isolated from human oral cavity

○桑原 紀子¹, 齋藤 真規², 瀧澤 智美², 泉福 英信², 平塚 浩一¹ (日大・松戸歯・生化学・分子生物学, ²日大・松戸歯・感染免疫学)

○Noriko Shinozaki-Kuwahara¹, Masanori Saito², Tomomi Hashizume-Takizawa², Hidenobu Senpuku², Koichi Hiratsuka¹ (1Dept. Biochem. Mol. Biol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo., ²Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

A long filamentous-shaped and gram-negative bacilli and was isolated from saliva of healthy human. The isolate was tentatively identified as a *Leptotrichia* species based on the biochemical tests and 16S rRNA gene sequence analysis. In this study, complete genome sequence of *Leptotrichia* sp. named SK-5 has determined and analyzed. De novo assembly of the microbial genome data generated by the PacBio RSII sequencer was performed. Digital DNA-DNA hybridization (dDDH) and average nucleotide identity (ANI) between SK-5 and its related species were analyzed by calculator, respectively. Comparative 16S rRNA gene sequence analysis classified SK-5 into the genus *Leptotrichia* with *L. hofstadii* and *L. buccalis* as their closest relations with 98 and 97% similarity, respectively. The whole genome sequence of SK-5 consisted of 2,536,480 bp with a G+C content of 29.8% in a single circular chromosome. A total of 2,432 CDSs, 15 rRNAs, 46 tRNAs, and 9 CRISPRs included in SK-5 genome. The dDDH and ANI values between strain SK-5 and its most closely related *L. hofstadii* and *L. buccalis* were 48% and 36%, and 93% and 89%, respectively, which were below the threshold (dDDH; 70% and ANI; 95%, respectively) for species delineation. On the basis of differences, strain SK-5 would be suggested to be a novel species of the genus *Leptotrichia*.

[会員外共同演者: 田中陽子 (日大・松戸歯・有病者歯科検査医学)]

P2-028/DP2-13-17

口腔保湿ジェル成分のバイオフィーム抑制効果

○成 雪菲¹, 宮崎 貴文², 上川 善昭³, 泉福 英信¹ (1日本大・松戸歯・感染免疫学, ²株式会社ピカッシュ, ³鹿児島大・歯学部)

Inhibition effect of oral moisturizing gel ingredients on the biofilm formation

○Setsuhi Sei¹, Takafumi Miyazaki², Yoshiaki Kamikawa³, Hidenobu Senpuku¹ (1Dept. Microbiol. Immunol., Dent., Sch. at Matsudo, Nihon Univ., ²Pikasshu, ³Sch. Dent., Kagoshima Univ.)

700種類以上の口腔微生物によるバイオフィーム (BF) 形成を制御することは、口腔の健康を維持するために重要である。高齢者において、口腔 BF 形成が歯周病のみならず誤嚥性肺炎の発症に関与することが危惧されており、口腔清掃を含む口腔ケアの重要性が高まっている。特に高齢者は口腔が乾燥するケースが見られ、その乾燥が口腔 BF 形成を増加させることが問題となる。口腔乾燥を防止するために口腔保湿ジェルが使用されている。この保湿ジェルに BF 形成阻害効果があれば、保湿ジェルの効果に加えて BF 形成を阻害し、口腔の健康維持に大きく貢献すると考えられる。そこで、市販の口腔保湿ジェル (スッキリン) を使用し、口腔微生物 BF 形成に対する阻害効果を検討した。スッキリンには、水、グリセリン、アルギン酸、セルロースガム、キシリトール、炭、カラギーナン、クエン酸、クエン酸ナトリウム、銀、ポリビニルピロリドン、フェノキシエタノール、香料が含まれている。BF 形成実験は、マイクロタイプレートを使用し、0.25% スクロースが含まれた Tryptic Soy Broth を用いて菌を加え、そこにスッキリン溶液も加えた。形成された BF を洗浄し、0.5% サフランで染色、洗浄後 70% アルコールで色素を抽出し、492nm の吸収値で BF 量を測定した。その結果、*Actinomyces oris* MG1, *Actinomyces oris* MG1, *Streptococcus mutans* MT8148 と UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715 の BF 形成は、スッキリンにより有意に抑制された。口腔保湿のために使用されているスッキリンは、口腔 BF 形成に関与する *A. oris*, *S. mutans*, *S. sobrinus* の BF 形成を阻害する効果も有することが明らかとなった。

P2-029/DP2-13-18

高齢者施設居住者の腸管内における溶血性レンサ球菌の保菌状況調査

○池田 佳歩¹, 磯部 順子¹, 前西 絵美¹, 木全 恵子¹, 金谷 潤一¹, 齋藤 和輝¹, 池辺 忠義², 明田 幸宏², 大石 和徳¹ (1富山衛研・細菌, ²感染研・細菌1)

Prevalence of intestinal carriage of hemolytic streptococci in the nursing home residents

○Kaho Ikeda¹, Junko Isobe¹, Emi Maenishi¹, Keiko Kimata¹, Jun-ichi Kanatani¹, Kazuki Saito¹, Tadayoshi Ikebe², Yukihiko Akeda², Kazunori Oishi¹ (1Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health, ²Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis.)

【背景】劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) の致死率は高く、その公衆衛生上のインパクトは大きい。我々は 2023 年に侵入門戸不明で高齢者にみられた STSS の 1 致死的例を経験し、発症時の血液と便から *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) を分離した。また、NGS 解析から両菌株が同一株であることを報告した (日本感染症学会西日本地方会, 2023 年)。本症例は腸管内 SDSE が bacterial translocation (BT) により STSS を発症した可能性を示唆している。今回、我々は高齢者施設居住者における腸管内の溶レン菌の保菌状況を調査した。

【対象・方法】2 高齢者施設の居住者 64 名を対象とし、2023 年 10 月と 12 月に計 2 回採便を実施し、各 64 検体、58 検体を採取した。コロニー血液寒天培地に便を塗抹し、溶血を認めるコロニーを釣菌し、群別・菌種同定を行った。

【結果・考察】溶レン菌の分離は 1 回目 25/64 (39%), 2 回目 22/58 (38%) で、菌分離率は 1 回目、2 回目で SDSE が (23%, 24%), *S. agalactiae* (SA) が (6%, 2%) であった。今回、高齢者施設の居住者の便から SDSE が 23~24%, SA は 2~6% 分離されたが、*S. pyogenes* は分離されなかった。1 回目、2 回目に共通して 11 名 (17%) から SDSE が分離された。この結果は、本菌が BT を介して STSS を発症するポテンシャルを示唆している。(共同研究者: 厚生連高岡病院 伊藤宏保, 狩野恵彦, 東慶之介, 脇田明宏, 浦田孝之)

P2-030/DP2-13-19

Bacillus cereus foodborne outbreaks in Tokyo, 1977-2023

○門間 千枝, 岡田 若葉, 古田 菜摘, 浅山 睦子, 上原 さとみ, 小池 裕, 神田 真軌, 尾畑 浩魅, 横山 敬子, 貞升 健志 (東京都健康安全研究センター)

○Chie Monma, Wakaba Okada, Natsumi Furuta, Chikako Asayama, Satomi Uehara, Hiroshi Koike, Maki Kanda, Hiromi Obata, Keiko Yokoyama, Kenji Sadamasu (Dept. Microbiol., Tokyo Metropolitan Inst.)

Several foodborne outbreaks caused by *Bacillus cereus* have been reported every year. We studied the isolates and emetic toxin in causative food of those outbreaks in Tokyo from 1977 to 2023. A total of 236 strains were examined, including 152 isolates (90 emetic foodborne outbreaks), 56 isolates (6 outbreaks of nosocomial infections), and 28 other strains (environmental origin etc.). Serotyping, cereulide gene (*crs*), emetic toxin production of the isolates using MALDI-TOF MS, and MLST analysis were performed. In addition, the productions of cereulide in 13 causative foods were quantified by LC-MS/MS. The causative foods were all cooked cereal foods except for unknown outbreak incidents. Cereulide was quantified in 13 causative foods (0.11 - 30 µg/g). These amounts were considered sufficient to cause the emetic disease. The serotypes of the foodborne outbreaks' isolates were Taylor & Gilbert type 1 (97.4%). In the isolates from the other origins, serotypes were varied. Most of the foodborne outbreaks' isolates carried *crs* but all nosocomial isolates didn't have carry. The results of the MLST analysis showed that the foodborne outbreaks isolates (88.5%) were ST26, unlike the other isolates. ST26 was found in high numbers in rice isolates, which was consistent with the high number of cooked cereal foods in causative foods of *B. cereus* foodborne outbreaks.

P2-031/DP1-03-03**The inhibition of *Staphylococcus aureus* by commensal bacterium via its metabolites**

○田高 亜紀子^{1,2}, 金城 雄樹^{1,2} (1慈恵医大・医・細菌, 2慈恵・バイオフィルム研究センター)

○Akiko Tajima^{1,2}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol. The Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Ctr. Biofilm Sci. & Tech.)

The human skin microbiota plays an essential role in the protection against pathogens, and we hypothesized that commensal bacteria antagonize pathogens by cooperating with host molecules such as free fatty acids (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 unsaturated FFAs. Competitive interaction between species can be due to limiting nutrients or the production of antimicrobial compounds, and the latter were often encoded by biosynthetic gene clusters (BGCs) which are responsible for the production of secondary metabolites involved in microbial interference competition. Genome analysis of this bacterium revealed the presence of several putative BGCs. Using a comparative genomics approach, we found the BGC which absent in the non-inhibitory *Corynebacterium* species genomes. Deletion of this BGC led to loss of inhibitory activity, suggesting that inhibition was due to antimicrobial production. The identified this BGC consists of genes encoding a putative bacteriocin, which belongs to a family of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). These results suggested that commensal *Corynebacterium* sp. inhibit *S. aureus* growth through bacteriocin production.

P2-032/DP1-03-04**Indoor Microbiome: Interactions with Occupants and Environmental Factors in Residential Settings**

○侯 建建¹, 中嶋 麻起子^{2,3}, 藤吉 奏^{1,2}, 西内 由紀子¹, 小椋 大輔^{2,4}, 丸山 史人^{1,2} (1広島大・IDEC, 2広島大・CHOBE, 3広島工業大・工・建築工学, 4京都大・院・工学)

○Jianjian Hou¹, Makiko Nakajima^{2,3}, So Fujiyoshi^{1,2}, Yukiko Nishiuchi¹, Daisuke Ogura^{2,4}, Fumito Maruyama^{1,2} (1IDEC Inst., Hiroshima Univ., 2CHOBE, Hiroshima Univ., 3Fac. Engineer., Hiroshima Inst. Tech., 4Grad. Sch. Engineer., Kyoto Univ.)

The connection between indoor microbiomes and human health, particularly allergies, is increasingly recognized. This research comprehensively studies microbiota in residential settings, examining bacterial and eukaryotic compositions in air, dust, and water to understand their interactions with occupants and indoor greenery (biotope). In occupied, unoccupied, and biotope-integrated environments, we collected 159 samples from aerosols, dust, and water-related sources. Amplicon sequencing highlighted the diverse microbial presence, illustrating the complex relationship between indoor microbiomes, humans, and greenery. Our analysis reveals that the presence of occupants significantly influences bacterial and eukaryotic communities in dust and water-related samples, albeit not in aerosols. Biotope presence predominantly affects bacterial communities, especially within water-related environments. We identified distinct microbial taxa associated with different residential contexts. Specific pathogen-associated bacteria, fungi, amoeba, and house dust mites were prevalent in certain samples, underscoring potential health implications. Network analysis facilitated the identification of core interactive taxa within these residential ecosystems. The humidity and temperature exhibited varied correlations with microbiota, indicating their role in shaping indoor microbial communities.

P2-033/DP1-03-05**Ingestion of *Campylobacter jejuni* by *Acanthamoeba polyphaga***

北出 真子¹, ○下畑 隆明^{1,2} (1福井県立大・海洋生物資源, 2徳島大・院医歯薬・予防環境栄養)

Mako Kitade¹, ○Takaaki Shimohata^{1,2} (1Marine-Bio, Fukui Prefectural Univ., 2Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch.)

Background: *Campylobacter jejuni* causes human food-borne disease in the world. In *C. jejuni*-infections are associated contaminated food, consumption of undercooked chicken meat, and unchlorinated water. A number of studies have enlightened the role of unicellular eukaryote, particularly free living amoebae (FLA) for survival and dissemination of many water borne pathogenic bacteria. Nevertheless, there is a few experimental reports that examines participation of FLA for the survival and dissemination in *C. jejuni*. Herein, we examined *C. jejuni* internalization and intracellular survival in *Acanthamoeba polyphaga*, a modl of FLA. **Method:** HeLa cells and *A. polyphaga* were incubated with wild type (WT) *C. jejuni* (NCTC11168) or CapA::cmr mutant strain, which deficient internalization factor for HeLa cells. The bacterial internalization and intracellular survival were estimated in 25°C and 37°C by gentamycin protection assay. **Results & Discussion:** WT-*C. jejuni* was internalized in HeLa cell, but CapA::cmr mutant strain decreased in internalization in HeLa cell in 37°C. Those internalization of bacterial cells were abolished in 25°C. On the other hands, internalization level between WT and CapA::cmr mutant strain were similar in *A. polyphaga* in 37°C and 25°C. Those data indicates that *C. jejuni* were internalized in *A. polyphaga* with different mechanisms from epithelial cells.

P2-034/DP1-03-06**Symbiotic bacteria break through narrow passage by flagellar wrapping**

吉岡 青葉¹, 菅 哲朗², 竹下 和貴³, 和田 浩史⁴, 菊池 義智⁵, ○中根 大介¹ (1電通大・基盤理工, 2電通大・機械知能, 3秋田県立大・生物資源, 4立命館大・物理, 5産総研・生物プロセス)

Aoba Yoshioka¹, Tetsuo Kan², Kazutaka Takeshita³, Hirofumi Wada⁴, Yoshitomo Kikuchi⁵, ○Daisuke Nakane¹ (1Dept. Eng. Sci., UEC, 2Dept. Mech. Int. Sys. Eng., UEC, 3Fac. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ., 4Dept. Phys., Ritsumeikan Univ., 5Biopro. Res. Inst. AIST)

Narrow environments are frequently encountered in natural settings, such as intra-animal habitats. Despite the prevalence of such environments, research on the bacterial behavior in these confined spaces is limited. Here, we have developed a microfluidic device based on MEMS technology that comprises hundreds of linear passages with 1-μm width in parallel, allowing the movement of a single bacterium in one dimension. We detailed the behavioral patterns of 14 species of *Burkholderia sensu lato* within the device. Essential to the directional movement in the device was the flagellar wrapping around the bacterial cell body. The flagellar wrapping of *Caballeronia insecticola* was directly visualized by *in vivo* live imaging at the limited space in the organ of a bean bug, *Riptortus pedestris*. Mathematical calculations and gene swapping experiments showed that the stiffness of the hook, a soft polymer at the base of each flagellum, is necessary for facilitating mobility within the device and enhancing flagellar wrapping efficiency. The microfluidic device stands as a useful tool for studying host-specific swimming styles of bacteria where spatial limitations act as mechanical stimuli. These findings are valuable for understanding the role and mechanism of motility in both symbiotic and pathogenic bacteria during host infection.

P2-035/DP1-03-07

細菌が産生する揮発性有機化合物による大腸菌の抗菌薬耐性の誘導
○見坂 武彦^{1,2}, 西澤 佳穂², 土居 奈津美² (1)摂南大・理工, (2)大阪大谷大・薬)

Induction of antibiotic tolerance of *Escherichia coli* by microbial volatile organic compounds

○Takehiko Kenzaka^{1,2}, Kaho Nishizawa², Natsumi Doi² (1)Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ., (2)Fac. Pharm., Osaka Ohtani Univ.)

真菌や細菌は様々な揮発性物質を産生し、その揮発性物質が他の生物の生育に影響を与える場合がある。本研究では、シトロバクター属菌由来の揮発性有機化合物 (MVOC) が細菌の抗菌薬に対する突然変異および耐性に与える影響について検討した。同じ密封容器の中で、*Escherichia coli* および *Citrobacter freundii* をそれぞれ LB 寒天培地で培養したところ、*E. coli* の生菌数は変化することなく、ストレプトマイシン耐性の突然変異頻度は約 10 倍増加した。GC-MS により MVOC 成分を分析したところ、主要成分として 3-メチル-1-ブタノール、ジメチルジスルフィド、5-ジメチルピラジン、フェノールが検出され、ジメチルジスルフィドは約 20 倍変異頻度を増加させる効果があった。また *E. coli* の抗菌薬感受性を調べたところ、*C. freundii* およびジメチルジスルフィド存在下でアミノグリコシド系・ニューキノロン系抗菌薬に対する MIC は有意に増加した一方、影響のない抗菌薬もあった。*E. coli* の RNA-seq 解析の結果、*C. freundii* の存在下では sulfate transport, sulfur metabolism, thiamine biosynthesis 系などに関連した遺伝子発現が低下し、L-leucine biosynthesis, L-arginine degradation I, Arginine transport system, cellular response to hydrogen peroxide などの遺伝子発現が上昇した。これらの結果から特定の MVOC 成分が空間を隔てた状態で細菌の抗菌薬耐性を誘導することがわかった。

P2-036/DP1-03-08

昆虫と植物をまたぐ共生メカニズムの解明に向けた挑戦

○森村 洋行¹, 竹下 和貴², 石神 広太^{1,3}, 松浦 優⁴, Peter Mergaert⁵, 菊池 義智^{1,3} (1)産総研・生命プロセス, (2)秋田県立大・生物資源・応用生物, (3)北大大学院・農学研究院, (4)琉大・熱研セ, (5)2BC, CNRS, Paris-Saclay Univ.)

A challenge toward discover of symbiotic mechanism over Insects-Plants

○Hiroyuki Morimura¹, Kazutaka Takeshita², Kota Ishigami^{1,3}, Yu Matsuura⁴, Peter Mergaert⁵, Yoshitomo Kikuchi^{1,3} (1)Bioprod. Res. Inst., AIST, (2)Dept. Biotech., Appl. Biol. Sci., Akita Pref. Univ., (3)Grad. Sch. Ag., Hokkaido Univ., (4)TBRC, Univ. Ryukyus, (5)2BC, CNRS, Paris-Saclay Univ.)

自然界では多くの動植物が微生物と共生関係を結んでおり、緊密な相互作用を行っている。マメ科植物と根粒菌の共生系はよく知られた例であり、共生細菌が行う窒素固定により宿主植物は大きな利益を得る。また、陸上最大の動物群である昆虫も多様な共生系を発達させており、腸内や特殊な細胞の細胞質内に共生細菌を持ち、それら共生細菌が餌の分解や、餌に不足する栄養素の供給に重要な役割を果たしている。このように動植物に広くみられる微生物共生系であるが、共生メカニズムの共通性や異質性についてはあまり調査されていない。重要害虫として知られるホソヘリカメムシ *Reptortis pedestris* とその近縁カメムシ類は、環境土壌中から *Caballeronia* 共生細菌を獲得し、消化管に発達する袋状組織の内腔に保持する (即ち細胞外共生を行う) ことが知られている。最近我々は、コバネヒョウタンナガカメムシ *Togo hemipterus* が、土から獲得した *Caballeronia* を腸管上皮細胞中に取り込むだけでなく、細胞内共生を行うことを発見した。このようなナガカメムシの共生系は、共生細菌を土から獲得し細胞内共生を行うという点で、よく知られたマメ科植物-根粒菌共生系と大きな共通性を持つ。今回我々は、ナガカメムシにおける細胞内共生の分子基盤解明に向けて、オミクス解析、変異株スクリーニング、宿主遺伝子の RNAi を行ったところ、面白いことにマメ科植物-根粒菌共生系と共通のメカニズムで昆虫の細胞内共生が成立していることが明らかとなってきた。本発表ではそのメカニズムの詳細について報告する。

P2-037/DP1-09-02

Lactobacillus play an important role in maintaining a healthy vaginal environment

○相澤 志保子¹, 高田 和秀¹, 林田 真吾², 早川 智¹ (1)日本大・医・微生物学, (2)日本大・医・小児科学)

○Shihoko Aizawa¹, Kazuhide Takada¹, Shingo Hayashida², Satoshi Hayakawa¹ (1)Div. Microbiol., Dept. Pathol. and Microbiol., Nihon Univ. Sch. Med., (2)Div. Pediatrics, Nihon Univ. Sch. Med.)

Background: Dodelrein bacilli, which include one or two species of lactobacilli (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. glasseri*, *L. iners*), comprise the vaginal flora of healthy adult women. Dysbiosis of the vaginal flora cause bacterial vaginosis (BV) and obstetric complications, such as preterm delivery. In this study, we investigated the impact of lactobacilli on pathogenic bacteria.

Methods: The biomass concentration of each bacterium was evaluated by measuring the turbidity of the culture medium at OD600. The effect of each *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. glasseri*, *L. paragasseri*, *L. vaginalis*, *L. acidophilus*, and *L. rhamnosus*) supernatant on the biomass concentration of pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, and *Gardnerella vaginalis*) were evaluated, and vice versa.

Results: The culture supernatant from *Lactobacillus* significantly reduced the biomass concentration of pathogenic bacteria. In contrast, the culture supernatant from pathogenic bacteria did not affect the biomass concentrations of *Lactobacillus*. The biomass concentrations of *Lactobacillus* were not significantly affected by the culture supernatant from other vaginal *Lactobacillus* species.

Discussion: The present result suggested that lactobacilli as vaginal commensal bacteria play an important role in maintaining a healthy vaginal environment.

P2-038/DP1-09-03

Identification of symbiote candidates for ileoanal pouch in ulcerative colitis in Japan

○孫 安生¹, 加藤 完², 松尾 禎之³, 塙 莊太郎⁴, 中西 由美子², 大野 博司², 小椋 英樹¹, 石戸 聡¹, 池内 浩基⁵, 内野 基⁵ (1)兵庫医大・医・病原微生物, (2)理研・IMS, (3)関西医大・医・侵襲反応制御, (4)兵庫医大・医・歯科口腔外科学, (5)兵庫医大・医・炎症性腸疾患外科)

○Aoi Son¹, Tamotsu Kato², Yoshiyuki Matsuo³, Soutaro Hanawa⁴, Yumiko Nakanishi², Hiroshi Ohno², Hideki Ogura¹, Satoshi Ishido¹, Hiroki Ikeuchi⁵, Motoi Uchino⁵ (1)Dept. Microbiol., Sch. Med., Hyogo Med. Univ., (2)IMS, (3)Dept. Human Stress Response Science, Inst. Bionomedical Science, Kansai Med. Univ., (4)Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Hyogo Med. Univ., (5)Dept. IBD Surgery, Hyogo Med. Univ.)

At present, since the number of ulcerative colitis (UC) patient is remarkably increasing, the Japanese government has categorized the disease as designated intractable disease. UC has been recognized as a life-long inflammatory disease; it's challenging to achieve the remission even through the state-of the art medication. Therefore, medication-uncontrollable UC patients require the surgical operation: total proctocolectomy and ileal pouch anal anastomosis (IPPA). The surgical operation could improve the quality of life of the patients, but yet requires intensive medical following, because more than 40% develop the inflammation of ileal pouch diagnosed as pouchitis. We have explored the symbiote candidates for ileoanal pouch through comprehensive microbiome and metabolome analysis. 16S rRNA amplicon meta-analysis and metabolome analysis for 170 patients were performed. Several bacterial genera were statistically reduced in correlation with inflammatory clinical score and were shown having significant relation with protective metabolites. In addition, the extent of decrease in these candidates was strikingly prominent in medication-refractory pouchitis. Thus, our data show these bacterial taxa as symbiote candidates and could be attractive targets for maintenance of ileal pouch in UC.

P2-039/DP1-09-04

Streptococcus sobrinus が放出する膜小胞 (MV) がバイオフィルム形成に及ぼす影響についての研究

○吉田 浩子¹, 袴田 社², 根岸 慎一¹, 泉福 英信² (¹日本大・歯・矯正, ²日本大・歯・微生物免疫)

Biofilm formation by membrane vesicles released from *Streptococcus sobrinus*

○Hiroko Yoshida¹, Morito Hakamada², Shinichi Negishi¹, Hidenobu Senpuku² (¹Dept. Orthodontics., Sch. Dent., Nihon Univ., ²Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Nihon Univ.)

口腔内のバイオフィルム (BF) 形成に関与する *Streptococcus sobrinus* は, *Streptococcus mutans* とともに砂糖を基質とする多糖類であるグルカンを合成する。近年 *S. mutans* は, 膜小胞 (MV) を放出し, 他の菌の BF 形成を誘導することが明らかとなった。*S. sobrinus* も MV を放出する可能性やその機能は明らかとなっていない。そこで本研究では, *S. sobrinus* の MV の放出と機能を明らかにするために, *S. sobrinus* の MV による BF 形成実験を行った。BF 形成実験: 96 穴マイクロタイタープレートにフィルター滅菌したヒト唾液をコートした後, 0.25% スクロースを添加した Tryptic Soy Broth (TSBs) で様々な濃度に希釈された *S. sobrinus* の MV を加えた。そこに, *S. mutans* UA159.gtfBC- (BF 形成能力を失った株), *S. aureus* cowan I, *Actinomyces naeslundii* x600, *Actinomyces oris* MG1 をそれぞれ加えて 37°C で 16 時間の培養を行った。培養後, 蒸留水にて 2 回 BF を洗浄した。染色はサフラニン溶液にて行い, 洗浄・乾燥後, 70% エタノールで脱色し着色された溶液を吸光度計にて 492nm の吸収値で測定し, その値を BF 形成量とした。*S. sobrinus* の MV は, 濃度依存的に *S. mutans* UA159.gtfBC-, *S. aureus* cowan I および *A. oris* MG1 の BF 形成を誘導した。共焦点レーザー顕微鏡による Live-Dead 染色の観察において, *S. sobrinus* の MV は, 口腔バイオフィルム形成に関与する *S. mutans* や *A. oris*, 口腔内の日和見菌である *S. aureus* の死菌依存的 BF 形成を誘導した。よって, *S. sobrinus* の MV も新たな病原因子と考えられた。

P2-040/DP1-09-05

米ぬか摂取マウスからの大腸炎抑制性腸内細菌の単離

○沖梨咲子¹, 田中一己², 野村 暢彦³, 尾花 望⁴, 福田 真嗣^{2,4,5} (¹筑波大・生物資源, ²慶大・先端生命研, ³筑波大・生命環境系, ⁴筑波大・医・TMRC, ⁵(株)メタジェン)

Isolation of colitis-suppressing bacteria from gut microbiota of rice bran-fed mice

○Risako Oki¹, Kazuki Tanaka², Nobuhiko Nomura³, Nozomu Obana⁴, Shinji Fukuda^{2,4,5} (¹Biol. Resource Sci., Univ. Tsukuba, ²Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ³Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ⁴TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, ⁵Metabologenomics, Inc.)

腸内細菌叢は炎症性腸疾患などの宿主の病態形成に密接に関与している。ある種のプレバイオティクスは, 特定の有益な腸内細菌の増殖を誘導し, 宿主に有益な効果をもたらす。本研究ではその一つである大腸炎抑制効果をもつ米ぬかに着目した。先行研究において, 米ぬか摂取によりマウスの大腸炎症状が緩和すること, および米ぬか摂取マウスの腸内細菌叢が大腸炎抑制活性を有することが明らかになった。そのため, 本研究では, 米ぬか摂取マウスの腸内細菌叢より, 大腸炎抑制活性を有する腸内細菌の単離および同定することを目的とした。複数の腸内細菌単離用培地で米ぬか摂取マウス由来の腸内細菌を培養し, 各培地で増殖する細菌群を 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスによって同定した。その結果, 各種培地で増殖する細菌群が大きく異なることが示唆された。そこで, 各培地で出現したコロニーを回収し, 無菌マウスに投与することにより, ノトバイオートマウスを作出した。Dextran Sodium Sulfate (DSS) 誘発大腸炎モデルを用いて, 各培地で増殖した細菌群の大腸炎抑制活性を評価した。その結果, 特定の培地を用いた場合, DSS 投与によるノトバイオートマウスの体重減少および DAI (disease activity index) スコアが有意に改善し, 大腸炎抑制活性を有する腸内細菌が定着していることが示唆された。以上の結果より, 腸内細菌の多くは難培養性であるが, 特定の培地を用いることで米ぬか摂取マウス腸内細菌中の大腸炎抑制活性性腸内細菌を単離可能であることが示唆された。今後, 大腸炎抑制活性を有する細菌種を単離および同定することで, 新規プロバイオティクスの開発などに繋がることを期待される。

P2-041/DP1-09-06

塩分排泄量と血圧レベルによる腸内細菌由来ポリアミン代謝経路の遺伝子発現に関する研究

○五十川 泰雄¹, 唐島 成宙², 溝口 蓮³, 越田 葵¹, 辻口 博聖⁴, 原 章規⁴, 中村 裕之⁴, 岡本 成史⁵ (¹金沢大・新学術創成研究科, ²金沢大・国際基幹教育院, ³金沢大・医薬保健学総合研究科未来型健康増進医学, ⁴金沢大・医薬保健・医・環境生態医学・公衆衛生学, ⁵大阪大・院・医・保健学)

Gene expression of gut bacterial polyamine metabolism based on salt excretion and blood pressure

○Yasuo Ikagawa¹, Shigehiro Karashima², Ren Mizoguchi³, Aoi Koshida¹, Hiromasa Tsujiguchi⁴, Akinori Hara⁴, Hiroyuki Nakamura⁴, Shigefumi Okamoto⁵ (ILAS, Kanazawa Univ., ²FSI, Kanazawa Univ., ³Dept. Health Prom. & Med. Fut., Kanazawa Univ., ⁴Dept. Hygiene & Pub. Health, Grad. Sch. Adv. Prev. Med. Sci., Kanazawa Univ., ⁵Div. Health Sci., Sch. Med., Osaka Univ.)

高血圧の要因として食塩の過剰摂取が挙げられるが, 一部は食塩の適正ないし過少な摂取量であるにも関わらず高血圧となる。また, 血圧抑制作用を持つスペルミジン (Spd) や原料となるアルギニン (Arg) は一部の腸内細菌により産生される。食塩摂取量による高血圧発症の機序に関して, 腸内細菌由来 Spd の関与を検討した報告はない。本研究では, 一般住民の腸内細菌叢の構成と機能解析を行い, 腸内細菌由来 Spd 代謝が食塩摂取量と血圧との関係に与える影響について検討した。対象者を推定 1 日食塩排泄量と平均血圧の 2 つの指標により 4 群化し, それぞれ低食塩血圧正常群, 低食塩血圧高値群, 高食塩血圧正常群, 高食塩血圧高値群とし, 低食塩血圧正常群と他の群の 2 群間比較を行った。菌叢構成解析において, β 多様性では低食塩血圧正常群と高食塩血圧高値群の間に有意差が認められた。細菌叢構成細菌種はどの群間にも複数種に有意差が認められた。Arg から Spd までの合成経路を構成する各酵素遺伝子存在量を群間比較したところ, 低食塩血圧正常群において, プトレンシンから Spd を合成する EC 2.5.1.16 遺伝子量は低食塩血圧高値群及び高食塩血圧高値群よりも有意に高値であることを見いだした。生体内での合成活性を示す血清中の代謝産物比には有意差は認められなかった。ヒトにおいて, EC 4.1.1.17 によるオルニチンからプトレシンの合成は Spd 合成の律速段階であり, Spd は EC 4.1.1.17 のフィードバック阻害剤として作用する。腸内細菌由来 Spd は, ヒトの EC 4.1.1.17 活性に影響も与えて Spd 自体の合成量に影響を与えている可能性がある。

P2-042/DP1-09-07

幼若期のアンピシリン暴露が食餌誘導性 NASH モデルマウスに及ぼす影響

石川 隆司¹, 大西 光莉¹, 清水 真祐子², 櫻井 明子¹, 〇片岡 佳子¹ (¹徳島大・医・微生物遺伝子解析, ²徳島大・医・疾患病理)

Effect of ampicillin exposure in weaning period in diet-induced NASH model mice

Ryuji Ishikawa¹, Hikari Ohnishi¹, Mayuko Shimizu², Akiko Sakurai¹, 〇Keiko Kataoka¹ (¹Dept. Microbiol. Gen. Anal., Sch. Med., Tokushima Univ., ²Dept. Pathol. Lab. Med., Sch. Med., Tokushima Univ.)

【目的】ウェスタンダイエットの摂取により発症する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) のモデルマウスを用いて, 幼若期の抗菌薬暴露が脂肪性肝炎の発症と腸内細菌叢に及ぼす影響を検討した。【方法】C57BL/6J マウスを交配後, 出産 1~2 日前から出産後の仔マウスが離乳する 3 週齢までの間, 母仔同ケージで, 1g/L アンピシリン水溶液または水道水を飲料水として自由摂取させた。離乳後 8 週齢までは通常食を与え, 8~28 週齢の間は通常食の継続またはウェスタンダイエット (D12079B, Research Diet 社) の自由摂取に切替えた。28 週齢 (実験終了時) に, 全仔マウスの採血と肝臓を採取した。NASH の評価には肝臓組織の HE 染色標本上での脂肪化, 小葉内炎症等のスコアおよび血清 ALT 値を用いた。仔マウス各個体の 4, 8, 28 週齢での自然排便を採取し, Miseq (Illumina 社) による菌叢の 16S メタゲノム解析を行った。【結果・考察】雄マウスでは, 陰性対照群 (抗菌薬なし+通常食の継続) に比べて, 陽性対照群 (抗菌薬なし+ D12079B 摂取へ切替え) で NASH スコアと血清 ALT 値が有意に高値であった。NASH が誘導されていたが, 抗菌薬暴露群 (アンピシリン暴露+ D12079B 摂取へ切替え) では有意な影響はみられなかった。糞便中の菌叢構成は, 抗菌薬暴露群において 4 週齢時に菌叢の多様性が著しく低下し *Firmicutes* が 98% 以上を占めていた。今後, 肝臓組織の線維化の程度を NASH の評価に加え, NASH と幼若期のアンピシリン暴露や食餌切替えによる菌叢の経時的な変動との関連を検討する必要がある。

P2-043/DP1-09-08

宿主の加齢と相関するメンブレンベシクル産生腸内細菌の同定

○松下 未来¹, 菊池 薫¹, 野原 正勝², 尾花 望^{3,4}, 野村 暢彦^{4,5} (筑波大・理工情報生命・生命地球科学, ²岡山理科大・獣医, ³筑波大・医学医療系・TMRC, ⁴筑波大・MiCS, ⁵筑波大・生命環境系)

Identification of membrane vesicle-producing gut bacteria correlated with host aging

○Miku Matsushita¹, Kaoru Kikuchi¹, Masakatsu Nohara², Nozomu Obana^{3,4}, Nobuhiko Nomura^{4,5} (Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci. Univ. Tsukuba, ²Fac. Vet., Okayama Univ. Science, ³TMRC, Inst. Med., Univ. Tsukuba, ⁴MiCS, Univ. Tsukuba, ⁵Inst. 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やメンブレンベシクル (MV) が寄与すると考えられている。MV とは直径 20 から 400 nm の球状膜構造体であり、内包する菌体成分を周囲の細胞に輸送している。これまでに腸内細菌由来 MV が様々な宿主生理機能の調節に関与することが示唆されているが、実際の腸管内における MV 産生菌種とその機能については不明な点が多い。本研究では、マウス腸管中における MV 産生細菌を特定するため、異なる週齢のマウスの便より細菌由来 MV を単離し、その DNA を用いた 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を行った。その結果、高齢マウスから単離した MV 画分に含まれる DNA より *Turicibacter* 属細菌が高頻度に検出された。本属細菌の腸管中の存在量は、腸管炎症と正に相関することが報告されていることから、本属菌の産生する MV は炎症性に関与すると予想した。そこで、*Turicibacter* 属細菌より MV を精製し、培養細胞に対する炎症性サイトカイン誘導量を測定したところ、常在細菌である *Bacteroides fragilis* および *B. thetaiotaomicron* 由来の MV と比較して、高い TNF- α および IL-6 誘導能を有することが明らかとなった。さらに、大腸炎モデルマウス系を用いて、*Turicibacter* 属細菌の腸管炎症に対する影響を解析したところ、*Turicibacter* 投与マウスでは大腸炎の症状が有意に悪化した。以上の結果から、*Turicibacter* 属細菌が高齢マウスの腸管内で MV を豊富に産生し、その MV が宿主の腸管炎症を誘発する可能性が示された。

P2-044/DP1-09-11

Adaptive Laboratory Evolution of Minimal Genome Bacterium to Low Temperature

○水谷 雅希¹, 森山 実¹, 古賀 隆一¹, 深津 武馬^{1,2,3}, 柿澤 茂行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)

○Masaki Mizutani¹, Minoru Moriyama¹, Ryuichi Koga¹, Takema Fukatsu^{1,2,3}, Shigeyuki Kakizawa¹ (Bioproduct. Res. Inst., AIST., ²Dept. Bio. Sci., Univ. Tokyo, ³Grad. Sch. Life. Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

JCVI-syn3B is an artificial bacterium whose genome consists of chemically synthesized-essential genes based on the information of *Mycoplasma* genome. The genome size is 545 kbp which is the smallest in isolated and culturable bacteria. JCVI-syn3B is useful for functional analyses of introduced genes and contributed to reveal the minimal gene set for swimming motility in *Spiroplasma*. To precisely reconstitute the function of introduced genes, similarity of optimal growth temperature between gene donor and recipient cells is important, because temperature strongly affect to protein folding. Especially, higher temperature than optimal temperature sometimes causes protein misfolding. The optimal growth temperature of JCVI-syn3B is 37°C which is higher than that of many environmental bacteria. In the present study, we continuously cultivated JCVI-syn3B at lower temperature than 37°C. Growth speed of cells increased with passages and finally the evolved strains could be culturable at 25°C which is unculturable temperature for original cell. The results of proteomics analysis in evolved strains indicated several important functions for low temperature adaptation: RNA degradation, Stabilization of single-stranded DNA in replication, cell division, and glycerol metabolism. Some of them are probably fundamental functions for low temperature adaptation in bacteria.

P2-045/DP1-09-12

人肌加温効果による乾燥面に付着した病原性細菌の生存性制御：加温便座の有効性の検討

○栗城 琴華^{1,2}, 大久保 寅彦¹, 山口 博之¹ (北大・院・保健科学, ²北大・院・医学)

Controlling the viability of bacteria on dry surfaces: the effectiveness of warmed toilet seats

○Kotoka Kuriki^{1,2}, Torahiko Okubo¹, Hiroyuki Yamaguchi¹ (Fac. Health. Sci., Hokkaido Univ., ²Fac. Med., Hokkaido Univ.)

手すり等の高頻度接触面に付着した細菌は接触感染の原因になると懸念されている。本研究室では接触面の菌数の低減策を検討し、手すりを人肌程度に加温すると無加温と比べて菌数が減少することを報告した (Konno et al., PLoS ONE 2023)。一方、手すりの付着菌は手指由来と予想されるのに対し、トイレの便座は糞便細菌が付着しやすく、菌数も手すりより多いと考えられる。本研究では便座の生菌数が表面温度の違いで変化するかを比較し、便座の加温が付着菌数の低減に有効か検討した。便座はアイソレーター内に設置した市販の暖房便座 (TOTO TCF116 #NW1) で、低温・中温・高温のいずれかに設定し使用した。表面温度はサーモグラフィ (FLIR ONE) で便座上 10 点で確認し、低温時 22±3.5°C, 中温時 31±2.6°C, 高温時 37±5.5°C だった。供試菌は大腸菌 (DH5 α) と黄色ブドウ球菌 (ATCC29213) で、培養後に菌液調製して便座に滴下した (10 μ L/spot, 1.0×10⁸CFU/spot)。乾燥直後、24h, 48h, 72h に PBS で洗浄回収し、LB 寒天培地に塗布して集落数から生菌数を算出した。大腸菌生菌数 (CFU/spot) は、低温時は 72h で乾燥直後に対して 1/100 に減少したのに対し、高温時は 72h で 1/10,000 に減少した。黄色ブドウ球菌生菌数 (CFU/spot) は、低温時は 72h までほぼ横這いだったのに対し、高温時は 72h で乾燥直後に対して 1/10,000 まで激減した。両菌種とも生菌数と表面温度の間に負の相関があった (大腸菌 72h: $r=-0.53$, $p<0.05$; 黄色ブドウ球菌 72h: $r=-0.73$, $p<0.01$)。便座の加温は使用時に快適性をもたらすだけでなく、付着菌数の低減にも効果があると考えられる。現在、実際の糞便 (牛糞) を用いて実証中である。会員外協力者：滝川瑞季

P2-046/DP1-09-13

模擬微小重力環境におけるミュータンス菌の抗菌剤に対する感受性変化

○東海林 知佳, 本田 みちよ (明大院・理工研・応用化学)

Changes of Sensitivity to antibiotics against *Streptococcus mutans* under simulated microgravity

○Chika Tokairin, Michiyo Honda (Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech., Meiji Univ.)

【緒言】齲蝕は一般的な口腔疾患の一つであり、微小重力環境である宇宙空間ではその発生リスクが上昇することが確認されている。これは、齲蝕の主要な病原性細菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) をはじめとする種々の細菌の特徴が、宇宙空間で変化することに起因すると推察されているが、詳細は不明である。宇宙空間における口腔衛生の維持を目的とし、本研究では、抗生物質や抗菌ペプチドを用いて、地上重力環境 (1G) と模擬微小重力環境 (SMG) で培養した *S. mutans* に対する薬剤感受性について評価した。【実験・結果】はじめに、1G と SMG での *S. mutans* の増殖性を調べたところ、増殖性に変化は認められなかった。次に、1G と SMG において抗生物質と抗菌ペプチドを *S. mutans* に処理し、薬剤感受性について調査した。その結果、抗生物質を処理した場合では、いずれの薬剤においても感受性が変化しなかった。一方、抗菌ペプチドを処理した場合では、SMG において調査したいずれの薬剤に対しても感受性が低下した。【考察】1G と SMG において増殖性に変化が見られなかったことから、感受性の変化は細菌の増殖性に起因するものではないと考えられる。一方、今回調査した抗菌ペプチドの共通の特徴として、カチオン性であること、分子量が 1000 以上であることが挙げられるが、作用機序はそれぞれ異なる。多くの抗菌ペプチドは細胞膜に孔を形成し細菌内に入り込むが、本研究で使用した抗生物質は膜を透過して細菌内部へ侵入した後に抗菌性を発現する。このことから、*S. mutans* は SMG で培養すると細胞膜の構造や組成に変化が生じ、その結果、カチオン性抗菌ペプチドに対して感受性が低下した可能性が考えられる。

P2-047/DP1-09-14

Effects of *Campylobacter jejuni* infection in the VBNC state on the mouse intestinal tract土田 瑞季¹, 平田 暁大¹, 猪島 康雄^{1,2}, 岡田 彩加^{1,2} (1岐阜大・獣医, 2岐阜大・GeFAH)Mizuki Tsuchida¹, Akihiro Hirata¹, Yasuo Inoshima^{1,2}, Ayaka Okada^{1,2} (1Dept. Vet. Med., Gifu Univ., 2GeFAH., Gifu Univ.)

【背景・目的】*Campylobacter jejuni* は日本における細菌性の食中毒事件発生数第一位の原因菌である。*C. jejuni* の一部は、温度や浸透圧などの環境ストレスにより、生きてはいるが培養ができない、viable but non-culturable (VBNC) 状態となる。一般的に *C. jejuni* は培養法によって分離・検出が行われるため、VBNC 状態の菌は検出されず見逃されている可能性がある。しかし、VBNC 菌がヒトの腸管で増殖し、食中毒の原因となるかは不明である。本研究は、食中毒対応策に VBNC 菌を含めるべきかを検討するため、モデルマウスを用いて VBNC 菌の腸管での定着性、増殖性および病原性を評価することを目的とした。【材料・方法】マウス (C57BL/6, 3週齢, 雄) に *C. jejuni* 投与 2 週間前から亜鉛欠乏食を与え、投与 4 日~1 日前まで複数種類の抗生物質を飲水投与した。*C. jejuni* NCTC11168 株の培養可能菌または VBNC 菌を各 5 匹に 10⁷CFU/匹となるように経口投与し、投与後 1 日おきに臨床症状の観察、経時的な糞便回収および体重測定を行った。回収した糞便は 10% 糞便乳剤とし、mCCDA 培地を用いた直接分離培養またはプレストン培地を用いた増菌培養とともに、リアルタイム PCR により総菌数を定量した。*C. jejuni* 投与後 8 日目に安楽殺し、腸管の病理組織学的解析を実施した。【結果・考察】臨床症状、下痢や血便、体重の変化は培養可能菌、VBNC 菌ともに認められず、腸管の顕著な炎症を示す組織学的変化は認められなかった。培養可能菌投与では、糞便中の菌の増殖が培養およびリアルタイム PCR の両方において認められた。一方 VBNC 菌投与では投与 1 日後以外では菌が検出されず、VBNC 菌はマウス腸管内に定着できないことが示唆された。

P2-048/DP1-02-04

Exploring novel metabolism of modified nucleosides in bacteria

○西口 葉世^{1,2}, 永芳 友^{1,2}, 山村 遼介^{1,2}, 富澤 一仁¹ (1熊本大・医・分子生理, 2熊本大病院・腎臓内科)○Kayo Nishiguchi^{1,2}, Yu Nagayoshi^{1,2}, Ryosuke Yamamura^{1,2}, Kazuhito Tomizawa¹ (1Dept. Mol. Physiol., Fac. Life. Sci., Kumamoto Univ., 2Dept. Nephrol., Fac. Life. Sci., Kumamoto Univ.)

RNA modification contribute to the stability of RNA structure and translational efficiency. Modified RNAs are finally degraded to nucleosides, and the modified nucleosides are excreted outside the cell. In addition, certain modifications are species-specific, and there are differences between bacteria and mammals. In this study, we focused on modified nucleoside profiling induced by co-culture experiments of bacteria and cultured cells. First, we performed co-cultured experiments using *E. coli* and THP-1 cells. LC-MS analysis in the culture medium revealed a novel metabolite under the same mass as methyladenosine. We also performed same experiments using other 23 pathogenic bacterial species. The metabolites was not detected in co-cultures of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus caprae*. We hypothesized that RNA modification enzymes are involved in the appearance of new metabolites. We examined the RNA modification profiling of the two strains. The results showed that the bacterial-specific RNA modification 2-methyladenosine (m2A) was absent in the two strains. From this result, we performed co-culture experiments using RlmN, the m2A modification enzyme, deficient *E. coli*. The new metabolite did not detect from this co-culture medium. These results suggest that RlmN, a bacterial-specific RNA modification enzyme, is involved in the appearance of new metabolites.

P2-049/DP1-02-05

生物種横断的な環化超硫黄分子の生成および生理機能の解明

○松永 哲郎¹, Uladzimir Barayeu¹, 清水 隆之², 守田 匡伸¹, 緒方 星陵¹, Minkyung Jung¹, 増田 真二³, 吉沢 道人⁴, 本橋 ぼつみ⁵, 赤池 孝章¹ (1東北大・院医・環境医学, 2奈良女子大・自然科学・生物科学, 3東工大・生命理工, 4東工大・化生研, 5東北大・院医・医化学)

Generation and physiological functions of cyclo-octasulfur conserved from bacteria to mammals

○Tetsuro Matsunaga¹, Uladzimir Barayeu¹, Takayuki Shimizu², Masanobu Morita¹, Seiryu Ogata¹, Minkyung Jung¹, Shinji Masuda³, Michito Yoshizawa⁴, Hozumi Motohashi⁵, Takaaki Akaike¹ (1Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., 2Fac. Div. Nat. Sci., Biol. Sci. Res. Group, Nara Women's Univ., 3Sch. Life Sci. & Tech., Tokyo Tech, 4Lab. Chem. Life Sci., Inst. Innov. Res., Tokyo Inst. Tech., 5Dept. Med. Biochem., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】我々は、硫黄原子が連鎖・重合 (カテナーション) した超硫黄分子種が生体内で豊富に生成され、硫黄酸化酵素である sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) を介して硫黄呼吸など多様な生理機能を発揮することを明らかにしてきた。本研究では、未だ不明な点が残されている硫黄依存型エネルギー代謝の分子メカニズムの詳細な解析、および、環化超硫黄分子 (cyclo-octasulfur, S₈) に着目した解析を行った。

【方法・結果】単離ミトコンドリアを用いた硫黄呼吸の可視化・定量解析法を独自に開発し、超硫黄分子による膜電位形成を精度よく定量解析した。その結果、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の単離ミトコンドリアにおける膜電位形成が、硫黄ドナー (NaHS および Na₂S₂) の添加により増加し、SQR 依存的であった。一方、超硫黄 S₈ を効率よく捕捉する分子カプセルを用いた質量分析により、硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* および *Allochromatium vinosum* の菌体内で生成する S₈ が検出され、HEK293T 細胞では硫黄細菌に匹敵する高いレベルの S₈ 生成が示された。さらに、シングルミトコンドリア解析により、分子カプセルを添加した直後に HEK293T のミトコンドリア膜電位が著しく消失した。

【考察】本研究において開発した単一ミトコンドリア機能解析システムを用いて、超硫黄分子に依存したミトコンドリアの膜電位形成を精度よく定量分析することで、真核生物の酸素呼吸が、実際は、超硫黄分子と酸素分子によるハイブリッド型のエネルギー代謝であることが示唆された。

P2-050/DP1-02-06

NADPH オキシダーゼおよび一酸化窒素合成酵素を介した超硫黄分子活性化と宿主防御機構

○守田 匡伸¹, 高田 剛¹, 松永 哲郎¹, 井田 智章¹, Minkyung Jung¹, 土屋 幸弘², 渡邊 泰男², 本橋 ぼつみ³, 住本 英樹⁴, 赤池 孝章¹ (1東北大院・医・環境医学, 2昭和薬大・薬理学, 3東北大・加齢医学・遺伝子発現制御, 4九州大院・医・生化学)

Supersulfide activation and host defense through NADPH oxidase and NO synthase

○Masanobu Morita¹, Tsuyoshi Takata¹, Tetsuro Matsunaga¹, Tomoaki Ida¹, Minkyung Jung¹, Yukihiko Tsuchiya², Yasuo Watanabe², Hozumi Motohashi³, Hideki Sumimoto⁴, Takaaki Akaike¹ (1Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., 2Dept. Pharm., Showa Pharm. Univ., 3Dept. Gene Exp. Reg., IDAC, Tohoku Univ., 4Dept. 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。我々には最近、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。これは NOX や NOS の反応においても NADPH から供給される電子を酵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宿主防御機能の解明を目指した。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 (GSSG) を処置し、硫黄代謝物を網羅的に解析した結果、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 GSSG 存在下で NADPH と反応させたところ、NADPH の消費と共に GSSG 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、連結した硫黄から閉環した八硫黄 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へのネズミチフス菌 (*Salmoneella*) 感染モデルにおいて、GSSG 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宿主防御機能を発揮していることが示唆された。

P2-051/DP1-02-12

Investigation of cell motility mechanism of *Spiroplasma* using a minimal synthetic bacterium

○木山花¹, 柿澤茂行², 高橋大地^{1,3}, 宮田真人^{1,4} (1大阪公大・院理, 2産総研・生物プロセス, 3岡山大・異分野基礎科学, 4大阪公大・複合先端)

○Hana Kiyama¹, Shigeyuki Kakizawa², Daichi Takahashi^{1,3}, Makoto Miyata^{1,4} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2Bioproduction Res. Inst., AIST, 3Res. Inst. Interdisciplinary Sci., Okayama Univ., 4OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

Wall-less helical bacteria *Spiroplasma* are parasitic bacteria that infect plants and arthropods, and are widely distributed globally. *Spiroplasma* exhibits a unique swimming motility by alternately switching between left- and right-handed helices of the cell using an intracellular ribbon structure containing five types of bacterial actin, MreBs (MreB1–5). Our previous study using a minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B revealed that co-expression of two different bacterial actins, MreB4–MreB5, reconstructs the swimming motility. However, the mechanism by which the two MreBs drive motility remained unclear. In this study, to discuss relation between the two MreBs and their individual roles, various mutations were introduced into MreB and expressed in JCVI-syn3B. We analyzed helix formation, handedness, and switching behavior of JCVI-syn3B expressing MreB5–MreB4 using optical microscopy. The results suggest the following three points. 1) ATPase activities of both MreB4 and MreB5 are important for switching helicity from right- to left-handed. 2) C-terminal region of MreB5, which is involved in membrane binding, is important for helix formation. 3) The hydrophobic core of domain IA of MreB5 is responsible for the formation of stable right-handed helices.

Based on these results, we propose a model for the swimming mechanism in which MreB4 changes the filament structure of MreB5.

P2-052/DP1-02-13

Sheet-like structure of bacterial actin MreBs driving helicity switching by cryo electron tomography

○湯浅永¹, 笹嶋雄也¹, 木山花¹, 高橋大地^{1,2}, 豊永拓真^{1,3}, 宮田知子^{4,5}, 牧野文信^{4,5,6}, 難波啓一^{4,5}, 宮田真人^{1,3} (1大阪公大・院理, 2岡山大・異分野基礎, 3大阪公大・複合先端, 4阪大・生命機能, 5阪大・日本電子YOKOGUSHI協働研究所, 6日本電子株式会社)

○Haruka Yuasa¹, Yuya Sasajima¹, Hana Kiyama¹, Daichi Takahashi^{1,2}, Takuma Toyonaga^{1,3}, Tomoko Miyata^{4,5}, Fumiaki Makino^{4,5,6}, Keiichi Namba^{4,5}, Makoto Miyata^{1,3} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2RIIS, Okayama Univ., 3OCARINA, Osaka Metropolitan Univ., 4Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., 5JEOL YOKOGUSHI Res. Alliance Lab., Osaka Univ., 6JEOL Ltd.)

Spiroplasma are parasitic bacteria that infect arthropods and plants. They exhibit a unique swimming behavior in viscous liquids by switching handedness of their helical cells. Previously, our group reconstituted the helicity switching swimming in a nonmotile minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B (syn3B) by expressing MreB4 and MreB5. Here, we performed cryo-electron tomography to visualize the MreB filaments reconstituted in syn3B, which is advantageous for observation of internal structures because of the cell thickness. Syn3B cells expressing MreB showed a various morphology, we focused on a strain expressing an ATPase-deficient mutant of MreB4 and the wild-type MreB5, which showed high proportion of helical cells. Sheet-like structures composed of 6 to 10 protofilaments aligned underneath the cell membrane. The sheet-structure was partially double-layered. A strain only expressing the wild-type MreB5 showed sheet-like structure as well.

P2-053/DP1-02-14

Haloplasma motility reconstituted in minimal synthetic bacterium, JCVI-syn3B

○三村萌音¹, 木山花¹, 加藤真悟², 笹嶋雄也¹, 上野山敦子¹, 柿澤茂行³, 宮田知子⁴, 牧野文信⁴, 難波啓一⁴, 宮田真人^{1,5} (1大阪公大・院理, 2理研・BRC・JCM, 3産総研・生物プロセス, 4大阪大・院理・生命機能, 5大阪公大・複合先端)

○Mone Mimura¹, Hana Kiyama¹, Shingo Kato², Yuya Sasajima¹, Atsuko Uenoyama¹, Shigeyuki Kakizawa³, Tomoko Miyata⁴, Fumiaki Makino⁴, Keiichi Namba⁴, Makoto Miyata^{1,5} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2RIKEN BRC., JCM, 3Bioproduction Res. Inst., AIST, 4Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., 5OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

MreB is a bacterial actin protein that serves as a scaffold for peptidoglycan synthesis. However, *Spiroplasma*, parasitic bacteria lacking the cell wall, have five types of MreB and swim by switching their helicity between left and right. Previously, our group reconstructed *Spiroplasma* swimming in JCVI-syn3B (Syn3B), a spherical, non-motile minimal synthetic bacterium, by expressing pair of MreB. In this study, we focus on a deep sea bacterium, *Haloplasma contractile* which positions phylogenetically close to walled bacteria in wall less class Mollicutes including *Spiroplasma*. *Haloplasma* have 7 MreB homologs named HMreBs 1~7, which are related distantly to *Spiroplasma* MreBs. We succeeded in reconstructing *Haloplasma* like coiling motility by expressing all 7 HMreBs in Syn3B. The Syn3B cell formed coils along the long axis of the cell, distinct from *Spiroplasma* swimming. Sequence analysis revealed that HMreBs can be categorized into three phylogenetic groups. We found that the expression of HMreB pairs from different groups gives rise to motility in Syn3B. These results suggest that *Haloplasma* motility was generated by differentiation and combination of two MreB proteins.

P2-054/DP1-02-15

Stator dynamics of hybrid-fuel *E. coli* flagellar motor observed by fluorescence microscopy

○庄司智哉¹, 日高直樹², 蔡荣淑³, 曾和義幸^{1,2} (1法政大・生命・生命機能, 2法政大・ナノテク, 3大阪大・院生命機能)

○Tomoya Shoji¹, Naoki Hidaka², Yong-Suk Che³, Yoshiyuki Sowa^{1,2} (1Dep. Front. Biosci., Hosei Univ., 2Micro-Nano Tech., Hosei Univ., 3Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ.)

The bacterial flagellar motor rotates driven by an electrochemical ion gradient across the membrane. It consists of a rotor and multiple ion-conducting stator units. The binding of stator units to a rotor is enhanced by the ion-motive force for the coupling ion and the rotational torque (Fukuoka et al. Ito et al.). The rotational torque, however, is closely related to the ion-motive force; therefore, it is unclear whether coupling ion is directly required for the stator assembly. *E. coli* has an H⁺-driven stator in Nature, and a chimeric stator supports the rotation of an *E. coli* motor driven by Na⁺. When *E. coli* cells express wild-type H⁺- and chimeric Na⁺- stator units, their motor works as a hybrid fuel type. This motor can be driven by both H⁺ and Na⁺ in the presence of Na⁺ and only by H⁺ in the absence of Na⁺. In this study, we attempted to monitor the assembly of GFP-fused chimeric Na⁺ stator units in the motor driven by only H⁺- stator units without Na⁺. We first constructed a GFP-fused chimeric stator and confirmed it disassembled without Na⁺. We then measured the rotation of the *E. coli* cells' motor with H⁺- and GFP-fused Na⁺- stator and confirmed it works as a hybrid-fuel motor. We will discuss the stator dynamics at varying Na⁺ concentrations in functioning motors by combining motor rotation assay and total internal reflection fluorescence microscopy.

P2-055/DP1-02-16**Inner cellular structure of *Mycoplasma mobile* gliding machinery observed by electron cryotomography**

○福島 秀実¹, 宮田 知子^{2,3}, 難波 啓一^{2,3}, 豊永 拓真¹, 宮田 真人^{1,4} (1大阪公大・院理, 2大阪大・院生命機能, 3大阪大・日本電子YOKOGUSHI協働研究所, 4大阪公大・複合先端研)

○Minoru Fukushima¹, Tomoko Miyata^{2,3}, Keiichi Namba^{2,3}, Takuma Toyonaga¹, Makoto Miyata^{1,4} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 2Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., 3JEOL YOKOGUSHI Res. Alliance Lab., Osaka Univ., 4OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

Mycoplasma mobile features a unique gliding machinery located at the cell pole. This machinery comprises both inner and surface structures. The surface structures consist of three proteins, including an adhesion protein. The inner structure is divided into a bell and chains, with the chains anchored to the bell and aligned along the cell membrane. The components of the chain are gliding motors and spacers. The gliding motor is a complex which evolved from the F-type ATP synthase and generates gliding force through the hydrolyzation of ATP. Previous reports indicated that the chains form a sheet by linking adjacent ones, and the spacer is a cylindrical structure with a 6 nm diameter and 13 nm height, extending vertically to the cell membrane. The formation of the sheet, which supports the membrane, is believed to maintain the shape of the wall-less *M. mobile*. In the present study, we employed electron cryotomography for a detailed observation of the machinery. Our findings reveal that the spacer also extends 24 nm horizontally toward the cell membrane. Overlaying the chain structure with the previously observed sheet structure suggests that the spacer is involved in linking adjacent chains. Furthermore, the spacer may play a role in anchoring the chain to the cell membrane. We will discuss about construction of the machinery, focusing on connection of each complex.

P2-056/DP1-02-17**Visualization and analysis of MreBs driving *Spiroplasma* motility in minimal synthetic bacterium**

○田中 芳樹¹, 木山 花¹, 豊永 拓真^{1,2}, 宮田 真人^{1,2} (1大阪公大・院理, 2大阪公大・複合先端)

○Yoshiki Tanaka¹, Hana Kiyama¹, Takuma Toyonaga^{1,2}, Makoto Miyata^{1,2} (1Grad. Sch. Sci., Osaka Metro Univ., 2OCARINA, Osaka Metro Univ.)

Spiroplasma, parasitic bacteria, swim by switching the handedness of their helical cell body. Previously, our group reconstituted this motility in JCVI-syn3B, a minimal synthetic bacterium, by expressing bacterial actin proteins MreB4 and MreB5, two of the five MreBs involved in *Spiroplasma* swimming (Kiyama H et al., Sci Adv 2022). Fluorescence observation of mCherry-fused MreB5 in live cells suggested that MreB5 forms relatively stable filaments. On the other hand, fluorescent labeling at 16 locations of MreB4 did not result in motile strains, suggesting stringent structural constraints on MreB4's function. We also discussed the function of MreB through the changes in cell motility by the addition of the MreB polymerization inhibitor A22. Single residue substitution known to confer A22 resistance in other bacteria, was introduced in MreB4, to limit the effect of A22 solely on MreB5. The construct showed cells with reduced helicity and motility even in the presence of A22, while the WT exhibited stalling and straightening, suggesting that de novo MreB5 polymerization might not be necessary for the motility. In order to trace behavior of MreB5 molecules, Halo-Tag was inserted at the same position with the mCherry fusion and observed by TIRF microscopy. Fluorescent particles were observed to travel along the cell axis in cells with reduced movement and shorter helical pitch.

P2-057/DP1-08-05**コレラ菌タウリン走性受容体遺伝子の高温による発現誘導メカニズム**

○佐藤 沙知香¹, 山内 那津¹, 小野木 汐里¹, 田島 寛隆^{2,3}, 川岸 郁朗^{1,2,3} (1法政大・院理工・生命機能, 2法政大・生命科学・生命機能, 3法政大・ナノテクセンター)

Induction of the *Vibrio cholerae* taurine chemoreceptor gene in higher temperature

○Sachika Sato¹, Natsu Yamauchi¹, Shiori Onogi¹, Hirokata Tajima^{2,3}, Ikuro Kawagishi^{1,2,3} (1Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., 2Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., 3Res. 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、胆汁の構成成分であるタウリンおよび多くのアミノ酸を認識する。Mlp37 をコードする遺伝子 (*mfp37*) 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。本研究では、まず、*mfp37* の転写に対する病原性遺伝子転写制御因子 ToxR, TcP 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 *mfp37* プロモーター活性が 37°C で培養したときと同じレベルまで上昇したことから、*mfp37* の転写は病原性と関連した制御を受けることが示唆された。つぎに、テトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子 *tetA* をレポーターとした菌株 (30°C で Tc 感受性, 37°C で Tc 耐性) を構築し、30°C で Tc 耐性となる変異体を単離した。得られた変異体を解析した結果、コーディング領域上流の縦列・逆位反復配列 (DR, IR) の一部が失われると 30°C での転写量が増加したことから、これらの配列が温度依存性に関与すると示唆された。さらに、RNA シャペロン Hfq の遺伝子を欠失させると培養温度に関わらず *mfp37* プロモーター活性が著しく低下した。以上の結果から、Mlp37 が感染過程で働くこと、*mfp37* の転写には RNA シャペロン Hfq が関与すること、DR, IR に作用し 30°C で転写を抑制する ToxR 依存的機構が存在することが示唆された。

P2-058/DP1-08-06**青枯病菌 OE1-1 株におけるクオラムセンシングから独立した病原力制御経路**

○植山 竜弘¹, 館田 宇宙¹, 木場 章範¹, 大西 浩平¹, 井上 加奈子², 曳地 康史¹, 都筑 正行¹ (1高知大・農林海洋, 2奈良先端大・バイオ)

Quorum sensing-independent virulence regulation pathway in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1

○Tatsuya Ueyama¹, Sora Tateda¹, Akinori Kiba¹, Kouhei Ohnishi¹, Kanako Inoue², Yasufumi Hikichi¹, Masayuki Tsuzuki¹ (1Fac. Agric. Marine Sci., Kochi Univ., 2Div. Bio. Sci., NAIST)

土壌生息性グラム陰性細菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* OE1-1 株は、宿主植物の根の成長帯の皮層上で、クオラムセンシング (QS) を起動し、皮層細胞内に感染してマッシュルーム型バイオフィーム (mBF) を形成する。その後、OE1-1 株は導管へ感染し、感染植物は萎凋症状を引き起こす。この mBF 形成は、皮層上での QS 起動とともに OE1-1 株の病原性に不可欠な感染過程である。mBF 形成は、QS により産生・分泌が誘導されるラルフラノン (Ral) を必要とするが、QS により抑制される。すなわち、QS とは独立して、Ral は病原力制御に関与する。本研究では、QS とは独立した、Ral による病原力制御機構の解明を目的に、まず、QS 能喪失株と Ral 産生能喪失株のトランスクリプトームを RNA-seq 法による解析し、Ral 依存的に産生が誘導される、新奇の AcrR 型転写制御因子 RSp0599 を見出した。RSp0599 遺伝子欠損株 (Δ RSp0599) 接種トマト植物では根の皮層細胞内で正常な mBF とは異なる凝集体が認められ、成長帯の導管への感染は認められなかった。しかし、トマト植物の地際部の導管での Δ RSp0599 感染が認められ、 Δ RSp0599 接種トマトの萎凋症状の進行は、OE1-1 株接種トマト植物と比較して早まった。さらに、病原因子である主要な菌体外多糖 EPS I の産生に関連する *eps* 遺伝子群の発現が OE1-1 株と比較して有意に低下したが、EPS I 産生能は有意に増加した。これらの結果から、 Δ RSp0599 の病原力の上昇は、mBF の秩序性の喪失による感染経路の変更と EPS I の過剰産生によると考えられた。そして、RSp0599 は、QS と独立して、根の皮層細胞内で形成される mBF 構造の秩序性と EPS I 産生の制御に関与すると考えられた。

P2-059/DP1-08-07

大腸菌ヒスチジンキナーゼ BaeS は細胞質ドメインでインドールを感知する

○田島 寛隆^{1,2}, 山本 健太郎³, 井芹 友香¹, 武井 陸⁴, 川岸 郁朗^{1,2,4} (1)法政大・生命科学・生命機能, (2)法政大・ナノテクセンター, (3)国立感染症研・感染制御, (4)法政大・院理工・生命機能)

The histidine kinase BaeS senses indole in its cytoplasmic domain

○Hirota Tajima^{1,2}, Kentaro Yamamoto³, Tomoka Iseri¹, Riku Takei⁴, Ikuro Kawagishi^{1,2,4} (1)Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., (2)Res. Cen. Micro-Nano Tech., Hosei Univ., (3)Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, (4)Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ.)

大腸菌二成分制御系ヒスチジンキナーゼ BaeS はインドールを感知し、ペリプラズムシャペロン、異物排出トランスポーターなどの遺伝子の発現を調節する。しかし、BaeSの活性化には2 mM以上ものインドールが必要なことから、実際には高濃度インドールによって引き起こされた膜ストレスをBaeSが感知すると提唱されている。ところが、当研究室では、インドールの細胞外排出に関わる *tolC* を欠失させると、異物排出トランスポーター遺伝子 *acrD* が構成的に発現することを見出した。さらに、*baeS* やインドール合成酵素遺伝子 *tnaA* を欠失させるとこの発現が失われることから、BaeS は細胞内に蓄積されたインドールを感知することが示唆された。そこで、ペリプラズムドメインを欠失させた BaeS を発現させたところ、大腸菌野生株では *acrD* が発現し、*tolC* 欠失株では発現が抑制された。この応答は全長 BaeS によるものと正反対であるが、BaeS の細胞質ドメインもしくは膜貫通ドメインがインドール感知に関わっていることを示唆している。そこで次に、膜貫通ドメインがインドール感知に必須かどうか調べるため、BaeS の HAMP ドメイン直後に Gly₇ 残基を挿入し、外部シグナルを遮断した変異体 BaeS を構築した。その結果、Gly₇ 挿入 BaeS を発現した菌は *tolC* を欠失させると *acrD* プロモーター活性が低下した。すなわち、ペリプラズム欠失 BaeS と同じく、野生型 BaeS 発現菌と比較して逆転した応答を示した。したがって、Gly₇ 挿入 BaeS はインドール感知機能を保持していると推定され、BaeS の細胞質ドメインがインドール感知に関わると考えられた。

P2-060/DP1-08-08

南極大陸で分離した微生物からのバイオフィーム阻害剤のスクリーニング

○阿座上 弘行^{1,2}, 木下 颯², Ayesha Siddiq², 林 昌平³ (1)山口大・中高温微生, (2)山口大・農・生物機能, (3)島根大・生物資源・環境共生)

Screening for biofilm inhibitors from microorganisms isolated in Antarctica

○Hiroyuki Azakami^{1,2}, Hayato Kinoshita², Ayesha Siddiq², Shohei Hayashi³ (1)Res. Cent. Thermotolerant Microb. Resources, Yamaguchi Univ., (2)Dept. Biol. Chem., Fac. Agr., Yamaguchi Univ., (3)Dept. Env. Sustain. Sci., Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

19 地点の南極土砂サンプルから 7 綱 40 属に分類される細菌約 1500 株を単離・同定し、それらは南極微生物ライブラリーとして凍結保管した。その中のエキドリ管巣跡から単離された約 200 株について、病原菌のバイオフィーム形成への影響をスクリーニングした。ライブラリーの菌株を 15°C、10 日間または 25°C、7 日間培養した後、培養上清を調整した。これらの培養液を緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 及びびう蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* UA159 の培養液に添加し、バイオフィーム形成量を定量した。スクリーニングの結果、192 株中 10 株の培養液が *P. aeruginosa* に対して、6 株の培養液が *S. mutans* に対してバイオフィーム形成を 60% 以上阻害した。強い活性を示した株の半数以上が *Bacillus* 属に分類されるものであり、同じ管巣跡から分離されたものであった。 *P. aeruginosa* に対して強い阻害を示した 10 株のうち 5 株を再培養してそれらの培養上清のバイオフィーム阻害を調べたところ、4 株において高い阻害活性が確認できた。その 4 株全てが 4% 濃度でも阻害が見られ、うち 1 株は 1% 濃度でも阻害が見られた。また、 *S. mutans* に対して強い阻害活性を示した 6 株のうち 5 株を再培養してそれらの培養上清のバイオフィーム阻害を調べたところ、1 株において高い阻害活性が確認できた。その株は 4% 濃度でも阻害が見られた。さらに、この株の培養上清は *S. mutans* の増殖を阻害したことから、増殖阻害によるバイオフィーム阻害効果であることが示唆された。

P2-061/DP1-08-09

PTS と TCS 間で保存的に新規糖刺激を伝えるコネクター RcsG

○山口 和宣, 保山 菜穂子, 萩原 慧, 深見 知可, 川畑 海翔, 加藤 明宣 (近畿大・農・バイオ)

RcsG, conserved connector transmitting a novel sugar stimulus from PTS to TCS

○Kazunobu Yamaguchi, Naoko Hozan, Kei Hagihara, Tomoka Fukami, Kaito Kawabata, Akinori Kato (Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai Univ.)

細菌は情報伝達機構の Two-component system (TCS) を複数備えている。一般的な TCS では、ヒスチジンキナーゼ (HK) が環境変化をシグナルとして感知しレスポンスレギュレーター (RR) へのリン酸リレーを介し標的遺伝子の発現が制御される。 *Salmonella typhimurium* の病原調節ネットワークでは、小タンパク質のコネクターが複数の TCS 間を繋ぐ重要な役割を担うことが近年明らかとなった。一方、糖取り込み系の一つの Phosphotransferase system (PTS) は、解糖系のホスホエノールピルビン酸由来のリン酸が PTS タンパク質を経由して糖の取り込みと同時にそれをリン酸化する。加えて、リン酸リレーは情報伝達の役割も担う。本研究では、 *S. typhimurium* とその近縁種において PTS と TCS の間で糖刺激を伝える新規コネクター RcsG について報告する。

変則的な TCS の RcsBCD 系は、細胞表面のストレスを感知することで HK の RcsC から HPT ドメインを含む RcsD を介し RR である RcsB へのリン酸リレーにより莢膜多糖合成遺伝子群 (*cps*) を活性化する。これまでに、 *cps* 発現を活性化し、RcsD と相互作用する因子として *rscG* 遺伝子を含むクローンが単離された。本研究では、 *rscG* を含む遺伝子クラスターの推定から、N-アセチル-D-グルコサミン酸 (GlcNAc) が PTS の転写因子をコードする *rscH* 依存的に RcsG の発現を誘導し、 *cps* を活性化することを見出し、この糖刺激の受容から始まる一連のネットワークが明らかとなった。更に、エンテロバクター (*Enterobacter asburiae*) においては、通常の培養条件下 (LB) で RcsH, RcsG, RcsB 依存的に *cps* 発現が活性化されることから、この細菌の環境中での GlcNAc 生産者としての役割が示唆された。

P2-062/DP1-08-15

MamJ regulates MamK polymerization to form a dynamic cytoskeleton for magnetosome positioning

○潘 遠媛¹, 奥田 喜弘², 齋藤 拓海¹, 田岡 東^{3,4} (1)金沢大・院・自然科学, (2)金沢大・理工・生命理工, (3)国立遺伝学研究所・生命情報・DDBJセンター, (4)金沢大・ナノ生命)

○Yuanyuan Pan¹, Yoshihiro Okuda², Takumi Saito¹, Azuma Taoka^{3,4} (1)Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., (2)Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., (3)Bioinf. DDBJ Ctr. Natl. Inst. Genet., (4)NanoLSI, Kanazawa Univ.)

MamK is one of the bacterial actin-like proteins known for its distinctive feature, which can be utilized to position a magnetic organelle called a magnetosome within magnetotactic bacterial cells. While it has been reported that MamJ plays a role in regulating MamK filament dynamics in vivo, contributing to the maintenance of dynamic filaments, the molecular role of MamJ in the MamK cytoskeleton remains inadequately elucidated. In this study, our focus is directed toward unraveling the molecular role of MamJ in MamK polymerization in vitro. We analyzed MamJ activity on MamK polymerization using purified *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 MamJ and MamK proteins. We performed a light scattering assay to investigate the effects of MamJ on MamK polymerization in vitro. Adding MamJ caused decreasing light scattering intensities in a MamJ concentration-dependent manner, indicating that MamJ affects the structure of MamK polymer. Then, we observed the dynamic MamK polymerization process in the presence of MamJ using high-speed AFM. As a result, MamK formed short filaments with uniform length distribution in the presence of MamJ. This result indicated that MamJ regulates its polymerization property to form short and dynamic networks of MamK filaments. We are currently analyzing MamJ amino acid sequences essential in regulation for MamK polymerization using a series of MamJ mutants.

P2-063/DP1-08-16**Biochemical Analysis of Cell Division Protein FtsZ of *Haloplasma contractile***

○藤田 寛興, 笠井 大司, 塩見 大輔 (立教大・理)

○Hirooki Fujita, Taishi Kasai, Daisuke Shiomi (Dept. Life Sci., Col. Sci., Rikkyo Univ.)

Most bacteria are surrounded by a cell wall and their division relies on the formation of a Z-ring at the division site. The Z ring is mainly composed of FtsZ and serves as a scaffold for enzymes required for cell wall synthesis and hydrolysis at the division site. Bacteria such as *Mycoplasma* have lost their cell wall during evolution. However, it still encodes the *ftsZ* gene on its genome. As mentioned earlier, FtsZ is thought to regulate cell wall synthesis at the division site, but how was the function of FtsZ changed or kept when the cell wall was lost during evolution? *Haloplasma contractile* is an anaerobic bacterium belonging to the class *Mollicutes*, and like *Mycoplasma*, it encodes *ftsZ* in its genome. While it is controversial whether *H. contractile* is surrounded by a cell wall, it is in the phylum *Mollicutes* that is closest in lineage to *Bacillus subtilis* which is surrounded by a cell wall. Therefore, elucidating the function and biochemical characterization of FtsZ in *H. contractile* and comparison with those of FtsZ of *B. subtilis* and *Mycoplasma* would help to understand how the function of FtsZ has evolved during the evolutionary process. In this study, we report the purification of FtsZ from *H. contractile* and its biochemical characteristics.

P2-064/DP1-08-17**凍結割断/SEM 法による歯周病原細菌とその外膜小胞の微細構造の可視化**○高橋 葵^{1,2}, 小林 宏尚³, 長田 勝英^{1,4}, 安部 公博¹, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹, 中村 知世^{1,2,4}, 西野 智彦^{2,4}, 中尾 龍馬¹ (1)感染研・細菌1, (2)工科大・バイオニクス, (3)感染研・感染病理, (4)工科大・応生)**Visualization of periodontopathic bacteria and the outer membrane vesicles by freeze fracture/SEM**○Aoi Takahashi^{1,2}, Hiroataka Kobayashi³, Katsutoshi Osada^{1,4}, Kimihiro Abe¹, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiko Akeda¹, Tomoyo Nakamura^{1,2,4}, Tomohiko Nishino^{2,4}, Ryoma Nakao¹ (1)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Grad. Sch. Bionics, Tokyo Univ. Technol., (3)Dept. Pathology. I, Natl. Inst. Infect. Dis., (4)Sch. Biosci. Biotechnol, Tokyo Univ. Technol.)

【目的】歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) はジンジパイン、アニオン性リポ多糖 (A-LPS)、線毛等の病原因子を保有する。これらの病原因子は外膜小胞 (OMVs) と呼ばれる微粒子に濃縮されて菌体外に放出される。本研究では、Pg 菌体及び OMVs の微細構造と病原因子の局在を可視化できる凍結割断/走査型顕微鏡 (SEM) 法の確立を目指した。【方法】Pg 野生株と IX 型分泌機構 (T9SS) 欠損株の培養液の沈渣と上清から、それぞれ菌体と OMVs を回収した。菌体を更に分画し、外膜・ペリプラズム・内膜・細胞質の各画分を得た。OMVs は、ナノフローサイトメーター、SEM、SDS-PAGE により、その形状と組成の解析を行った。凍結割断/SEM では、菌体や OMVs を包埋剤に封入後、液体窒素中で割断して内部構造を観察した。【結果と考察】各種病原因子の抗体を用いた免疫 SEM 等の結果から、T9SS 欠損株は野生株と比べて、菌体や OMVs の表面構造が滑沢で、線毛、ジンジパイン、A-LPS の発現量が著しく低下または欠損することが明らかとなった。また野生株の菌体の割断面と非割断面に対する A-LPS 抗体と金コロイド二次抗体による免疫 SEM では、割断面の菌体外周と非割断面の菌体表面にシグナルを得たことから、菌体内外の分子局在を可視化する凍結割断/SEM 法が確立された。尚、菌体内部には充実性の構造物が観察される一方で、現時点では OMVs 内部に充実性の構造物は観察されていない。今後、凍結割断/SEM 法による OMVs 内外の微細構造および分子局在の可視化を目指している。

P2-065/DP2-20-01**The type VII secretion system's EsxA reveals a novel function in the sporulation of *Bacillus cereus***○Harvey Kamboyi¹, 東 秀明¹, Atmika Paudel¹, Misheck Shawa¹, 菅原 未紗¹, Tuvshinzaya Zorig¹, Joseph Chizimu¹, 古田 芳一¹, Bernard Hang'ombe², Musso Munyeme³ (1)北大・人獣共通感染症国際共同研究所・感染・免疫, (2)Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, (3)Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)○Harvey Kamboyi¹, Hideaki Higashi¹, Atmika Paudel¹, Misheck Shawa¹, Misa Sugawara¹, Tuvshinzaya Zorig¹, Joseph Chizimu¹, Yoshikazu Furuta¹, Bernard Hang'ombe², Musso Munyeme³ (1)Div. Infection and Immunity, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., (2)Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, (3)Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

Bacillus cereus is a spore-forming bacteria that produces a variety of effectors important for niche adaptation and the development of various infections. Among these is EsxA, the major effector of the type VII secretion system (T7SS). EsxA's roles within the bacterial cell have not yet been reported, although some studies have suggested it may play a role in sporulation. *B. cereus* ATCC14579 was used to generate the T7SSb mutant, Δ essC, and, comparatively, analyzed the culture supernatant of wild type and the Δ essC mutant through LC-MS/MS. Based on LC-MS/MS results, we further generated T7SSb-specific gene deletions to investigate their roles on growth under normal and stress conditions. From LC-MS/MS analysis, we identified a pair of nearly identical (94%) effector proteins named EsxA belonging to the sagEsxA-like subfamily of the WXG100 protein superfamily in the culture supernatant of the wild type and none in the Δ essC mutant. Independent deletions of *esxA1* and *esxA2* resulted in strains with similar phenotypes and growth rates under all conditions. In contrast, the Δ esxA1 Δ esxA2 deletion resulted in significantly fewer viable spores and a slower sporulation process. The maximum spore ratios for the wild type and Δ esxA1 Δ esxA2 were 0.96 and 0.72, respectively. These results indicated that EsxA1 and EsxA2 are required for sporulation in *B. cereus* ATCC14567.

P2-066/DP2-20-02**Novel structure of lipoteichoic acid in *Apilactobacillus kosoii* and its IgA-inducing activity**○白石 宗¹, 松崎 千秋², 邱 泰瑛³, 久米田 博之⁴, 川田 真実², 山本 憲二⁵, 高橋 知也⁶, 横田 伸一¹ (1)札幌医科大学・医・微生物, (2)石川県大・生物資源工学, (3)北見工大・バイオ環境化学, (4)北大・先端生命科学, (5)和歌山大, (6)アルソア慧央グループ・アルソアR&Dセンター)○Tsukasa Shiraishi¹, Chiaki Matsuzaki², Tai-Ying Chiu³, Hiroyuki Kumeta⁴, Manami Kawada², Kenji Yamamoto⁵, Tomoya Takahashi⁶, Shin-ichi Yokota¹ (1)Dept. Microbiol., Sch. Med., Sapporo Medical Univ., (2)Research Inst. Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural Univ., (3)Dept. Biotechnol. Environ. Chem., Kitami Inst. Technology, (4)Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ., (5)Wakayama Univ., (6)ARSOA Research & Development Center, Arsoa Keioh Group Corp.)

Gram-positive bacterial lipoteichoic acid (LTA), an accessory molecule in the cell wall, acts as an immunomodulatory factor on host cells. The chemical structures of LTA vary among bacterial species and strains, and may be related to biological activities. In our previous work, much higher immunoglobulin A (IgA)-inducing activity was observed in cells of the *Apilactobacillus kosoii* 10H^T than those of other lactic acid bacteria, and their LTA was responsible for the activity. In the present study, we elucidated the chemical structures of LTA from *A. kosoii* 10H^T to explore the structure-function relationship of the high IgA-inducing activity. The ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy suggested that LTA had a glycerolphosphate polymer as a hydrophilic main chain with partial substitution of glucose(α 1-, glucosyl(α 1-2)glucose(α 1-, and L-lysine at the C-2 hydroxyl group of the glycerol residue. This is the first report of L-lysine in bacterial LTA. Anchor glycolipids of LTA were typical dihexosyldiacylglycerol. Removal of L-lysine from LTA by mild alkaline treatment decreased IgA induction in mouse Peyer's patch cells. The novel L-lysine residue in *A. kosoii* 10H^T LTA plays a crucial role in the remarkably high IgA-inducing activity.

P2-067/DP2-20-03

The biosynthesis of glycopeptidolipid in nontuberculous bacteria

○藤原 永年¹, 宮本 友司², 星野 仁彦², 慶長 直人³, 中屋 慎⁴, 前田 伸司⁵
(¹塚根山大学・現代生活・食物栄養, ²国立感染症研・ハンセン研, ³結核予防会・結核研, ⁴大阪公立大・研究推進機構, ⁵北海道科学大・薬・薬)

○Nagatoshi Fujiwara¹, Yuji Miyamoto², Yoshihiko Hoshino², Naoto Keicho³, Makoto Nakaya⁴, Shinji Maeda⁵ (Dept. Food Nutrition, Facult. Contemp. Human Life Scie., Tezukayama Univ., ²Nat. Inst. Infect. Dis.: Lep. Res. Cent., ³The Res. Inst. TB, Jap. Anti-TB Assoc., ⁴Org. Res. Prom., Osaka Metrop. Univ., ⁵Fac. Pharm., Hokkaido Univ. Scie.)

MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) is one of the major nontuberculous bacteria, and is classified into 28 serotypes by the serotype-specific glycopeptidolipid (GPL). We have reported the deletion of GPL in some strains. The colony morphology of the GPL-deleted strains changed rough-type instead of smooth-type, and implies to affect their virulence and pathogenicity. In this study, we focused the GPL biosynthesis in MAC strains. We showed the features of a clinical isolate, *M. intracellulare* Ku11 which produced a novel GPL. Its oligosaccharide was composed of six sugar moieties. We analyzed the gene cluster involved in the GPL biosynthesis, and found the similarity of the deduced amino acid sequences in the eight open reading frames (*orfs*) of Ku11. *M. intracellulare* NF113 produces serotype-1 GPL which oligosaccharide is composed of just only two sugar moieties. We introduced the *orf1-8* of Ku11 into *M. intracellulare* NF113, and the GPL was replaced to Ku11-GPL from serotype-1 GPL. The gene cluster of *orf1-8* was functionally responsible for the complete elongation of oligosaccharide in Ku11-GPL. We also deleted the *orf1* in the Ku11 genome by CRISPR-Cas9 system. This mutant produced serotype-1 GPL, and the *orf1* was identified as glycosyltransferase at second Rha position. We discuss the structural and functional diversity of GPLs.

P2-068/DP2-20-04

Vibrio FliK and FlhB catalyze export switching of the Salmonella flagellar type III secretion system

○南野 徹¹, 木下 実紀¹, 難波 啓一^{1,2} (¹大阪大・生命機能, ²大阪大・日本電子YOKOGUSHI協働研究所)

○Tohru Minamino¹, Miki Kinoshita¹, Keiichi Namba^{1,2} (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ²JEOL YOKOGUSHI, Osaka Univ.)

The bacterial flagellum is a supramolecular motility machine consisting of the basal body, the hook, and the filament. For construction of the flagella on the cell surface, the flagellar type III secretion system (FT3SS) transports flagellar structural subunits from the cytoplasm to the distal end of the growing flagellar structure. The hook length is relatively well controlled at about 55 nm in *Salmonella* by the FT3SS using a secreted molecular ruler protein, FliK, to monitor the assembly state of the hook structure. When the hook length reaches about 55 nm, FliK transmits the hook length signal to FlhA through an interaction between FliK and FlhB. As a result, the FT3SS switches substrate specificity from the rod-hook-type to the filament-type, terminating hook assembly and initiating filament assembly. However, it is still unclear how the hook length signal is transmitted to FlhA via FliK and FlhB. In this study, we performed a cross-complementation assay in *Salmonella* and provide experimental evidence that *Vibrio* FliK and FlhB can catalyze the substrate specificity switching of the *Salmonella* FT3SS to a significant degree. Based on the results obtained in this study, the export switching mechanism of the FT3SS will be discussed.

P2-069/DP2-20-05

9型分泌機構関連タンパク質 PorE の機能解析

富永 孝志, 〇庄子 幹郎, 雪竹 英治, 内藤 真理子 (長崎大院・医歯薬・口腔病原微生物学)

Functional analyses of a T9SS PorE protein

Takashi Tominaga, 〇Mikio Shoji, Hideharu Yukitake, Mariko Naito (Dept. Microbiol. Oral Infect. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

【目的】歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* は 9 型分泌機構 (T9SS) によりジンジパインと呼ばれる強力なタンパク質分解酵素を分泌する。以前、血液寒天培地上の黒色集落形成を指標にしてトランスポゾン挿入位置を調べた際に T9SS 関連タンパク質 PorE の C 末端側にはトランスポゾンが全く挿入されなかったことから、その部分は機能に無関係と考えていた。PorE は外膜内葉に存在するリポタンパク質であり、PorE-PorP 複合体を形成する。本研究では PorE の機能解析について調べた。【方法】(1) PorE は N 末端側より TPR, WD40, CRD, OmpA という 4 つのドメインからなる。それぞれのドメイン欠損 PorE の機能性について調べた。(2) PorE リポタンパク質の重要性について調べた。(3) PorP の挿入変異株と完全欠損株を作製し機能が調べた。(4) ドメイン欠損 PorE は PorP と結合できるかを調べた。(5) PorE 依存型もしくは非依存型の T9SS 分泌タンパク質について調べた。【結果】(1) PorE の CRD 以外の 3 つのドメインは機能に必須であった。(2) PorE の 18 番目と 24 番目の両方のシステムが機能に必須であった。(3) PorP 完全欠損株は下流の遺伝子発現に影響があったが、PorP 挿入欠損株は下流の遺伝子発現に影響がなかった。(4) PorE-PorP の結合には PorE の TPR, WD40 ドメインが重要であった。(5) ジンジパインは PorE 依存型分泌であるのに対し PorA や Hbp35 は PorE 非依存型分泌であった。【考察】ドメイン欠損解析から PorE の C 末端側にある OmpA ドメインは機能に必須であり、特にペプチドグリカンとの結合が重要であることを見出した。また、T9SS 分泌には PorE 依存型または非依存型の分泌機構があることを新規に見出した。

P2-070/DP2-20-06

物質封入膜小胞による受け渡し関連遺伝子の探索

○小松 詩温¹, 白倉 雄紀¹, 野村 暢彦², 豊福 雅典² (¹筑波大・理工情報生命・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系・微生物サスティナビリティ研究センター)

Genetic screening of genes involved in membrane vesicles delivery

○Shion Komatsu¹, Yuki Usukura¹, Nobuhiko Nomura², Masanori Toyofuku² (Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci. Univ. Tsukuba, ²MICS, Fac. Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる数十～数百 nm の膜小胞を形成する。MV には DNA や RNA, シグナル物質が含まれていると報告されている。また、MV は細菌間のコミュニケーションや遺伝子の水平伝播などに使用されることが知られている。MV による DNA などの物質送達において、MV の形成、伝播、付着・融合の過程があるとされている。形成メカニズムについてはグラム陰性、陽性細菌の機構は明らかになっている。一方で、付着・融合することで MV が細菌に受け渡されるとされるが、それらに関わる遺伝子やメカニズムについては未だに明らかになっていない。本研究では MV が受け渡されているのかを確認する指標として抗生物質を用い、抗生物質封入 MV を作製した。作製にあたり、当研究室で見出した細胞死を介した MV 形成経路を利用することで、ゲンタマイシンを緑膿菌の MV に封入させることに成功した。また、MV の受け渡しに関わる遺伝子を同定するためにトランスポゾンを用いて、ランダムミュータントライブラリーを作製し、抗生物質封入 MV への耐性・感受性を指標にスクリーニングを実施した。その結果、ゲンタマイシンには野生株と同等の感受性を示すが、抗生物質封入 MV に対する耐性・感受性のみが野生株と異なる変異株が確認された。スクリーニングで選抜された遺伝子の機能解析を行い、MV 受け渡し機構との関連について考察する予定である。これにより細菌間の物質送達メカニズムが解明できれば、医療面への応用が期待できる。

P2-071/DP2-20-07

ヒト腸内細菌 *Phocaeicola plebeius* 由来キシラン取り込みに関する SusD の解析

○カ石 佑紀¹, 林 秀謙^{1,2}, 辻 省吾¹ (1前工大院・工・生物工, 2前工大・工・生物工)

Characterization of SusD regarding xylan uptake from the human gut bacterium *Phocaeicola plebeius*

○Yuki Chikaraishi¹, Hidenori Hayashi^{1,2}, Shogo Tsuji¹ (1Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Maebashi Inst. Technol., 2Dept. Biotech., Fac. Eng., Maebashi Inst. Technol.)

【目的】 *Phocaeicola plebeius* のキシラン資化遺伝子群 (PUL17) にはキシラン取り込みに関与する外膜タンパク質 SusC と SusD が各2種類ずつ存在している。キシロオリゴ糖の結合に関与すると思われる2つの SusD を大腸菌で発現させ、キシランとセルロースの吸着解析を行った。

【方法】 コドン最適化した SusD (01963) の遺伝子を発現ベクターに連結して、大腸菌を形質転換した。形質転換体より発現したタンパク質を抽出し、精製を行った。SusD の基質との吸着を明らかにするために、Native-affinity-PAGE により SusD の移動度を測定した。また、SusD を各基質と混合し、遠心分離後、その上清と沈殿 (基質) を SDS-PAGE により定性的に吸着量の解析を行った。SusD を各基質と混合し、遠心分離後、その上清のタンパク質量を定量し、吸着等温式を用いて最大結合量 [PX]_{max} と吸着平衡定数 *Ka* を求めた。

【結果および考察】 SusD (01963) は Native-affinity-PAGE において SusD は可溶性のキシラン、セルロースいずれとも親和性は確認されなかった。SDS-PAGE による定性的な結合解析ではキシランとセルロースとの吸着が確認できた。定性結合実験では基質との吸着が確認されたが Native-affinity-PAGE では吸着は確認できなかった。このことから SusD は不溶性基質とは結合するが可溶性基質とは結合が弱いかも知れない。現在、SusD (01963) の定量的結合解析および SusD (01961) の解析を行っている。

P2-072/DP2-20-13

細菌共存が使用済みオルソケラトロジーレンズケースから検出された細菌のバイオフィーム形成能に与える影響

○渡邊 愛, 木村 優那, 角出 泰造 (株) メニコン)

Effect of coexistence on biofilm-forming potency of bacteria from used orthokeratology lens cases

○Ai Watanabe, Yuna Kimura, Taizo Sumide (Menicon Co., Ltd.)

【目的】 オルソケラトロジー (OK) はコンタクトレンズによる視力矯正の一つである。OK レンズは、内面形状が特殊なガス透過性ハードコンタクトレンズであり、就寝時装用による角膜前面の平坦化で、一時的に近視を軽減させる。日中は専用ケースでレンズを保管し、使用後ケースは水道水での洗浄や乾燥が推奨される。OK レンズ装用者が使用したケース内の微生物汚染調査では、ほぼ全てのケースで日和見病原体や BSL2 の細菌が生菌の状態を検出され、結膜嚢常在菌 *Staphylococcus epidermidis* や口腔常在菌 *Streptococcus salivarius*、ケース洗浄で用いる水道水に含まれる *Methylobacterium rhodesianum* 等が複数のケースから検出された。これらの中には高いバイオフィーム (BF) 形成能を示す細菌も存在した。本研究では、使用済み OK レンズケースから検出された細菌の BF 形成能へ他細菌の共存が与える影響を検証した。【方法】 BF 形成能が比較的低い *S.epidermidis* に着目し、培養用インサートを介した他細菌共存による BF 形成能の変化をクリスタルバイオレット染色法で評価した。共存菌には、使用済みケースで検出された *S.salivarius*、*Streptococcus parasanguinis*、*M.rhodesianum*、*Stenotrophomonas maltophilia* を用いた。【結果と考察】 *S.epidermidis* の BF 形成能は *S.salivarius* 共存下でのみ有意に上昇した ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。洗浄後レンズケースは、洗面台で蓋を開けた開放系で乾燥、保管される場合が多いため、飛散した唾液により口腔常在菌 *S.salivarius* が混入する可能性が高い。本結果から、洗面台でのケース保管に起因した口腔常在菌 *S.salivarius* 混入は、BF によるケース汚染リスク増大に繋がると示唆された。

P2-073/DP2-20-14

Group B Streptococcus が保持するストレス応答性酵素 MazF の働き

○岡部 拓真^{1,2}, 葵 理恵^{1,2}, 横田 亜紀子², 石塚 寛子², Jiang Yunong^{2,3}, 常田 聡¹, 野田 尚宏^{1,2,4} (1早大院・先進理工・生命医科, 2産総研・バイオメディカル, 3筑大院・人間総合科学, 4筑大・グローバル教育院)

Group B Streptococcus of Stress-responsive ribonuclease MazF

○Takuma Okabe^{1,2}, Rie Aoi^{1,2}, Akiko Yokota², Hiroko Tamiya-Ishitsuka², Jiang Yunong^{2,3}, Satoshi Tsuneda¹, Naohiro Noda^{1,2,4} (1Dept. Life Sci. & Med. Biosci., Waseda Univ., 2Biomed. Res. Inst., Natl. Inst. of Adv. Ind. Sci. & Tech. (AIST), 3Grad. Sch. of Compr. Hum. Sci., Univ. of Tsukuba, 4SIGMA, Univ. of Tsukuba)

MazF はストレス応答性の毒性タンパク質であり、原核生物間で広く保存される。宿主細菌が通常環境にいる場合、MazF は同時に発現する抗毒性タンパク質 MazE と結合し、その活性を抑制される。一方、宿主細菌が栄養飢餓等の環境ストレスに曝されると、MazE がプロテアーゼによって優先的に分解され、遊離した MazF は配列特異的に RNA を切断することで翻訳を制御し宿主の細胞活動を抑制する。MazF の配列特異性は原核生物種によって異なり、例えば、大腸菌では ACA を切断し、黄色ブドウ球菌では UACAU を切断する。現在まで複数の MazF が解析されたが、未だ多くの原核生物種の MazF の RNA 切断配列は調査されていない。本研究では Group B Streptococcus が保持する MazF (MazF-GBS) に着目した。MazF-GBS は株間で MazF の長さが異なり、NEM316 株の 112 アミノ酸に対して 2603V/R 株では 62 アミノ酸であった。2603V/R 株の MazF が小さい原因は、ORF 上のトリプトファンのコドン TGG が終止コドン TAG に置き換わったためである。一般的な MazF のアミノ酸長は 110 アミノ酸前後であるのに対して、MazF-GBS (2603V/R) はそれよりも大幅に小さい 62 アミノ酸であるため、切断活性または配列特異性が機能的に欠如していると予想された。しかし実際に MazF-GBS (2603V/R) と RNA を反応させ、ゲル電気泳動により RNA の様子を確認したところ、RNA の切断が確認された。さらに次世代シーケンサーおよび蛍光プローブを用いた MazF-GBS の RNA 切断配列同定を行ったところ、特定の 6 塩基 UACAU を認識して RNA を切断することが明らかになった。このように MazF-GBS はタンパク質のサイズが小さいながらも、配列特異的な RNA 切断活性を保持していることが示唆された。

P2-074/DP2-20-15

リボソームタンパク質の過剰発現による大腸菌の亜鉛耐性化機構

○小崎 智己, 白川 璃子, 石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡大院・医歯薬・分子生物学)

Overexpression of ribosomal proteins leads to zinc resistance in *Escherichia coli*

○Tomoki Kosaki, Riko Shirakawa, Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

亜鉛は細菌の生存に必須であると同時に過剰量では細菌に対して毒性を示す。宿主は過剰な亜鉛を細菌に暴露することで細菌を殺菌する生体防御機能を有している。我々は以前に、リボソームタンパク質 RpmJ の遺伝子欠損株が亜鉛耐性を示すこと、RpmJ 遺伝子欠損株では RpmJ 以外のリボソームタンパク質の発現量が増加していることを報告している。本研究では、リボソームタンパク質の過剰発現が亜鉛耐性化を引き起こすのではないかと考え、大腸菌遺伝子過剰発現ライブラリー (ASKA クローン) を用いて検証をおこなった。解析の結果、リボソームタンパク質過剰発現株 54 株のうち、49 株が亜鉛耐性を示すことを見出した。一方、リボソームタンパク質以外のタンパク質の過剰発現では亜鉛耐性は導かれず、亜鉛耐性化はリボソームタンパク質の過剰発現に特異的な現象であると考えられた。また、リボソームタンパク質の過剰発現は亜鉛以外の金属イオン (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+) に対する耐性を導かないことから、亜鉛特異的な耐性化機構が示唆された。リボソームタンパク質過剰発現株において亜鉛排出ポンプ ZntA を欠損させると、亜鉛耐性が失われた。また、ATP 依存に細胞内の異常タンパク質を分解する Lon プロテアーゼをリボソームタンパク質過剰発現株において欠損すると、過剰発現したリボソームタンパク質の蓄積が検出され、亜鉛耐性が失われた。以上の結果は、リボソームタンパク質の過剰発現は、亜鉛排出ポンプ ZntA ならびに Lon プロテアーゼを介して亜鉛耐性を導くことを示唆している。

P2-075/DP2-20-16

Limited proteolysis of mycobacterial DNA-binding protein 1 to unveil posttranslational modifications

○西山 晃史¹, 吉田 豊¹, Desak NSS Dewi¹, 山崎 智也¹, 横山 晃¹, 小林 大記², 今道 仁¹, 尾関 百合子¹, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (1新潟大院・医歯学総合・細菌, 2新潟大院・医歯学総合・研究推進センター)

○Akihito Nishiyama¹, Yutaka Yoshida¹, Desak NSS Dewi¹, Tomoya Yamazaki¹, Akira Yokoyama¹, Daiki Kobayashi², Hitoshi Kondo¹, Yuriko Ozeki¹, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (1Dept. Bacteriol., Niigata Univ. Sch. Med., 2Omics Unit, Niigata Univ. Sch. Med.)

The basic, intrinsically disordered regions (IDRs) of eukaryotic histones and their bacterial counterparts are presumed to act as signaling hubs to regulate the compaction of chromosomes and various DNA processes. Posttranslational modifications (PTMs) on these regions are pivotal in regulating chromosome compaction and DNA processes. However, the low sequence complexity and the presence of short Lys-rich repeats in the regions have hindered the accurate determination of PTMs using conventional proteomic procedures. In this study, we developed a limited proteolysis protocol using trypsin to analyze PTMs on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1), a histone-like protein conserved among mycobacterial species that possesses a Lys-rich IDR. This limited proteolysis approach successfully revealed significant methylation on many Lys residues in IDR of MDP1 purified from *Mycobacterium tuberculosis*, which was lacking in the corresponding region of recombinant MDP1 expressed in *Escherichia coli*.

P2-076/DP2-20-17

黄色ブドウ球菌の膜タンパク質から成るトキシン・アンチトキシンシステムの機能解析

○加藤 文紀 (広島大院・医)

Characterization of *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system composed of membrane proteins

○Fuminori Kato (Grad. Sch. Biomed. Heal Sci., Hiroshima Univ.)

多くの生物においてゲノム配列情報が解読されているが、小さいサイズのタンパク質に関しては、その機能解明が進んでいない。我々は黄色ブドウ球菌の保有する 100 アミノ酸残基以下から成るタンパク質に注目し、その機能解明を試みている。トキシン・アンチトキシン (TA) システムは、小さなタンパク質から成る事が知られており、これまでに我々は黄色ブドウ球菌のゲノム上に存在する 100 アミノ酸以下の機能未解明な遺伝子群から、新規な TA システムを複数種見出ししている。本研究では、膜タンパク質と推定される黄色ブドウ球菌の TA システムである TsaA/TsaT の機能を明らかにすることを目的とした。Macromolecules Assay および LIVE/DEAD 染色から、TsaT トキシンは大腸菌および黄色ブドウ球菌の細胞膜に障害を引き起こす事が示唆された。さらに、FLAGx3 タグを融合させた TsaT トキシンおよび TsaA アンチトキシンを黄色ブドウ球菌内で発現させ、細胞内局在を解析した結果、TsaT トキシンと TsaA アンチトキシンの両タンパク質は膜画分に存在しており、膜タンパク質であることが実験的に示唆された。また、相同性検索の結果、新規 TA システム TsaA/TsaT は、ゲノム情報が登録されている全ての黄色ブドウ球菌で保存されており、加えて、周辺領域の遺伝子群もブドウ球菌属で保存されている傾向が見られた。細菌の TA システムにおいて、トキシンが膜タンパク質である報告は存在するが、アンチトキシンも膜タンパク質である報告は無く、新規な知見である。現在、黄色ブドウ球菌における役割の解明に向けて取り組んでいる。【会員外共同研究者: Masayori Inouye, Keiko Inouye (Rutgers University)]

P2-077/W6-2

Population genomics of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*

○高橋 弘喜¹, Xiaohui He¹, 楠屋 陽子², 萩原 大祐^{1,3}, 豊留 孝仁^{1,4}, 新居 鉄平¹, Cai Bian⁵, 永山 聖樹¹, 柴田 紗帆¹, 渡邊 哲¹ (1千葉大・真菌, 2NITE, NBRC, 3筑波大・生命環境, 4帯畜大・獣医, 5BGI)

○Hiroki Takahashi¹, Xiaohui He¹, Yoko Kusuya², Daisuke Hagiwara^{1,3}, Takahito Toyotome^{1,4}, Teppei Arai¹, Cai Bian⁵, Masaki Nagayama¹, Saho Shibata¹, Akira Watanabe¹ (1Med. Mycol. Res. Cent., Chiba Univ., 2NBRC, NITE, 3Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, 4Dept. Vet. Med., Obihiro Univ. A.V.M., 5BGI)

Aspergillus fumigatus is a pathogenic fungus with a global distribution. Although azole-resistant TR-mutants are widely distributed, only a few TR-mutants have been isolated in Japan. The emergence of azole-resistant *A. fumigatus* (ARAF) other than the TR-mutants is a problem in Japan. Additionally, the genetic diversity of *A. fumigatus* strains in Japan remains relatively unknown. In this study, we analyzed the genome sequences of 171 strains from Japan as well as the antifungal susceptibility of these strains. We found that 22 strains were highly tolerant to itraconazole. Next, we conducted a population analysis of 876 strains by combining the available genomic data for strains isolated worldwide, which were grouped in six clusters. We observed the geographic distributions of clusters such as Cluster 2 where the strains from Japan were over-represented. Finally, using 628 strains from Clusters 1, 2, and 4, the genomic loci associated with azole resistance were detected on the basis of a genome-wide association study. Thus, we revealed the complexity of the genomic mechanism underlying the emergence of ARAF strains other than the TR-mutants as well as the genomic diversity of *A. fumigatus* in Japan.

P2-078/DP2-14-01

Diversity of the Japanese Gut Microbiome Analysis: Relative Approach Using Compositional Analysis

○板垣 竜樹, 中村 圭佑, 中野 晋太郎, 笠井 満知子, Ji-Won Lee, 長谷部 晃 (北大・院・歯・口腔病態学・口腔分子微生物学)

○Tatsuki Itagaki, Keisuke Nakamura, Shintaro Nakano, Machiko Kasai, Ji-Won Lee, Akira Hasebe (Oral Molecular Microbiology, Fac. Dental Medicine, Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ.)

A compositional data vector is a special type of multivariate observation in which the elements of the vector are non-negative and sum to a constant, usually taken to be unity. A compositional data only retains relative information. Furthermore, comparisons can only be made between compositional data of the same component. The relevant sample space is the standard simplex. A simplex space is a space that is a generalized form of a triangle. For compositional data, many of the operations defined in Euclidean space are meaningless. Microbiome analyzes have become popular in recent years. Operational Taxonomic Units (OTUs) used in microbiome analysis are one type of compositional data. The OTUs data were compositional, with information only about relative abundance. Firmicutes and Bacteroidetes, the major phyla in the colon, have been observed in humans worldwide. Gut microbiome analyses often use the Firmicutes/Bacteroidetes ratio and principal coordinates analysis (PCoA). However, misinformation is pervasive in the human microbiome literature and analysis. An attempt was made to demonstrate how to analyze using the “National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN JMD) (Public Data).” The results showed that PCoA did not work, and principal component analysis (PCA) might be useful for analyzing the gut microbiome relative diversity.

P2-079/DP2-14-02

Genomic Analysis of *Salmonella* Isolated from Canal Water in Bangkok, Thailand

○Jirachaya Toyting¹, Narong Nuanmuang², Fuangfa Utrarachkij³, Pimlapas Leekitcharoenphon², Frank Aarestrup², 佐藤 豊孝⁴, Jeewan Thapa¹, 中島 千絵¹, 鈴木 定彦¹ (¹北大・人獣共通感染症国際共同研究所・バイオリソース部門, ²Res. Gr. for Genom. Epi., Nat. Food Int., Tech. Univ. of Denmark, ³Dept. Microbiol., Fac. Publ. Healt. Mahidol Univ., ⁴北海道大・院・獣医・衛生学・獣医衛生学)

○Jirachaya Toyting¹, Narong Nuanmuang², Fuangfa Utrarachkij³, Pimlapas Leekitcharoenphon², Frank Aarestrup², Toyotaka Sato⁴, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima¹, Yasuhiko Suzuki¹ (¹Div. Biores., Hokkaido Univ. Int. Inst. Zoonosi. Contr., ²Res. Gr. for Genom. Epi., Nat. Food Int., Tech. Univ. of Denmark, ³Dept. Microbiol., Fac. Publ. Healt. Mahidol Univ., ⁴Lab. Vet. Hyg., Fac. Vet. Med., Hokkaido Univ.)

Introduction: Antimicrobial resistance (AMR) poses a growing global public health threat. Canals are essential in Thailand, including the capital city, Bangkok, as agricultural and daily water sources. **Objective:** To elucidate the characteristic and antimicrobial-resistance properties of the bacteria in the urban canals. **Materials & Methods:** Whole genome sequencing was used to characterize 30 genomes of *Salmonella enterica* isolated from Bangkok canal water from 2016 to 2020. **Results:** The dominant serotype was *Salmonella* Agona. In total, 35 antimicrobial resistance genes and 30 chromosomal-mediated gene mutations were identified, in which 21 strains carried both acquired genes and mutations associated with fluoroquinolone resistance. 75.9% of the study strains were multidrug-resistant and all the strains harbored the necessary virulence factors associated with causing salmonellosis. Col(pHAD28) was the most common plasmid replicon type. Comparative analysis of nine *S. Agona* from Bangkok and 167 from public databases revealed that specific clonal lineages of *S. Agona* might have been circulating between canal water and food sources in Thailand and globally. **Conclusion:** These findings provide insight into potential pathogens in the aquatic ecosystem and support the inclusion of environmental sampling into comprehensive AMR surveillance initiatives as part of a One Health approach.

P2-080/DP2-14-03

Quantification and visualization of the *Escherichia coli* genome based on phylogenetic trees

○鈴木 匡弘 (藤田医大・医・微生物)

○Masahiro Suzuki (Dept. Microbiology, Sch. Med., Fujita Health Univ.)

Recent genome analysis advances have significantly reduced time and cost for whole-genome bacterial studies. However, the full potential of genomic data in bacterial analysis remains underexplored. In this study, we've introduced an innovative approach: converting cgMLST allele numbers into a new PhyloCode with numerical values based on phylogenetic relationships. This method transforms the bacterial genome into a numeric sequence for intuitive and visual data interpretation.

Our methodology applied to *Escherichia coli* cgMLST data from PubMLST, focusing on 2513 loci. We created the PhyloCode by constructing phylogenetic trees for each locus, quantifying alleles based on their position along a semicircle's circumference. PhyloCodes were established by considering circular order and distance within the phylogenetic tree using the lplnet R package, assigning angles to each allele. A dedicated database streamlines allele number to PhyloCode conversion.

The resulting PhyloCode can be further translated into color parameters, forming a comprehensive color map of the cgMLST genome on a 51x50 square plane. This study anticipates enhancing genome diversity understanding through visual representation and improving genomic data utilization in fields like machine learning by systematically assigning meaningful numerical values to genomic information. (Nonmember author: Chihiro Hayazaki)

P2-081/DP2-14-04

侵襲性肺炎球菌感染症の発症因子の遺伝統計学的探索

○大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也^{1,2,3,4}, 川端 重忠^{1,4} (¹大阪大・菌・微生物, ²大阪大・菌・バイオインフォ, ³大阪大・微研・バイオインフォ, ⁴大阪大・CiDER)

Statistical-genetic investigation of the pathogenic factors in invasive pneumococcal diseases

○Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi^{1,2,3,4}, Shigetada Kawabata^{1,4} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfor. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³Bioinfor. Center, Res. Inst. Microbial Dis., Osaka Univ., ⁴CiDER, Osaka Univ.)

肺炎球菌は肺炎や中耳炎などに加え、致死的な侵襲性肺炎球菌感染症を引き起こす。侵襲性感染症は複数の因子により複数の機序で発症することが示唆されている。本研究では遺伝統計学的解析により、病態と相関する肺炎球菌の因子の探索を行った。

1978年から2018年にかけて世界20カ国で分離された12,599株の肺炎球菌の全ゲノム情報を収集した。プログラムRoaryを用いたパンゲノム解析により99%以上の株が保有するコア遺伝子を687遺伝子同定し、プログラムsnp-sitesによりコア遺伝子から274,786箇所の一塩基多型(SNP)を抽出した。またパンゲノムから42,473遺伝子を抽出した。続いて、プログラムpvseerを用いたゲノムワイド関連解析により侵襲性感染症の病態と相関するSNPの探索を行ったところ、14,778箇所の変異が病態と有意に関連した。次に、遺伝子の分布と病態の関連を解析した結果、3,102遺伝子の存在が検出され、分布パターンから45クラスターに分類された。さらに、SignalPを用いて細胞外に局在する分子をコードする遺伝子をスクリーニングし、遺伝子欠失株を作製してマウス敗血症モデルにおける病原性を比較した。その結果、TIGR4野生株と比較して、菌体表層分子をコードするgroup_3907遺伝子の欠失株を感染させたマウスの生存率が有意に高いことが示された。

侵襲性肺炎球菌感染症の発症に関連する遺伝因子の分布パターンが複数存在することから、特定の遺伝因子の集積した集団ごとに異なる発症機序が存在する可能性が示された。また、遺伝統計学的解析より病態との相関関係が示されたgroup_3907が、マウス敗血症モデルにて病原性に寄与することが示唆された。

P2-082/DP2-14-05

astA保有大腸菌O166:H15の系統解析と細胞付着性の解析

窪村 亜希子¹, 李 謙一¹, 新免 香織², 鹿島 かおり³, 榎田 希³, 門口 真由美⁴, 工藤 由起子⁵, 明田 幸宏¹, 伊豫田 淳¹ (¹感染研, ²姫路市衛研, ³埼玉県衛研, ⁴熊本市衛研, ⁵国衛研)

Phylogenetic analysis and cell adhesion of astA-positive *Escherichia coli* O166:H15

Akiko Kubomura¹, Ken-ichi Lee¹, Kaori Shimmen², Kaori Kashima³, Nozomi Sakakida³, Mayumi Kadoguchi⁴, Yukiko Kudo⁵, Yukihiko Akeda¹, Sunao Iyoda¹ (¹National Inst. Infectious Diseases, ²Himeji Inst. Env. Health, ³Saitama Pref., ⁴Kumamoto City, ⁵National Inst. Health Sciences)

【目的】EAEC heat stable toxin (EAST1)をコードする遺伝子(astA)を保有する大腸菌は、既存の下痢原性大腸菌分類には属さないが、集団下痢症事例の起原菌として複数回報告されていることから病原性が示唆される大腸菌である。しかし、astA保有大腸菌は健康者からも検出され、食中毒由来株との特徴的な違いは明らかとなっていない。本研究ではastA保有大腸菌のうち食中毒起原菌として複数回報告されるO166:H15株に着目し、全ゲノム配列(WGS)解析や培養細胞を使用した解析により病原性等究明を試みる。

【方法】過去3件の食中毒事例から分離された8株を含む合計14株のastA保有大腸菌O166:H15株を対象とし、WGS解析と培養細胞を使用した細胞付着性試験を実施した。WGS解析では保有する病原性関連遺伝子の網羅的な検出、さらに公共のデータベースから取得したゲノムデータも使用して系統解析を行った。付着性試験ではHEp-2細胞、CHO細胞、INT407細胞について感染実験を行った後、鏡検により付着性の解析を行った。

【結果・考察】付着性試験のうちHEp-2細胞は全株で非付着性となったが、CHO細胞とINT407細胞においては食中毒由来株で付着性が認められた。しかし、WGS解析では食中毒由来株にのみ共通して検出される病原性遺伝子や付着遺伝子は確認されなかった。系統解析ではO166:H15株はMLSTにより4つの系統に分類され、解析を行った多くの株はST349に分類されたが、食中毒由来株は共通してST2914であったことから、ST2914が本菌の病原性系統である可能性が示唆された。食中毒由来株が示す細胞付着性は本菌の病原性に関与している可能性があるため、今後付着因子を特定することが重要である。

P2-083/DP2-14-06

健康保菌者から分離された志賀毒素産生性大腸菌のゲノム特性の解明

○今井 有未¹, 金子 寛², 奥野 未来¹, 星子 裕貴¹, 山本 武司¹, 李 謙一³, 野口 秋雄², 伊豫田 淳³, 佐藤 寿夫², 小椋 義俊¹ (1)久留米大・医・感染医学, (2)株式会社 日本微生物研究所, (3)感染研・細菌第一)

Genomic characterization of STEC strains isolated from asymptomatic carriers

○Yumi Imai¹, Hiroshi Kaneko², Miki Okuno¹, Yuki Hoshiko¹, Takeshi Yamamoto¹, Ken-ichi Lee³, Akio Noguchi², Sunao Iyoda³, Toshio Sato², Yoshitoshi Ogura¹ (1)Div. Microbiol. Dept. Infect. Med. Kurume Univ. Sch. Med., (2)Japan Microbiological Laboratory Co., Ltd., (3)Dept. Bacteriology I, National Inst. Infectious Diseases)

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、下痢や出血性大腸炎、溶血性尿毒症候群 (HUS) や脳症などの重篤な合併症の原因となる。様々な血清型の株が問題となるが、国内では O157:H7, O26:H11, O111:H8 が多い。主な病原因子は志賀毒素 (Stx) である。Stx には抗原性の異なる Stx1 と Stx2 が存在し、さらにそれぞれが少なくとも 3 種類 (Stx1a, Stx1c, Stx1d) と 15 種類 (Stx2a~Stx2o) のサブタイプに分類されている。STEC はこれらのサブタイプを単独もしくは複数保持する。Stx は出血性大腸炎や重篤な合併症の発症に深く関与するが、特に Stx2a 産生性は重症化リスク因子の一つとして知られている。また、STEC には LEE 領域にコードされた 3 型分泌装置を保持する株が存在し、LEE 陽性株は LEE 陰性株に比べて重症化率が高い。一方、食品取扱従事者の検便検査では、被験者の約 0.03% が STEC を健康保菌していることが判明している。しかし、健康保菌者由来と有症者由来株のゲノムや病原因子の違いは未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、健康保菌者由来 STEC のゲノム特性の解明を目的として、STEC 検便分離株の大規模ゲノム解析を実施した。2021 年に分離された STEC 計 495 株のゲノム配列を決定した。in silico 血清型別の結果、O156:H25 (67 株)、次いで O174:H21 (38 株) と O105:H7 (30 株) の血清型の株が多く、O157:H7 は 2% のみであった。stx サブタイプは、stx1a が 195 株と最も多く、次いで stx2f (73 株)、stx2c (62 株)、stx2e (53 株) が多かった。stx2e 陽性株はブタの浮腫病の原因となるが、ヒト患者から分離されることは稀である。また、LEE 陽性株は 36.77% であった。現在、系統解析やその他病原因子と薬剤耐性遺伝子の解析などを進めている。

P2-084/DP2-14-07

浴室環境から分離された非結核性抗酸菌株のマルチゲノミック解析

○猪飼 りえ¹, 西内 由紀子², 藤吉 奏², 丸山 史人², 港 雄介¹ (1)藤田医科大学・医・微生物学, (2)広島大・環境遺伝体学)

Functional Genomic Characterization of Nontuberculous Mycobacteria from Bathroom Environments

○Marie Ikai¹, Yukiko Nishiuchi², So Fujiyoshi², Fumito Maruyama², Yusuke Minato¹ (1)Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., (2)Dept. Microbial Genomics and Ecology, Hiroshima Univ.)

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は近年、先進諸国を中心に患者数が急増している。NTM 感染症の中でも *Mycobacterium avium* complex (MAC) に起因する肺 MAC 症の感染者が約 8 割を占めている。我が国で MAC は、浴室環境から高頻度に検出される。しかし浴室に定着した MAC がどの程度、人の呼吸器に感染し、肺 MAC 感染症を引き起こすのかは明らかにされていない。

そこで本研究は、浴室環境から分離された MAC のゲノム特性を調べる目的で、機能ゲノム解析および既知臨床分離株との比較解析を実施した。

まず浴室から採取した 16 種類の *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* (MAH) 株から、トランスポゾンシーケンス (Tn-seq) 法で必須遺伝子解析を行うために、トランスポゾン (Tn) ライブラリを高効率に作製できる MAH 株のスクリーニングを行った。一般的にマイコバクテリウム属の Tn 変異株の作製は、マイコバクテリオファージ phAE180 を用いてマリナートランスポゾンを導入する方法が用いられるが、MAC では本法による Tn 変異株の作製効率が結核菌に比べ、低いと報告されている。スクリーニングの結果、高効率に Tn ライブラリ作製ができる株としてシャワーヘッドから分離した OCU683 株を選定した。本株の完全ゲノム配列決定を PacBio Revio の HiFi リードにて行い、その結果 5,355,563bp と 18,943bp の環状 DNA を得た。次に本株にマリナートランスポゾンを導入し、約 40 万個の Tn 変異株コロニーを得た。得られたコロニーからまとめてゲノム DNA を抽出し、Tn 隣接部位を PCR で増幅したのち、Illumina NextSeq 2000 を用いてシーケンスを行った。

本発表では OCU683 株の Tn-seq 解析を用いた必須遺伝子解析と、臨床分離株との比較解析の結果を報告する。

P2-085/DP2-14-08

比較ゲノム解析による ESBL 産生 *Aeromonas hydrophila* の耐性遺伝子伝播機構の解明

○奥野 未来¹, 杉山 美千代², 星子 裕貴¹, 山本 武司¹, 浅井 鉄夫², 小椋 義俊¹ (1)久留米大・医・感染医学, (2)岐阜大・連合獣医)

Genome analysis reveals mechanisms of resistance gene transfer in ESBL-producing *Aeromonas*

○Miki Okuno¹, Michiyo Sugiyama², Yuki Hoshiko¹, Takeshi Yamamoto¹, Tetsuo Asai², Yoshitoshi Ogura¹ (1)Dept. Infectious Med., Kurume Univ. Sch. Med., (2)United Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ.)

河川などの環境から分離される細菌の薬剤耐性化に関わる遺伝的・環境的因子の理解は多剤耐性菌の制御に繋がると期待される。*Aeromonas* 属は淡水域およびその周辺の土壌や魚介類などに広く分布する環境菌であり、ヒトに対して腸管感染症、創傷感染症などを引き起こす。また、基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (Extended Spectrum beta (β)-Lactamase, ESBL) を獲得し、耐性化することが知られている。本研究では岐阜県の伊自良川において 2018 年 4 月-2019 年 11 月の間に分離された ESBL 産生 *A. hydrophila* のゲノムの特性および耐性遺伝子の獲得・維持に関わる機構を明らかにすることを目的として、11 株の全ゲノムシーケンスデータを取得し、比較ゲノム解析を実施した。

Oxford nanopore および Illumina シークエンサーにより得られたデータを用いて完全長ゲノムを決定したところ、全ての株で染色体上の同一の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子を含む外来由来のカセットが挿入されていることが確認された。各株の挿入カセットの配列長は 24-75 kbp と株間で差異が見られたが、bla_{VEB-3} を含む 13-15kbp の配列は分離時期や系統関係が離れた株においても高度に保存されていた。岐阜県の河川由来株で見られた挿入位置は公共データベース上のゲノム配列においても外来配列の挿入が確認され、挿入のホットスポットであると考えられた。耐性遺伝子をコードする外来配列が染色体に挿入することで菌体内で安定的に維持され、河川環境から継続的に ESBL 産生菌が分離されるようになったことが示唆された。

P2-086/DP2-17-03

The role of responses against environmental stress on the pathogenicity of *Treponema denticola*

○石原 和幸¹, 北村 友里恵², 菊池 有一郎¹, 国分 栄仁¹, 山下 慶子², 齋藤 淳² (1)東歯大・微生物, (2)東歯大・歯周病)

○Kazuyuki Ishihara¹, Yurie Kitamura², Yuichiro Kikuchi¹, Eitoyo Kokubu¹, Keiko Yamashita², Atsushi Saito² (1)Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Coll., (2)Dept. Periodontol., Tokyo Dent. Coll.)

In periodontal milieu, subgingival bacteria face environmental stresses. Responses to these stresses are necessary for their survival. In particular, oxygen is a fatal stress for periodontopathic bacteria. In dental plaque, some resident bacteria produce H₂O₂. *Treponema denticola*, which is a major pathogen of periodontitis, overcomes the stresses to increase in dental plaque. However, the mechanism of the responses remains unclear. TDE_0127 has DNA binding motif and its expression was upregulated under oxygen exposure and in the dentilisin mutant. It is possible that this gene is associated with response to the stress. To investigate the role of the gene in the response and the virulence of *T. denticola*, TDE_0127 mutant was constructed. In the mutant, 152 genes were downregulated, which included peroxiredoxin. 44 genes including internalin related protein were upregulated. Under aerobic conditions, the viable cells in the mutant strain was reduced by approximately 40% as compared to wild type strain (p<0.05), indicating that TDE_0127 is involved in resistance to oxygen via peroxiredoxin. In addition, dentilisin activity in the mutant strain decreased by approximately 27% compared to the wild type. These results suggest that *T. denticola* TDE_0127 is involved in the resistance to oxygen stress, and affects the expression of genes associated with pathogenicity such as dentilisin.

P2-087/W6-4

タンパク質合成を保証する「タンパク質」の解析

○茶谷 悠平¹, 上村 英里², 田口 英樹² (1岡山大学・学術研究院, 2東工大・研究院)

The ABCF proteins in *Escherichia coli* alleviate "hard-to-translate" amino acid sequences

○Yuhei Chadani¹, Eri Uemura², Hideki Taguchi² (1Fac. Env., Life., Nat. Sci., and Tech., Okayama Univ., 2IIR, Tokyo Inst. of Tech.)

生物の保有する遺伝情報は DNA から mRNA へと転写されたのち、細胞内装置リボソームによってタンパク質へと翻訳される。多種多様な配列のタンパク質を合成するにあたって、リボソームには非常に高い万能性が求められる。しかしリボソームにも得手不得手があり、たとえば連続したプロリン残基間の連結反応は著しく効率が低く、しばしば翻訳伸長が停滞してしまう。また我々のこれまでの解析から、負電荷アミノ酸を連続して翻訳した場合に確率的にリボソームが不安定化し、翻訳を途中で異常終了させてしまうことも明らかとなっている。このように合成されるタンパク質のアミノ酸配列自身に、合成を破綻させる様々なリスクが内包されることが明らかとなりつつある。では生物はそうしたリスクにどのように対処しているのであろうか？上述したプロリン連続配列には翻訳伸長因子 EF-P が作用し、翻訳の停滞を解消してタンパク質合成を保証する機構が備わっている。EF-P のような翻訳伸長因子により、生物はアミノ酸配列による合成上の制約を取り払い、様々なタンパク質機能を獲得してきたものと考えられる。我々は、グラム陽性菌の薬剤耐性化に寄与することが報告されていた翻訳因子 ABCF タンパク質が、アミノ酸配列そのものに起因する様々な翻訳異常をも解消することを新規に見出した。生化学的、遺伝学的解析から得られた結果について報告するとともに、ABCF タンパク質群の新たな生理機能について議論したい。

P2-088/W6-1

リードスルー転写がつなぐ正のフィードバックループによる腸炎ビブリオ病原性遺伝子の発現制御機構

○石井 英治^{1,2}, Dhira Saraswati Anggramukti¹, Andre Pratama¹, Mohamad Al Kadi³, 飯田 哲也^{1,2}, 児玉 年央⁴, 松田 重輝^{1,2} (1阪大・微研・細菌感染, 2阪大・感染症総合教育研究拠点, 3阪大・免フロ・ヒト免疫, 4長崎大・熱研・細菌学)

The regulatory circuit for pathogenicity by read-through transcription in *Vibrio parahaemolyticus*

○Eiji Ishii^{1,2}, Dhira Saraswati Anggramukti¹, Andre Pratama¹, Mohamad Al Kadi³, Tetsuya Iida^{1,2}, Toshio Kodama⁴, Shigeaki Matsuda^{1,2} (1Dept. Bac. Infect., RIMD, Osaka Univ., 2Cent. for Infect. Dis. Edu. Res., Osaka Univ., 3Hum. Immunol., IFREC, Osaka Univ., 4Dept. Bac., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

主要な食中毒菌である腸炎ビブリオは、腸管での病原性発揮に病原遺伝子アイランド (Vp-PAI) にコードされている 3 型分泌装置 2 (T3SS2) を要する。T3SS2 遺伝子群を含む Vp-PAI の遺伝子発現は、同じく Vp-PAI 内にコードされている転写因子 VtrB に依存しており、VtrB 遺伝子の発現は低食塩や胆汁酸といった刺激に反応して別の転写因子 VtrA と ToxR が VtrB 遺伝子のプロモーター領域に結合することで誘導される。本研究ではこの VtrB 遺伝子の転写が、細菌の転写因子にしばしばみられる正のフィードバック制御機構を持つことを明らかとした。しかしながらその活性化様式は一般的な自己プロモーターの活性化によるものではなく、VtrB 遺伝子から約 7 kbp 上流の upa1356 遺伝子のプロモーター活性に依存していた。VtrB 遺伝子の上流域は upa1356-49 の 8 つの遺伝子からなるオペロンで構成されており、VtrB 依存的に発現誘導される。VtrB によって活性化された上流からの転写が VtrB 遺伝子にリードインしてフィードバックループを形成するためには、オペロン最下流の upa1349 遺伝子が有するターミネーターを超える必要がある。実際、このターミネーターは転写終結能を有していたが一部の転写はこのターミネーターをリードスルーし VtrB 遺伝子に到達していた。この位置に強力なターミネーターを導入しフィードバックループを止めた変異株では、VtrB 制御下の T3SS2 遺伝子の発現が減少し T3SS2 依存的な病原性も減弱した。本研究は VtrB の正のフィードバック制御が T3SS2 遺伝子群の効率的な発現に重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、細菌の転写因子における遺伝子発現の自己活性化の新たなメカニズムを提示するものである。

P2-089/DP2-17-04**Effect of phased A-tracts on α -toxin gene expression in *Clostridium perfringens***

○片山 誠一¹, 松井 佐弥², 橋川 直也¹, 佐藤 日向太², 相原 一欽², 田中 千晴², 成谷 宏文³, 松永 望¹ (1岡山理科大学・理・臨床生命科学, 2岡山理科大学・理・臨床生命科学, 3十文字学園女子大学・人間生活学部・食品開発)

○Seiichi Katayama¹, Saya Matsui², Naoya Hashikawa¹, Hinata Sato², Kazuyoshi Aibara², Chiharu Tanaka², Hirofumi Nariya³, Nozomu Matsunaga¹ (1Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., 2Dept. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., 3Dept. Food Sci., Fac. Human Life, Jumonji Univ.)

Clostridium perfringens is a Gram-positive anaerobe, causing gas gangrene and food poisoning for humans. α -toxin is one of primary causative toxins of gas gangrene. There are three phased A-tracts (3A) upstream of the promoter of *plc* gene coding α -toxin. We previously reported that the phased A-tracts enhance the *plc* gene expression in a low temperature-dependent manner, *in vitro*. The other hand, Shimizu reported that VR-RNA, a small RNA molecule, also enhanced the *plc* gene expression and the RNA expression was regulated by VirR/S, a two-component system. We constructed VR-RNA-deficient and phased A-tracts-deficient strains (0A), as well as strains lacking both. The α -toxin productions and the *plc* gene expressions of these mutants were examined by western blotting analyses and real-time PCRs. The deletion of the phased A-tracts sequence (0A) significantly decreased both the α -toxin production (1/14 to 1/5) and the level of *plc* transcription (1/46 to 1/7). The deletion of VR-RNA (*urr*) gene decreased the α -toxin production (1/5 to 1/2) and the level of *plc* transcription (1/2). In VR-RNA-deficient mutants, the *plc* gene expression significantly enhanced in a low temperature-dependent manner, *in vivo*. These results suggest that the phased A-tracts might contribute to *plc* gene expression independently of the VR-RNA-mediated VirR/S two-component regulatory system.

P2-090/DP2-17-05***Salmonella* adia mRNA encoding acid resistance core releases sRNA in acidic and anaerobic environment**

○神田 健¹, Fang Liu², Sarah Reichardt³, Hoda Kooshapour³, Alexander Westermann³, Yanjie Chao², 宮腰 昌利¹ (1筑波大・医, 2Shanghai Institute of Immunity and Infection, CAS, 3Univ. Würzburg)

○Takeshi Kanda¹, Fang Liu², Sarah Reichardt³, Hoda Kooshapour³, Alexander Westermann³, Yanjie Chao², Masatoshi Miyakoshi¹ (1Inst. Med., Univ. Tsukuba, 2Shanghai Institute of Immunity and Infection, CAS, 3Univ. Würzburg)

Acid resistance (AR) is one of the most important properties of many enterobacteria since they encounter a variety of acidic environments in their lifecycle, such as stomach, colon, and phagosomes within macrophages. In *Salmonella*, the arginine decarboxylase system (Adi system) is the most effective AR system that catalyzes H⁺-consuming reaction to increase the intracellular pH and is specifically induced under acidic and anaerobic conditions. Interestingly, a ~90-nt stable small RNA (sRNA) was previously detected in the 3' untranslated region (3'UTR) of the *adiA* mRNA encoding the arginine decarboxylase (STnc1180, Kroger *et al.*, *PNAS*, 2012). However, its expression mechanism and its potential function were not known. Here, we report that the 3'UTR of the *adiA* mRNA releases the sRNA renamed as Adiz via RNase E cleavage, which functions as an Hfq chaperone-dependent sRNA. Through the base-pairing mechanism, Adiz represses the expression of two mRNA targets, *pykF* encoding pyruvate kinase, a key enzyme of glycolysis, and *dmsA* encoding dimethyl sulfoxide (DMSO) reductase, a key component of anaerobic respiration. We suggest that the *adiA* mRNA expresses the H⁺-consuming protein and the sRNA regulator to facilitate AR by coordinating central metabolism and organic acid fermentation under acidic and anaerobic conditions in *Salmonella*.

P2-091/DP2-17-06

アルテロモナス属細菌における翻訳アレスト因子の解析

○辻 奈緒子, 藤原 圭吾, 高田 啓, 千葉 志信 (京産大・生命科学)

Analysis of translation arrest peptides in *Alteromonas* species

○Naoko Tsuji, Keigo Fujiwara, Hiraku Takada, Shionobu Chiba (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo Univ.)

近年, 制御された翻訳の一時停止を利用して, 生理機能を発揮するタンパク質がいくつも見つかってきている。例えば, 大腸菌で見つかった SecM は, 翻訳の一時停止 (翻訳アレスト) を利用して細胞のタンパク質局在能をモニターし, タンパク質局在化装置である SecA の発現量をフィードバック調節している。本研究では, 新たなアレスト因子の発見を目的に, アルテロモナス属のプロテオーム上で RGPP や RAPP といった, 最近当研究室で見出された翻訳アレストを起こしやすいアミノ酸モチーフの探索を行なった。さらに, 探索に用いた生物のリボソームを精製して大腸菌の精製再構成の翻訳系と組み合わせた Hybrid PURE system を用いて探索した因子が翻訳アレストを起こすかどうかを検証した。その結果, RAPP を持つ翻訳アレストペプチドを新たに 2 つ, RGPP を持つ翻訳アレストペプチドを新たに 3 つ見出すことができた。興味深いことに, その多くは, アレストモチーフを C 末端付近に持っており, アレストを介して下流遺伝子の発現制御を担っている可能性が考えられた。実際, アルテロモナス属由来のアレスト因子について, 大腸菌を用いたレポーターアッセイで解析したところ, 5 つの因子全てが, 翻訳アレスト依存的にそれぞれの下流遺伝子の発現量を上昇させた。また, そのうちの一つについて, *in vivo*, *in vitro* での変異解析を行ったところ, アレスト依存的に mRNA の二次構造をアンフォールディングし, 下流遺伝子の SD 配列を露出させることで, 下流遺伝子の発現を誘導していることも示唆された。これらの結果は, 下流遺伝子の発現量を制御する翻訳アレスト因子の普遍性と, その機能の多様性を示唆している。

P2-092/DP2-17-07

Exploring Cold Shock Protein Variants Across Bacterial Lineages and Analyzing Genome Characteristics

○長谷川 智^{1,2}, 猪瀬 礼璃菜¹, 森田 鉄兵^{1,3} (1慶大・先端生命研, 2慶大・環境情報, 3慶大・政策メディア)

○Satoshi Hasegawa^{1,2}, Rerina Inose¹, Teppei Morita^{1,3} (1Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., 2Fac. Env. Info. Studies, Keio Univ., 3Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.)

Cold Shock Proteins (CSPs) constitute a subset of bacterial RNA-binding proteins that are crucial for various cellular processes. CSP is conserved across a wide range of bacteria, and certain model bacteria exhibit multiple CSP genes. Recently, we identified a distinctive role of *Escherichia coli* CspD (*EcCspD*) in RNA production, involving the attenuation of transcription termination and stabilization of transcripts. Moreover, specific amino acid residues in the loop region were found to define the recognition of target RNA by *EcCspD*. In this work, we present a categorization scheme for CSD proteins based on these residues and explore their phylogenetic distribution. Additionally, the study further investigates how genome characteristics vary in bacterial strains with different CSD protein counts. Our results provide insights into broader trends among bacteria containing CSD proteins.

P2-093/W6-5

ファージの KO ライブラリーを用いた攻撃システムの探索

○小島 新二郎¹, Aa Haeruman Azam¹, 近藤 恒平², 千原 康太郎¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈¹, 中村 暢宏^{1,3}, 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹, 氣賀 恒太郎¹ (1国立感染研・治ワク, 2国立感染研・薬剤耐性研究センター, 3酪農学園大・獣医・獣医生化学)

Systemic discovery of phage genes that inactivate bacterial immune systems

○Shinjiro Ojima¹, Aa Haeruman Azam¹, Kohei Kondo², Kotaro Chihara¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita¹, Tomohiro Nakamura^{1,3}, Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹, Kotaro Kiga¹ (1Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2AMR Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., 3Lab. Vet. Biochem. Dept. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ.)

バクテリオファージ (ファージ) は細菌を宿主として感染し殺菌するウイルスである。近年, ファージの感染メカニズムの解析が盛んに行われ, 細菌側の防衛機構について明らかになってきた。しかし, ファージ側の攻撃的機構についてはいまだに明らかになっていない。ファージの攻撃的遺伝子を高効率に探索する方法が存在しないからである。本研究では, ファージの遺伝子欠損ライブラリーを利用することで, 多数の攻撃的遺伝子を発見することに成功した。105 個の遺伝子を保有するファージから遺伝子一つずつ欠損させていき, 最終的に 72 種類の欠損ファージライブラリーの構築に成功した。欠損できなかった遺伝子は, 主にファージの構造タンパク質をコードする遺伝子であった。つづいて, 防御システム保有菌株に対して, 本ファージ遺伝子欠損株ライブラリーの感染性を調べた。その結果, 33 種類の細菌由来防御システムに対して感染性が変化した遺伝子欠損ファージが 18 株検出された。ここで同定された 8 種類のファージ遺伝子が, 実際に細菌由来防御機構を無力化することを実験的に確認した。我々は, これらの遺伝子をファージ由来攻撃システムと呼ぶことにした。本研究により, ファージには多くの攻撃システムがコードされていることが明らかになった。防御システムの攻略はファージ療法の課題でもあり, 本研究成果は今後ファージ療法の更なる進展に寄与することが期待される。

P2-094/DP2-17-08

Development of Bacteriophage Vectors for Targeted Gene Delivery to Cancer Cells

○菅野 貴史, Srivani Veerananarayanan, 相羽 由詞, 宮永 一彦, XinEe Tan, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Takashi Sugano, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, XinEe Tan, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Viral vectors are generally employed for therapeutic gene delivery with positive outcomes. However, there are limitations in terms of toxicity, costs, and cargo capacity. **In this study, we explored the potential of bacteriophages (phages) as an alternative vector system.** While phages naturally infect bacteria and lack specificity for mammalian cells, we sought to impart cancer cell tropism to phage through genome engineering. Our approach involved engineering phages to display various cancer cell-targeting peptides on their structural proteins, resulting in the successful generation of diverse engineered phages. Confocal microscopy and flow cytometric analysis confirmed the increased uptake of these engineered phages by cancer cells compared to wild-types. However, our assessment using an optimized plaque assay revealed varying outcomes, potentially attributed to the limitation of the plaque assay, which accounts only for viable phages. The endolysosomal pathway could lead to the degradation of internalized phages, justifying the diverse results observed with the plaque assay. In conclusion, our study demonstrates the successful synthesis of engineered phages displaying cancer cell-targeting peptides, achieved through a synthetic approach to confer cancer cell tropism. These findings pave the way for the development of efficient and targeted gene delivery systems using phages.

P2-095/DP2-17-09**高曲率性膜認識プローブを用いた膜小胞産生細菌の検出・分離**

○大野 一騎¹, 佐藤 雄介², 徳田 真穂³, 新谷 政己^{1,3,4,5}, 大熊 盛也⁴, 二又 裕之^{1,3,5}, 田代 陽介^{1,3} (1)静大院・総合科技, (2)東北大院・理, (3)静大院・創造, (4)理研・BRC-JCM, (5)静大・グリーン研)

Isolation of membrane vesicle-producing bacteria using probes sensing highly curved membranes

○Itsuki Oono¹, Yusuke Sato², Maho Tokuda³, Masaki Shintani^{1,3,4,5}, Moriya Ohkuma⁴, Hiroyuki Futamata^{1,3,5}, Yosuke Tashiro^{1,3} (1)Grad. Sch. Integr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., (2)Grad. Sch. Sci. Tohoku Univ., (3)Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka Univ., (4)BRC-JCM, RIKEN, (5)Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

【目的・背景】細菌が細胞外に放出する膜小胞は細胞間情報伝達の媒介としての役割を有している。そのため、病原菌から宿主細胞への毒素運搬や腸内環境における微生物間相互作用を理解する上で膜小胞産生細菌の実態を明らかにすることが重要である。これまで培養可能な微生物の培養上清から膜小胞形成量を評価する手法が主流であり、膜小胞を活発に産生する細菌を迅速・簡便に検出することが困難であった。そこで本研究では、膜小胞形成部位で細胞膜表層が湾曲する点に着目し、高曲率性膜を認識するペプチドプローブ ApoC-NR を用いた膜小胞産生細菌の迅速検出法の確立を目的とした。【方法・結果と考察】緑膿菌 PAO1 野生株 (WT) およびその膜小胞低産生株, *Buttiauxella agrestis* JCM 1090^T WT およびその膜小胞過剰産生株を用いて膜小胞産生能と ApoC-NR による蛍光標識との関係を検証したところ、膜小胞および膜小胞産生能の高い細菌が標識された。また、ApoC-NR 標識後、菌体を経時的に観察したところ、菌体周囲に膜小胞が観察された時間帯において標識による蛍光強度が強くなる様子が確認された。*B. agrestis* にて ApoC-NR を結合させた金ナノ粒子で標識したところ、過剰産生株表層の湾曲部位において金ナノ粒子の結合が確認された。さらに、ApoC-NR 標識細菌をフローサイトメトリーで解析した結果、膜小胞を活発に産生する細菌の分離可能性が示された。今後は、純粋培養系における標識細菌の分離より膜小胞産生因子の模索、また、複合微生物系を構成する環境からの膜小胞産生細菌の分離を目指す。

P2-096/DP2-17-17**Development of an antimicrobial phage-capsid targeting Colorectal cancer (CRC)-associated *E. coli***

○Ola Alessa¹, Kanate Thitiananpakorn¹, 日高 侑也¹, 相羽 由詞¹, 渡邊 真弥¹, 宮永 一彦¹, Srivani Veeranarayanan¹, XinEe Tan¹, 氣 篤 恒太郎², 崔 龍洙¹ (1)自治医科大・医・細菌学, (2)国立感染症研究所・創薬・ワクチン開発研究センター)

○Ola Alessa¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Yuya Hidaka¹, Yoshifumi Aiba¹, Shinya Watanabe¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Srivani Veeranarayanan¹, XinEe Tan¹, Kotaro Kiga², Longzhu Cui¹ (1)Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., (2)Research Center for Drug and Vaccine Development, NIID)

Colorectal cancer (CRC) ranks among the leading causes of global death. The composition of human intestinal flora, particularly the abundance of certain pathogenic bacteria, has been associated with CRC development. Notably, a subgroup of *E. coli*, referred to as toxin X-producing *E. coli*, is implicated in CRC carcinogenesis. Eliminating this bacterial group could serve as an initial defense against CRC progression but preserving natural balance of gut flora through sequence-specific targeting is essential. This study aims to develop a CRISPR-Cas13a-loaded antimicrobial phage capsid (AB-capsid) to specifically eradicate toxin X-producing *E. coli*. Three types of identical Ca13a phagemids were constructed, each with a small variation in the spacer region. Two served as controls: one without spacer sequence Cas-NS and one carrying a non-targeted spacer Cas-NT. For targeted spacer construction, 21 spacers sequence along the key gene encoding toxin X were screened and the best spacer Cas-TS was chosen. These phagemids were later loaded into a helper phage capsid and the killing activity of the resulted AB-capsids was evaluated using target bacteria and a heterologous expression strain carrying the target gene. AB-capsid Cas-TS demonstrates promising results in specifically killing target bacteria in vitro and we are currently focusing on its further development for in vivo studies.

P2-097/DP2-17-18**Functional genomics reveals the mechanism of hypoxic adaptation in nontuberculous mycobacteria**

○立石 善隆, 尾関 百合子, 西山 晃史, 松本 壮吉 (新潟大・医・細菌)

○Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Akihito Nishiyama, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

Mycobacterium intracellulare is a major etiological agent of the recently expanding *Mycobacterium avium*-intracellulare complex pulmonary disease (MAC-PD). To identify novel targets for drug development that accommodate the genomic diversity of *M. avium*-intracellulare, we subjected eight clinical MAC-PD isolates and the type strain ATCC13950 to genome-wide profiling to comprehensively identify universally essential functions. Among these strains, we identified 131 shared essential or growth-defect-associated genes. Unlike the type strain, the clinical strains showed an increased requirement for genes involved in gluconeogenesis and the type VII secretion system under standard growth conditions, the same genes required for hypoxic pellicle-type biofilm formation in ATCC13950. Consistent with the central role of hypoxia in the evolution of *M. intracellulare*, the clinical MAC-PD strains showed more rapid adaptation to hypoxic growth than the type strain. Importantly, the increased essentiality of hypoxic fitness genes was confirmed in a mouse lung infection model. These findings confirm the concordant gene essentiality under hypoxic conditions in vitro and hypoxia-related conditions in vivo, and highlight the importance of using clinical strains and host-relevant growth conditions to identify high-value targets for drug development.

P2-098/DP2-17-19**Novel chromosomal markers for detecting *Bacillus anthracis***

○Tuvshinzaya Zorigt¹, 東 秀明¹, 古田 芳一¹, Atmika Paudel¹, Harvey Kamboyi¹, Misheck Shawa¹, Mungunsar Chuluun¹, 菅原 未紗¹, Musso Munyeme², Bernard Hang'ombe³ (1)北大・人獣共通感染症国際共同研究所・感染・免疫部門, (2)Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, (3)Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

○Tuvshinzaya Zorigt¹, Hideaki Higashi¹, Yoshikazu Furuta¹, Atmika Paudel¹, Harvey Kamboyi¹, Misheck Shawa¹, Mungunsar Chuluun¹, Misa Sugawara¹, Musso Munyeme², Bernard Hang'ombe³ (1)Infection and Immunity, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., (2)Public Health Unit, Disease Control Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia, (3)Microbiology Unit, Paraclinical Studies, Sch. Veterinary Medicine, Univ. Zambia)

Bacillus anthracis, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* are highly similar bacterial species in terms of genetic background yet exhibit distinct phenotypic characteristics. It's challenging to identify species-specific marker genes for each of these species. Among these three, *B. anthracis* causes acute infections in animals and humans, making it a significant concern as a pathogen and biological agent. Accordingly, accurate diagnosis of *B. anthracis* is essential for public safety. Here, we identified eleven *B. anthracis* chromosome-encoded specific genes by performing pan-genome comparison analyses among 151 whole-genome sequences consisting of *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, and *B. weihenstephanensis* strains. The distribution of genes among the sampled genomes exhibits a distinct pattern depending on bacterial species and strains. Further, comparative analyses identified genes exclusively present in *B. anthracis*. Based on the identified genes, we established multiplex polymerase chain reactions for an accurate and reliable alternative method for detecting *B. anthracis*. Furthermore, the identified genetic markers have importance in anthrax vaccine development and understanding the pathogenicity of *B. anthracis*.

P2-099

LEE 非保有の腸管出血性大腸菌感染症の重症化に関する因子特定のための解析

○窪村 亜希子¹, 李 謙一¹, 伊豫田 淳¹, 明田 幸宏¹, EHEC Working Group² (1国立感染症研究所, 2全国地方衛生研究所)

Analysis to identify factors of the severity in LEE-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*

○Akiko Kubomura¹, Ken-ichi Lee¹, Sunao Iyoda¹, Yukihiro Akeda¹, EHEC Working Group² (1National Inst. Infectious Diseases, 2Local Health Research Inst.)

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、重症例では血便や溶血性尿毒症候群 (HUS) を発症させるため、公衆衛生上重要な感染症である。EHEC の主要な血清群では、保有する病原性遺伝子領域 LEE が宿主細胞への付着と重症化に関与している。一方で、LEE を保有しない EHEC (LEE 非保有 EHEC) による重症例や死亡例も報告されているが、重症化因子について十分に研究されていない。本研究では LEE 非保有 EHEC の全ゲノム配列 (WGS) 解析と培養細胞の付着性解析により重症化に寄与する因子の特定を試みた。

【方法】2007-2021 年に国内で分離された LEE 非保有 EHEC 全株について WGS 解析により保有する病原性関連遺伝子を網羅的に検出した。さらに各遺伝子の保有状況を重症例と非重症例由来株に区分して比較解析を行い、重症例から有意に検出される遺伝子の抽出を試みた。また、HUS 患者由来株を対象に細胞付着性試験を行い、付着性が検出された株が付着因子 Saa を保有している場合は破壊株の作製と付着性の解析も行った。

【結果・考察】WGS 解析により全供試株における 369 種類の病原性関連遺伝子保有状況が判明した。さらに各遺伝子の保有状況について比較解析を行った結果、重症例由来株から特定の 3 遺伝子が有意に検出された ($p < 0.01$)。HUS 患者由来株においては 3 株が細胞付着性を示し、作製した saa 破壊株の付着性解析により、いずれも Saa 以外の未特定の付着因子が付着性に寄与している可能性が示唆された。本研究により抽出した 3 遺伝子または未特定の細胞付着因子は LEE 非保有 EHEC の重症化に寄与している可能性があるため、引き続き解析を行うことが重要である。

P2-100/DP1-04-02

尿路病原性大腸菌(UPEC)の病原性とマイクロコロニー形成における硫黄転移酵素複合体 TusDCB の役割

○佐藤 百美佳¹, 滝田 綾子¹, 鈴江 一友², 橋本 佑輔¹, 平本 卓³, 村上 正巳³, 富田 治芳¹, 平川 秀忠¹ (1群馬大・医・細菌, 2群馬大・医・生体防御, 3群馬大・医・臨床検査)

The role of TusDCB, a sulfur transferase complex on pathogenesis and microcolony formation in UPEC

○Yumika Sato¹, Ayako Takita¹, Kazutomo Suzue², Yusuke Hashimoto¹, Suguru Hiramoto³, Masami Murakami³, Haruyoshi Tomita¹, Hidetada Hirakawa¹ (1Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ., 2Dept. Host Def., Sch. Med., Gunma Univ., 3Dept. Clin. Lab. Med., Sch. Med., Gunma Univ.)

UPEC は、尿路感染症の主要な起因菌であり、尿路上皮細胞へ侵入し、バイオフィーム様のマイクロコロニーを形成することで、様々な抗菌薬や自然免疫に対して抵抗力を示すことが知られている。私たちは、UPEC 感染症の難治化因子であるマイクロコロニー形成に着目している。本研究では、UPEC のマイクロコロニー形成に関わる新規責任因子のスクリーニングを行った過程で、硫黄転移酵素複合体 TusDCB を発見し、さらにその機能解析を行った。私たちは、tusDCB 欠損株を作製し表現型の解析を行った。tusDCB 欠損株は、人工尿培地においては親株と同程度の Growth を示したが、膀胱上皮細胞に感染させたところ、欠損株が作るマイクロコロニーは親株よりも低密度であった。tusDCB 欠損株を経尿道的にマウスに感染させたところ、腎臓および膀胱に感染した菌数は、親株感染時よりも 10 倍以上低い値を示した。我々の過去の研究から、UPEC のマイクロコロニー形成には、1 型線毛及びべん毛が関与していることが明らかとなっている。赤血球凝集試験、運動性試験、定量 PCR の結果から、tusDCB 欠損株では 1 型線毛及びべん毛の発現レベルが親株より 4 倍以上低いことが分かった。さらに、TusDCB の硫黄転移活性を欠いた変異株では、tusDCB 欠損株と同程度のマイクロコロニー形成能を示した。TusDCB は、近年システインから tRNA への硫黄分子の転移に関与していることが明らかにされているものの、病原性との関係を含めその生理機能の全容は明らかになっていない。本研究により、TusDCB は UPEC のマイクロコロニー形成や病原性に寄与することが示されたことから、本蛋白質は UPEC 感染症の新規治療標的の候補になりうるものと期待している。

P2-101/DP1-04-03

ヒト由来大腸菌におけるシャペロン・アッシャー線毛の遺伝的多様性に関する in silico 分析

○井上 陽晴¹, 和田 崇之^{1,2} (1大阪公大院・生・食栄養・微生物, 2大阪国際感染症研究センター)

In silico analysis of genetic diversity in chaperone-usher fimbria of *E. coli* from human samples

○Hiharu Inoue¹, Takayuki Wada^{1,2} (1Dept. Microbiol., Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metropolitan Univ., 2Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis.)

【背景と目的】微生物は外界との接着を担う分子機構 (接着因子) を菌体表面に露出している。シャペロン・アッシャー (CU) 線毛は、最も多様かつ一般的な接着因子である。CU 線毛はヒトのみならず家畜などの病原因子を含み、感染宿主への適応と拡散にも関わっていると考えられるが、その多様性の全貌は未解明である。本研究では、ヒト由来の大腸菌における CU 線毛の保有状況や多様性を比較し、全体像を把握することを目的とした。【方法】データベース (BV-BRC) からヒト由来大腸菌株 (腸管由来:6,204 株, 尿由来:2,599 株, 血液由来:1,467 株) のゲノム配列を取得した。アッシャー遺伝子を local BLAST によって抽出し、系統クラスに分類後、保有率および菌株あたりの保有数を比較した。さらに、各配列を相同性にしたがってクラスタリングし、レアファクション解析および α 多様度の算出・比較を行った。【結果と考察】抽出された全アッシャー遺伝子数は 106,330 個であり、1 株あたりの保有数は 10.4 個となった。これらは 8 クラスに系統分類され、由来ごとに各系統の保有率に有意な差が認められた。腸管由来株を下痢症患者と健康者の由来に分けて比較したところ、保有率、多様度に有意差がみられ、一部のクラスに病原接着因子が集中している可能性が示唆された。一方で、レアファクション曲線はいずれのクラスにおいてもプラトーに到達せず、CU 線毛の全体像を把握するためにはより多くのデータが必要であることが示唆された。また、下痢症由来株において多様度が極めて高いクラス (γ 3) が見出された。CU 線毛の多様性にみられる由来ごとの相違は、菌株のニッチを規定する要因として重要であり、さまざまな比較検証が求められる。

P2-102/DP1-04-04

P. gingivalis が持つ Mfa 線毛の構築機構および細菌間結合領域と宿主免疫回避に関する構造

○柴田 敏史^{1,2}, 松波 秀行², 應原 一久⁴, 谷口 友梨⁴, 庄子 幹郎³, Matthias Wolf² (1鳥取大・医・感染制御学・細菌学, 2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, 3長崎大・院医歯薬・口腔病原微生物学, 4広島大・院医系科学・歯周病態学)

Assembly mechanism and structural insights into the Mfa1 minor pilus from *Porphyromonas gingivalis*

○Satoshi Shibata^{1,2}, Hideyuki Matsunami², Kazuhisa Ouhara⁴, Yuri Taniguchi⁴, Mikio Shoji³, Matthias Wolf² (1Div. Bacteriol, Dept. Microbiol. Immunol., Med., Tottori Univ., 2Molecular Cryo-Electron Microscopy Unit, OIST, 3Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Bio. Sci., Nagasaki Univ., 4Dept. Periodontal Medicine, Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ.)

Porphyromonas gingivalis は歯周病を引き起こす主要な病原菌であり、Fim 線毛と Mfa 線毛と呼ばれる 2 種類の V 型線毛を有している。これらの線毛は宿主への付着、バイオフィーム形成、病原性に重要である。以前、我々は Fim 線毛の構成ピリントタンパク質 FimA の重合体構造と FimA がプロテアーゼによる切断修飾をきっかけにストランド交換反応によって重合することを明らかにした。一方で、Mfa 線毛の構造や重合機構は不明であった。本研究では、Mfa 線毛の主要構成ピリン Mfa1 の重合体をクライオ電子顕微鏡で構造解析した。この結果、Mfa1 ピリンは FimA 同様にプロテアーゼ依存のストランド交換反応によって重合することが明らかになった。また、Mfa1 上にある口腔内連鎖球菌と特異的に相互作用する領域の構造はモノマーと重合体で異なることが判明した。構造解析に加えて、変異株作成や生化学的解析により、Mfa1 はカルシウムイオン結合領域を持ち、カルシウムイオンの結合が宿主の自然免疫認識回避に寄与することが示唆された。機能的な天然状態である Mfa1 重合体構造は、歯周病や *P. gingivalis* に関連した全身疾患の治療薬開発のための鋳型として活用されることが期待できる。

P2-103/DP1-04-05**Identification of diffusely adherent *Escherichia albertii* from raccoon**

○日根野谷 淳¹, Sharda Awasthi^{1,2,3}, 畑中 律敏^{1,2,3}, 山崎 伸二^{1,2,3} (1)阪公大・獣医・獣医国際防疫, (2)阪公大・アジア健科研, (3)阪公大・大阪国際感染症研)

○Atsushi Hinenoya¹, Sharda Awasthi^{1,2,3}, Noritoshi Hatanaka^{1,2,3}, Shinji Yamasaki^{1,2,3} (1)Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ., (2)Asian Health Sci. Res. Inst., Osaka Metro. Univ., (3)Osaka Int. Res. Cent. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

Escherichia albertii is an emerging zoonotic enteropathogen that has caused several human foodborne outbreaks. Generally, this bacterium forms localized-like adhesion using a type 3 secretion system. However, we found a strain showing diffused adhesion (DA) on HeLa cells. This study was aimed to identify and characterize the responsible factor for the DA. Whole genome sequencing of the *E. albertii* strain RAC112 revealed a chromosome (4.6 Mb) and 3 plasmids (I:84.6, II:100 and III:109 kb). A novel chaperone/usher system gene cluster (~10.5 kb), similar to that of F4 fimbria, was identified on plasmid I. A deletion mutant of *faeG*-like gene, encoding putative fiber major subunit protein, lost the ability of DA, while the complementary strain restored DA phenotype. Functional cloning experiments revealed that *E. coli* transformant of a laboratory strain with pBR322 bearing the gene cluster could exhibit DA. Immunofluorescence microscopy revealed that the adhering bacterial cells showed fluorescence, indicating the surface expression of the FaeG-like protein. In addition, plasmid I was transferable to both *E. coli* and *E. albertii* strains, and the resulting transconjugants showed diffusely adherence. This is the first report regarding the identification of diffusely adherent *E. albertii* and its related genes. The strain could show DA by expressing a novel F4 fimbria on the cell surface.

P2-104/DP1-10-08***Bordetella bronchiseptica* produces pertussis toxin**

○Shymaa Ali¹, 平松 征洋¹, 西田 隆司¹, Dendi Krisna Nugraha¹, 堀口 安彦^{1,2} (1)阪大・微研・分子細菌学, (2)阪大・感染症総合教育研究拠)

○Shymaa Ali¹, Yukihiko Hiramatsu¹, Takashi Nishida¹, Dendi Krisna Nugraha¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (1)Dept. Mol. Bact., RIMD, Osaka Univ., (2)CiDER, Osaka Univ.)

Bordetella pertussis (Bp), *B. bronchiseptica* (Bb), and *B. parapertussis* (Bpp), which cause respiratory diseases in mammals including humans, are genetically closely related and share many virulence factors except pertussis toxin (PTx), a major virulence factor of Bp. Bb and Bpp have long been considered not to produce PTx because of the dysfunctional promoter of the *ptx* operon. In this study, however, we found that bacterial lysates of Bb but not Bpp caused ADP-ribosylation of the α subunits of heterotrimeric G_i GTPases, the enzyme action of PTx, in T98G human glioblastoma cells. Consistently, the lysates caused CHO-K1 cell clustering, indicating the presence of active PTx. The ADP-ribosylating and cell clustering activities were not detected from the lysate of a Bb mutant defective in the *ptx-ptl* operon encoding PTx and its secretion apparatus. The ADP-ribosylating activity of the Bb lysate was about 100 times lower than that of the Bp lysate. The culture supernatant of Bb exhibited the ADP-ribosylating activity on the cells only after at least 10-fold concentration. Immunoblotting with anti-PTx antibody failed to detect PTx from the lysates and culture supernatants from Bb. These results indicate that Bb produces about 1/100 of active PTx as *B. pertussis*. We are currently investigating whether Bb PTx is involved in inducing cough in host animals.

P2-105/DP1-10-09**Analysis of the transcription of serine protease gene by *Aeromonas sobria***

○高橋 栄造¹, 越智 定幸¹, 田中 大晴¹, 油井 利樹¹, 小林 秀文², 清家 総史², 山中 浩泰², 岡本 敬の介³ (1)横浜薬大・薬, (2)広島国際大・薬, (3)岡山大院・医歯薬)

○Eizo Takahashi¹, Sadayuki Ochi¹, Masaharu Tanaka¹, Toshiyuki Yui¹, Hidetomo Kobayashi², Soshi Seike², Hiroyasu Yamanaka², Keinosuke Okamoto³ (1)Fac. Pharm. Sci., Yokohama Univ. Pharm., (2)Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., (3)Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.)

Aeromonas species, which inhabit in various aquatic environments, cause diarrhea in both adults and children. *A. sobria* secretes two types of extracellular proteases, serine protease (ASP) and metalloprotease (AMP). Previously, we carried out the random mutations in the upstream region of *asp* in *A. sobria* 288 and found that the mutation at two specific sites decrease the production of ASP. Two specific sites locate at -78 and -194, when the initial base of start codon of translation of *asp* is numbered as +1.

In this study, we examined the transcriptional level of *asp* in these mutants by quantitative RT-PCR. When the mutant were cultivated at 37°C and 25°C, the transcriptional level of *asp* in the mutant which has the mutation at -78 were decreased to the amount of 9.3% and 3.6% with those of parent strain, respectively. Similarly, the transcriptional level of *asp* in the mutant which has the mutation at -194 decreased to the amount of 77.4% and 12.1%, respectively. Next, we determined the transcription start site (TSS) of *asp* by 5'-RACE. From the analysis of the amplicon, TSS was indicated to be at position -43. However, RT-PCR using the primer which anneals from -206 to -183 presented the amplification products. These results suggested that there are multiple TSS of *asp*.

P2-106/DP1-10-10**細菌性コラゲナーゼの構造・動態と基質水解機構の解析**

○松下 治¹, 美間 健彦², Adjoa Bonsu³, 沖 大也⁶, 増田 亮⁷, 小出 隆規⁸, 山下 隼人⁴, 河原 一樹⁵, Joshua Sakon³ (1)岡山大・院医歯薬・病原細菌学, (2)愛媛県立医療技術大・保健科学・臨床検査・微生物検査, (3)Dept. Chem. Biochem., Univ. Arkansas, (4)阪大・院基礎工・極限科学センター, (5)阪大・院薬・高分子化学, (6)阪大・微研・感染症メタゲノム研究, (7)早稲田大・理工総研, (8)早稲田大・先進理工・化学生命化学)

Structure and dynamics analysis of a clostridial collagenase

○Osamu Matsushita¹, Takehiko Mima², Adjoa Bonsu³, Hiroya Oki⁶, Ryo Masuda⁷, Takaki Koide⁸, Hayato Yamashita⁴, Kazuki Kawahara⁵, Joshua Sakon³ (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., (2)Dept. Med. Tech., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., (3)Dept. Chem. Biochem., Univ. Arkansas, (4)Ctr. Sci. Tech. Extr. Cond. Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., (5)Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., (6)Dept. Infect. Metagenomics, Res. Inst. Micro. Dis., Osaka Univ., (7)Waseda Res. Inst. Sci. Engineer., Waseda Univ., (8)Dept. Chem. Biochem., Sch. Adv. Sci Eng., Waseda Univ.)

ガス壊疽菌群は、交通事故等による血流途絶を伴う深い創傷部位に感染し、組織を破壊しつつ、急速に感染巣を拡大する。感染巣では、種々の細胞毒素による細胞死に加え、細胞外マトリックス (ECM) の破壊が認められる。中でも、ECM の主要な構成要素である膠原線維は、細菌性コラゲナーゼによって水解される。本酵素は、触媒モジュールと基質結合モジュールからなり、それぞれが複数のドメインにより構成されている。

Hathewayia histolytica (旧名: *Clostridium histolyticum*) が産生するクラス II コラゲナーゼ (ColH) の基質結合モジュールのうち、C 末端にあるコラーゲン結合ドメイン (CBD) は β サンドイッチ構造をとり、片側のシートによって三重らせん構造をとる基質に結合した。CBD の N 末側にある PKD ドメイン 2 は、CBD の基質結合を増強した。PKD ドメイン 2 も β サンドイッチ構造をとり、疎水性残基が露出していた。また、これらのドメインを用いて生理活性物質をコラーゲン基材にアンカリングすることで組織再生を促進する複合剤を作製することができた。

今回の研究は、ColH の触媒モジュールの構造・動態と三重らせん構造をとる基質の巻き戻し・水解機構の関係性を明らかにすることを目的としている。触媒モジュールの X 線結晶学的な構造解析、ならびに全長酵素のクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を試みている。また高速原子間力顕微鏡を用いた触媒モジュールの分子動態の観察を試みている。さらに、基質への結合と巻き戻しについて、ブルダウンアッセイおよび NMR による検討を進めている。

P2-107/DP1-10-11

S. mitis Nm-76 株が産生する **Discoidinolysin** のヒト由来細胞に対する傷害メカニズムの検討

○塚崎 清香¹, 大倉 一人², 友安 俊文^{1,3}, 長宗 秀明³, 田端 厚之^{1,3} (徳島大・院創成科学研究科・生物資源学, ²鈴鹿医療科学大院・薬・医療薬学, ³徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学)

Investigation of the cytotoxic mechanism of Discoidinolysin produced by S. mitis strain Nm-76

○Sayaka Tsukasaki¹, Kazuto Ohkura², Toshifumi Tomoyasu^{1,3}, Hideaki Nagamune³, Atsushi Tabata^{1,3} (Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. Innov., Tokushima Univ., ²Div. Pharm. Sci., Suzuka Univ. Med. Sci. Grad. Sch., ³Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】*Streptococcus mitis* (SM) は Mitis 群レンサ球菌に属し、一般的には日和見病原菌と認識されているが、近年ではヒトに対する病原性が注目されつつある。我々は、川崎病患児由来の SM 株である Nm-76 株が産生するコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) であり、分子 N 末に追加ドメインを有す非典型 CDC である Discoidinolysin (DLY) の細胞傷害性についてこれまでに報告したが、その病原性との関連については不明である。そこで本研究では、DLY に特徴的な N 末追加ドメインに注目し、DLY 依存的な Nm-76 株の細胞傷害メカニズムについて検討を行った。

【方法】Nm-76 株を親株として、受容能促進ペプチドを用いた形質転換法により、N 末追加ドメインを欠失させた DLY 変異体産生株や、DLY コード遺伝子欠失株を作製した。得られた被検株の増殖特性や CDC 産生性を確認すると共に、ヒト赤血球に対する溶血活性測定やヒト由来株化細胞に対する細胞傷害性および細胞付着性等について検討した。

【結果および考察】作製した DLY 変異体産生株や DLY コード遺伝子欠失株の増殖性は親株である Nm-76 株と同様であり、親株同様に培養に伴う溶菌現象も確認された。抗 DLY 抗血清を用いた免疫化学的な検討により、DLY 変異体産生株の CDC 産生量は親株と同様であり、ヒト赤血球に対する溶血活性やヒト由来株化細胞に対する傷害性が確認された。興味深いことに、細胞に対する付着性については、親株と比較して DLY 変異体産生株で低下していた。以上の結果から、Nm-76 株が産生する 5 ドメイン構造を有す DLY は菌体の細胞付着にも関与し、Nm-76 株の DLY 依存的な細胞傷害性に寄与していることが考えられた。

P2-108/DP1-10-12

Elucidation of mechanism of vacuolation induced by Escherichia coli-derived Outer Membrane Vesicles

○Teresia Kimeu, 村瀬 一典, 野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大・医・微生物感染症)

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

Bacterial extracellular vesicles are spherical blebs naturally released from both Gram-negative and Gram-positive bacteria. They average in diameter from 20 to 300 nm and are often called outer membrane vesicles (OMVs), especially in Gram-negative bacteria. Recent studies showed that OMVs carry many bacteria-derived biomolecules, including toxin proteins as cargo and that OMVs and their cargo induce diverse biological effects in host cells. We previously reported that *Escherichia coli*-derived OMVs (eOMVs) induce cytoplasmic vacuoles in HeLa cells. The vacuoles appear at 8 hours post infection (hpi) and progressively enlarge up to 24 hpi. While eOMVs have been reported to inhibit the autophagic flux by impairing autophagosome-lysosome fusion, the detailed mechanism by which eOMVs cause vacuoles formation and enlargement remains unclear. Our study aims to elucidate the molecular mechanism underlying eOMVs-induced vacuoles and processes leading to the vacuolar enlargement. Immunostaining with early endosome marker EEA1 and late endosome marker Rab9a revealed that both markers localized to the vacuoles. TGN46, a trans-Golgi network (TGN) marker, also localized to the vacuoles, and dispersion of TGN without effect on cis-Golgi was observed in eOMV-treated cells. These results suggest that eOMVs disrupt endosomal trafficking, potentially contributing to the observed vacuole formation.

P2-109/DP1-10-13

Bordetella 属細菌が産生するタンパク質 **BteA** と **BopN** の相互作用領域の解析

○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

○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と考えられるが、BteA と BopN の相互作用領域や相互作用の意義は不明である。そこで本研究では、BteA の部分欠失変異体及び点変異体を作製し、BteA の BopN との相互作用領域の解析を行った。

Bordetella 属細菌の一種である気管支敗血症菌に BteA 部分欠失変異体産生用プラスミドを導入し、それらの菌株をラット肺上皮由来の L2 細胞に感染させ、BteA の移行量を調べた。その結果、BteA の N 末端側 448 アミノ酸領域と 249 から 448 番目のアミノ酸領域を欠失させた BteA は BopN 依存的に宿主細胞内へ移行したが、BteA の N 末端側 248 アミノ酸領域は BopN 依存的な移行は見られなかった。更に BteA 点変異体産生用プラスミドを導入した菌株を L2 細胞に感染させ、BteA の移行量を調べることでより詳細な解析を行った。その結果、263 番目のアスパラギン酸と 340 番目のフェニルアラニンがアラニンに変化させた BteA は BopN 存在下であっても宿主細胞内へ移行しなかった。

以上の結果から、BteA の 249 から 448 番目のアミノ酸領域と 449 から 658 番目のアミノ酸領域において BopN による宿主細胞移行制御を受けることが示唆された。また、263 番目のアスパラギン酸と 340 番目のフェニルアラニンが BopN の制御を受けるのに重要なアミノ酸である事が示唆された。

P2-110/DP1-10-14

Bordetella 属細菌が産生するタンパク質 **BcrH2** の機能解析

○宮杉 真帆, 阿部 章夫, 桑江 朝臣 (北里大院・感染制御科学・分子細菌)

Functional analysis of Bordetella BcrH2

○Maho Miyasugi, Akio Abe, Asaomi Kuwae (Grad. Sch. Infect. Contr. Sci., Kitasato Univ.)

Bordetella 属細菌はグラム陰性の偏性好気性桿菌であり、多くの病原性グラム陰性菌と同様にニードル状の構造を持つ III 型分泌装置を産生する。*Bordetella* 属細菌が宿主細胞と接触した後、III 型分泌装置の先端でこの装置から分泌される BopD と BopB というタンパク質の複合体が宿主細胞膜上にトランスロコンと呼ばれる孔を形成し、宿主細胞へエフェクターと呼ばれる病原因子を注入する。一般的に、III 型分泌装置から分泌されるタンパク質は菌体内において安定性を維持するためにシャペロンと呼ばれるタンパク質と結合することが知られている。BopD と BopB をコードする遺伝子の近傍に BcrH2 と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子が存在しており、BcrH2 を欠損させた *Bordetella* 属細菌では BopD の分泌量が低下することがわかってきた。

本研究では BcrH2 の機能を明らかにするために、BopD および BcrH2 を精製し、BopD と BcrH2 が直接相互作用するか否かを解析した。*B. bronchiseptica* S798 の DNA を鋳型とした PCR により *bopD*, *bcrH2* 遺伝子を含む DNA 断片を増幅後、発現ベクター pColdII に挿入した。このプラスミドを保有する大腸菌より精製した BopD と BcrH2 で結合試験を行ったところ、BcrH2 と BopD の相互作用が認められた。また、BopD の N 末端側および C 末端側の部分欠失変異体を作製し、結合試験を行った結果、BcrH2 との結合は BopD の N 末端側を介していることが示唆された。

P2-111/DP1-10-15

***Streptococcus intermedius* が保有する細胞壁アンカー蛋白質 Endo D の機能解析**

○友安 俊文¹, 田端 厚之¹, 高尾 亜由子², 長宗 秀明¹ (徳島大院・社会産業理工学・生物資源産業, ²鶴見大・歯・口腔微生物学)

Functional analysis of the cell wall-anchored surface protein "Endo D" of *Streptococcus intermedius*

○Toshifumi Tomoyasu¹, Atsushi Tabata¹, Ayuko Takao², Hideaki Nagamune¹ (¹Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ²Dept. Oral Bacteriol., Tsurumi Univ.)

【序論】*Streptococcus intermedius* (SI) は、アングノサス群連鎖球菌 (AGS) に属し、日和見的に深部臓器に重篤な膿瘍を形成する。SI はシアリダーゼ活性を保有する NanA と β-ガラクトシダーゼ活性および N-アセチルグルコサミンダーゼ活性を持つ MsgA を保有しており AGS の中で唯一糖蛋白質の糖鎖を切断して資化することが可能である。さらに SI は、糖鎖の根本にあるキトビオースの切断に関わる細胞壁アンカー蛋白質 (Endo D) と相同性を持つ蛋白質を保存していた。そこで、Endo D の機能を解析する目的で本研究をおこなった。【結果と考察】SI ゲノム配列を解析した結果、endo D コード領域にはマンノシダーゼ、トランスポートターなど糖鎖の切断や代謝に関わると可能性がある蛋白質をコードする遺伝子群が約 20kbp の領域にわたって存在していることがわかった。さらに、この領域は AGS の中で SI のみに保存されていることも確認した。次に、精製 Endo D を用いて、フェチニンなどが保有する糖鎖を切断するか否かについて解析を行った。その結果、Endo D は無傷の糖鎖を切断せず、NanA と MsgA によってシアリ酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンが除去されたコア糖鎖を切断することがわかった。さらに、グリコシダーゼ処理によりコア糖鎖だけにしたフェチニンを基質に用いて SI の臨床分離株 20 株と歯垢分離株 10 株の培養上清中の Endo D 活性を比較した。その結果、2 株の Endo D 活性は弱かったものの、他の株は活性のある Endo D を分泌していることを確認した。今後、Endo D が SI 感染部位における増殖や病原性に果たす役割について解析を進めていく計画である。【会員外共同研究者：清水 桐也 (徳島大院)】

P2-112/DP1-10-16

血清成分存在下での *Gemella bergeri* 臨床分離株の増殖性および病原性に関する検討

○田端 厚之¹, 友安 俊文¹, 菊池 賢², 長宗 秀明¹ (徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, ²東京女子医・感染症)

Investigation for growth and pathogenicity of *G. bergeri* isolate in the presence of serum components

○Atsushi Tabata¹, Toshifumi Tomoyasu¹, Ken Kikuchi², Hideaki Nagamune¹ (¹Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ²Dept. Infect. Dis., Tokyo Women's Med. Univ.)

【目的】*Gemella* 属細菌は、ヒト咽頭口腔内や上気道、消化管、および泌尿生殖器などに常在するグラム陽性球菌である。*Gemella* 属は 9 菌種で構成されているが、このうち、*G. bergeri* を含む 3 菌種ではコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) のコード遺伝子を染色体上に保有することが確認されている。本研究では、レミエール症候群と電撃性紫斑病を伴った敗血症患者から分離された *G. bergeri* 臨床分離株について、血清成分存在下での本菌の増殖性や CDC に依存した病原性に関して基準株と比較検討することにより、*G. bergeri* 臨床分離株の病原性の要因を明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】被検菌の培養は BHI 培地を基本培地とし、添加成分として非働化ウシ胎児血清 (FBS) や血清アルブミンを対象として、37°C, 5% CO₂ 存在条件下で検討を行った。被検菌の増殖性は菌液濁度で評価すると共に、ヒト赤血球溶血活性やヒト由来株化細胞の傷害性を指標として被検菌の病原性も検討した。

【結果および考察】本研究の被検菌である *G. bergeri* は、栄養要求性が高い細菌の培養に使用される BHI 培地を用いても十分に増殖せず、FBS や血清アルブミンの添加が必須であった。*G. bergeri* が増殖可能な条件下で基準株と臨床分離株の増殖性を比較すると、臨床分離株において高い増殖性が確認され、この特性は *G. bergeri* 臨床分離株の実臨床像との関連で興味深い知見である。なお、*G. bergeri* はグラム陽性病原細菌の代表的な病原因子の一つである CDC のコード遺伝子を染色体上に保有することより、本菌の病原性における CDC の関与について現在検討を行っている。

【会員外研究協力者】大橋歩果 (徳島大・生物資源産業)

P2-113/DP2-16-01

赤血球由来成分存在下における *S. infantis* の増殖性と毒素産生性に関する検討

○伊藤 理真¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明^{1,2}, 高尾 亜由子³, 田端 厚之^{1,2} (徳島大・院創成科学研究科・生物資源学, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, ³鶴見大・歯・口腔微生物学)

The growth and toxin-production property of *S. infantis* in the presence of erythrocyte components

○Yoshiki Itoh¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune^{1,2}, Ayuko Takao³, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci & Tech. Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ³Dept. Oral Bacteriol., Tsurumi Univ.)

【目的】*S. infantis* は、ヒト咽頭口腔常在性の日和見レンサ球菌である。我々は、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) を産生する *S. infantis* 株を対象とし、その株が産生する CDC を Infantylisin (InLY) と名付け、本菌の病原性との関連を検討している。本研究では、InLY 産生性の *S. infantis* 株の血中移行を想定し、赤血球成分存在下での増殖性や InLY 産生性について検討を行った。

【方法】被検菌の培養は BHI 培地を基本培地とし、37°C, 5%CO₂ 条件下で行った。培地添加成分として、ヒト赤血球溶血液やヘモグロビンなどの赤血球由来成分について検討した。被検菌の増殖性は菌液濁度を指標として評価し、InLY 産生量は抗 InLY 抗血清を用いて免疫化学的に評価した。また、InLY コード遺伝子上流の配列情報から示唆された InLY 産生におけるカタボライト抑制についても検討した。

【結果及び考察】まず、赤血球由来成分存在下で被検菌を培養した結果、被検菌の増殖性は溶血液及びヘモグロビンの添加で亢進した。各成分存在下における一定菌量あたりの InLY 産生量は、基本培地と比較して同等以上の産生が確認された。現在、血清成分存在下での検討を行っている。また、基本培地への高濃度グルコース添加で InLY 産生量が顕著に低下したことから、被検菌の InLY 産生はカタボライト抑制制御下にあることが強く示唆された。以上の結果から、本菌が血中に移行する場合、InLY 産生はカタボライト抑制を受けるものの通常の血糖濃度では InLY の産生抑制は生じず、産生された InLY による溶血作用で得られる赤血球成分が被検菌の増殖性の亢進と持続的な InLY の産生に寄与していることが想定され、本菌の病原性と InLY の関連性が注目される。

P2-114/DP2-16-02

***Listeria monocytogenes* promotes inflammasome activation through Btk phosphorylation**

○山内 肇, 松田 泰幸, 原 英樹 (旭川医大・医・感染症学微生物学)

○Hajime Yamauchi, Yasuyuki Matsuda, Hideki Hara (Dept. Infect. Dis., Div. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ.)

Listeria monocytogenes, known as a food poisoning bacterium, causes listeriosis, which can be serious for pregnant women, older adults and people with compromised immune systems. The immune responses to such as bacterial invasion and cellular damage induce inflammatory responses including formation of cytoplasmic protein complex inflammasomes. Inflammasome regulates caspase-1 activation that induces secretion of inflammatory cytokines, interleukin-1β (IL-1β) and IL-18, and cell death known as pyroptosis. Previously, it has been shown that the inflammasome responses exacerbates infectious diseases caused by *L. monocytogenes*, and listeriolysin O (LLO) promotes the inflammasome activation. LLO accelerates a phosphorylation of the inflammasome adaptor ASC through Lyn-Syk signaling pathway. However, a molecule downstream of Lyn-Syk pathway remains unknown.

Bruton's tyrosine kinase (Btk) is known to be modulated by Syk. In this study, we investigated a contribution of Btk in the inflammasome activation upon *L. monocytogenes* infection. *L. monocytogenes* induced Btk activation, which was reduced by a treatment with Syk inhibitor. By inhibition of Btk, inflammasome-dependent IL-1β secretion and cell death were suppressed in macrophages infected with *L. monocytogenes*. These results suggest that *L. monocytogenes* promotes inflammasome activation through Btk downstream of Lyn-Syk pathway.

P2-115/W6-7

Exploring genes necessary for *Bordetella bronchiseptica* survival in *Acanthamoeba castellanii*

○ヌグラハ デンディクリスナ¹, 馬 幸延¹, 山口 博之², 堀口 安彦^{1,3} (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 Nugraha¹, Xingyan Ma¹, Hiroyuki Yamaguchi², Yasuhiko Horiguchi^{1,3} (1)Dept. Mol. Bact. RIMD, Osaka Univ., (2)Fac. Health Sci. Hokkaido Univ., (3)CiDER, Osaka Univ.)

The respiratory pathogenic bacterium, *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*), can persistently survive in terrestrial and aquatic environments, serving as a potential source of infection. Given the possible encounters of *Bb* with environmental protists, we investigated the mode of bacterial interaction with a representative environmental amoeba, *Acanthamoeba castellanii* (*Ac*), and demonstrated that two Bvg⁺ phase-specific virulence factors, filamentous hemagglutinin and fimbriae, were targeted by *Ac* predation. The expression of these virulence factors is downregulated in the Bvg⁻ phase, emphasizing the vital role of the Bvg⁻ phase for survival within *Ac*. Although it is presumed that Bvg⁻ phase-related genes are also involved in *Bb*-*Ac* interaction, the details of such factors remain unknown. In this study, we attempted to search these factors by employing high-throughput transposon sequencing (Tn-seq) and identified six genes specifically expressed in the Bvg⁻ phase. Upon co-inoculation with the wild-type strain, mutant strains lacking each of the identified genes were eliminated by *Ac* predation. Microscopy analyses of co-infection assays indicated that *Bb* wild-type, but not the mutants, was frequently found within the contractile vacuole (CV). Our results suggest that these six genes may play a beneficial role in bacterial survival from *Ac* predation.

P2-116/W6-8

ネズミチフス菌による細胞内侵入の時空間的顕微解析

○久保田 寛顕¹, 下澤 東吾², 小林 甲斐¹, 水戸部 森歌¹, 鈴木 康規³, 鈴木 淳¹, 貞升 健志¹ (1)都健安研・微生物部, (2)東大・理, (3)北里大・獣医・獣医公衆衛生学)

Spatiotemporal microscopic analysis of the *Salmonella* Typhimurium invasion

○Hiroaki Kubota¹, Togo Shimozawa², Kai Kobayashi¹, Morika Mitobe¹, Yasunori Suzuki³, Jun Suzuki¹, Kenji Sadamasu¹ (1)Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, (2)Sch. Sci., The Univ. Tokyo, (3)Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Salmonella Typhimurium の上皮細胞内侵入には細胞膜表面への吸着, 細胞内へのエフェクターの注入, アクチン細胞骨格の再編成の誘発による細胞膜の変形 (Membrane Ruffling) といった一連の初期過程が伴う。本性質は古くから研究がなされてきた一方で時空間的な理解が不十分であり, 細胞膜変形については顕微鏡を利用した平面的な観察に留まっている。本研究では *S. Typhimurium* の侵入がどのような時系列で進むのかを探るために, その動態を三次元的に把握することを試みた。まず, MDCK 細胞に蛍光ナノボディを導入して重合型アクチンを可視化するとともに, 光ピンセットを用いて *S. Typhimurium* 一個体をプラスチックビーズに結合し, 細胞膜表面に移動して吸着させた。すると, 蛍光可視化したアクチンを通じて観察された Membrane Ruffle の広がり最大となるタイミングでプラスチックビーズが一気に沈み込み, この時点で *S. Typhimurium* が細胞内へと侵入することが明らかとなった。また, Membrane Ruffle の最大サイズはイベント毎に差があるものの, 形成開始から最大となるまでの時間は共通して約 100 秒程度であった。 *S. Typhimurium* には Membrane Ruffling を介した協同的病原性の存在が知られているが, 本実験結果から, 最初の個体の侵入は別の個体に 100 秒程度の吸着する時間的猶予を与え, Membrane Ruffle が閉じることでそれらをまとめて細胞内に取り込むというメカニズムが考えられた。

P2-117/DP2-16-05

Analysis of protective function of mycobacterial biofilms for bacilli

○鳥越 祥太^{1,2}, 山本 健太郎¹, 阿戸 学¹ (1)国立感染症研・感染制御, (2)国立感染症研・安管)

○Shota Torigoe^{1,2}, Kentaro Yamamoto¹, Manabu Ato¹ (1)Dept. Mycobacteriol. Lepr. Res. Ctr., NIID, (2)Mgmt. Dept. Biosafety, Lab. Anim., and Pathog. Bank, NIID)

Mycobacteria form cellulose-based biofilms contributing to drug resistance in infection sites, however, its function against host defense is still unknown. Mycobacterial biofilms are produced around the bacilli following infection; thus, it is possible that the biofilms play a role in a resistance against nitric oxide (NO) stress and capture by phagocytic cells, which is a bactericidal effector and mechanism. To elucidate the resistance of mycobacterial biofilms, we analyzed the burden of NO stress to bacilli using GFP-expressing *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) BCG in response to NO (NO-BCG) and capture of bacteria by phagocytes using constitutively GFP-expressing *M. bovis* BCG (Cons-BCG). GFP expression of NO-BCG was increased under NO stress, while its expression was suppressed under biofilms formation, indicating that mycobacterial biofilms prevented NO from reaching the bacteria. Furthermore, in the presence of biofilms, phagocytic cells were less able to capture Cons-BCG than in the absence of biofilms. Interestingly, cellulase attenuated these protective functions of mycobacterial biofilm. These results showed that mycobacterial biofilms inhibit NO stress and phagocytic trapping of the bacteria, suggesting the possibility of mycobacterial biofilms as novel therapeutic targets.

P2-118/W8-1

A role of *Aeromonas hydrophila* RtxA during necrotizing soft tissue infection

○山崎 浩平, 白石 圭, 滝沢 牙子, 柏本 孝茂 (北里大・獣医・獣医公衆衛生)

○Kohei Yamazaki, Kei Shiraiishi, Saeko Takizawa, Takashige Kashimoto (Vet. Public Health, Kitasato Univ.)

Aeromonas hydrophila is a pathogenic bacterium that causes necrotic soft tissue scarring. However, the pathogenic mechanism of this infection is not clear. RTX is a large toxin that is conserved in a variety of bacteria. It has been reported that *A. hydrophila* repeat in toxin A (RtxA) is cytotoxic, but pathogenicity has not been thoroughly analyzed. We aimed to determine whether it is involved in the proliferation within its host. To investigate this, we created a *rtxA* knockout strain, Δ *rtxA*. Subcutaneous inoculation of the parent strain (WT) or Δ *rtxA* into mice revealed that all mice inoculated with WT died, while some inoculated with Δ *rtxA* survived. To assess the effect of RtxA on the proliferation of *A. hydrophila*, we measured colony-forming units (CFUs) in the soft tissue and observed by In Vivo Imaging System (IVIS). The CFUs of WT were higher than those of Δ *rtxA* at 12 hours post-infection, indicating a defect in the proliferation of Δ *rtxA* in soft tissues. IVIS further demonstrated the impaired proliferation of Δ *rtxA* in soft tissues. These results indicate that RtxA is essential for the proliferation of *A. hydrophila* in soft tissue. Additionally, we observed that the range of soft tissue necrosis caused by Δ *rtxA* infection was narrower than that caused by WT infection. So, we conclude that RtxA is a crucial pathogenic factor of *A. hydrophila*.

P2-119/W8-2**Rop in enterohemorrhagic *Escherichia coli* enhances the general stress response via small RNAs**

○清水 健¹, 鈴木 真¹, 濱端 崇² (1千葉大・医・病原細菌, 2国立国際医療研究センター研究所・細菌感染)

○Takeshi Shimizu¹, Shin Suzuki¹, Takashi Hamabata² (1Dept. Mol. Infectiol., Grad. Sch. Med., Chiba Univ., 2Bacterial Infection, Reserach Inst., NCGHM)

Rop encoded on pOSAK1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) enhances the general stress response such as increased NO resistance, although the mechanism of action remains unclear. Since the Rop is known as an RNA-binding protein, it is possible that small RNAs were involved in this action. Therefore, we confirmed the enhancement of NO resistance by Rop using small RNA-deficient EHECs. The results showed that the enhancements of effect by Rop were significantly reduced in 6 small RNA-deficient EHECs (DsrA, 6S RNA, RyhB, AcrZ, CyaR, and RprA). Among these, the small RNAs of DsrA, AcrZ, and RprA are known to be directly involved in the translational regulation of *rpoS* expression corresponding to the general stress response, suggesting that Rop regulates *rpoS* expression via small RNAs. Thus, using the 6 small RNA-deficient EHECs, we constructed 6 double mutant EHECs with an additional deletion of the 5'-upstream region required for *rpoS* translation regulation. As results, all double mutant EHECs recovered the enhancement of effect by Rop. Furthermore, Rop suppressed *rpoS* expression in the presence of NO stress. In summary, our results indicate that the Rop negatively regulates *rpoS* expression at the translation level via small RNA, thereby enhancing the general stress response in EHEC.

P2-120/DP2-16-06**Immunomodulatory Effect of Heat Shock Protein SSA1 Enriched in Hypoxic Secretome of *Candida albicans***

○Wei Teng¹, Phawinee Subsomwong¹, 成田 浩司², 中根 明夫³, 浅野 クリスナ^{1,3} (1弘前大・院医・感染生体防御学, 2弘前大・院医・動物実験施設, 3弘前大・院医・生体高分子健康科学)

○Wei Teng¹, Phawinee Subsomwong¹, Kouji Narita², Akio Nakane³, Krisana Asano^{1,3} (1Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 2Inst. Anim. Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 3Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

Candida albicans is an opportunistic pathogenic fungus that can survive in both normoxic and hypoxic environments. It has been demonstrated that *C. albicans* secretome is involved in host biological processes. However, the immunological effect of *C. albicans* secretome released under hypoxic condition remains unclear. This study demonstrated the differences in cytokine responses and protein profiles between secretomes prepared under normoxic and hypoxic conditions. Furthermore, the immunoregulatory effects of heat shock protein SSA1 (Ssa1), a protein enriched in the hypoxic secretome, were investigated. Stimulation of mouse bone marrow-derived macrophages (BMMs) with Ssa1 resulted in the significant production of interleukin (IL)-10, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α as well as the significant expression of M2b macrophage markers (CD86, CD274 and tumor necrosis factor superfamily member 14). These results suggest that *C. albicans* Ssa1 may promote polarization of macrophages towards an M2b-like phenotype. Based on these results, we also investigated the effect of Ssa1 on *C. albicans* infection and showed that Ssa1 inhibited the uptake of *C. albicans* by BMMs. Taken together, our findings demonstrate that *C. albicans* is able to alter its secretome, particularly by promoting the release of Ssa1, to modulate host immune response and survive under hypoxic conditions.

P2-121/DP2-16-07**サルモネラにおける過剰なカチオンの毒性とその耐性メカニズム**

○岩館 佑未, James Slauch (イリノイ大・分子細胞生物・微生物)

Excess cation stress and tolerance mechanisms in *Salmonella*

○Yumi Iwadate, James Slauch (Dept. Microbiol., Sch. Mol. Cell Biol., Univ. Illinois.)

サルモネラは、食中毒の原因菌のひとつであり、重篤な全身性感染症を引き起こす際、マクロファージ内で増殖する過程で、マグネシウム飢餓にさらされる。この際、二成分制御系 PhoPQ を介した遺伝子発現の制御が生存および病原性に重要であることが知られる。我々のこれまでの研究より、マグネシウム飢餓に反応して、Mg の取り込み系だけでなく、ポリアミン合成系も誘導され、細胞質の Mg レベルが回復するまで、ポリアミンが Mg の役割を一部補うことを示した。また、増殖が停止し定常期に移行すると、マグネシウムの需要が減少し、カチオンレベルのオーバーシュート、過剰なカチオンの毒性が発生すること、この毒性を抑制するために PaeA を介したポリアミンの排出が必要であることが分かった。しかし、過剰なカチオンの毒性の根本的な生理学的理解や他の耐性メカニズムについては未解明である。本研究では、過剰なカチオンの毒性に対する新しい耐性メカニズムの同定を目的とし、PaeA と同様に CorC ドメインを含むタンパク質、CorC および YoaE に焦点を当てた。corC 遺伝子の欠損により、マグネシウム飢餓の定常期における生存率が低下し、加えて yoaE 遺伝子欠損させると生存率がさらに低下した。生理学的・遺伝学的解析により、CorC と YoaE はポリアミン排出トランスポーターの PaeA とは異なるメカニズムで過剰なカチオンの毒性への耐性に作用することが示唆された。現在、これらの遺伝子が過剰なカチオンの毒性を軽減するメカニズムと、サルモネラの病原性における役割を解明することに焦点を当て、研究を行なっている。

P2-122/DP2-19-02**家禽チフス菌の *ratA* は鶏における致死的全身感染に寄与する**

○相川 知宏, 岡村 雅史 (帯広畜産大・獣医学研究部門・獣医微生物)

***Salmonella enterica* serovar Gallinarum *ratA* contributes to lethal systemic infection in chickens**

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

Salmonella enterica serovar Gallinarum (SG) は、鶏の致死的全身性感染症である家禽チフスの原因菌であり、世界各国でしばしば甚大な経済被害を引き起こす。本症発症に関連する SG の病原性を理解することは、ワクチン等の効果的な感染制御策を講ずる上で重要だが、鶏生体内での SG の感染動態についてはほとんど分かっていない。本研究では、先行研究において鶏生体内で強く発現する SG の抗原遺伝子の 1 つとして同定した *ratA* に着目し、本遺伝子欠損株の鶏接種試験から SG の病原性への寄与を解析した。また、*ratA* と同じ Pathogenicity Island に含まれる *ratB* と *shdA* の他、3 型分泌装置 (T3SS)-1 及び 2 の各構成因子 *invA* および *spiB* についても遺伝子欠損株を作成し、SG の病原性への寄与を解析した。野生型接種鶏群では、接種 3 日後から嗜眠や食欲低下などの臨床症状が観察され、接種 7 日までに全羽死亡した。対して、5 種類の遺伝子欠損株接種群では、臨床症状を示す個体数やその程度は低減し死亡率も低下した。なかでも、*ratA* 及び *spiB* 欠損株接種群は、全個体が何ら臨床症状を呈さず実験期間終了まで生存した。接種 5 日後の盲腸内容からの回収菌数は、*spiB* 欠損株を除く全ての欠損変異株群で野生型群より減少し、また肝臓と脾臓からの回収菌数は、全ての欠損株接種群で野生型群より減少した。特に *ratA* 及び *spiB* 欠損株接種群の肝臓と脾臓からは菌が全く回収されなかった。以上より、*ratA* と *spiB* は鶏の致死的全身感染に強く寄与していることが明らかになった。一方、*ratA* は *spiB* と異なり、糞便への SG の持続的な排菌にも関与しており、T3SS に依存しない独立した機序を介して SG の病原性に寄与していると考えられる。

P2-123/DP2-19-03

A型ウエルシュ菌感染に対する宿主応答の解析

石原 知明¹, 阪口 義彦², 永浜 政博², 〇竹原 正也² (長崎国際大・薬, ²徳島文理大・薬・微生物)

Analysis of host response to *Clostridium perfringens* type A infection

Tomoaki Ishihara¹, Yoshihiko Sakaguchi², Masahiro Nagahama², 〇Masaya Takehara² (¹Fac. Pharm. Sci., Nagasaki International Univ., ²Dept. Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ.)

【目的】 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く、重篤な感染症である。これまでに、本菌の産生するα毒素がガス壊疽の発症に関与することが判明している。本研究では、A型ウエルシュ菌の感染に対する宿主応答について、DNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行ったので、その結果について報告する。

【方法】 1. 対数増殖期まで培養した野生型 (Wild-type), または、α毒素遺伝子をノックアウトしたA型ウエルシュ菌 (PLC-KO) をC3H/HeNマウスの大腿筋に投与し、大腿筋を採取した。
2. 採取した筋組織より、RNAを抽出・精製した。
3. 菌感染した大腿筋での遺伝子発現を、DNAマイクロアレイにより網羅的に測定した。

【結果と考察】 Wild-typeに感染したマウスでは、Interleukin 1 betaなど、炎症に関連する遺伝子や、血管新生や血管内皮細胞の機能に関与するCysteine-rich angiogenic inducer 61などの発現増加が認められた。また、Gene set enrichment analysis (GSEA) では、本菌に感染したマウスで脂肪酸の代謝に関与する遺伝子群の発現が減少した。さらに、Wild-typeとPLC-KOとの比較では、Wild-typeで骨格筋の分化に関与するMyogeninや、ストレスから細胞を保護するHeat shock protein beta-1などの発現が増加した。また、これらのマウスでのGSEAでは、Wild-type感染マウスでミトコンドリア関連遺伝子群やATP合成に関連する遺伝子群の発現増加が認められた。これまでに、α毒素は末梢の循環障害を引き起こし、虚血を誘導するため、これらの遺伝子の発現増加は、虚血やこれに続くATP産生の低下に対する宿主の防御機構となっている可能性が考えられる。

P2-124/DP2-19-04

Ability of *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* to metabolize selenocysteine

〇久綱 僚, 富田 純子, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

〇Ryo Kutsuna, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

以前、我々は潰瘍性大腸炎 (UC) モデルマウス糞便中に増加する特定細菌を見出し、分類学的精査解析により *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* sp. nov. PAGU 1678^T を提案した。さらに、当該菌をモデルマウスへ経口投与することによって、マウス病態増悪能の証明に成功している。そして、PAGU 1678^T 株は類縁菌に比して細胞内侵入能が高く、細胞内では当該菌処理による炎症応答が確認されたことから、一連の炎症活性への菌体成分の関与を予想し、当該菌の全菌体タンパク質解析および全ゲノム解析を実施した。我々はそこから見出されたPAGU 1678^T 株に特徴的な特定微量元素Aに対する代謝能に着目した。当該微量元素は生体内でタンパク質Bの合成に利用され、タンパク質Bは生体にとって生存に重要な働きをする。UCを含む炎症性腸疾患患者の多くは、Aを含む微量栄養素の吸収が不十分であることが知られており、A処理によりPAGU 1678^T 株でのタンパク質Bレベルの上昇が認められたことから、当該菌とモデルマウス間でのAの競合がマウス病態増悪の一因であると予想した。そこで、PAGU 1678^T 株で重症化したUCモデルマウスに対するAの補充を試みたところ、対照群に比してPAGU 1678^T 株処理群における炎症の軽減傾向を示した。今後、PAGU 1678^T 株によるAの利用能およびモデルマウスとのAの競合を裏付けることが出来れば、PAGU 1678^T 株のマウス病態増悪メカニズムの解明に繋がれると考えている。

P2-125/DP2-19-05

Vibrio vulnificus 臨床分離株の比較解析による病原因子同定の試み

〇外崎 佑果, 齋藤 和, 山崎 浩平, 上野 俊治, 柏本 孝茂 (北里大・獣医・公衆衛生)

Identification of virulence factors by comparative analysis of *Vibrio vulnificus* clinical isolates

〇Yuuka Tonosaki, Ai Saito, Kohei Yamazaki, Shunji Ueno, Takashige Kashimoto (Lab. Vet. Public Health. Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Vibrio vulnificus (V. v.) は、ヒトに経口あるいは創傷感染し、軟部組織壊死症や敗血症を引き起こす。現在、V. v.の病原性研究には、敗血症患者より分離されたCMCP6株が世界中で使用されている。本研究では、V. v.の臨床分離株を10株収集し、マウスに対する致死性と既知の病原因子 (運動性、莢膜発現、およびRtx) をCMCP6と比較し、CMCP6の病原株としての位置付けを解析するとともに、マウスの致死に必要な病原因子について解析した。新たに収集した10株をそれぞれマウスの右大腿部皮下に接種したところ、6株がマウスを致死させ、そのうちの1株は、CMCP6よりも短時間でマウスを致死させた。この1株の一定時間後における接種局所の筋肉および脾臓中菌数を算出したところ、CMCP6より有意に高かった。既知の病原因子の比較では、運動性はCMCP6よりも高く、莢膜発現度は同等であったが、RtxはCMCP6が臨床分離株タイプであったのに対し、環境分離株タイプであった。これらの結果から、この株の高い致死性の主要因は、運動性にあると示唆された。マウスを致死させた他の5株の病原因子をCMCP6と比較したところ、運動性はCMCP6よりも同等が高く、逆にマウスを致死させなかった5株中4株の運動性は、CMCP6よりも低かった。莢膜発現度およびRtxタイプとマウスに対する致死性との間に明確な関連はなかった。これらのことから、V. v.の運動性はマウスに対する致死性に最も重要であると考えられた。また、CMCP6の致死性は高く、創傷感染モデルを利用した病原性研究に適した株であった。

P2-126/DP2-19-06

Analysis of immune responses in oral infection of mice with *Candida albicans*

〇豊永 憲司^{1,2}, 永尾 潤一², 田崎 園子¹, 梅村 正幸³, 岸川 咲吏^{1,2}, 加地 英美¹, 岩沼 青葉¹, 中上 昌信¹, 岩井 寛¹, 田中 芳彦^{1,2} (福歯大・機能生物・感染生物, ²福歯大・口腔医学セ, ³琉球大・熱生研・感染防御)

〇Kenji Toyonaga^{1,2}, Jun-ichi Nagao^{1,2}, Sonoko Tasaki¹, Masayuki Umemura³, Sari Kishikawa^{1,2}, Emi Kaji¹, Aoba Iwanuma¹, Masanobu Nakagami¹, Satoru Iwai¹, Yoshihiko Tanaka^{1,2} (¹Div. Infect. Biol., Dept. Funct. Biosci., Fukuoka Dent. Coll., ²Oral Med. Res. Cent., Fukuoka Dent. Coll., ³Mol. Microbiol. Gr., TBRC, Univ. Ryukyus)

Candida albicans is a commensal fungus in humans that causes oral candidiasis and disseminated candidiasis in immunocompromised hosts. Analysis of murine models of systemic candidiasis has revealed the important role of C-type lectin receptors in disseminated candidiasis, however, the detailed control mechanisms for oral candidiasis are poorly understood. Therefore, we attempted to analyze the host defense mechanism in a murine model of oral candidiasis (without immunosuppressive agents). In these mice, the production of various inflammatory cytokines and chemokines was observed in the tongue, which is an infected tissue, and most of the fungus were eliminated by four days after an infection. In this presentation, we would like to discuss the role of these inflammatory mediators in oral candidiasis.

P2-127/W6-6

ブドウ球菌エンテロトキシン A 産生における内在性制御因子とプロファージの協調

○佐藤 祐介¹, 久恒 順三², Aziz Fatkhanuddin³, 達川 伸行³, 中川 (柴田) 真里⁴, 小野 久弥⁵, 内藤 郁慶⁴, 重茂 彦彦⁴, 菅井 基行² (1)麻布大・獣・感染免疫, 2)感染研・薬剤耐性研究センター, 3)広島大・院・細菌学, 4)岩手大・獣・食品安全, 5)北里大・獣・人獣共通)

Coordination of prophage and global regulator lead to high SEA production

○Yusuke Sato¹, Junzo Hisatsune², Aziz Fatkhanuddin³, Nobuyuki Tatsukawa³, Mari Nakagawa-Shibata⁴, K. Hisaya Ono⁵, Ikonori Naito⁴, Katsuhiko Omoe⁴, Motoyuki Sugai² (1)Lab. Infect. Cont. and Immun., Sch. Vet. Med. Azabu Univ., 2)Antimicro. Resist. Res. Center, NIID, 3)Bacteriol., Hiroshima Grad. Univ., 4)Lab. Food Safety, Sch. Vet. Med. Iwate Univ., 5)Lab. Zoonosis, Sch. Vet. Med. Kitasato Univ.)

【背景】ブドウ球菌食中毒は、ブドウ球菌が食品中で Staphylococcal enterotoxin (SE) を産生することが原因である。SE には 20 以上の型があり、その中でも SEA は食中毒事例から高頻度で検出されるため重要視されている。この要因として SEA 発現制御が遺伝子の存在するプロファージに影響されることが示唆されているが、その全容は不明である。そこで本研究では SEA 高産生系統 (CC81 subtype-1) の解析を行い、その詳細な制御機構の解明を行なった。【方法】SEA 産生量比較のため、CC81 subtype-1 および同一の SEA 高産生型プロファージが溶原化している MW2 株を培地および加工肉で培養し、ELISA で定量した。これらの株は全ゲノム配列の比較を行った。遺伝子発現は RT-qPCR、プロテイン A (Spa) 発現はヒト IgG を用いた WB でそれぞれ行なった。リコンビナント SarS および SEA プロモーター配列を用いて、ゲルシフトを行なった。【結果・考察】まず、CC81 subtype-1 と MW2 株のプロファージの影響を検討した。SOS 応答を増強もしくは減弱させたところ、同一のプロファージにも関わらず両者の SEA 産生に差が認められ、コアゲノム側の要因が示唆された。ゲノム比較では、CC81 subtype-1 の 1 株で内在性制御因子 SarS のナンセンス変異が認められ、これを MW2 型に戻すことで SEA 産生が低下した。他の CC81 subtype-1 株では SarS および SarS の支配下にある Spa の発現低下が認められた。さらに SarS が SEA プロモーターに直接結合した。CC81 subtype-1 系統は高産生型ファージ溶原化と SarS の機能不全を伴うことで SEA 高産生を示すことが明らかになった。

P2-128/DP2-19-07

腐蛆病菌ではない蜂蜜由来 *Paenibacillus* 属細菌のミツバチ幼虫への病原性

○高松 大輔^{1,2}, 中村 佳子³, 原田 真理子³, 岡本 真理子¹, 馬田 貴史¹ (1)農研機構・動衛研, 2)岐阜大, 3)生安研)

Pathogenicity of *Paenibacillus* spp. from honey other than foulbrood pathogens to honeybee larvae

○Daisuke Takamatsu^{1,2}, Keiko Nakamura³, Mariko Harada³, Mariko Okamoto¹, Takashi Mada¹ (1)Nat. Inst. Anim. Hlth., NARO, 2)Gifu Univ., 3)RIAS)

ミツバチは農作物の花粉媒介に広く活用される重要な生物資源である。ミツバチ幼虫の病原細菌としては、これまでアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* とヨーロッパ腐蛆病菌 *Melissococcus plutonius* の 2 菌種しか知られていなかったが、我々は、経口投与によってミツバチの幼虫の死亡率を上昇させる腐蛆病菌以外の *Paenibacillus* 属菌を蜂蜜の中から発見した。これらの菌の多くはゲノム解析によって、*P. azoreducens* または *P. melissococcoides* と同定されたが、1 株 (J27TS7 株) は、*Paenibacillus* 属ではあったものの、既知の菌種には属していなかった。孵化後 24 時間以内のミツバチ幼虫にこれらの *Paenibacillus* 属菌と *P. larvae* の芽胞を異なる濃度で 24 時間経口摂取させた結果、*P. larvae* の 50% 致死濃度 (LC₅₀) は 1,750-8,872 個/ml であったのに対し、J27TS7 株、*P. azoreducens* 代表株及び *P. melissococcoides* 代表株の LC₅₀ は、それぞれ 9,760 個/ml, 35,310 個/ml 及び 360,745 個/ml であり、J27TS7 株が *P. larvae* に最も近い毒性を示した。J27TS7 株は *P. larvae* と同様に孵化後 2 日以上経過した幼虫に対する毒性は極端に低下したが、孵化後 24 時間以内の幼虫に感染させた場合、日本で分離される遺伝子型の *P. larvae* 株より幼虫を早く殺す傾向があった。感染幼虫を病理組織学的に解析した結果、J27TS7 株の芽胞は、幼虫の中腸内で発芽・増殖し、中腸上皮細胞の変性が確認された。しかし、中腸上皮細胞の表面を覆う餌食膜は破壊せず、*P. larvae* のように積極的に中腸内から血体腔に侵入する様子は観察されなかった。今後は、これらの新規病原細菌の蜂群に対する影響を理解するため、各菌の国内における分布状況を調査する必要がある。

P2-129/DP2-19-08

オゾンウルトラファインバブル水の殺菌および細菌毒素不活化作用の解析

○滝澤 史雄¹, 土門 久哲^{1,2}, 平山 悟¹, 磯野 俊仁¹, 笹川 花梨¹, 米澤 大輔³, 牛田 晃臣⁴, 筒浦 さとみ⁵, 寺尾 豊^{1,2} (1)新潟大・院医歯・微生物, 2)新潟大・院医歯・高口研セ, 3)新潟大・院医歯・口腔衛生, 4)新潟大・工・機械システム, 5)新潟大・農)

Analysis of the effect of ozone ultrafine bubble water against various bacteria and bacterial toxins

○Fumio Takizawa¹, Hisanori Domon^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Toshihito Isono¹, Karin Sasagawa¹, Daisuke Yonezawa³, Akiomi Ushida⁴, Satomi Tsutsuura⁵, Yutaka Terao^{1,2} (1)Div. Microbiol. Infect Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2)Cent. For. Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3)Div. Oral Sci. Health Prom, Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 4)Inst. Sci. Tech., Niigata Univ., 5)Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】オゾンガスは様々な細菌に対して殺菌作用を示すが、水溶液化が困難であった。そこで、気体をナノサイズの気泡にして水中に分散・安定させるウルトラファインバブル技術に着目し、新たなオゾンウルトラファインバブル水 (以下オゾンナノ水) 発生装置を開発した。本研究では、オゾンナノ水の消毒液としての応用に向け、殺菌作用および細菌毒素に対する不活化作用を解析した。【方法】オゾンナノ水を *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* の培養液に添加し、コロニーカウント法にて各細菌の生存率を算定した。また、オゾンナノ水に曝露した *S. pneumoniae* を透過型電子顕微鏡で観察した。続いて、*S. pneumoniae* の PLY もしくは *S. aureus* の SEA をオゾンナノ水に添加し、SDS-PAGE で展開後、銀染色を行った。また、ヒト好中球に組換え PLY またはオゾンナノ水処理した組換え PLY を添加し、LDH 細胞傷害性試験を行った。【結果】オゾン濃度 1 ppm 以上のオゾンナノ水は、供試した全ての菌株を 30 秒以内に死滅させた。透過型電子顕微鏡観察において、オゾンナノ水に曝露した *S. pneumoniae* の細胞壁の損傷が確認された。オゾンナノ水で処理した組換え PLY と SEA は銀染色で検出されなかった。また、オゾンナノ水で処理した PLY を添加した好中球の LDH 漏出量は、未処理群と比較して有意に少なかった。一方で、オゾンナノ水は LPS を分解せず、LPS の炎症誘導能も抑制しなかった。【考察】オゾンナノ水は様々な細菌を殺菌するとともに、タンパク質性の細菌毒素を分解・不活化することが示唆された。これらの結果から、オゾンナノ水を消毒薬として応用できる可能性が示された。

P2-130/DP2-19-09

ミツバチのヨーロッパ腐蛆病発症過程における低分子物質チラミンの影響の解析

○岡本 真理子¹, 高松 大輔^{1,2}, 上垣 隆一¹, 中村 佳子³, 原田 真理子³ (1)動衛研・農研機構, 2)岐阜大, 3)生安研)

Analysis of the effect of tyramine on the pathogenesis of European foulbrood in honey bees

○Mariko Okamoto¹, Daisuke Takamatsu^{1,2}, Ryuichi Uegaki¹, Keiko Nakamura³, Mariko Harada³ (1)NIAH, NARO, 2)UGSVS, Gifu Univ., 3)RIAS)

ヨーロッパ腐蛆病 (EFB) は *Melissococcus plutonius* を原因とするミツバチ幼虫の細菌感染症である。本菌の遺伝子型 CC12 株は幼虫への毒性が最も強い重要な株であるが、その病原因子は明らかになっていない。幼虫に経口摂取された CC12 株は腸内で増殖し、中腸内壁を保護する餌食膜を破壊して中腸上皮細胞に接触する。餌食膜を失った上皮細胞は変性し、幼虫は死に至る。しかし、餌食膜を破壊できない CC12 株を幼虫に感染させても中腸上皮細胞は変性したことから、CC12 株は餌食膜を通過し細胞変性を起こす物質を分泌している可能性が示唆されている。*M. plutonius* のゲノム解析を行った報告では、CC12 株が細胞傷害活性を持つ低分子物質チラミンの各遺伝子を保有することが明らかになっているが、EFB 発症への関与は不明であった。そこで、本研究では、CC12 株が実際にチラミンを産生することを確認するため、LC-MS/MS を用いたチラミンの定量分析系を構築し、CC12 株感染および非感染幼虫中のチラミン量を比較した。その結果、非感染幼虫ではチラミンが未検出であったのに対し、感染幼虫では平均 11.8µg/幼虫の量で検出され、CC12 株は幼虫内でチラミンを産生していることが明らかとなった。続いて、チラミンが EFB 発症に関与しているか調査するため、CC12 株を親株として餌食膜分解及びチラミン合成に関与する遺伝子を欠失させた株を作出した。親株と欠失株を用いて幼虫への感染実験を行ったところ、欠失株では親株より幼虫の死亡率が低下し、これらの遺伝子が部分的に EFB 発症に関与している可能性が示唆された。今後、欠失遺伝子を再導入した相補株を作出し、EFB 発症へのチラミンの関与をさらに解析する予定である。

P2-131/DP2-19-10

胃炎-胃癌患者の胃粘膜より分離された硝酸塩還元菌の性状

○桑木 星里香¹, 山本 由弥子², 内山 淳平², 松下 治², 後藤 和義¹, 渡辺 朱理³, 横田 憲治¹ (1岡山大学・保健学, 2岡山大学・医歯薬・病原細菌学, 3徳島大学・医歯薬学・口腔機能管理学)

Characteristics of nitrate-reducing bacteria from patients with gastritis and gastric cancer

○Serika Kuwagi¹, Yumiko Yamamoto², Jumpei Uchiyama², Osamu Matsushita², Kazuyoshi Gotoh¹, Akari Watanabe³, Kenji Yokota¹ (1Health Science, Okayama Univ., 2Dept. Path. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pham. Okayama Univ., 3Oral Health Care and Rehabilitation, Inst. Biomed. Sciences, Tokushima Univ.)

【はじめに】これまでの研究により、胃炎患者の胃粘膜委縮の進行に伴い胃内の硝酸塩還元菌の検出率が高まることを報告した。本研究の目的は、胃内より分離された硝酸塩還元菌の硝酸塩還元能について胃炎患者と胃癌患者で比較することである。【実験方法】1.対象ピロリ菌感染胃癌と診断された患者より、上部消化管内視鏡時にピロリ菌の培養目的で前庭部大弯、胃体部大弯より粘膜生検を行った。そのうち、19検体から検出された硝酸塩還元菌について硝酸塩還元能を調べた。19検体から検出された菌を増殖の早い菌と遅い菌に分けて比較・検討した。2.硝酸塩還元能測定 硝酸塩を添加した液体培地に硝酸塩還元菌をそれぞれ接種し、増殖が早い菌種と遅い菌種に分け、亜硝酸塩濃度と増殖曲線のタイムコースをそれぞれとった。尚、亜硝酸塩濃度については亜硝酸に反応する試薬を入れた後の発色度合いをELISAリーダーにて測定し、菌量については培養した菌液そのものの吸光度を測定した。【結果と考察】培養総菌数は、胃癌患者で有意に増加し、硝酸塩還元菌の菌数も胃癌患者で有意に増加していた。また、胃癌では検出される菌種も口腔内細菌より腸内細菌の割合が高くなることから判明した。分離した菌における亜硝酸産生量の最大値 (Vmax) を比較検討した。増殖の遅い菌については、胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の方が、Vmax が強い傾向があった。増殖の早い菌については、胃癌患者由来の硝酸塩還元菌のVmax が有意に高かった。増殖が早い菌・遅い菌ともに胃癌患者由来の硝酸塩還元菌の方が、還元能が高いということから、ピロリ菌による胃癌発癌への硝酸塩還元菌の関与が示唆された。

P2-132/DP2-19-11

Possibility of periodontal bacteria causing changes in liver drug metabolism

○三浦 利貴¹, 鈴木 舟², 及川 貴子³, 石河 太知¹ (1岩手医大・歯・微生物・分子微生物, 2岩手医大・歯・口腔顎顔面再建・口腔外科, 3岩手医大・歯・歯科保存・歯周療法)

○Toshitaka Miura¹, Shuu Suzuki², Takako Oikawa³, Taichi Ishikawa¹ (1Div. Mol. Microbiol., Dept. Microbiol., Sch. Dent., Iwate Med. Univ., 2Div. Oral Maxillofac. Surg., Dep. Reconstructive Oral Maxillofac. Surg., Sch. Dent., Iwate Med. Univ., 3Div. Periodont., Dep. Conservative Dent., Sch. Dent., Iwate Med. Univ.)

Periodontal bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, are indigenous oral bacteria and are implicated in periodontal disease. Recent studies also show their involvement in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma, are suggesting that these conditions may be caused by exposure to these bacteria. However, whether these affect liver drug metabolism have not been elucidated. In this study, human liver cancer cell line HuH7 was exposed to heat-killed *P. gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. After exposure, gene and protein expression levels were detected using real-time PCR and western blotting. Our results indicated that bacterial exposure induced a part of cytochrome P450 (CYP) expressions. These expressions were involved the aryl hydrocarbon receptor (AhR). The results suggested that these bacteria may activate the AhR pathway. The induction of drug metabolism enzymes increases the metabolism of chemical substances, may be impacting drug resistance in therapy. Additionally, the involvement of the AhR pathway extends to immune systems and cancer progression. Thus, the presence of periodontal bacteria, affecting the liver, may contribute to diseases and therapy resistance on a broader scale.

P2-133/DP1-05-01

Alendronate augments lipid A-induced IL-1 β release via activation of ASC or AP-1, but not caspase-11

○玉井 利代子, 清浦 有祐 (奥羽大・歯・口腔病態解析制御)

○Riyoko Tamai, Yusuke Kiyoura (Dept. Oral Med. Sci., Sch. Dent., Ohu Univ.)

Purpose: The present study aimed to examine whether alendronate (ALN), an anti-bone-resorptive drugs, augments lipid A-induced IL-1 β release using mouse macrophage-like J774.1 cells, ASC-deficient RAW264 cells, or caspase-11-deficient RAW264.7 cells. Caspase-11 is a receptor of LPS.

Method: Cells were pretreated with or without ALN, and then incubated with or without lipid A. For inhibition assays, the cells were pretreated with inhibitors for 1 h or antibodies for 30 min prior to the addition of ALN. Levels of secreted mouse IL-1 β in culture supernatants and activation of AP-1 were measured by ELISA. Expression of caspase-11, ASC, and actin was analyzed by Western blot analysis. Toll-like receptor (TLR) 4 expression was analyzed by flow cytometry.

Results: Pretreatment of the cells, even caspase-11-deficient RAW264.7 cells, with ALN significantly augmented lipid A-induced IL-1 β release although ALN did not upregulate the expression of TLR4. Anti-ASC antibody inhibited ALN-augmented IL-1 β release in J774.1 cells. However, ALN upregulated the activation of AP-1 in RAW264 cells. Furthermore, pretreatment with the AP-1 inhibitor SR11302 before addition of ALN inhibited ALN-augmented IL-1 β release by lipid A-treated RAW264 cells.

Discussion: These findings collectively suggested that ALN augmented lipid A-induced IL-1 β release via activation of ASC or AP-1, but not caspase-11.

P2-134/DP1-05-02

Detection of bacteria by immune activating receptor via plasma components

○李 一凡¹, 平安 恒幸¹, 長谷川 玄¹, 富田 陽生², 橋川 裕子³, 荒瀬 尚^{4,5}, 華山 力成^{1,3} (1金沢大・先進, 2金沢大・医薬・免疫, 3金沢大・ナノ研, 4阪大・微研・免疫, 5阪大・免フ口・免疫)

○Yifan Li¹, Kouyuki Hirayasu¹, Gen Hasegawa¹, Yosei Tomita², Yuko Hashikawa³, Hisashi Arase^{4,5}, Rikinari Hanayama^{1,3} (1Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., 2Dept. Immunol., Med. Pharm., Kanazawa Univ., 3NanoLSI., Kanazawa Univ., 4Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., 5Lab. Immunochem., IFRc, Osaka Univ.)

Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) family is a primate-specific immunoreceptor, widely expressed on most immune cells, regulating immune responses through interactions with various ligands. The inhibitory type of LILRBs has been widely studied and many ligands such as HLA class I have been found. On the other hand, little is known about the activating type of LILRBs. We previously identified microbially cleaved immunoglobulin as a non-self ligand for LILRA2. Here, we found an endogenous ligand for LILRA2 that recognized the plasma component. LILRA2, upon recognition of the plasma component, activated human primary monocytes and promoted the expression of a variety of inflammation-related genes. It was previously reported that a variety of bacteria can evade immunity by binding to the plasma component on the bacterial surface. We confirmed that the plasma component bound to the bacterial surface. Although LILRA2 was unable to recognize bacteria directly, bacteria that bound the plasma component was recognized by LILRA2. Our findings suggest that LILRA2 is a sensor of bacterial immune evasion, which reflects the co-evolution of the immune system and bacteria.

P2-135/DP1-05-03**RSウイルス感染による鼻咽頭定着肺炎球菌の増殖機構**

○石川 紗妃¹, 岡田 七海², 福井 優珠², 中村 茂樹¹, 伊藤 利洋², 柴田 岳彦¹ (¹東医大・医・微生物, ²奈医大・医・免疫)

Growth of *S. pneumoniae* colonized in the nasopharynx associated with RSV infection

○Saki Ishikawa¹, Nanami Okada², Yuzu Fukui², Shigeki Nakamura¹, Toshihiro Ito², Takehiko Shibata¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Tokyo Med. Univ., ²Dept. Immunol., Sch. Med., Nara Med. Univ.)

20-50%の小児の鼻咽頭には肺炎球菌が定着している。この肺炎球菌が増殖すると、肺炎などの重症化をもたらすことがある。定着状態では無症候であるが、何らかのきっかけにより肺炎球菌が増殖することがある。しかし、この肺炎球菌の増殖機構は解明されていない。そこで本研究では、これまでに我々が見出した新規免疫抑制シグナル growth arrest-specific protein 6 (Gas6) /Axlに着目し、この機構を解明することを目的とした。

肺炎球菌鼻咽頭定着モデルマウスにRSウイルスを感染させると、RSウイルス非感染グループと比較して鼻咽頭洗浄液 (NAL) と気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の肺炎球菌数が増加した。また、RSウイルス感染グループではNALとBAL中の好中球数が増加し、肺炎像も観察された。さらに、肺炎球菌定着モデルマウスにRSウイルスを感染させたのち、Axl阻害剤であるBGB324を投与すると、RSウイルス感染に伴う肺炎球菌数の増加が抑制された。一方、定着モデルマウスにRSウイルスの代わりにリコンビナント Gas6を鼻咽頭に投与すると、肺炎球菌が増殖した。そして、Gas6/Axlシグナルによる肺炎球菌の増殖は、このシグナルによるマクロファージのフェノタイプの変化が原因である可能性が見出された。

以上の結果より、RSウイルス感染に伴い誘導されるGas6がマクロファージのAxlに作用し、鼻咽頭定着肺炎球菌を増殖させることが示唆された。この成果は、Gas6/Axlシグナルあるいはマクロファージを標的とした肺炎球菌感染症の重症化予防・治療法の開発につながる可能性がある。

P2-136/DP1-05-04**A balance of paired immune receptors and bacterial pathogenicity**

○長谷川 玄¹, 平安 恒幸¹, 李 一凡¹, 荒瀬 尚^{2,3,4}, 山口 雅也^{4,5,6,7}, 川端 重忠^{4,7}, 華山 力成¹ (¹金沢大・先進, ²阪大・微研・免疫, ³阪大・免フロ・免疫, ⁴阪大・CiDER, ⁵阪大・院歯・バイオインフォ, ⁶阪大・微研・バイオインフォ, ⁷阪大・院歯・微生物)

○Gen Hasegawa¹, Kouyuki Hirayasu¹, Yifan Li¹, Hisashi Arase^{2,3,4}, Masaya Yamaguchi^{4,5,6,7}, Shigetada Kawabata^{4,7}, Rikinari Hanayama¹ (¹Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., ²Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., ³Lab. Immunochem., IFRc, Osaka Univ., ⁴CiDER, Osaka Univ., ⁵Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ⁶Bioinform. Cent., RIMD, Osaka Univ., ⁷Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

Leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor (LILR) is a paired receptor family expressed on various cells in primates. The LILR family shares extracellular domains characterized by high homology and transduce activating or inhibitory signals based on the difference of the intracellular structure. The activating receptor LILRA6 and inhibitory receptor LILRB3 show remarkably high homology in their extracellular domains, making them indistinguishable by antibodies. Additionally, numerous non-synonymous polymorphisms in LILRA6 and LILRB3 suggest complex regulation of immune activity. Consequently, it is conceivable that LILRA6 and LILRB3 are subject to substantial selective pressure. Nevertheless, their specific ligand remains unidentified. Through comprehensive screening of various pathogens, we discovered that LILRA6 and LILRB3 specifically recognize a certain bacterium. Furthermore, a statistically significant association was found between infection history and the polymorphic variations within LILRA6 and LILRB3 polymorphism, suggesting that LILRA6 and LILRB3 play an important role in the susceptibility to the bacteria. Moreover, the identified ligand also exhibits genetic diversity, leading to variations in molecule expression levels. Based on these findings, we propose a competitive co-evolution model of human-pathogen interactions mediated through immune receptors.

P2-137/W8-3**E3 ligase SIAH1 mediates Streptolysin O ubiquitination for xenophagy against Group A Streptococcus**

○Min Wu, Xin Hu, 飯伏 純平, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大・医・微生物)

○Min Wu, Xin Hu, Junpei Iibushi, Atsuko Nozawa, Kazunori Murase, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Upon pathogen invasion, host cells employ ubiquitination to label and initiate autophagy, a selective autophagy process, to eliminate invading pathogens. However, the bacterial components targeted for ubiquitination and corresponding ubiquitin enzymes remain poorly understood. This study reveals the pivotal role of the E3 ligase SIAH1 in recognizing and ubiquitinating Streptolysin O (SLO), a toxin secreted by Group A Streptococcus (GAS), and promoting autophagosome formation and maturation. Since xenophagy against GAS is induced by SLO-mediated bacterial invasion into the cytosol, SLO itself was considered one of the ubiquitination targets. Super-resolution microscopy revealed colocalization of SLO and ubiquitin around intracellular bacteria. Ubiquitination assay and in situ proximity ligation assay (in situ PLA) confirmed its ubiquitination during GAS infection. We identified the PSVP motif in SLO as a candidate binding site for E3 ligase SIAH1. Mutation of SLO decreased its ubiquitination and ubiquitin accumulation in bacteria. Furthermore, SIAH1 was recruited to intracellular GAS and colocalized with SLO. SIAH1 knockout diminished GAS ubiquitination, autophagosome formation, and increased GAS survival. This study highlights the crucial role of SIAH1-mediated ubiquitination of SLO in the xenophagy against GAS, offering potential avenues for therapeutic intervention.

P2-138/DP1-05-05**Rab13 GTPase is involved in ubiquitin-mediated recognition of Group A Streptococcus in xenophagy**

○Xin Hu, Min Wu, 飯伏 純平, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大院・医・微生物)

○Xin Hu, Min Wu, Junpei Iibushi, Atsuko Nozawa, Kazunori Murase, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Pathogenic bacteria can invade host cells, multiply and spread infection. This triggers a response from the cell-autonomous immune system. Group A Streptococcus (GAS) invades human epithelial cells through a process called endocytosis. Cytosolic GAS is coated with a protein called ubiquitin, which helps in efficiently eliminating it by xenophagy. Our research on small GTPase Rab proteins, which are master regulators of membrane trafficking, has revealed their roles in autophagosome trafficking, bacterial recognition, xenophagy activation and membrane repair during GAS infection. Rab proteins are involved in membrane trafficking, and we believe that they can unveil novel cell-autonomous immunity signaling pathways. In this study, we screened 60 Rab GTPases in GAS infection and discovered that Rab13 colocalized with xenophagosomes. Knockdown or knockout of Rab13 significantly decreased ubiquitin-positive bacteria and xenophagosome formation, suggesting that Rab13 is involved in ubiquitin-mediated recognition of bacteria during GAS infection for xenophagy. Moreover, we found that E3 ligase RNF115 that ubiquitinates Rab13 localized to xenophagosomes and was involved in ubiquitin-associated xenophagosome formation. Collectively, these results imply that Rab13 and RNF115 play a role in recognition of intracellular GAS in xenophagy.

P2-139/DP1-11-06

細菌由来膜小胞のがん治療効果増強に向けた磁性ナノ粒子封入

○長坂 有志¹, 鈴木 千博², 二又 裕之^{1,3}, 大多 哲史¹, 田代 陽介¹ (静大院・総合科技, ²静大工, ³静大・グリーン研)

Magnetic Nanoparticle Encapsulation of Membrane Vesicles to Enhance Cancer Therapy Effectiveness

○Yushi Nagasaka¹, Chihiro Suzuki², Hiroyuki Futamata^{1,3}, Satoshi Ota¹, Yosuke Tashiro¹ (Grad. Sch. Intgr. Sci. Tech. Shizuoka Univ., ²Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Shizuoka Univ., ³Res. Inst. Green Sci. Tech. Shizuoka Univ.)

グラム陰性菌が放出する膜小胞は、直径約 100 nm の脂質二重膜から構成される生体微粒子であり、長期的な抗腫瘍免疫反応を効果的に誘導する。しかし、効率の向上が必須であり、実用化には至っていない。本研究では、細菌由来膜小胞内に磁性ナノ粒子を封入することで、ハイブリッド微粒子「磁性膜小胞」を作製し、膜小胞の免疫誘導と磁性ナノ粒子の発熱という 2 つのプロセスの相乗効果によるがん治療効果増強を目的とした。膜小胞の免疫活性能がより高いことで知られるプロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) ベン毛欠損株を培養した。培養上清から抽出した膜小胞と磁性ナノ粒子 synomag (Micromod) を混合し、エクストルーダー (Avanti) による押し出し後、磁気分離を行った。その後、各微粒子のタンパク質量を Bradford 法で行ったところ、磁性微粒子に十分量のタンパク質が検出され、膜小胞との複合微粒子形成が示唆された。また、ナノトラック解析 (NTA) と SEM 観察から、膜小胞コーティング後の粒子径増大が確認された。以上により、膜小胞内への磁性ナノ粒子封入が示された。次に、各微粒子の免疫細胞への影響を調べた。その結果、磁性ナノ粒子と比べ、磁性膜小胞添加時のマクロファージによる貪食能が向上した。また、磁性膜小胞のマクロファージへの細胞障害性は低いものの、がん治療に重要な炎症性サイトカインである IL-6 を産生することが示された。本研究ではがん治療に有効な磁性膜小胞の作製法を確立した。今後は、培養細胞、モデルマウスを用いてがん腫瘍に対する免疫誘導能および安全性について評価する。

P2-140/DP1-11-07

Strategic Construction of DNA Vaccine Candidates with Bacteriophages for TB

○劉 怡, ヴィーラナラヤナン スリワニ, ティティアナンパコーン カネート, 相羽 由詞, タンシンイー, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍沫 (自治医大・医・細菌学)

○Yi Liu, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitianapakorn, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, stands as the world's most lethal infection from a single infectious agent. Despite the pivotal role of vaccines in tuberculosis prevention, the current TB vaccine, BCG, falls short in preventing TB in adults, highlighting the urgent need for an alternative. Bacteriophages (phages), viruses with the ability to infect and kill bacteria, pose no threat to humans. The repetitive architecture of their capsids serves as natural self-adjuvant, rendering them as promising vaccine vehicles. This study delves into the design and development of a DNA vaccine vector employing bacteriophages to combat TB. For this purpose, we utilized *Staphylococcus aureus* phage and strategically deleted the integrase-encoding gene to preclude phage integration and ensure safety. Subsequently, an immune-cell targeting peptide was engineered to be displayed on the structural protein, and its targeting efficacy was successfully evaluated. Next, a mammalian expression system was incorporated into the phage genome to enable efficient expression of antigen-encoding DNA cargo in humans, thereby inducing robust immune response. We propose that this phage-based DNA vaccine candidate has the potential to effectively deliver antigen-encoding DNA, leading to the production of antigenic proteins and eliciting an efficient immune response against TB.

P2-141/W8-4

Periodontitis vaccine using three different bacterial outer membrane vesicles in canine model

○中尾 龍馬¹, 山口 雄大¹, 佐伯 潤², 安部 公博¹, 明田 幸宏¹, 中村 知世³, 西野 智彦³, 石原 和幸⁴, 大上 厚志⁵, 井上 智¹ (1)感染研・細菌1, (2)帝京大・アニマルサイエンス, (3)工科大・応生, (4)東歯大・微生, (5)群大・バイオリソース)

○Ryoma Nakao¹, Takehiro Yamaguchi¹, Jun Saeki², Kimihiro Abe¹, Yukihiro Akeda¹, Tomoyo Nakamura³, Tomohiko Nishino³, Kazuyuki Ishihara⁴, Atsushi Jinno-Oue⁵, Satoshi Inoue¹ (1)Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Dept. Ani. Sci., Teikyo Univ. Technol., (3)Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., (4)Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Coll., (5)Biores. Center, Gunma Univ.)

The aim of this study is to investigate whether bacterial outer membrane vesicle (OMV)-based periodontal vaccines induced humoral immune response in canines from a human vaccine development perspective. *c-Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Treponema denticola* (Td), two major periodontal pathogens, were chosen as vaccine targets. Intranasal immunization with Pg OMVs and Td OMVs strongly elicited humoral immune responses, particularly when adjuvanted with a probiotic *Escherichia coli* derivative (EcNflhD)-derived OMVs. However, in beagles, intranasal immunization with the same Pg/Td/EcNflhD OMV vaccine insufficiently elicit humoral immune responses. Nevertheless, the subcutaneous booster with the same OMVs dramatically improved antibody responses in both systemic blood circulation and mucosal sites such as eyes, oral cavity, and upper and lower respiratory tracts. Metagenomic analysis revealed that the OMV vaccine changed the salivary microbial composition. In *in vitro* Pg growth inhibition assay, serum samples from OMV-immunized beagles significantly inhibited growth of the gingipain-deficient strain but not the gingipain-expressing wild type strain. Taken together, our data offer the trivalent OMV vaccine strategy by IN-prime/SC-boost regimen, which could elicit robust mucosal immune responses, which may build sterilizing immunity in oral cavity.

P2-142/DP1-11-08

人參養榮湯の *Klebsiella pneumoniae* 感染症予防効果の分子機構

○田中 里佳¹, 椿 翔吾², 津川 仁² (1)東海大・医・生体防御学領域・免疫学, (2)東海大・医・生体防御学領域・生物界間シグナル解析)

Molecular mechanism of the preventive effect of Ninjinyoito on *Klebsiella pneumoniae* infection

○Rika Tanaka¹, Shogo Tsubaki², Hitoshi Tsugawa² (1)Dept. Immunology, Div. Infect. Host Def., Sch. Med., Tokai Univ., (2)Transkingdom Signaling Research Unit, Div. Infect. Host Def., Sch. Med., Tokai Univ.)

腸内細菌の一種である *Klebsiella pneumoniae* は高齢者を中心に肺炎や肝膿瘍を引き起こす。本菌感染症の特徴は、消化管内に共生する菌株が肺や肝臓の遠隔臓器で感染巣を確立する点にある。本研究では、体力低下を補う効能を持つ漢方処方に *K. pneumoniae* 感染症に対する予防効果があるか検証した。トランスウェルインサートを介した RAW264.7 マクロファージ様細胞と Caco2 上皮細胞の共培養システムを用いた *K. pneumoniae* の感染モデルでは、大建中湯、十全大補湯、補中益気湯に比べ人參養榮湯のみ *K. pneumoniae* の Caco2 細胞内への侵入抑制効果が認められた。RAW264.7 マクロファージ様細胞への人參養榮湯の刺激により顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の分泌が促進されることが RNA sequence 解析並びに ELISA 試験により明らかになり、Caco2 細胞への G-CSF 刺激は *K. pneumoniae* の Caco2 細胞内への侵入を有意に抑制した。また、老齢マウス (56 週齢) から構築した Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) への *K. pneumoniae* 感染モデルでは、人參養榮湯は BMDMs 内での本菌の生存性を有意に抑制した。そこで、人參養榮湯含有飼料を与えた老齢マウスへ *K. pneumoniae* を経口感染させると、人參養榮湯非投与群に比べ老齢マウスの生存性が亢進した。これらの結果から、人參養榮湯はマクロファージへの作用を基点に、G-CSF の分泌誘導を介した上皮細胞バリアの亢進とマクロファージ内での *K. pneumoniae* の排除応答の促進活性を発揮することで、*K. pneumoniae* 感染症に対する予防効果を発揮すると考えられた。

P2-143/DP1-11-09

Different prime-boost regimens via systemic or mucosal routes with a novel membrane vesicle vaccine

○内山 大樹^{1,2}, 山口 雄大¹, 尾花 望³, 安部 公博¹, 豊福 雅典⁴, 野村 暢彦⁴, 明田 幸宏¹, 中尾 龍馬¹ (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筑波大・医学医療系, 4筑波大・生命環境)

○Hiroki Uchiyama^{1,2}, Takehiro Yamaguchi¹, Nozomu Obana³, Kimihiro Abe¹, Masanori Toyofuku⁴, Nobuhiko Nomura⁴, Yukihiko Akeda¹, Ryoma Nakao¹ (1Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dept. Surg., Tokyo Med. Dent. Univ. Grad Sch. Med., 3Tsukuba Transborder Medical Research Center, Fac. Medicine, Univ. of Tsukuba, 4Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS), Univ. Tsukuba)

Novel vaccines that elicit both systemic and mucosal immune responses may offer a solution for reducing the burden of mucosal infections. We have recently characterized a probiotic *Escherichia coli* membrane vesicle (MV) chimera displaying pneumococcal capsular polysaccharide at high density, which elicited potent IgG-dominant immune response in mice after a subcutaneous (SC) vaccine regimen. Here we assess immune responses and protection from pneumococci following all different combinations in a three-dose regimen via SC or intranasal (IN) route with a novel detoxified bacterial MV-based vaccine against pneumococcal disease. IN prime elicited stronger IgG response as compared to SC prime, whatever the second or third administration route was chosen. Both systemic and mucosal IgA levels increased as the number of IN administration increased. An upper respiratory infection model study revealed that a significant bacterial clearance was observed only when administered via IN route not less than twice in three-dose regimen. The number of pneumococci detected was inversely correlated to the SIgA levels in oral and nasal cavity. The present findings suggest the MV-based vaccine administered via heterologous routes, e.g., IN-IN-SC, IN-SC-IN, could be beneficial for building both systemic and mucosal protective immunity accompanied with robust class-switch recombination to IgG/A.

P2-144/DP1-11-10

活動性結核マウスモデルを用いた肺内結核菌数を反映する肺および血液 RNA シグネチャーの探索

○中村 創, 瀬戸 真太郎, 土方 美奈子, 慶長 直人 (結核研究所・生体防御部)

Exploration of RNA signatures reflecting mycobacterial load in the lungs using active TB mouse model

○Hajime Nakamura, Shintaro Seto, Minako Hijikata, Naoto Keicho (Dept. Pathophysiol. Host Defense, Research Inst. Tuberculosis)

結核は現在でも全世界で1,000万人以上の新規患者と130万人の死亡者が発生している。また、世界人口の4分の1が結核菌に感染しているといわれている。結核の感染制御において重要な、発症・重症化を予測するバイオマーカーが探索されているが、未だ確立されていない。私たちの研究グループは活動性結核マウスモデルとして利用されている C3HeB/FeJ マウスを用いた結核菌感染モデルの構築に成功している。C3HeB/FeJ マウスは、ヒト結核と同様に感染肺に乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する、ヒト結核病態を反映するマウスである。これまでに、高病原性の結核菌臨床分離株を感染させた C3HeB/FeJ マウスでは、ヒト結核患者と類似した血液 RNA 発現プロファイルを示すことが報告されている。本研究では、本マウスモデルを用いて肺内菌数を反映する肺および血液での RNA シグネチャーを探索した。C3HeB/FeJ マウスに結核菌 Erdman 株を噴霧吸入感染させて、感染12週後に肺と血液を採取した。それぞれの試料から RNA を抽出して RNA シークエンシングを行った。その結果、血液 RNA 発現プロファイルは肺 RNA 発現プロファイルと同様に I 型インターフェロン応答を含む炎症反応に関わる遺伝子群の発現が亢進していた。また、肺と血液において共通して発現量が変化する遺伝子を抽出した結果、I 型および II 型インターフェロン応答に関連する遺伝子群を見出した。今後、発現量変動遺伝子から肺内菌数と連動する遺伝子群を weighted correlation network analysis (WGCNA) によって明らかにする。

P2-145/DP1-11-11

百日咳菌の外膜小胞を用いた経鼻ワクチンによる感染防御効果と免疫応答評価

○石川 青空^{1,3}, 相内 章¹, 坂本 玲奈¹, 中尾 龍馬², 鈴木 忠樹¹, 田村 浩二³ (1感染研・病理, 2感染研・細菌一部, 3東理大・先進工・生命工)

Evaluation of protective effect induced by intranasal vaccination of *Bordetella Pertussis*

○Sora Ishikawa^{1,3}, Akira Aina¹, Rena Sakamoto¹, Ryoma Nakao², Tadaki Suzuki¹, Koji Tamura³ (1Dept. Pathology, NIID, 2Dept. Bacteria 1, NIID, 3Dept. Bio Sci. and Tech., Grad. Sch. Indu. Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci.)

【背景と目的】百日咳は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染で引き起こされる急性呼吸器感染症である。現行の無細胞百日咳ワクチン (Acellular pertussis vaccine; aP) は発症予防効果が認められる一方で、感染そのものに対する防御効果が不十分であることが指摘されている。また、現行のワクチンでは Th2 主体の免疫応答が誘導されるのに対し、百日咳菌感染では Th1 ならびに Th17 応答が誘導され上気道における再感染の防御には Siglec-F 陽性の好中球が寄与している可能性が報告されている。より効果の高いワクチンとして、現行のワクチンに不足している多様な抗原を百日咳菌から放出される外膜小胞 (outer membrane vesicle; OMV) を添加し補うことが考えられる。さらに、接種経路を経鼻接種に変更することで、百日咳菌の感染成立の場である気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体の誘導が可能になり、発症予防のみならず感染防御効果が期待できる。以上のことから、本研究では、aP+OMV の経鼻接種により誘導される抗体ならびに好中球をはじめとする免疫応答と感染防御効果について検討した。【結果】aP 接種群では、血清中の IgG 抗体は誘導されたものの IgA 抗体については全く誘導されなかった。対して、aP+OMV の経鼻接種では気道粘膜上に Fim に対する IgA 抗体が誘導された。また aP+OMV の経鼻接種では鼻腔において Siglec-F 陽性の好中球の割合が aP の皮下接種に比べて高いことが明らかとなった。aP+OMV の経鼻接種群では百日咳菌感染後の生菌数が大きく抑えられたことから、aP 皮下接種と比較して感染防御効果が高いことが示唆された。

P2-146/W8-5

Recombinant MDP1 with post-translational modifications enhances IFN-gamma production by blood cells

○尾関 百合子¹, 西山 晃史¹, 立石 善隆¹, 前山 順一², 伊保 澄子³, 山本 十糸子², 林 大介⁴, 山本 三郎^{2,4}, Amina Kaboso Shaban¹, 松本 壮吉¹ (新潟大・医・細菌学, 2感染研・村山, 3パスツール研, 4BCG研)

○Yuriko Ozeki¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Jun-ichi Maeyama², Sumiko Iho³, Toshiko Yamamoto², Daisuke Hayashi⁴, Saburo Yamamoto^{2,4}, Amina Kaboso Shaban¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (1Dept. Bact. Sch. Med., Niigata Univ., 2NIID, 3Pasteur Center, 4Japan BCG)

While BCG is an excellent vaccine, its drawback lies in the lack of sustained efficacy. We believe that booster vaccines are necessary to revive its effectiveness. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1, namely Rv2986c, hupB or HU) is a major Mycobacterium tuberculosis protein that induces vaccine-efficacy by co-administration with CpG DNA. To produce MDP1 for booster-vaccine use, we have created recombinant MDP1 produced in both *Escherichia coli* (eMDP1) and *Mycobacterium smegmatis* (mMDP1), an avirulent rapid-growing mycobacteria. We tested their immunogenicity by checking interferon (IFN)-gamma production by stimulated peripheral blood cells derived from BCG-vaccinated individuals. Similar to native *M. tuberculosis* MDP1, we observed that most lysin resides in the C-terminal half of mMDP1 are highly methylated. In contrast, eMDP1 had less post-translational modifications and IFN-gamma stimulation. mMDP1 stimulated the highest amount of IFN-gamma production among the examined native *M. tuberculosis* proteins including immunodominant MPT32 and Antigen 85 complex. MDP1-mediated IFN-gamma production was more strongly enhanced when combined with a new type of CpG DNA G9.1 than any other tested CpG DNAs. Taken together, these results suggest that the combination of mMDP1 and G9.1 possess high potential use for human booster vaccine against tuberculosis.

P2-147/DP1-11-12

Enhanced immunity to pulmonary tuberculosis by vaccination with Zinc metalloprotease 1-deficient BCG

○梅村 正幸^{1,2,3}, 高江洲 義一^{1,2,3}, 松崎 吾朗^{1,2,3} (1)琉球大・熱生研・感染防御, (2)琉球大・院・医・生体防御, (3)琉球大・医・先端医学・動物実験)

○Masayuki Umemura^{1,2,3}, Giichi Takaesu^{1,2,3}, Goro Matsuzaki^{1,2,3} (1) Trop. Biosphere Res. Cent., Univ. Ryukyus, (2) Drpt. Host Defense, Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, (3) Adv. Med. Res. Cent., Fac. Med., Univ. Ryukyus)

Interleukin (IL)-1 β is crucial in defense against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection and induction of IL-17A production. Mtb secretes Zinc metalloprotease 1 (Zmp1) to dampen IL-1 β production by infected macrophages. This study scrutinized the anti-Mtb immune response elicited by vaccination with a Zmp1-deficient (Δ Zmp1) BCG strain. B6 mice were vaccinated with either wild-type (WT) or Δ Zmp1-BCG, then intratracheally infected with Mtb 8 weeks later. A non-vaccinated control group (gr) was included. Four weeks post-infection, the mice were assessed. Δ Zmp1-BCG vaccinated gr exhibited higher level of production of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-17A) compared to the control and WT-BCG vaccinated grs. IL-17A-producing TCR $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ T17) cells in the infected lungs significantly increased in Δ Zmp1-BCG vaccinated gr, surpassing both control and WT-BCG vaccinated grs. Although the Mtb CFU in the lungs of WT- and Δ Zmp1-BCG vaccinated grs did not significantly differ, it was lower than that in the control gr. Interestingly, Δ Zmp1-BCG vaccinated gr exhibited a marked reduction in bacterial burden in the spleen. These findings suggest that a robust IL-17A response by $\gamma\delta$ T17 cells in the lungs restrains Mtb dissemination to other organs in Δ Zmp1-BCG vaccinated mice, indicating superior efficacy of Δ Zmp1-BCG vaccine in preventing Mtb infection compared to WT-BCG.

P2-148/DP1-11-13

MPB70 とそのプロモーターを利用した遺伝子組換えは、BCG 東京株での効率的な遺伝子発現と分泌を可能とする

○竹石 惇樹, Amina Kaboso Shaban, 尾関 百合子, 吉田 豊, 西山 晃史, 立石 善隆, 松本 壮吉 (新潟大・医・細菌学)

Genetic engineering employing MPB70 enables efficient expression of foreign antigen in BCG Tokyo

○Atsuki Takeishi, Amina Kaboso Shaban, Yuriko Ozeki, Yutaka Yoshida, Akihito Nishiyama, Yoshitaka Tateishi, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med, Niigata Univ.)

【背景と目的】 *Mycobacterium tuberculosis* variant BCG (以下、BCG) を用いて任意の外来抗原を発現する組換え BCG を作成し、任意の感染症のワクチンとすることができる。我々は BCG 東京株を元株として、既報を凌駕しうる新規遺伝子組換え手法を探索した。【方法と結果】 1) 対数増殖期と定常期にある BCG 東京株から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。いずれの増殖フェーズにおいても、最も転写されていた遺伝子は *mpb70* であった。2) *mpb70* 遺伝子プロモーター支配下で、オリゴペプチド (タグペプチド)、または新型コロナウイルスの S タンパク受容体結合ドメイン (RBD) を発現する組換え BCG を作出し、発現したタンパク質をそれぞれに特異的な抗体を用いてウェスタンブロットにて評価した。タグペプチド、RBD とともに組換え BCG 培養産物中に検出された。3) RBD 発現組換え BCG をマウスに投与し、得られた血清の中和活性を評価した。RBD 発現組換え BCG を投与されたマウス血清は、陰性対照のマウス血清より高い中和活性を示す傾向にあった。4) RBD 発現組換え BCG を凍結乾燥し、マウスに投与して脾臓から回収した。凍結乾燥組換え BCG と脾臓から回収した菌体の培養産物を、抗 RBD 抗体を用いたウェスタンブロットにて評価したところ、RBD が検出された。【考察】 *mpb70* 遺伝子が BCG 東京株で盛んに転写されることを利用し、既報のない組換え手法を確立することができた。この方法にて作成した組換え BCG は、オリゴペプチドから実用的なタンパク質までも発現でき、凍結乾燥処理や生体内で安定であった。MPB70 の発現過程をさらに解明することで、十分な中和抗体を誘導可能で、さらに実用的な組換え手法の確立が期待できる。

P2-149/W8-6

Metabolites from microbiota provide colonization resistance against *Candida albicans* in the gut

○後藤 義幸, Bonita McCuaig (千葉大・真菌・感染免疫)

○Yoshiyuki Goto, Bonita McCuaig (Div. Mol. Immunol., MMRC., Chiba Univ.)

Candida albicans is an opportunistic fungus in the human gut. Recent reports have shown that *C. albicans* is associated with the development of invasive candidiasis. Although several groups have reported that commensal bacteria prevent the colonization of *C. albicans* in the gut, the molecular and cellular mechanisms are still largely unknown. Using a series of antibiotic-treated mice and NGS analysis, we found that Enterobacteriaceae have the potential to prevent *C. albicans* colonization. We further isolated Enterobacteriaceae and confirmed that these bacteria prevent *C. albicans* colonization using gnotobiotic mice. To identify bacteria-derived metabolites responsible for colonization resistance against *C. albicans*, we performed a metabolome analysis of feces from mice that allow or are resistant to *C. albicans* colonization. In addition, we found that the supernatant of the culture medium of isolated Enterobacteriaceae has the potential to kill *C. albicans*. After purification and GC-MS, LC-MS, and NMR analysis, we identified that indole derivatives had fungicide effects. Using CRISPR/Cas9-based genome editing, we created a bacterial strain that defects indole derivatives. In contrast to the wild-type strain, the strain failed to kill *C. albicans*. These results indicate that commensal bacteria produce indole derivatives for preventing *C. albicans* colonization in the gut.

P2-150/W8-7

様々なファージ因子を認識して活性化する抗ファージ防御システム Septu の多様性

○千原 康太郎¹, 近藤 恒平², Aa Haeruman Azam¹, 小島 新二郎¹, 菅原 庸², 菅井 基行², 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹, 氣賀 恒太郎¹ (1) 感染研・治療薬ワクチン開発研究センター, (2) 感染研・薬剤耐性研究センター)

Diversity of Septu anti-phage defense system triggered by distinct phage components

○Kotaro Chihara¹, Kohei Kondo², Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Yo Sugawara², Motoyuki Sugai², Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹, Kotaro Kiga¹ (1) Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., (2) AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis.)

細菌はファージ感染を克服するために様々な抗ファージ防御システムを獲得している。制限修飾系や CRISPR-Cas システムはその代表例だが、近年の研究により、100 以上もの新たな抗ファージ防御システムが発見されている。一方で、これらの防御システムがファージ感染をどのように感知しているのかは未解明である。新規抗ファージ防御システムの 1 つである Septu はゲノムが解読された全細菌のうち約 4% に保存されたシステムであり、AAA ATPase ドメインを有する PtuA と HNH エンドヌクレアーゼドメインを有する PtuB から構成される。我々は、大腸菌臨床分離株から 15 個の Septu ホモログをクローニングし、そのファージ防御活性を評価したところ、様々な T 型ファージに対して非常に強力かつ多様な防御能を示すことが明らかになった。15 個の Septu ホモログの中でも幅広い防御能を示した Septu Ec^{B16} に着目して、Septu がどのようにファージ感染を感知しているのかを調査した。Septu Ec^{B16} に防御されないエスケープファージを獲得し、その全ゲノムを解読した結果、抗ファージ防御システム RexAB の阻害因子である RIIA や制限修飾系阻害因子である Ocr に変異が見つかった。さらに生化学の実験により、RIIA は Septu Ec^{B16} を構成する PtuA の突出領域に結合することで Septu Ec^{B16} を活性化することが明らかになった。PtuA の突出領域は 15 個のホモログの中で最も多様性のある構造領域であり、この多様性を持って異なる Septu ホモログが様々なファージ因子を認識して活性化する手段となっていると考えられる。以上のように、抗ファージ防御システムは感染を感知する領域に多様性を持たせることで、広範なファージに対応していると解釈される。

P2-151/W8-8**Transcription factor MafB regulates Mycobacterial infection in mice**

○引地 遥香^{1,2}, 中村 創¹, 大森 志保¹, 瀬戸 真太郎¹, 土方 美奈子¹, 慶長 直人³ (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・院・医歯薬・新興感染症病態制御学, 3公益財団法人結核予防会結核研究所)

○Haruka Hikichi^{1,2}, Hajime Nakamura¹, Shiho Omori¹, Shintaro Seto¹, Minako Hijikata¹, Naoto Keicho³ (1Dept. Pathophysiology and Host Defense, RIT, JATA, 2Dept. Infection Research, Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sciences, 3The Research Inst. Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

MAFB, is a transcription factor that regulates macrophage differentiation. A genome-wide association study revealed that a single-nucleotide polymorphism in the neighborhood of *MAFB* is associated with early tuberculosis (TB) onset in Thai and Japanese populations. We have demonstrated that MAFB regulates interferon-related pathways in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-infected human macrophages (Hikichi H et al., Front Microbiol, 2022). These studies led to a hypothesis that MAFB is associated with TB susceptibility. To test this, we subjected macrophage-specific *MafB* conditional knockout (*MafB*-cKO) mice to aerosol infection with *Mtb*. *MafB*-cKO mice exhibited a higher bacterial burden and reduced survival. In the lungs of *MafB*-cKO mice, pathological examination demonstrated the presence of granulomas characterized by an indistinct boundary. Flow cytometry analysis revealed impaired recruitment of T cell and enhanced infiltration of Ly6G-positive neutrophil in *MafB*-cKO mouse lungs. Finally, we discuss the mRNA sequencing results of *Mtb*-infected mice lungs in the context of impaired immunity and higher susceptibility to *Mtb* infection. This study offers insights into the role of MAFB in TB progression, paving the way for the development of predictive biomarkers for TB onset, as well as novel anti-TB drugs targeting host factors.

P2-152/DP1-06-01**MRSA の抗菌薬感受性に対する β -caryophyllene の影響**

○野村 陽恵¹, 佐久間 克也², 一色 恭徳¹ (1城西大・薬・病原微生物, 2小川香料 (株))

Effects of β -caryophyllene on antimicrobial susceptibility of MRSA

○Harue Nomura¹, Katsuya Sakuma², Yasunori Isshiki¹ (1Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Josai Univ., 2Ogawa & Co., Ltd.)

【背景】MRSA は、医療関連感染症の原因菌として広く知られている。現在、抗 MRSA 薬は僅か 6 剤のみであり、新たな治療薬の開発が求められている。そこで、MRSA が耐性を獲得したことで使用できない既存抗菌薬を再利用することを目的として、MRSA の抗菌薬感受性を増強させた β -caryophyllene の作用解析を行った。【材料】試験菌は、*Staphylococcus aureus* JCM2413 (MSSA), ATCC43300 (MRSA), JBCC018 (MRSA, 臨床分離株) を使用した。 β -caryophyllene は、小川香料株式会社より分与された。抗菌薬感受性増強効果の解析は、checkerboard 法を用いて評価した。また、RT-PCR とウェスタンブロットニング (WB) を用いて作用解析を行なった。【結果・考察】これまでに約 1000 香料について MRSA の抗菌薬感受性に対する影響を評価した結果、クローブやホップに含まれる香り成分である β -caryophyllene が β -lactam 系抗菌薬との併用により強い増強効果を示した。 RT-PCR 解析の結果、 β -caryophyllene 存在下において *mecA* 遺伝子と *blaZ* 遺伝子の発現が減少し、WB 解析においても PBP2a 発現量が減少した。さらに、菌体膜への影響を評価した結果、脂質二重膜内部の流動性を上昇させた。これらのことから、 β -caryophyllene は菌体膜の流動性を変化させることで、菌体膜上に存在し、PBP2a や β -lactamase 発現を調節する MecR1 や BlaR1 に影響することで、MRSA の β -lactam 系抗菌薬に対する感受性を増強することが示唆された。

P2-153/DP1-06-02**バンコマイシン耐性腸球菌に対するハスカップ果実の抗菌効果**

○南 正明¹, 中村 峰夫² (1名市大院・医・細菌, 2中村薬局)

Antibacterial effect of *Lonicera caerulea* fruit against vancomycin-resistant enterococci

○Masaaki Minami¹, Mineo Nakamura² (1Dept. Bacteriol. Nagoya City Univ. Grad. Sch. Med., 2Nakamura Pharm.)

【背景】近年、ヒトだけでなく家畜も含めた抗生物質耐性菌が増加しており、その中でバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が問題視されている。ハスカップは北海道固有の植物で、不老長寿の果実として知られている。我々はハスカップの抗菌効果についてこれまで本学会で報告してきたが、薬剤耐性菌に関する薬剤感受性に関する検討等は未だなされていない。本研究では、バンコマイシン (VCM) との併用効果を考慮したハスカップ果実の VRE に対する抗菌作用を検討した。【方法と材料】HKP エキスは、厚真産ハスカップ果実からメタノール抽出した。VRE は ATCC700221 を使用した。VCM 濃度は CLSI ガイドラインを参考に 32 μ g/mL を基準とした。薬剤感受性はディスク拡散法で、バイオフィルムの確認はサフランレッド染色法による光学顕微鏡で観察した。細菌の形態はネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡で観察した。【結果】ディスク拡散法による薬剤感受性試験では、HKP エキスを添加した VCM は VCM 単独よりも有意に細菌阻止円が拡大し、判定が薬剤耐性菌から薬剤感受性菌に変化した。また、サフランレッド染色によるバイオフィルム確認法では、HKP エキスを添加した VCM は VCM 単独よりも有意にバイオフィルム形成が抑制された。さらに、透過型電子顕微鏡によるネガティブ染色法での細菌形態確認方法では、HKP エキスを添加した VCM は VCM 単独よりも菌体が凝縮崩壊していた。【結論】我々の結果から、VRE に対して HKP エキスには VCM との併用による薬剤感受性増強作用や、バイオフィルム形成の抑制効果や、細菌菌体の凝縮崩壊効果が示唆された。

P2-154/DP1-06-03**A 群レンサ球菌の糖結合蛋白質 SPs0871 の機能を阻害する阻害剤の探索**

○山脇 つくし¹, 中木戸 誠¹, 長門石 暁¹, 相川 知宏², カアペイロ ホセ³, 中川 一路⁴, 津本 浩平^{1,5} (1東大院・工, 2帯広畜産大・畜産, 3九大・院薬, 4京大院・医, 5東大・医科研)

The development of inhibitors that regulate the function of a sugar-binding protein of *S. pyogenes*

○Tsukushi Yamawaki¹, Makoto Nakakido¹, Satoru Nagatoishi¹, Chihiro Aikawa², Jose Caaveiro³, Ichiro Nakagawa⁴, Kouhei Tsumoto^{1,5} (1Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, 2Sch. Agri., Obihiro Univ., 3Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ., 4Sch. Med., Univ. of Kyoto, 5Inst. of Med. Sci., The 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。SPs0871 は A 群レンサ球菌由来のマルトデキストリン結合蛋白質であり、病原性に欠かせない炭水化物の代謝に必要なマルトデキストリンを取り込む ABC トランスポーターの構成蛋白質である。本研究では、SPs0871 特異的に結合しマルトデキストリン獲得を阻害する新たな阻害剤の開発を目的とした。その中で、阻害剤の分子モダリティとして、高い親和性と高い特異性がある一方で、分子量が大きくコストのかかる抗体と、親和性と特異性は低いが、分子量が小さく低コストである低分子を選択し、分子レベルでの制御様式の違いと抗菌活性の相関について解析した。抗体に関しては、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。低分子に関しては、*in silico*・*in vitro* スクリーニングを経てヒット化合物を 1 つ獲得した。この低分子は、マルトデキストリンの結合と競合し、菌の増殖も抑制した。いずれの阻害剤もリガンドの結合と競合する一方で、菌の増殖抑制能に違いが見られたのは、モダリティによる菌体表面へのアクセス性の違いに起因すると考えられる。原因として、A 群レンサ球菌が防御機構としてもつ莢膜を考慮しており、この点についても議論したい。

P2-155/DP1-06-04

Lonidamine as an inactivator for the BvgAS system of *Bordetella pertussis*

○大田 菜都子¹, 上野 俊哉¹, 平松 征洋¹, 堀口 安彦^{1,2} (1阪大・微研・分子細菌学, 2阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Natsuko Ota¹, Toshiya Ueno¹, Yukihiro Hiramatsu¹, Yasuhiko Horiguchi^{1,2} (1Dept. Mol. Bacteriol., RIMD., Osaka Univ., 2CIDER., 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⁺ and avirulent Bvg⁻ phases, the conversion of which is regulated by the BvgAS two-component system. *Bp* in the Bvg⁻ phase is incapable of establishing infection. Thus, substances leading *Bp* to the Bvg⁻ phase by inactivating the BvgAS system may provide an antibiotic-free therapeutic measure. Previously, we found a compound, lonidamine, as a promising candidate for this purpose after screening an FDA-approved drug library. In this study, we analyzed the action mode of lonidamine. Lonidamine was ineffective on a Bvg⁺-locked strain with a mutation in the gene of BvgS, a sensor kinase (*Bp* BvgSR570H). The isothermal titration calorimetry revealed the direct binding of lonidamine to the periplasmic VFT2 domain of BvgS. These results indicate that lonidamine directly interacts with BvgS but not BvgA. A comparative study with analogs of lonidamine suggested that the carboxyl group of lonidamine is involved in the binding to VFT2. We are now investigating the structure of a lonidamine-VFT2 complex to further understand the interaction mechanism.

P2-156/DP1-06-05

Isolation and characterization of a useful broad-host-range prophage from *E. coli*

○Justin Edrian Revilleza, Ho Thi My Duyen, Kanate Thitiananpakorn, Ola Alessa, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Srivani Veeranarayanan, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Justin Edrian Revilleza, Ho Thi My Duyen, Kanate Thitiananpakorn, Ola Alessa, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyanaga, Srivani Veeranarayanan, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Antibiotic resistance among bacteria is rapidly spreading. To address this, our lab has established AB Capsid, an antibacterial agent loaded with CRISPR-Cas13a on phage capsids, showing its skill to sequence-specifically target antibiotic-resistant *E. coli* strains. Yet, the limited infection range of existing phages poses a clinical challenge. This study focuses on finding a broad-host range phage to enhance the application of AB capsid against *E. coli*.

Prophages were induced from 136 *E. coli* strains by Mitomycin C induction, and the host range was determined against 689 *E. coli* strains. Bacteriocin and prophage were separated with trypsin; prophages were characterized by whole genome sequencing and TEM observations. Then, bacterial receptor essential for phage infection was identified.

From 167 crude phage solutions, 64 showed bactericidal activities, and lysates of 25 kept their activity after trypsin exposure, yielding bacteriophages with infection rates of 0.15% to 33.67%. Phage ϕ Don1, identified as a wide infection host range, possesses a genome size of approximately 32 kb and belongs to the *Myoviridae* family, as shown by TEM observation. Furthermore, it was found that ϕ Don1 uses LPS as a bacterial receptor for phage infection.

The future plan is to construct an AB capsid with CRISPR-Cas13 system onto ϕ Don1 capsid and evaluating its sequence-specific bactericidal activity.

P2-157/DP1-06-06

β -グリチルレチン酸がヒト歯肉縁上バイオフィームに与える影響の解析

○加藤 慎也^{1,2}, Xiangtao Ma¹, 佐藤 佳昌³, 奥村 綾³, 吉村 賢治³, 吉成 伸夫^{1,2}, 吉田 明弘^{1,4} (1松歯大・院歯・口腔科学, 2松歯大・歯周, 3花王株式会社ヒューマンヘルスケア研究所, 4松歯大・微生物)

Analysis of the effect of β -glycyrrhetic acid on human supragingival biofilms

○Shinya Kato^{1,2}, Xiangtao Ma¹, Kayo Satou³, Aya Okumura³, Kenji Yoshimura³, Nobuo Yoshinari^{1,2}, Akihiro Yoshida^{1,4} (1Dept. Oral Health Sci., Grad. Sch. Matsumoto Dent. Univ., 2Dept. Periodontol., Matsumoto Dent. Univ., 3Human Health Care Products Research, Kao Corporation, 4Dept. Microbiol., Matsumoto Dent. Univ.)

【目的】 β -グリチルレチン酸 (BGA) は甘草由来の抗炎症・抗菌成分である。我々は BGA のヒト歯肉縁上歯垢から採取した細菌 (口腔細菌) によるバイオフィーム (縁上歯垢 BF) への影響を解析した。【方法】BGA および塩化セチルピリジニウム (CPC) の口腔細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, BF への影響を解析する濃度とした。チャンバースライドシステムに形成した縁上歯垢 BF に, BGA と CPC を 6 時間作用させ, 生菌死菌の割合を Live/Dead 染色と蛍光顕微鏡を用いて解析した。BGA と CPC の BF の剥離効果について, ポリスチレンプレート上の縁上歯垢 BF に BGA, CPC を 6 時間曝露後, 浮遊細菌量を指標に解析した。縁上歯垢 BF の脆弱性については, BGA, CPC を 6 時間曝露した縁上歯垢 BF に超音波照射を行い, 剥離 BF 量を解析した。【結果と考察】口腔細菌に対する BGA および CPC の MIC は, それぞれ 128 μ g/ml および 40 μ g/ml であった。この濃度を縁上歯垢 BF に作用させ Live/Dead 染色を行ったところ, 抗菌物質を含まない対照群の全細菌に対する死菌の割合は 40.0%であったが, CPC は 85.7%, BGA は 60.0%であった。BF の脆弱性については BGA, CPC および対照群について差は見られなかった。これらの結果から, BGA は縁上歯垢 BF を殺菌し, 化学的作用により剥離する効果はあるものの, BF の脆弱性に影響を与えるものでないことが示唆された。

P2-158/DP1-06-07

Photothermal Ablation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by Phage Gold Nanorod Bioconjugates

○Sarangi Jayathilake, 川口 智史, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, XinEe Tan, 相羽 由詞, 宮永 一彦, Longzhu Cui (自治医科大・医・細菌学)

○Sarangi Jayathilake, Tomofumi Kawaguchi, Srivani Veeranarayanan, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, XinEe Tan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Longzhu Cui (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen implicated in severe, challenging-to-treat infections due to its intrinsic nature of antimicrobial resistance and tolerance. Although phage therapy is considered as an effective therapeutic option, the concerns persist regarding post-therapy containment and safety risks. In this study, we propose an antibacterial approach that involves the use of *P. aeruginosa* phages conjugated to gold nanorods (AuNR) to achieve targeted photothermal therapy. Phages were decorated with a gold-binding peptide through phage display, and AuNRs were allowed to bind on phages. The morphological, physical, and chemical properties of conjugates were characterized and after confirming successful conjugation, their targeted photothermal therapeutic potential was assessed under near-infrared (NIR) irradiation by mixing the conjugates either with *P. aeruginosa* suspension or mature biofilms. Post therapy, *P. aeruginosa* planktonic cell number exhibited a 5-log reduction compared to untreated controls. In mature biofilm, a 4.6-log reduction was observed without compromising the viability of the surrounding mammalian cells. This study demonstrates the successful utilization of phages' bacteria-targeting property combined with the photothermal properties of AuNR to develop a simple yet powerful method to eradicate complex biofilms systematically.

P2-159/DP1-06-08

脂肪酸の黄色ブドウ球菌および化膿レンサ球菌に対する抗菌活性

○大段 慶十郎^{1,2}, 鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, 荒井 千夏^{3,4}, 久恒 順三^{3,4}, 菅原 庸^{3,4}, 相川 友直², 菅井 基行^{3,4}, 小松澤 均^{1,3} (1)広島大・医系科学研究科・細菌学, (2)広島大・医系科学研究科・口腔外科学, (3)広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, (4)国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Antibacterial activity of fatty acids against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*

○Keijuro Ohdan^{1,2}, Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, Chika Arai^{3,4}, Junzo Hisatsune^{3,4}, Yo Sugawara^{3,4}, Tomonao Aikawa², Motoyuki Sugai^{3,4}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,3} (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., (2)Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., (3)Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., (4)Antimicrobial Resistance Res. Ctr., National Inst. Infectious Diseases)

【背景】*Staphylococcus aureus* (Sa) と *Streptococcus pyogenes* (Sp) は、健康なヒトの鼻腔や咽頭に常在するが、時に重大な疾患を引き起こすことがある。一方、ヒトの皮膚や鼻腔には抗菌活性を持つ遊離脂肪酸が存在し、細菌の定着・侵入を防ぐ役割があることも知られている。本研究では、皮膚や鼻腔にみられる遊離脂肪酸と、Sa 及び Sp の 2 菌種における脂肪酸の感受性について検証した。【方法】ヒトに存在する Myristic acid (MA), Stearic acid (SA), Palmitic acid (PA), Linoleic acid (LA), Palmitoleic acid (PTA), Oleic acid (OA) の 6 つの脂肪酸について、Sp SF340 株および Sa MW2 株を用いてディスク法及び増殖曲線の測定によって抗菌活性を測定した。LA, PTA については、Sa 54 株の MIC を測定し、Sa については薬剤耐性遺伝子の保有との関連性について検討した。【結果】ディスク法において、Sp は、MA, LA, PTA に対し感受性を認め、Sa では、PTA のみ感受性を認めた。増殖阻害実験の結果、200 μ M の LA と PTA を加えた培地において、Sa の増殖阻害が認められた。Sa 54 株における感受性試験について、PTA の MIC はおおよそ 37.5~75 μ M であり、良好な感受性を示した。一方、LA の MIC については 46 株が 75 μ M 以上を示し、PTA に比べ感受性が低かった。また、*mecA* を保有する MRSA は MSSA に比較し、有意に PTA の MIC が高かった。【考察】ヒトの皮膚に存在する脂肪酸のうち、特に LA と PTA は 2 菌種に対し強い抗菌活性があり、PTA の方が LA より Sa に対して強い抗菌活性を示した。さらに、MRSA は PTA 感受性が低く、これは MRSA の脂肪酸抵抗性を介した皮膚・鼻腔定着力につながっている可能性がある。

P2-160/W10-7

Costruction of CRISPR-Cas13a antibacterial capsid for targeting Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

○Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyayama, XinEe Tan, Kanate Thitianapakorn, Tepppei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Gut bacteria play a pivotal role in human health, contributing to the onset of various diseases. *Bacteroides fragilis*, a prominent member of the gut bacteria, is divided into two subgroups based on enterotoxin production: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and Nontoxigenic *Bacteroides fragilis* (NTBF). ETBF produces the BFT toxin and has been associated with inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. Currently, there is no efficient method for selectively removing harmful bacteria from the gut, emphasizing the urgent need for technology capable of eliminating pathogenic bacteria while preserving beneficial ones. Our laboratory has developed a system that utilizes the CRISPR-Cas13a system loaded into phage capsid to eliminate target bacteria selectively. Our research aims to develop a system for targeting and eliminating ETBF. To achieve this, we have collected 314 strains of *B. fragilis*. 45 strains were confirmed to be ETBF. Subsequently, we isolated 8 phages after induction of 92 *B. fragilis* strains. The host infection range was 4-16% on 45 ETBF strains. These phages were characterized by whole genome sequencing. We will employ phage 22 (46785 bp, 60 ORF), which has a host infection range of 16%, to construct CRISPR-Cas13a antibacterial capsid (AB capsid) by packaging Cas13a into its capsid. This AB capsid will infect *B. fragilis* and only eliminate ETBF.

P2-161/DP1-06-09

WQ-3810: A Novel Fluoroquinolone Exhibiting Potency Against Fluoroquinolone-Resistant *M. avium*

○Sasini Jayaweera¹, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima^{1,2}, Yasuhiko Suzuki^{1,2} (1)Div. Bioresources, International Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ., (2)Inst. Vaccine Research and Development, Hokkaido Univ.)

M. avium, part of the *M. avium* complex (MAC), is an opportunistic pathogen causing MAC lung diseases. Fluoroquinolones (FQs) are recommended for macrolide-resistant MAC infection, but overuse may lead to resistance. WQ-3810, a new FQ with significant efficacy against FQ-resistant pathogens, lacks sufficient studies on its activity against *M. avium*. This study assesses WQ-3810's inhibitory effect on recombinant wild-type (WT) gyrase A, B, and four mutant gyrase A proteins (Ala91Val, Asp95Ala, Asp95Gly, and Asp95Tyr) using a DNA supercoiling inhibitory assay, determining the drug concentration inhibiting half of the enzyme activity (IC₅₀). WQ-3810's Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was tested against 11 clinical *M. avium* isolates (7WT, 2Asp95Gly and 2Asp95Tyr), and results were compared with Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Levofloxacin from a previous study. WQ-3810 exhibited dose-dependent inhibition against WT and mutant gyrase A. All four mutant DNA gyrase A showed higher IC₅₀s (2.60 - 4.47 fold) than the WT. In comparison, Ciprofloxacin had the highest IC₅₀s for all mutants, while WQ-3810 had the lowest IC₅₀s for three mutants. Additionally, WQ-3810 MICs were comparable to Moxifloxacin for the WT and half of the MICs for mutants, suggesting a favorable inhibitory profile against both WT and mutant *M. avium* DNA gyrase A, highlighting its therapeutic potential.

P2-162/DP1-06-10

Development and Evaluation of Antibacterial Capsids Against Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

○川口 智史¹, 渡邊 真弥¹, 劉 怡¹, 氣駕 恒太郎^{1,2}, XinEe Tan¹, 崔 龍洙¹ (1)自治医科大・医・細菌学, (2)感染研・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Tomofumi Kawaguchi¹, Shinya Watanabe¹, Yi Liu¹, Kotaro Kiga^{1,2}, XinEe Tan¹, Longzhu Cui¹ (1)Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., (2)Drug and Vaccine Development, NIID)

Antimicrobial resistance (AMR) is a growing global threat, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) stands out as one of the most pressing AMR pathogens. Stemming from the stagnation in antibacterial drug development, bacteriophages (phages), which are viruses that infect bacteria, have attracted attention for their potential in combating the AMR. This study aimed to develop a novel phage formulation, the antibacterial capsid (AB-capsid), designed to selectively eliminates *P. aeruginosa* harboring a targeted gene. This was achieved by encapsulating CRISPR-Cas13a, an enzyme with sequence-specific bactericidal activity, within phage capsid. *P. aeruginosa* strains expressing *bla*_{IMP-1}, a carbapenem resistance gene, were employed as a model to assess the bactericidal activity of the AB-capsid. Seven spacers, previously demonstrated to be effective in *Escherichia coli*, were loaded into *P. aeruginosa* phage capsid alongside CRISPR-Cas13a system. AB-capsids were collected at a titer of 10⁸ TFU/mL. The presence of an inducer triggered the expression of *bla*_{IMP-1} in target host, and spacer IMP1_702 was shown to have pronounced effect eliminating *P. aeruginosa* expressing *bla*_{IMP-1}. These findings highlight the successful construction of an AB-capsid, a genetically modified *P. aeruginosa* phage carrying CRISPR-Cas13a, and its ability to eradicate target *P. aeruginosa*.

P2-163/DP1-06-11

クオラムセンシング阻害剤 Furanone C-30 は緑膿菌のニトロソ化ストレス感受性を上昇させる

○鈴木 真^{1,3}, 森田 雄二², 石毛 昭太¹, 甲斐 心皓¹, 川崎 健治³, 松下 一之³, 小倉 康平⁴, 秋山 徹⁵, 清水 健¹ (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, 4)京都大・農学・食品生物学専攻食品生産工学, 5)国立国際医療研究センター・研究所・感染症制御

Quorum-sensing inhibitor furanone C-30 increases nitrosative stress susceptibility of *P. aeruginosa*

○Shin Suzuki^{1,3}, Yuji Morita², Shota Ishige¹, Kiyohiro Kai¹, Kenji Kawasaki³, Kazuyuki Matsushita³, Kohei Ogura⁴, Tohru Miyoshi-Akiyama⁵, Takeshi Shimizu¹ (1)Dept. Molecular Infectiology, Grad. Sch. Medicine, Chiba Univ., 2)Dept. Infection Control Science, Meiji Pharmaceutical Univ., 3)Dept. Laboratory Medicine, Chiba Univ. Hospital, 4)Div. Food Science and Biotechnology, Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ., 5)Dept. Infect. Dis. Nat. Center. Global Health Med.)

【目的】緑膿菌による慢性気道感染症には低用量マクロライド療法が有効であり、マクロライドはクオラムセンシング (QS) の阻害に関与することが明らかになっている。しかし、マクロライド処理後に一酸化窒素 (NO) への抵抗性を示す株が一定数存在することも明らかになっている。そこで QS 阻害剤である Furanone C-30 (C-30) を用いて緑膿菌の NO 感受性に与える影響を検討し、さらに C-30 の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 PAO1, 薬剤排出ポンプ単独保持株, 薬剤排出ポンプ強発現株, 臨床分離株を対象とした。NO 感受性の測定は、10 µg/mL エリスロマイシン (EM), 10 µM C-30, NO ドナーは 100 µM DETA NONOate, 排出ポンプ阻害剤は 10 µg/mL PAβN を用いた。薬剤排出ポンプ遺伝子発現解析はリアルタイム RT-PCR 法により行い、薬剤排出ポンプおよび QS 関連遺伝子の変異解析は次世代シーケンサーによる全ゲノム解析により行った。【結果】PAO1 および薬剤排出ポンプ単独保持株では、C-30 添加時に EM 添加時以上または同等程度に NO 感受性が上昇した。また、MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM の過剰発現株においても C-30 により感受性が上昇した。MexAB-OprM の過剰発現株においては C-30 による感受性の変化はみられなかったが、PAβN を追加することにより感受性は上昇した。臨床分離株では 11 株中 9 株で C-30 により大幅に感受性は上昇し、残りの 2 株は PAβN の追加により 9 株と同程度の感受性を示した。遺伝子変異解析の結果、この 2 株には *mexAB-oprM* の抑制遺伝子 *nald* にフレームシフト変異が認められた。これらの結果より、C-30 は MexAB-OprM の過剰発現により効果が阻害されることが示唆された。

P2-164/DP1-06-12

腸球菌臨床分離株における bacteriocin 遺伝子の分布および抗菌活性の解析

○藤井 愛弓^{1,2}, 松尾 美樹^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, 荒井 千夏^{3,4}, 久恒 順三^{3,4}, 菅原 庸⁴, 相川 友直², 菅井 基行^{3,4}, 小松澤 均^{1,3} (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)広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, 4)国立感染症・薬剤耐性センター)

Distribution and antibacterial activity of bacteriocin genes in clinical isolates of Enterococci

○Ayumi Fujii^{1,2}, Miki Matsuo^{1,3}, Nguyen Tra Mi Le^{1,3}, Chika Arai^{3,4}, Junzo Hisatsune^{3,4}, Yo Sugawara⁴, Tomonao Aikawa², Motoyuki Sugai^{3,4}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,3} (1)Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., 2)Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., 3)Project Research Center for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., 4)Antimicrobial Resistance Research Ctr., National Inst. Infectious Diseases)

【背景】Bacteriocin とは近縁の細菌に抗菌活性を示すペプチドの総称であり、腸球菌は複数の bacteriocin を産生することが報告されている。近年、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含む薬剤耐性菌が世界的に問題となっており、新しい抗菌薬の開発が期待される。本研究では、VRE に有効な bacteriocin の探索を目的とし、腸球菌臨床分離株における bacteriocin 遺伝子の保有状況ならびに種々の細菌種に対する抗菌活性を網羅的に解析した。【方法】広島大学病院にて臨床的に分離された腸球菌 (7 菌種) 165 株を使用した。各菌株の全ゲノム塩基配列を決定し、bacteriocin 探索ソフト (BAGEL4) を用いて bacteriocin 遺伝子の同定を行った。腸球菌が産生する bacteriocin の抗菌活性は、VRE を含む腸球菌属に対して軟寒天オーバーレイ法を用いて評価した。【結果】全ゲノムデータを用いた解析の結果、Cytolysin (32%), Bacteriocin T8 (8.4%), Enterocin NKR-5-3B (6.7%), Enterocin B (0.6%), Enterocin P (3.0%), Enterolysin A (14%) をコードする bacteriocin 遺伝子を認めた。また、1 つの株で 2 つの bacteriocin 遺伝子を保有する株も認められた。抗菌活性については、Cytolysin 遺伝子を保有する *E. faecalis* は、*E. faecalis* や *E. faecium* に活性を認めた。Bacteriocin T8 を保有する *E. faecium* は *E. faecalis* に活性を示すが、*E. faecium* に対する活性は多様性を認めた。Enterolysin A を保有する *E. faecalis* は *E. faecalis* に比較し、*E. faecium* で強い活性を認めた。その他の遺伝子保有株ではほとんど活性は認められなかった。以上の結果より、腸球菌は多様な bacteriocin を産生し、一部、VRE にも有効であることが示された。

P2-165/DP1-06-13

Optimizing Cas13 variants in engineered bacteriophages for potent bactericidal activity against MRSA

○Adeline Yeo Syin Lian, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, 相羽 由詞, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Adeline Yeo Syin Lian, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyana, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The rise in MRSA infections demands innovative therapies, with bacteriophages emerging as promising candidates. We have developed a CRISPR-Cas13a-engineered bacteriophage targeting MRSA, yet challenges persist in synthesis and potency. This study aims to enhance the antimicrobial efficacy against MRSA in engineered bacteriophages by optimizing diverse CRISPR-Cas13 variants. Five Cas13 subtypes and five Cas13a class variants were curated, codon-optimized, and synthesized for targeting *Staphylococcus aureus* (SA). Synthesized Cas13 variants were cloned into plasmids containing *mecA* guide RNA. Bactericidal activity was assessed using a dual plasmid system by introducing the cloned plasmids into SA strains harboring a plasmid expressing *mecA* or a null expression plasmid. The Cas13 variants were loaded into a non-propagating engineered bacteriophage, rebooted, and evaluated for bactericidal activity. Cas13a displayed robust bactericidal activity among subtypes. Smaller subtypes, Cas13x and Cas13y, showed higher bacteriophage rebooting efficiency, albeit no observed bactericidal activity. Cas13a class variants showed strong bactericidal activity, and the construction of engineered bacteriophages is ongoing. The results suggest that the CRISPR-Cas13 system, especially Cas13a, in tandem with engineered bacteriophages, holds promise as a potent antimicrobial agent against MRSA infections.

P2-166/DP1-12-10

Mobile linezolid resistance genes in enterococci derived from livestock compost at Japanese farms

○福田 昭¹, 中島 千絵², 鈴木 定彦², 臼井 優^{1,2} (1)酪農大・獣医・食品衛生学, 2)北大・人獣研・バイオリソース)

○Akira Fukuda¹, Chie Nakajima², Yasuhiko Suzuki², Masaru Usui^{1,2} (1)Dept. Food Microbiol. and Food Safe., Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., 2)Div. Bioresources, Inter. Inst. Zoonosis Contr., Hokkaido Univ.)

Linezolid is a last-resort antimicrobial in human clinical settings. Mobile linezolid resistance genes (*optrA*, *poxA*, and *cfr*) have been detected in various sources worldwide. We clarified the existence of linezolid-non-susceptible bacteria and mobile linezolid resistance genes in farm environments in Japan. Enterococci isolates from feces compost collected from 10 pig and 11 cattle farms in Japan in 2021 were characterized. Whole-genome sequencing of *optrA* and/or *poxA* genes positive-enterococci was performed. Of 103 enterococci isolates, 12 from pig farm compost were non-susceptible to linezolid. These 12 various *Enterococcus* spp. isolates carried mobile linezolid resistance (*optrA* and/or *poxA*) genes on plasmids or chromosomes. The genetic structures of *optrA*- and *poxA*-carrying plasmids were almost identical to those reported in other countries. The *optrA*- and *poxA*-positive *Enterococcus faecium* belonged to ST324 (clade A2), a high-risk multidrug-resistant clone. Although linezolid is not used in livestock, linezolid-non-susceptible enterococci could be indirectly selected by frequently used antimicrobials, such as phenicols. Moreover, various enterococci species derived from livestock compost may serve as reservoirs of linezolid resistance genes carried on globally disseminated plasmids and multidrug-resistant high-risk clones.

P2-167/W10-3**Bioinformatic analysis of morphologies of antibiotic-resistant *Escherichia coli* cells**

○池邊 美季^{1,2}, 青木 工太¹, 西野 美都子^{1,2,3}, 西野 邦彦^{1,2,4} (1)阪大・産研,
 2)阪大・薬, 3)阪大・産業科学AIセンター, 4)阪大・感染症総合教育研究拠点)

○Miki Ikebe^{1,2}, Kota Aoki¹, Mitsuko Hayashi-Nishino^{1,2,3}, Kunihiko
 Nishino^{1,2,4} (1)SANKEN, Osaka Univ., 2)Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka
 Univ., 3)AIRC-ISIR, Osaka Univ., 4)CiDER, Osaka Univ.)

In Gram-negative rods, maintenance of cell shape is important for normal development. It is known that bacterial cells exposed to some antibiotics show abnormal shape. However, there is currently a lack of knowledge regarding the morphological characteristics of the resistant cells themselves, without the exposure to antibiotics.

In this study, we conducted bioinformatic analysis to elucidate morphological characteristics of resistant cells. The phase contrast optical microscopic images of 10 experimentally evolved resistant *Escherichia coli* strains were taken in the absence of antibiotics, and quantitative morphological analysis at the single-cell level was applied. Furthermore, Weighted Gene Correlation Network Analysis was employed to identify those genes associated with morphological characteristics of the resistant cells.

Morphological analysis showed that the resistant cells used in this study had specific cell shapes, generally becoming more spherical. Exploring the genetic background of these characteristics suggested a possible link between the acquisition of resistance and morphological changes.

We propose that morphological perspectives are important to elucidate the phenomenon of antibiotic resistance from the aspect of complex life science systems.

P2-168/DP1-12-11**Genetic and phenotypic analyses of *mcr*-harboring ESBL-producing *E. coli* from dogs and cats in Japan**

○安木 真世¹, 鳩谷 晋吾¹, 元岡 大祐², 近藤 大輔¹, 秋吉 秀保¹, 堀江 真行¹, 中村 昇太², 嶋田 照雅¹ (1)大公大・獣医, 2)阪大・微研)

○Mayo Yasugi¹, Shingo Hatoya¹, Daisuke Motooka², Daisuke Kondo¹,
 Hideo Akiyoshi¹, Masayuki Horie¹, Shota Nakamura², Terumasa Shimada¹
 (1)Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ., 2)RIMD, Osaka Univ.)

The emergence of *mcr* plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Enterobacteriales* among companion dogs and cats poses a risk of the animals acting as reservoirs for cross-species transmission. However, current knowledge of the bacteria, e.g. the genetic and phenotypic characteristics of the bacterial isolates and plasmids, in dogs and cats is still limited. Here, we identified *mcr* gene-harboring ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from a dog and a cat in Osaka, Japan. Colistin-resistant MY732 isolate from a dog carried two plasmids: *mcr-1.1*-harboring IncI2 plasmid and *bla*_{CTX-M-14}-harboring IncFIB plasmid. Conjugation assays revealed that both plasmids can be co-transferred even though the IncFIB plasmid lacked a conjugal transfer gene cassette. The other isolate MY504 from a cat harbored two *bla* genes and *mcr-9* on the identical IncHI2 plasmid. This isolate was not resistant to colistin. To the best of our knowledge, this is the first report of a colistin-resistant ESBL-producing *E. coli* isolate harboring *mcr-1* from a companion dog in Japan. Given that the *mcr* gene-harboring IncI2 and IncHI2 plasmids in this study shared high homology with plasmids from human or animal-derived *Enterobacteriales*, companion dogs and cats may act as important reservoirs for cross-species transmission of the *mcr* gene in the community, in Japan.

P2-169/DP1-12-12**Resistance to Sulfamethoxazole-Trimethoprim and Its Horizontal Transfer in *Haemophilus influenzae***

○安藤 友一, 輪島 文明, 田中 愛海, 打矢 恵一 (名城大・薬・微生物学)

○Tomokazu Ando, Takeaki Wajima, Emi Tanaka, Kei-ichi Uchiya (Dept. Microbiol., Fac. Pharm., Meijo Univ.)

Objectives: *Haemophilus influenzae* is occasionally isolated from urogenital tracts. Empirically, sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX/TMP) is used for the treatment of urinary tract infections. However, information on the susceptibility of *H. influenzae* to SMX/TMP and resistant mechanisms is limited. Therefore, this study aims to investigate SMX/TMP susceptibility and explore the resistant mechanism.

Methods: A total of 81 *H. influenzae* isolates, obtained in 2018 and 2022, were included. MIC was measured using the broth dilution method. For SMX/TMP resistant strains, the resistant mechanisms were analyzed. Additionally, horizontal transfer experiments were performed using the genomic DNA of resistant strains.

Results: SMX/TMP resistant isolates accounted for 37.5% in 2018 and 47.1 % in 2022. The quinolone low susceptibility rate of SMX/TMP resistant isolates was significantly higher than that of susceptible isolates. In contrast, no significant association was found with β -lactam resistance. No known acquired resistant genes was found, suggesting that chromosomal mutation could be associated with the resistance. Further, horizontal transfer experiments revealed the transfer of SMX/TMP resistance to susceptible strains.

Conclusions: This study indicated an increase in SMX/TMP resistance and suggested that horizontal transfer could contribute to spread among *H. influenzae*.

P2-170/DP1-12-13**Mechanism of high-level quinolone resistance in *H. haemolyticus* revealed by gene transfer assay**

○輪島 文明, 田中 愛海, 打矢 恵一 (名城大・薬・微生物)

○Takeaki Wajima, Emi Tanaka, Kei-ichi Uchiya (Dept. Microbiol., Fac. Pharm., Meijo Univ.)

Objectives: High-level quinolone-resistant *H. haemolyticus* was isolated from a paediatric patient in 2019. However, underlying mechanism of the resistance remained unclear. In this study, we aimed to identify the mechanism by a resistance transfer assay with *H. influenzae*.

Methods: A resistance transfer assay to *H. influenzae* was performed using genomic DNA or PCR-amplified quinolone-targeting genes from high-level quinolone-resistant *H. haemolyticus* 2019-19 strain. The amino acids responsible for quinolone resistance were identified through site-directed mutagenesis.

Results and Discussion: Upon introducing genomic DNA from *H. haemolyticus* 2019-19, resistant colonies were generated, displaying an equivalent level of resistance to 2019-19. Sequencing analysis revealed that *gyrA*, *parC*, and *parE* in the resulting *H. influenzae* colonies were replaced by their counterparts from *H. haemolyticus*. Subsequent addition of quinolone-targeting gene fragments demonstrated that *parE*, along with *gyrA* and *parC*, significantly contributed to high-level resistance. Notably, amino acid substitutions at both the 439 th and 502 nd residues of ParE were associated with this elevated resistance. These findings suggest that these amino acid substitutions of ParE, in conjunction with substitutions in both GyrA and ParC, play a crucial role in conferring high-level quinolone resistance.

P2-171/W2-8

National genomic surveillance of antimicrobial resistance in Japan: 1st phase of JARBS-GNR project

鹿山 鎮男, ○矢原 耕史, 菅原 庸, 川上 小夜子, 近藤 恒平, 左 弁, 沓野 祥子, 北村 徳一, 平林 亜希, 菅井 基行 (感染研・AMR研究センター)

Shizuo Kayama, ○Koji Yahara, Yo Sugawara, Sayoko Kawakami, Kohei Kondo, Hui Zuo, Shoko Kutsuno, Norikazu Kitamura, Aki Hirabayashi, Motoyuki Sugai (AMR Research Center, NIID)

Antimicrobial resistance is a global health concern; Enterobacterales resistant to third-generation cephalosporins (3GCs) and carbapenems are of the highest priority. Here, we developed national genomic surveillance (“JARBS-GNR”) that conducted genome sequencing and standardized quantitative antimicrobial susceptibility testing of 4,195 isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* resistant to 3GCs and Enterobacterales with reduced meropenem susceptibility collected across Japan. Our analyses provided a complete classification of 3GC resistance mechanisms. Analyses with complete reference plasmids revealed that among the ESBL *bla*_{CTX-M} genes, *bla*_{CTX-M-8} was typically encoded in highly similar plasmids. Our analyses identified strains positive for carbapenemase genes but phenotypically susceptible to carbapenems and undetectable by standard antimicrobial susceptibility testing. Systematic long-read sequencing enabled reconstruction of 183 complete plasmid sequences encoding three major carbapenemase genes and elucidation of their geographical distribution stratified by replicon types and species carrying the plasmids and potential plasmid transfer events. Overall, we provide a blueprint for a national genomic surveillance study that integrates standardized quantitative antimicrobial susceptibility testing and characterizes resistance determinants (*Nature Communications*, 2023).

P2-172/DP1-12-14

培養時間の延長によって誘導されるバイオフィルムの非カノニカルな抗菌薬感受性化

○原 慧一郎^{1,2}, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (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, 3慈恵医大・アミロイド制御研究室)

Long-term cultivation triggers non-canonical susceptibilization of biofilm cells to antibiotics

○Keiichiro Hara^{1,2}, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., 2Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., 3Lab. Amyloid Reg., Jikei Univ. Sch. Med.)

従来、バイオフィルムは時間経過と共に成熟し、その内部の菌は抗菌薬に対して抵抗性を増すと考えられてきた。最近我々は、黄色ブドウ球菌 Xen36 株で作製したバイオフィルムの培養期間を延長すると、バイオフィルム内細菌がゲンタマイシンに対し感受性化することを見出した。今回、この現象の普遍性とメカニズムを解析したので報告する。Xen36 株以外の複数の菌種・菌株を用い、培養期間の異なるバイオフィルムへ最小生育阻止濃度の 100 倍のゲンタマイシンを 24 時間作用させ、回収した菌のコロニー形成能を評価した。その結果、培養期間を延長してもその内部の菌の生存率（コロニー形成数）は変化しないが、ゲンタマイシン添加後のコロニー形成数は著しく低下することが黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、腸球菌、肺炎桿菌において確認された。この培養期間の延長に伴う抗菌薬感受性化は、抗菌薬の濃度や種類、バイオフィルムの培養期間や培地を変更しても確認された。また、本現象はバイオフィルムの培養時の酸素の有無に関わらず認められた。さらに、培養 1 日および 3 日のバイオフィルムを iCBiofilm 法で透明化後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、その構造に大きな変化は認められなかった。

以上より、バイオフィルムの培養期間を延長すると、その内部の菌は抗菌薬に対して感受性化するという非カノニカルな現象を発見し、その普遍性を明らかにした。また、本現象は酸化ストレスやバイオフィルムの立体構造の変化によって引き起こされるものではないことが示された。現在、黄色ブドウ球菌トランスポゾン変異株ライブラリーを用いて本現象のメカニズムを解析中である。

P2-173/DP1-12-15

アラニントランスポーター *CycA* は黄色ブドウ球菌のカチオン性抗菌剤への耐性に関与する

○鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,2}, Nguyen Tra Mi Le^{1,2}, That Thuan Vy Ton¹, 小松澤 均^{1,2} (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)

Alanine-transporter *CycA* supports cationic antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*

○Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,2}, Nguyen Tra Mi Le^{1,2}, That Thuan Vy Ton¹, Hitoshi Komatsuzawa^{1,2} (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 2Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ.)

【目的】黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、ヒトの鼻腔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。黄色ブドウ球菌が宿主に定着、侵襲する際には、宿主や環境中の競合細菌が産生するカチオン性抗菌ペプチド (CAMPs) に抵抗する能力が重要であることが知られている。CAMPs 抵抗システムの中でも、タイコ酸に D-アラニン修飾する Dlt システムは重要であるが、これをサポートするメカニズムについては知られていない。本研究では、アラニンの細胞内取り込みに関与するトランスポーターである *CycA* (AapA) に着目し、CAMPs 耐性における *CycA* の役割を解析した。

【方法】黄色ブドウ球菌 MW2 株および RN4220 株の *cycA* 不活化株 ($\Delta cycA$) を作成し、各種抗菌剤およびバクテリオシン、ディフェンシンの感受性を検証した。また、菌体表層荷電を解析する目的で、Cytochrome C binding assay を行った。

【結果】 $\Delta cycA$ 株において、陽性チャージの抗菌剤であるダプトマイシン、ゲンタマイシン、アルベカシンの感受性が高まっていることが判明した。また、nisin A や Pep5 などのカチオン性バクテリオシンに対する感受性も高まっていた。Cytochrome C を用いた菌体表層荷電解析の結果、MW2- $\Delta cycA$ 株は WT に比べ菌体表層の陰性荷電が強まっていることが確認できた。

【考察】 $\Delta cycA$ 株は、菌体表層の陰性荷電が強まることで、カチオン性抗菌剤や抗菌ペプチドに対する感受性が高まっていると考えられる。今後、*CycA* が Dlt によるタイコ酸への D-アラニン修飾に及ぼす影響や、黄色ブドウ球菌の侵襲性に及ぼす影響について検討していく予定である。

P2-174/DP1-12-16

Increased prevalence of Kanamycin-resistant *Salmonella* Schwarzengrund from broilers in Kagoshima

○George Sanga, 宮島 里佳, Vu Minh Duc, 中馬 猛久 (鹿大・共同獣医学部)

○George Sanga, Rika Miyajima, Vu Minh Duc, Takehisa Chuma (Joint Fac. Vet. Med. Kagoshima Univ.)

Salmonella is a notable foodborne pathogen affecting public health globally. The purpose of the current study was to survey the prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* recovered from broiler chickens in Kagoshima, Japan. A total of 181 *Salmonella* serovars were identified from 768 broiler chicken cecum samples in 2021. Among the serovars, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund (111/181, 61.3%) was the predominant serovar with high Kanamycin (KM) resistance (62/111, 55.9%) proportion observed. In addition, the overall prevalence of kanamycin-resistant *S. Schwarzengrund* has kept increasing from 0% to 34.3% between 2009 and 2021. Molecular analysis revealed that all (100%) KM-resistant *S. Schwarzengrund* isolates harbor the *aphA1* gene and belong to the IncP plasmid incompatibility group with one to two plasmids. Our findings provide important and updated information about the *Salmonella* status, especially the increased prevalence of *S. Schwarzengrund* and the associated kanamycin resistance in broiler chickens in Kagoshima Prefecture. The information generated contributes to the surveillance of *Salmonella* contamination trends in poultry in Kagoshima, hence ensuring food security.

P2-175/W10-4

AckA と Pta, Fis の機能欠失による大腸菌のホスホマイシン耐性化機構

○平川 秀忠¹, 滝田 綾子¹, 佐藤 百美佳¹, 橋本 佑輔¹, 平本 卓², 大嶋 紀安³, 南嶋 洋司³, 村上 正巳², 富田 治芳¹ (1群馬大・医・細菌, 2群馬大・医・臨床検査, 3群馬大・医・生化)

Fosfomycin resistance in *Escherichia coli* caused by functional deletion of AckA and Pta, Fis

○Hidetada Hirakawa¹, Ayako Takita¹, Yumika Sato¹, Yusuke Hashimoto¹, Suguru Hiramoto², Noriyasu Ohshima³, Yoji Minamishima³, Masami Murakami², Haruyoshi Tomita¹ (1Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ., 2Dept. Clin. Lab. Med., Sch. Med., Gunma Univ., 3Dept. Biochem., Sch. Med., Gunma Univ.)

ホスホマイシンは、尿路病原性大腸菌 (UPEC) などによって惹き起こされる尿路感染症の治療薬として用いられてきた。近年、尿路感染症の治療薬として中心的に用いられてきたキノロン薬やβラクタム薬に対する耐性菌の蔓延により、ホスホマイシンが再注目を浴びている。私たちは、ホスホマイシン療法に影響を及ぼす UPEC の新規責任遺伝子の探索を行った。本研究では、トランスポゾン挿入による UPEC のランダム遺伝子破壊ライブラリーを用いて、親株と比べてホスホマイシンに対する MIC が有意に増大した株のスクリーニングを行った。その結果、ackA と pta 遺伝子内部にトランスポゾンが挿入された株を得た。ackA と pta 遺伝子をそれぞれ in-frame で欠損させた ackA と pta 欠損株を作製した。当株は、親株と比べてホスホマイシンに対して 4 倍高い MIC 値を示した。ホスホマイシンは GlpT と UhpT 輸送体によって菌体内に取り込まれるが、上記の欠損株は、親株と比べて glpT の転写レベルが 10 倍程度低下しており、ホスホマイシン取り込み能も 8~47 倍低下していることが判明した。ackA と pta 遺伝子欠損によって glpT の発現が低下するメカニズムを検討した過程で、上記の欠損株は、親株と比べて核様体蛋白質 Fis の発現量が低下していることに気がついた。さらに、fis 遺伝子の欠損株および、過剰発現株、リコンビナント Fis 蛋白質を用いた一連の解析から Fis は glpT の遺伝子発現をポジティブに制御していることも明らかにした。本研究において、ホスホマイシンの抗菌活性に関与する新規責任因子として AckA, Pta 並びに Fis を発見し、これらの機能低下および、欠失することでホスホマイシンに対する感受性が低下しうることが示された。

P2-176/W10-2

グラム陽性細菌のグリセロ糖脂質合成酵素の過剰発現はダプトマイシン耐性をもたらす

○山本 凌吾¹, 石川 一也², 古田 和幸², 三好 伸^{3,4}, 垣内 力² (1岡山大・薬・分子生物学, 2岡山大・院医歯薬(薬)・分子生物学, 3岡山大・院医歯薬(薬), 4岡山大・インド感染症共同研究センター)

Glyceroglycolipid synthase overexpression leads to daptomycin resistance in Gram-positive bacteria

○Ryogo Yamamoto¹, Kazuya Ishikawa², Kazuyuki Furuta², Shin-ichi Miyoshi^{3,4}, Chikara Kaito² (1Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ., 2Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., 3Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., 4Collab. Res. Cent. Okayama Univ. Infect. Diseases. India)

カチオン性リポペプチド系抗生物質のダプトマイシンは、MRSA 感染症治療薬の一つとして使用されている。ダプトマイシンは Ca²⁺ 依存的に、細胞膜のホスファチジルグリセロール (PG) および lipid2 と複合体を形成し、膜穿孔を起こすことでグラム陽性細菌に対して殺菌作用を示す。近年、ダプトマイシン耐性株の出現が報告されており、ダプトマイシン耐性メカニズムを理解することへの重要性が高まっている。本研究では、グラム陽性細菌のダプトマイシン耐性化機構の解明を目的とした。枯草菌を用いて、ダプトマイシン耐性に関わる遺伝子の探索を行った結果、UgtP の過剰発現が枯草菌のダプトマイシン耐性をもたらすことを見出した。UgtP は UDP-glucose の glucose をジアシルグリセロール (DAG) に転移させ、ジグルコシルジアシルグリセロール (Glc₂DAG) を合成する酵素である。UgtP 過剰発現株では、Glc₂DAG が増加する一方で、酸性リン脂質であるカルジオリピンと PG、ならびに塩基性リン脂質であるリシルホスファチジルグリセロールが減少していた。UgtP 過剰発現株の菌体表面電荷は野生株と比べて変化しておらず、ダプトマイシン以外のカチオン性薬剤に対する耐性は見られなかった。また、黄色ブドウ球菌では、UgtP のホモログである YpfP と、Glc₂DAG を細胞膜の内側から外側へとフリップする LtaA を過剰発現することで、ダプトマイシン耐性が引き起こされた。以上の結果は、グラム陽性細菌においてグリセロ糖脂質 Glc₂DAG の増加がリン脂質組成の変化とダプトマイシン耐性をもたらすことを示唆する。

P2-177/W10-5

Tmn 防御システムを克服するファージの構築

○山下 和可奈^{1,2}, 千原 康太郎¹, アザム アアハエルマン¹, 小島 新二郎¹, 田村 あずみ¹, 常田 聡², 氣賀 恒太郎¹ (1国立感染研・治ワク, 2早大・先進理工・生命医科)

Phage Engineering for Overcoming Tmn Defense System

○Wakana Yamashita^{1,2}, Kotaro Chihara¹, Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Azumi Tamura¹, Satoshi Tsuneda², Kotaro Kiga¹ (1Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., 2Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

近年薬剤耐性菌の問題からバクテリオファージによる治療 (ファージセラピー) が注目を集めている。ファージセラピーにおける主な課題点は宿主域が狭いことである。宿主域が狭い原因の一つは細菌の持つディフェンスシステムによりファージが増幅できないことである。そこで本研究ではディフェンスシステムを阻害する因子を探索し、その因子を利用したファージ療法を開発することを目的とする。本研究で保有するファージライブラリーについて、33 種類のディフェンスシステムに対する感受性を調べた。その結果ゲノム相溶性が高い 7 ファージのうち、SMS22 ファージのみが transmembrane ATPase (tmn) と呼ばれるディフェンスシステムを逃れた。これより SMS22 は tmn に対する阻害因子を持つことが予想された。tmn は、ATPase ドメインと Transmembrane ドメインから構成される 1 遺伝子のディフェンスシステムであるが、そのファージ感染阻害メカニズムはいまだ明らかではない。本研究では、ゲノム相溶性が高い 7 つのファージのゲノムを比較し、SMS22 ファージに特徴的な遺伝子一つずつノックアウトすることにより tmn 阻害因子である anti-tmtn を同定した。また、tmn に感染を阻害されるファージに tmn 阻害因子を搭載することで、tmn に防御されないファージの合成に成功した。本研究はファージセラピーの治療効果の向上に寄与する可能性がある。

P2-178/DP1-12-17

Metabolic Remodeling by rpoBC Mutations is Associated with β-Lactam Resistance in OS-MRSA

○渡邊 真弥, ソフォル チジオーケ, ティティアナンパコーン カネート, タンシンイー, 相羽 由詞, 宮永 一彦, ヴィーラナラヤナン スリワニ, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Shinya Watanabe, Chijioke A Nsofor, Kanate Thitiananpakorn, XinEe Tan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Srivani Veerananarayanan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The emergence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) has imposed further challenges to the clinical management of MRSA infections. When exposed to β-lactam antibiotics, these strains can easily acquire a phenotype of reduced β-lactam susceptibility through chromosomal mutations, including those in RNA polymerase (RNAP) genes such as *rpoBC*, which may then lead to treatment failure. Despite apparent challenges they pose for diagnosis and treatment, there is limited information on the actual mechanisms that underly the transition to reduced β-lactam susceptibility, as it does not directly associate with the expression of *mecA*. This study investigated the cellular physiology and metabolism of six missense mutants with reduced oxacillin susceptibility, using mass spectrometry-based metabolomics analysis. Our results showed that *rpoBC* mutations give rise to RNAP dysfunction, which in turn caused intracellular accumulation of ribonucleotides. These mutations also led to the accumulation of UDP-Glc/Gal and UDP-GlcNAc, the precursors of UTP-associated peptidoglycan and wall teichoic acid. Consequently, this accumulation of the precursors increased the cell wall thickness of the mutant strains as observed with transmission electron microscopy analysis, and this phenomenon eventually resulted in decreased susceptibility to β-lactam in OS-MRSA.

P2-179/DP2-15-01

国産鶏肉から分離された薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の解析

○中島 瑠南¹, 桑野 玲奈¹, 松尾 朋香¹, 近藤 百香¹, 脇本 麗², 川野 光興¹
(¹中村学園大・栄養科学, ²中村学園大・食物栄養)

Analysis of antimicrobial-resistant bacteria and drug-resistance genes from domestic chicken meat

○Runa Nakashima¹, Reina Kuwano¹, Tomoka Matsuo¹, Momoka Kondo¹, Rei Wakimoto², Mitsuoki Kawano¹ (¹Dept. Nutritional Sciences., Nakamura Gakuen Univ., ²Div. Food and Nutrition., Nakamura Gakuen Univ. JC.)

【目的】近年、抗菌薬の汎用により薬剤耐性菌が増加し、臨床現場などで感染症の治療が困難になるケースが増えている。抗菌薬は動物への使用も多いことから、薬剤耐性菌は食品中からも多く検出されることが報告されている。本研究では福岡市の小売店で販売されている鶏肉から分離した薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の解析を行った。【方法】購入した鶏肉 20 検体、各 10 g を 90 ml の緩衝ペプトン水と混合し 1 分間ストマッキング処理を行った後、37°C で 24 時間静置培養した。その後 2 µg/ml セフトキシム (CTX) 含有クロモアガー ECC 寒天培地に培養液を 10 µl 塗布し、37°C で 24 時間静置培養後に現れたコロニーを 1 検体につき各 2 個解析した。その後、懸濁したコロニーを用いて、シカジーニアス マルチプレックス PCR キットを使用して ESBL 遺伝子と AmpC 遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動にて遺伝子型を決定した。また、複数の鑑別ディスクを用いて ESBL と AmpC 産生菌の薬剤感受性を調べた。【結果】ESBL 遺伝子型の決定では鶏肉 20 検体の内 10 検体から ESBL 産生遺伝子 (*bla* CTX-M, *bla* TEM) を保持する菌が計 12 株検出された。この内、11 株が大腸菌、1 株が肺炎桿菌であった。また、この 12 株において、IncFII と IncFIB が 7 検体、IncN が 1 検体検出された。AmpC 遺伝子型の決定では鶏肉 20 検体の内 14 検体から 22 株検出された。【考察】今回の結果から、国産鶏肉には高率に薬剤耐性菌が存在していた。食事を介して薬剤耐性菌が体内に入り定着し、抗菌薬の効果が減弱するなどヒトの健康への影響もあると考えられる。

P2-180/DP2-15-02

腸疾患患者から採取した腸粘液を用いた ESBL 産生遺伝子の探索

○脇本 麗¹, 鹿志毛 里帆², 鳥居 桃子², 手島 架², 塩谷 昭子³, Tingting Gu³, 中島 瑠南², 川野 光興² (¹中村学園大短大・食物栄養, ²中村学園大・栄養科学, ³川崎医科大・消化器内科)

Identification of ESBL genes using intestinal mucus samples from intestinal disease patients

○Rei Wakimoto¹, Riho Kashige², Momoko Shimai², Kakeru Teshima², Akiko Shiotani³, Tingting Gu³, Runa Nakashima², Mitsuoki Kawano² (¹Div. Food and Nutrition., Nakamura Gakuen Univ. Junior College, ²Dept. Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen Univ., ³Dept. Gastroenterology and Hepatology, Sch. Med., Kawasaki Univ.)

近年、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌などによる院内感染が問題となっている。本研究では、腸疾患患者由来の腸粘液から ESBL 産生遺伝子の検出を行い、患者が腸管内に保菌している細菌由来の ESBL 遺伝子の遺伝子型の判定およびその保有率を調査することを目的とした。川崎医科大学にて 2021 年に採取された腸疾患 (CD: クローン病, UC: 潰瘍性大腸炎, IBS-C: 過敏性腸症候群・便秘型, IBS-D: 過敏性腸症候群・下痢型) 患者の回腸および S 状結腸由来の腸粘液 DNA サンプル 42 名 (男性 18 名, 女性 24 名) の検体 (グループ 1) と、2015 年~2016 年に採取された腸疾患 (CD, UC, IBS-D, IBS-M: 過敏性腸症候群・混合型, EGID: 好酸球性消化管疾患, Control, その他の疾患) 患者の回腸由来の腸粘液 DNA サンプル 41 名 (男性 21 名, 女性 20 名) の検体 (グループ 2) を対象とし、シカジーニアス ESBL 遺伝子検出キットを用いて PCR により遺伝子の検出を行った。グループ 1 では、検査対象 42 名のうち 7 名 (16.7%)、グループ 2 では、検査対象 41 名のうち 31 名 (75.6%) の検体で ESBL 産生遺伝子が検出された。グループ 1 では、回腸と S 状結腸で検出された遺伝子型は必ずしも一致しておらず、部位によって薬剤耐性菌の定着状況に差異がみられた。また、疾患別の ESBL 産生遺伝子保有率は、グループ 1 で IBS-C が最も高かった (75%)。これは、感染性腸炎治療での抗菌剤使用による薬剤耐性菌の獲得によるものと示唆される。現在、腸疾患患者の便検体から ESBL 遺伝子の検出を進めている。

P2-181/DP2-15-03

Analysis of the amikacin resistance factor of carbapenem-resistant *Escherichia coli* AUH-256

○横山 雛子¹, 森下 愛月¹, 坂口 翔一², 中野 隆史², 中田 裕二¹ (¹藍野大・医療保健, ²大阪医科薬科大・医・微生物学・感染制御学)

○Hinako Yokoyama¹, Azuki Morishita¹, Shoichi Sakaguchi², Takashi Nakano², Yuji Nakada¹ (¹Fac. Healthcare Sci., Aino. Univ., ²Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ.)

Background: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) are known to exhibit resistance even to non-carbapenem antibacterial drugs. In general, the use of single antibiotics is limited to certain drugs, such as colistin and tigecycline. In addition, most of the CRE currently detected in Japan are characterized by their sensitivity to amikacin, an aminoglycoside antibacterial drug.

We previously conducted a molecular epidemiological analysis of carbapenem-resistant *E. coli* detected in medical facilities in northern Osaka Prefecture, among which we identified a strain that had developed resistance to multiple drugs, including amikacin.

Methods: We examined *E. coli* AUH-256, which exhibited resistance to different classes of antibacterial drugs, including meropenem, amikacin, levofloxacin, and minocycline. Aminoglycoside resistance genes were predicted by de novo analysis using NGS, and the amikacin resistance factor of this strain was determined by cloning the target genes.

Results: Whole-genome sequence analysis showed that strain AUH-256 was carbapenem-resistant *E. coli* carrying *bla*_{IMP-6} on its plasmid. Furthermore, the strain possessed multiple aminoglycoside resistance genes, and the cloning of each gene revealed that *aac6*-*Iae*, which was previously reported only in *Pseudomonas aeruginosa*, was the main factor contributing to amikacin resistance.

P2-182/DP2-15-04

Antimicrobial resistance of *emm89 Streptococcus pyogenes* isolates from patients throughout Japan

○Weichen Gong¹, 大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也^{1,2}, 元岡 大祐³, 広瀬 雄二郎¹, 奥野 ルミ⁴, 池辺 忠義⁵, 川端 重忠¹ (¹阪大・菌・微生物, ²阪大・菌・バイオフィーム, ³阪大・微研・ゲノム解析, ⁴東京健安研セ・微生物, ⁵感染研・細菌一部)

○Weichen Gong¹, Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi^{1,2}, Daisuke Motooka³, Yujiro Hirose¹, Rumi Okuno⁴, Tadayoshi Ikebe⁵, Shigetada Kawabata¹ (¹Dept. Microbiol. Sch. Dent., Osaka Univ., ²Dept. Info., Sch. Dent., Osaka Univ., ³NGS Core Facility, RIMD., Osaka Univ., ⁴Dept. Microbiol., Tokyo Metropolitan Inst. of Public Health, ⁵Dept. Bacteriol. I., NIID)

Streptococcus pyogenes is involved in a wide range of diseases including pharyngitis and life-threatening invasive infections. Increasing antimicrobial resistance (AMR) has been reported worldwide for various bacteria, which limits antibiotics use for infection cases. The present study investigated the AMR of *S. pyogenes emm89* strains, which have recently shown an increasing trend in Japan. Examined were 311 *emm89* strains previously isolated from patients with invasive and non-invasive infections throughout Japan. Following the Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, the minimum concentrations of six antibiotics, including penicillin-G, azithromycin (AZM), and clindamycin (CLI), for inhibition of the isolates were determined. In addition, genomes for AMR-associated genes were screened using the ARIBA software tool. Thirty-two AMR strains were identified, of which 84.38% showed resistance to AZM and/or CLI. Furthermore, there was a significantly higher correlation of non-invasive as compared to invasive infections showing AMR. Genomic analysis revealed a wide distribution of three genes related to AMR, *ermT*, *folP*, and *lmrP*, in the *emm89* strains. The high prevalence of *S. pyogenes* bacteria resistant to AZM and/or CLI poses a threat to public health in Japan, thus development of next-generation antimicrobial therapy is urgently needed.

P2-183/DP2-15-05

腸炎ビブリオにおける RND 型多剤排出ポンプ VmeJK の Mg²⁺要求性の解析

○村上 梨乃¹, 國光 綾美¹, 森田 大地², 熊谷 孝則², 黒田 照夫² (1)広島大・薬, (2)広島大・医系科学・微生物医薬品)

Mg²⁺ requirement in VmeJK, an RND multidrug efflux pump, in *Vibrio parahaemolyticus*

○Rino Murakami¹, Ayami Kunimitsu¹, Daichi Morita², Takanori Kumagai², Teruo Kuroda² (1)Sch. Pharm., Hiroshima Univ., (2)Dept. Microbiol. Med., Sch. Med. Sci., Hiroshima Univ.)

腸炎ビブリオは海洋性細菌であり、本菌の持つ RND 型多剤排出ポンプ VmeJK がその活性に Mg²⁺を必要とすることを私たちはこれまでに明らかにしている。排出活性に Mg²⁺を必要とする RND ポンプはこれまでに報告されておらず、その機構の解明は、本菌の薬剤耐性機構および RND ポンプの理解に役立つと考えられる。本研究では、VmeJK の Mg²⁺非要求性変異体を取得し、Mg²⁺要求性の機構について解析を行った。腸炎ビブリオ AQ3334 から 12 個の RND ポンプ遺伝子を破壊した株にプラスミドを用いて *vmeJK* を導入し、Ethidium Bromide (EtBr) および低濃度 Mg²⁺含有培地で継代培養を行い、Mg²⁺非要求的に EtBr 耐性を示す株を分離した。分離された 7 株のプラスミドのシーケンス解析を行い、遺伝子変異 (VmeJ V213A, VmeK D189E, VmeK E754K, *vmeJ* 開始コドン上流 10 bp での A 挿入) を見出した。*vmeJK* 上に遺伝子変異が確認された 4 株の Mg²⁺非存在下での最小生育阻止濃度 (MIC) は、野生型 VmeJK を持つ株と比較して、EtBr では上昇しなかったが他の基質であるエリスロマイシンでは 4~8 倍上昇し、変異により VmeJK の Mg²⁺要求性が低下した可能性が示唆された。さらに、*vmeJ* 開始コドン上流への 1 塩基挿入が確認された 3 株では、高濃度 Mg²⁺で EtBr を含む合計 5 つの基質に対して野生型 VmeJK 株より 4~8 倍大きい MIC が測定された。また、これら 3 株では Mg²⁺要求濃度未満である 0~3 mM Mg²⁺存在下で ethidium 排出活性が確認され、*vmeJ* 開始コドン上流での 1 塩基挿入により Mg²⁺が活性に不要になることが示唆された。

P2-184/DP2-15-06

薬剤耐性アシネトバクター属菌に感染するバクテリオファージの単離と解析

○田村 あずみ^{1,2,3}, 中村 暢宏¹, Aa Haeruman Azam¹, 千原 康太郎¹, 小島 新二郎¹, 崔 龍洙⁴, 渡士 幸一¹, 高橋 宜聖¹, 四柳 宏^{2,3}, 氣 篤 恒太郎^{1,4} (1)国立感染症・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, (4)自治医科大・医・細菌学)

Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting Drug-Resistant *Acinetobacter* Species

○Azumi Tamura^{1,2,3}, Tomohiro Nakamura¹, Aa Haeruman Azam¹, Kotaro Chihara¹, Shinjiro Ojima¹, Longzhu Cui⁴, Koichi Watashi¹, Yoshimasa Takahashi¹, Hiroshi Yotsuyanagi^{2,3}, Kotaro Kiga^{1,4} (1)Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Dept. Comp. Biol. Med. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Univ. of Tokyo, (3)Div. Infect. Dis., Inst. Med. Sci., Univ. of Tokyo, (4)Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

アシネトバクター属細菌は、自然環境中に広く存在するグラム陰性桿菌である。薬剤耐性を獲得しやすく、乾燥した表面でも長期間生存できることから、院内感染の原因菌となっている。抗菌薬の代替としてバクテリオファージを利用した治療法 (ファージ療法) が期待されており、多剤耐性アシネトバクター感染症に対する成功例も報告されている。一方で、アシネトバクター属細菌に感染するファージは、大腸菌など他のグラム陰性細菌と比べて単離数が少ない。また、*A. baumannii* (アシネトバクター・バウマニ) はヒトの感染症を引き起こすことが知られているが、*A. calcoaceticus* (アシネトバクター・カルコアセチカス) や *A. nosocomialis* (アシネトバクター・ノソコミリス) など生化学的性状が似ているため菌株同定が難しく、アシネトバクター・コンプレックスとして報告されている。ファージ療法に向けて、*A. baumannii* だけでなく他の菌株に対するファージも単離することが重要である。そこで本研究では、臨床分離株を用いてアシネトバクターに感染できるファージの単離と解析を進めた。これまでに、東京都の下水からアシネトバクターに感染するファージを 100 個以上単離した。中には *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* に広く感染できるファージが見つかった。また、360 kb ほどのゲノムを持つジャンボファージが採取でき、莢膜ではなく線毛を認識する特徴的なファージであることが分かった。他にもゲノム解析や宿主域の調査等、基礎的な解析の結果を報告する。

P2-185/W10-1

国内の市販鶏肉における ESBL 産生大腸菌の汚染実態とその遺伝学的解析

○山本 詩織^{1,2}, 中山 達哉³, 石井 良和⁴, 五十君 静信⁵, 岡田 由美子² (1)鎌倉女子大・家政・管理栄養, (2)国衛研・食品衛生管理, (3)広島大・総合生命, (4)広島大・IDEC, (5)東農大・総研)

Detection and genetic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* in retail chicken meat in Japan

○Shiori Yamamoto^{1,2}, Tatsuya Nakayama³, Yoshikazu Ishii⁴, Shizunobu Igimi⁵, Yumiko Okada² (1)Dept. Nutr. Diet., Kamakura Women's Univ., (2)Div. Biomedical Food Res., Nat. Inst. Health Sci., (3)Grad. Sch. Int. Sci. for Life, Hiroshima Univ., (4)IDEC Inst., Hiroshima Univ., (5)Res. Inst., Tokyo Univ. Agr.)

基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は、第三世代セファロスポリン系薬を分解する感染症起因菌の一つである。ヒト・ヒト間での水平伝播に加え、鶏肉の喫食を介した伝播経路も想定されている。我々はこれまでに市販鶏肉製品における ESBL 産生大腸菌の高率汚染を調査しており、本研究ではこれまでに得られた汚染成績を取り纏め、その汚染実態の推移ならびに分離菌株の遺伝的関係性を評価したので報告する。

2015 年度から 2021 年度にかけて入手した市販鶏肉計 557 検体を供試検体とした。ESBL 産生大腸菌の分離は、検体 25 g をセフォタキシム加緩衝ペプトン水で集積後、クロモアガー ESBL 培地を用いて行った。得られた分離菌株は、薬剤感受性試験、ESBL 産生遺伝子グループ別試験、不和合性プラスミド型別試験に供した。

ESBL 産生大腸菌は総計 557 検体中 310 検体 (55.7%) より検出された。年度毎の同検出率では、2015 年度 (77.0%) から 2021 年度 (50.8%) にかけて経時的な減少傾向であった。分離菌株は、テトラサイクリン (71.3%) 及びストレプトマイシン (59.7%) に対して高い耐性を示し、シプロフロキサシンに対しても比較的高めの耐性が認められた (27.1%)。遺伝子型は、*bla*_{CTX-M-1} グループが 32.4% と最も多く、続いて *bla*_{CTX-M-9} グループが 18.9%、*bla*_{CTX-M-2} グループが 18.2% であった。また、分離菌株の 40.0% では、IncI1 プラスミドの保有が認められた。以上より、国内の市販鶏肉検体における ESBL 産生大腸菌の高汚染状況が確認され、さらにヒト臨床分離株で多く報告される ESBL 産生遺伝子グループ並びに IncI1 プラスミド保有株も認められたことから、ヒトへの影響が示唆された。

P2-186/DP2-15-07

Evaluation of the bactericidal effect of bacteriophages on food products

○川野 光興¹, 一野 暁穂¹, 河路 英里¹, 吉田 夏乃葉¹, 中島 瑠南¹, 脇本 麗² (1)中村学園大・栄養科学・食品微生物, (2)中村学園大学・短大・食物栄養)

○Mitsuoki Kawano¹, Akiho Ichino¹, Eri Kawaji¹, Nanoha Yoshida¹, Runa Nakashima¹, Rei Wakimoto² (1)Dept. Nutritional Sci., Nakamura Gakuen Univ., (2)Div. Food and Nutrition, Junior College, Nakamura Gakuen Univ.)

Purpose: Our group isolated 12 ESBL-producing bacteria from chicken meat, and searched for bacteriophages that infect and lyse these ESBL-producing bacteria, and verified their bactericidal effect on food products.

Methods: Sewage sample and ESBL-producing bacteria culture were mixed, and plaque formation experiments were carried out using the double layered agar method. In the liquid culture experiment, MOI 100~0.0001 and no phage conditions were used and OD₆₁₀ were taken every 30 minutes to generate a growth curve. Chicken meat, rice, and processed cheese were used as foods. Host bacteria were applied to the foods and coated with phage solution and incubated overnight at 28°C. The diluted bacterial solution was applied to LB plates containing cefotaxime (2 μg/ml) and incubated at 37°C overnight.

Results: Phage infecting 10 out of 12 ESBL-producing bacteria were isolated. Since the plaques of φ13-1 were large and highly transparent, we prepared a high-titer phage solution of φ13-1 and performed the infection experiment in liquid culture. MOI=1 and MOI=0.01 showed low cell density after 24 h incubation. On cheese, the culture medium with phage showed 6.0 × 10⁵ cfu/ml, while the medium without phage showed 2.3 × 10⁷ cfu/ml, indicating a 97.3% reduction of ESBL-producing bacteria. Chicken and rice did not prove the bactericidal effect of phage in this condition.

P2-187/DP2-15-08

Isolation and application of *Klebsiella pneumoniae* prophage with a broad host range

李 俊杰, ○宮永一彦, ティティアナンバコーン カネート, グエンミンフォン, タンシンイー, ヴィーラナラヤナン スリワニ, 相羽 由詞, 笹原鉄平, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

Junjie Li, ○Kazuhiko Miyanaga, Kanate Thitiananpakorn, Minh Huong Nguyen, XinEe Tan, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, Teppei Sasahara, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is one of the threats because of its multidrug resistance and it makes chemotherapy difficult. Bacteriophage (phage) therapy is an alternative method against antibiotic-resistant pathogens. In this study, our focus was on applying phage with a broader host range to *K. pneumoniae*.

To obtain effective phages, 344 *K. pneumoniae* clinical strains were used for prophage induction by adding mitomycin C and 94 phages were isolated. Among them, 4 types of isolated prophage showed more than 20% of the host range by using 132 *K. pneumoniae* clinical strains. These phages were similar, and the genome size was ca. 54 kbp. To specifically target carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, phiKP77 with the broadest host range (ca. 33%) was selected for genetic engineering. Next, vector loading CRISPR-Cas13a system with the resistant-gene (*bla_{IMP}*) specific spacer was confirmed to kill the recombinant strain expressing the resistant gene. Then, the packaging site in the phiKP77 genome was inserted into this vector. This phagemid was transformed into *K. pneumoniae* strain integrated phiKP77. After induction by mitomycin C, the mixture of antibiotic capsid with the constructed phagemid and wildtype phiKP77 was obtained. To increase the efficiency of antibiotic-capsid production, the knockout of the packaging site in wild-type phage is needed for further study.

P2-188/DP2-15-09

Tailoring induce conditions for CRISPR-Cas13a loaded AB-Capsid and targeted killing of *S. aureus*

○Anujin Batbold, タンシンイー, ナンジンテレゲル, 渡邊 真弥, 相羽由詞, 宮永一彦, 笹原鉄平, ヴィーラナラヤナン スリワニ, ティティアナンバコーン カネート, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Anujin Batbold, XinEe Tan, Tergel Nayanjin, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyanaga, Teppei Sasahara, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thitiananpakorn, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The global rise in multi-drug resistant bacteria poses a significant challenge, concurrently there is a resurgence of interest in using bacteriophages as therapeutic and diagnostic applications. Our laboratory has previously pioneered the development of an antimicrobial capsid loaded with CRISPR-Cas13a (AB-capsid), which sequence-specifically kills target bacteria. However, achieving clinically relevant AB-capsids titers with therapeutic effectiveness remains a bottleneck. In this study, we identified the optimum concentration of mitomycin C (Mit C), a genotoxic agent used for the AB-capsid induction. Our results reveal that 0.4 µg/mL of Mit C is optimal, surpassing the conventionally used high concentration of 2 µg/mL, as it is less toxic and yields higher titers. This optimized strategy was applied for generating of AB-capsids targeting *S. aureus* accessory gene regulator (SA-CapsidCas13a-*agr*), resulting in an impressive yield of approximately 10⁸ TFU/mL of SA-CapsidCas13a-*agr*, which were 10-100 times higher than previous methods. Furthermore, we confirmed the sequence-specific killing activity of SA-CapsidCas13a-*agr* against RN4220 carrying target *agr* genes. This study not only established the optimal Mit C concentration for generating high titer of AB-capsids but also demonstrated the sequence-specific killing capability of resultant AB-capsids against the target host.

P2-189/DP2-21-06

系統学的に新規な複数の大腸菌ファージの標的レセプターの同定

○金子知義^{1,2}, 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファージセラピー研)

Identification of Receptors for Multiple Phylogenetically Novel *Escherichia coli* Phages

○Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ.)

【背景】バクテリオファージは薬剤耐性菌に対抗する切り札として再び注目をされているが、多くの細菌がファージに対しても耐性を獲得する。ファージ耐性を防ぐ手法として異なるファージの混合投与が提案されている。しかし、ファージは系統学的に未分類なものが多く、従ってファージの標的レセプターに関する情報も不足している。そこで、本研究では、系統学的に新規な大腸菌ファージの標的レセプターを調査した。

【方法】下水から単離した大腸菌ファージ 17 株の系統分類を比較解析した。次に、各ファージの耐性菌を作製し、比較ゲノム解析により変異部を同定することで標的レセプターの推定を行った。また、K12 株を宿主とするファージについては遺伝子の網羅的欠損株ライブラリーに対する感受性試験による標的レセプターの推定を行った。

【結果】単離した大腸菌ファージは主に 3 つの新規な系統に分離された。系統その 1 は *Ounavirinae* 亜科で *Felixounavirus* 属に近く、系統その 2 は *Stephanstirmvirinae* 亜科で *Phapecoctavirus* 属に近く、系統その 3 は *Caudovirales* 目の *Stephanstirmvirinae* 亜科および亜科未分類の *Barbavirus* 属に近かった。レセプターの推定の結果、系統その 1 はリボ多糖の外核の側鎖部分を、系統その 2 は外核の主鎖部分を、系統 3 は内核のリン酸化された主鎖部分および外膜分子 NfrA を標的とすることが示唆された。

P2-190/DP2-21-07

ライブラリーの拡張：ファージセラピー強化のための複数の黄色ブドウ球菌ファージの性状調査

○水谷 拓聖¹, 金子 知義^{1,2}, アザム アアハエルマン³, 北岡 一樹^{2,5}, 氣 篤恒太郎^{2,3,4}, 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファージセラピー研, ³感染研・治ワク, ⁴自治医科大・医・細菌学, ⁵医療法人社団 予防会 新宿サテライトクリニック)

Exploring the Arsenal: A Comprehensive Study of *Staphylococcus aureus* Phages for Phage Therapy

○Hiromasa Mizutani¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Aa Haeruman Azam³, Kazuki Kitaoka^{2,5}, Kotaro Kiga^{2,3,4}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ., ³Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ., ⁵Shinjuku Satellite Clinic)

昨今の薬剤耐性菌の増加に伴い、ファージセラピーが再び注目を集めている。様々な細菌が薬剤耐性を獲得しており、特に感染症治療の脅威となりうる細菌群として ESKAPE がある。そこに含まれる黄色ブドウ球菌は薬剤耐性化率が高く、感染症治療における重大な脅威となっている。黄色ブドウ球菌は、皮膚や粘膜に定着して感染症を引き起こすだけでなく、敗血症などの命に関わる感染症の原因となる場合もある。そのため、黄色ブドウ球菌に対するファージセラピーが期待されているが、黄色ブドウ球菌ファージは環境中から取得困難であると指摘されている。ゆえに、他の ESKAPE に感染するファージに比べて黄色ブドウ球菌ファージの単離株のデータは不足している。当研究室では 14 株の黄色ブドウ球菌感染ファージの取得に成功している。本研究では、これらのファージの感染域調査、濁度カーブ測定、吸着速度試験、ゲノム解析を網羅的に実施し、黄色ブドウ球菌ファージの特性を明らかにすることを目的とした。メチシリン耐性株を含む 24 株の黄色ブドウ球菌に対する感染域調査の結果、複数のファージで広域な感染性を示した。また、濁度測定の結果、14 株中 13 株で顕著な溶菌活性が確認され、そのうち 12 株は 24 時間以上にわたり細菌の増殖を抑制した。濁度カーブの形状は様々で、潜伏期間が非常に長いファージや、溶菌開始時間が一定でないファージの存在が示唆された。本研究により、臨床現場で課題となっている黄色ブドウ球菌の溶菌に有効なファージが見出された。また、14 株のファージは多様な溶菌形態を呈したことから、詳細な生理学的評価を行ったうえでライブラリー化することの重要性が示唆された。

P2-191/W10-6

大腸菌外膜タンパク質 OmpC のアミノ酸配列に基づくファージ療法 の提案

○中塚 哉太¹, 森川 莉帆¹, 金子 知義^{1,2}, 相羽 由詞³, 宮永 一彦^{2,3}, 崔 龍
洙³, 丹治 保典², 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファ
ージセラピー研, ³自治医科大・医・細菌学)

Proposal of Phage Therapy Based on Amino Acid Sequences of Escherichia coli Outer Membrane Protein C

○Kanata Nakatsuka¹, Riho Morikawa¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Yoshifumi
Aiba³, Kazuhiko Miyanaga^{2,3}, Longzhu Cui³, Yasunori Tanji², Satoshi
Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda
Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ., ³Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi
Med. Univ.)

【背景】新たな細菌感染症治療法として着目されているファージ療法の課
題の一つにファージの感染宿主域の狭さが挙げられる。ファージの感染
性は、ファージ尾繊維先端のタンパク質と細菌側の外膜分子との相互
作用に依存し、大腸菌ファージの多くは、細菌外膜上のタンパク質を標的
に吸着する。本研究では、多様な大腸菌に広く溶菌できるファージ治療
を目指し、大腸菌着群での保存性が比較的高い Outer membrane protein
C (OmpC) を標的受容体とするファージカクテルの作製を目指した。

【方法】薬剤耐性臨床分離株を含む大腸菌 158 株とゲノムデータベース
より取得した国外の大腸菌 20 株, 及び ATCC 43888 (O157:H7) 株,
BW25113 (K12) 株の計 180 株に対して Multi locus sequencing typing
(MLST) 解析と OmpC アミノ酸配列解析をそれぞれの株に対して行っ
た。次に、各 OmpC をコードする遺伝子を ompC 欠損株に形質転換し、
OmpC 多型ライブラリーを作製した。そして、OmpC を標的受容体とす
る天然ファージを都市下水中より単離し、OmpC 多型ライブラリーに対
する溶菌能の評価を行った。

【結果・考察】大腸菌 180 株の OmpC アミノ酸配列は 18 パターン (相
同性 < 99% は異なるパターンと判定) に分類され、180 株のうち 101 株
(56%) が Sequence Type (ST) 131 であり、ST と OmpC アミノ酸配列
パターンには強い相関性が認められた。また、取得した OmpC 標的
ファージは、複数の OmpC アミノ酸配列パターンを認識することが示さ
れた。これらのファージをカクテル化することで感染域の広域化が期待
されるほか、ST と OmpC アミノ酸配列パターンとの相関性に基づく有
効な個別型ファージ療法が提案できると期待される。

P2-193/DP2-21-09

Reactive oxygen species generated by 222 nm Far UV-C impair photorepair in Escherichia coli

○成田 浩司^{1,2}, 浅野 クリスナ^{1,3}, 福士 理沙子^{1,4}, 山根 享介⁵, 奥村 善彦⁵,
中根 明夫^{1,3,4} (¹弘前大・院医・感染生体防御, ²弘前大・院医・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・看護, ⁵ウ
シオ電機 (株))

○Kouji Narita^{1,2}, Krisana Asano^{1,3}, Risako Fukushi^{1,4}, Kyosuke Yamane⁵,
Yoshihiko Okumura⁵, Akio Nakane^{1,3,4} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki
Univ. Grad. Sch. Med., ²Inst. Animal Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.,
³Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ⁴Dept.
Nursing, Sch. Health Sci., Hirosaki Univ. Health Welfare, ⁵Ushio Inc.)

222 nm Far UV-C (222 UVC) elicits a germicidal effect as well as
conventional 254 nm UV-C (254 UVC) and is available in dwelling
spaces because of harmless to human. UVC causes DNA lesions such
as cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) that inhibit DNA replication
and transcription. However, in many pathogens, CPD is repaired by
photolysis and the proliferation ability is recovered by photorepair. In
this study, bacterial count of *E. coli* irradiated with 254 UVC was
reduced, but the count was increased after photorepair. 254 UVC
induced CPD formation in *E. coli* but the amount of CPD was reduced
by photorepair. On the other hand, count of *E. coli* irradiated with 222
UVC reduced, but the count was not increased, and amount of CPD
did not reduce after photorepair. 254 UVC was reported to induce
reactive oxygen species (ROS) that are involved in the germicidal
effect. In this study, ROS-producing *E. coli* cells were increased by
irradiation with 222 UVC compared with 254 UVC after photorepair.
ROS can induce carbonylation of proteins, which changes their
functional properties. Carbonylated proteins were increased in *E. coli*
irradiated with 222 UVC but not 254 UVC after photorepair. These
results indicated that ROS, which is induced by 222 UVC, impair
protein function related to photorepair and inhibit recover of
proliferation ability of *E. coli*.

P2-194/DP2-21-10

デフィシル菌溶菌酵素 Ecd09610 触媒ドメインの生化学的構造学 的解析

○玉井 栄治¹, 関谷 洋志¹, 野中 康宏², 神鳥 成弘³, 宮地 ともみ¹ (¹松山
大・薬・感染症学, ²香川大・医・分子細胞, ³香川大・医・研基セ)

Biochemical and structural analysis of the endolysin Ecd09610 catalytic domain from *C. difficile*

○Eiji Tamai¹, Hiroshi Sekiya¹, Yasuhiro Nonaka², Shigehiro Kamitori³,
Tomomi Miyaji¹ (¹Dept. Infec. Dis., Col. Pharm. Sci., Matsuyama Univ.,
²Dept. Endocrinol., Fac. Med., Kagawa Univ., ³Res. Faci. Cent. Sci. & Tec.
Facul. Med., Kagawa Univ.)

【目的】デ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問題となっている。溶菌酵素は、ペ
プチドグリカンに直接加水分解し菌を死滅させることから、耐性菌に
も有効な新規抗菌薬として期待されている。本研究では、デフィシル
菌溶菌酵素 Ecd09610 が持つ 2 つの触媒ドメイン (グルコサミニダー
ゼドメイン (GCD) とエンドペプチダーゼドメイン (ECD)) の生化学
的性質とその構造を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】デフィシル菌 630 株のゲノム DNA を鋳型に PCR にて
Ecd09610 の全体、触媒ドメイン、変異体の遺伝子を増幅し pColdII
に組み込み、大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL を用いて発現させ、各種カ
ラムを用いて精製した。溶菌活性は濁度低下法で、菌との結合はブル
ダウン法で調べた。さらに、高度に精製したタンパク質を用いて結晶
化スクリーニングを行い、得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析を
実施した。

【結果・考察】Ecd09610 の全体及びドメイン変異体はデフィシル菌に
対して溶菌活性を示した。特に、GCD-ECD が全体よりも強い溶菌活
性を示し、GCD の溶菌活性は最も低かった。また、これらの活性は
Ecd09610 全体と GCD-ECD, GCD では pH6 で、ECD では pH8 で最
も活性が高かった。また、これらの活性は 50-75mM の NaCl で最も
高く、Zn や Mn, Cu によって一部低下した。さらに、GCD-ECD,
ECD は加熱により活性が著しく低下したが GCD は 100°C で加熱して
も活性を維持していた。一方、GCD の結晶を得ることができ、構造解
析に成功した。さらに、GCD とペプチドグリカンのドッキングモデル
を作成し、基質結合部位の変異体を用いた解析により反応メカニズム
を推定した。

P2-195/DP2-21-11

The effects of *Monascus* Fermented Rice Extract on the pathogenicity of toxigenic *Vibrio cholerae*

○山城 哲¹, 許 駿¹, 金城 麗菜², 石原 圭一郎³, 金城 朱似乃², 橘 信二郎³
(¹琉球大・院医・細菌学, ²琉球大・院農, ³琉球大・農)

○Tetsu Yamashiro¹, Jun Xu¹, Rena Kinjo², Keiichiro Ishihara³, Aino Kinjo²,
Shinjiro Tachibana³ (¹Dept. Bacteriol. Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus,
²Grad. Sch. Agri., Univ. Ryukyus, ³Fac. Agri., Univ. Ryukyus)

The main pathogenic properties of *Vibrio cholerae* are ability to
produce cholera toxin, superior motility, and ability to colonize the
epithelial cells of the small intestine. In recent years, multi-drug
resistant toxigenic *V. cholerae* strains have emerged, and intensive
efforts have been made to find natural products that target the key
virulence factors of the bacteria without inhibiting their development.
Monascus spp. are filamentous fungi used in fermented foods. Certain
metabolites of *Monascus* spp. have been reported to have health
benefits in humans, however, there are few studies on the effects of
Monascus spp. on pathogenic bacteria and their virulence factors. In
the present study, we demonstrate the effects of *Monascus* spp.
fermented rice extracts (MFRE) on the major virulence factors of a
toxigenic *V. cholerae* strain.

When CTx was induced by *V. cholerae* O1 El Tor strain N16961 in the
AKI medium with MFRE, the CTx concentration was affected
compared to those of the controls. The effect of MFRE on the
bioactivities of CTx against animal cell lines was investigated using
the CHO cell elongation index and the cAMP assay. In both assays,
MFRE had a marked effect on the activity of CTx. In addition, the
excellent motility of N16961 was affected in the presence of MFRE.
In the presentation, some of the respective mechanisms will also be
discussed.

P2-196/W6-3

Novel Bacterial Production System: Achieving Endotoxin-Free Recombinant Bioactive Proteins

○鴨志田 剛^{1,2}, 山口 大貴², 山田 倫暉², 竹本 訓彦³, 八尋 錦之助², 森田 雄二¹ (1)明治薬大・感染制御, (2)京都薬大・微生物, (3)国立国際医療研究センター)

○Go Kamoshida^{1,2}, Daiki Yamaguchi², Noriteru Yamada², Norihiko Takemoto³, Kinnosuke Yahiro², Yuji Morita¹ (1)Dept. Infect. Cont. Sci. Meiji Pharm. Univ., (2)Lab. Microbiol. and Infect. Cont. Kyoto Pharm. Univ., (3)Pathogenic Microbe Lab., Dept. Infect. Dis., NCGM)

Bacterial recombinant protein expression systems are essential tools in modern science and biopharmaceutical production. Endotoxins, also known as lipopolysaccharides (LPS), are potent immunostimulatory molecules that are of critical concern in bacterial expression systems. The Gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* exhibits an interesting and unique phenotype characterized by the complete loss of LPS. Herein, we innovated a novel system for producing recombinant proteins that are completely devoid of endotoxin contamination, using LPS-deficient *A. baumannii*. We successfully purified endotoxin-free functional GFP, which reduced endotoxin contamination by about three orders of magnitude. Additionally, we enabled the extracellular production of small-molecule antibodies, and a multivalent variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody (VHH) that specifically binds to the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was purified from the culture supernatant. A virus neutralization assay demonstrated the functionality of the purified antibody in suppressing viral infections. Our established novel recombinant protein expression system represents the first of completely endotoxin-free platform compared to other bacterial expression systems, and is expected to be applied in various fields, including clinical practice, in the future.

P2-197/DP2-21-12

Development of periodontal disease prevention using ultraviolet light-emitting diodes

○松村 多恵¹, 鈴木 美里¹, 湯本 浩通², 田中 保¹, 栗飯原 睦美¹ (1)徳島大院・社会産業理工学研究所, (2)徳島大院・医歯薬)

○Tae Matsumura¹, Misato Suzuki¹, Hiromichi Yumoto², Tamotsu Tanaka¹, Mutsumi Aihara¹ (1)Grad. Sch. Tech. Indust. & Social Sci., Tokushima Univ., (2)Grad. Sch. Inst. of Biomed. Sci., Tokushima Univ.)

Periodontal disease affects about 80% of Japanese adults and is a risk factor for various systemic disease. *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) is often isolated from the periodontal pocket of severe chronic periodontitis sites. To prevent and treat periodontal disease, effective methods for disinfection of *P.g.* are needed. In this study, we focused on ultraviolet light-emitting diodes (UV-LED) to examine the bactericidal effect on *P.g.* and to analyze the underlying mechanism. *P.g.* ATCC33277 was cultured and adjusted at certain condition then irradiated with UV-LED (wavelength 280, 365 nm) to evaluate bactericidal effect by colony count. The UV dose-dependent bactericidal effect was achieved at each of UV wavelengths. At the same level of bactericidal effect, cell membrane surface damage was compared by the images with a scanning electron microscope. The cell membrane damage was observed at 365 nm, not 280 nm, suggesting the generation of reactive oxygen species. The amount of gingipain produced in *P.g.* was also compared. These results suggest that UV-LED is an effective bactericidal method against *P.g.* and may contribute to prevent and treat periodontal disease.

P2-198/DP2-21-13

Development of a water disinfection system by a combination of UV and chitosan

○鈴木 美里, 松村 多恵, 川上 竜巳, 田中 保, 栗飯原 睦美 (徳島大院・社会産業理工学研究所)

○Misato Suzuki, Tae Matsumura, Ryushi Kawakami, Tamotsu Tanaka, Mutsumi Aihara (Grad. Sch. Tech. Indust. & Social Sci., Tokushima Univ.)

Water disinfection technologies such as chlorination, ozone, and ultraviolet (UV) are commonly used, but there are concerns about environmental impact and human health, including the development of drug-resistant bacteria, toxicity, and carcinogenicity. Therefore, effective methods for water disinfection are needed. Combined effects of UV and chitosan, a polysaccharide extracted from natural chitin, as a biopolymer with antimicrobial activity are few reported. To developing a new water disinfection technology, we investigated the bactericidal effect of the combined use of UV and chitosan. *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli*) or *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (*S. aureus*) were used as bactericidal indicators. Chitosan was mixed with the bacteria solution and irradiated with UV to examine its bactericidal effect under various conditions. The results showed a synergistic bactericidal effect on *E. coli*, but no effect on *S. aureus*. Experiments using reactive oxygen species (ROS) scavengers showed differences in the species and amount of ROS generated. Damage to cell membranes caused by the combination of UV and chitosan was observed by scanning electron microscopy. These results indicate that treatment of chitosan combined with UV irradiation is potential method for effective water disinfection.

P2-199

Cholix による肝細胞死におけるエクソソームの影響

尾崎 和矢¹, 川村 朝香¹, ○永原 妃葉¹, 横谷 篤², 八尋 錦之助¹ (1)京都薬大・薬・微生物感染制御, (2)微生物化学研究所)

The effect of exosome pathway on Cholix-induced hepatocytes death

Kazuya Ozaki¹, Asaka Kawamura¹, ○Hiyo Nagahara¹, Atsushi Yokotani², Kinnosuke Yahiro¹ (1)Dept. Microbiol. Infect. Cont., Sch. Pharm., Kyoto Pharm. Univ., (2)Kyoto Biken Lab.)

【目的】 Cholix は、コレラ菌が産生する ADP リボシル化酵素であり、タンパク質合成を阻害することで肝細胞において細胞死を誘導する。エクソソームは細胞から放出される細胞外小胞であり、細胞死や細胞間コミュニケーションに関与する。エクソソームが Cholix の細胞死に関与するか明らかにすることを目的とした。【方法】エクソソーム阻害剤や siRNA を用いて、ウエスタンブロット法によるアポトーシスのバイオマーカーである cPARP と、CCK-8 による生細胞数を評価することで、細胞死に対するエクソソームの影響の有無を検討した。また、Cholix を作用させた肝細胞からエクソソームを回収し、そのエクソソームを用いて同様に cPARP の変化を評価した。【結果及び考察】エクソソーム阻害剤のうち、特に三環系抗うつ薬である Desipramine は cPARP の増加と生細胞数の減少が顕著な結果となった。エクソソーム放出に関与する生体分子である Rab27a をノックダウンすることによって cPARP の増加と生細胞数の減少は見られたが、Desipramine のエクソソーム阻害の標的である SMPD1 のノックダウンでは見られなかった。また、Cholix を作用させた肝細胞から回収したエクソソームと共に Cholix を作用させると cPARP の増加が見られた。以上より、エクソソームは Cholix の細胞致死活性に影響を与える結果となったが、Desipramine によるアポトーシス亢進は、エクソソームによるアポトーシス亢進とは違う経路で進行している可能性が示唆された。

2LS-3

無症状感染者拡大とその早期発見・早期改善—食品衛生法・大量調理施設衛生管理マニュアル検査の無症状感染者拡大とその早期発見・早期改善に向けて—

○佐藤 寿夫 (株式会社日本微生物研究所 精度管理室長)

Early detection and improvement of the increasing asymptomatic patients—For the purpose of early detection and improvement of the increasing asymptomatic patients screened by stool test inspection that is defined in “Manual for Hygiene Management at Large-scale Food Preparation Facilities”

○Toshio Sato (Manager of Quality Control Department, JAPAN BIOSCIENCES CO., LTD.)

3LS-2

AMR 対策アクションプラン —抗菌薬の安定供給を中心に—

○松本 哲哉^{1,2} (¹国際医療福祉大学医学部感染症学講座, ²国際医療福祉大学成田病院感染制御部)

Action Plan for AMR Control - Focusing on Stable Supply of Antimicrobial Agents

○Tetsuya Matsumoto^{1,2} (¹Grad. Sch. Medicine, Grad. Sch. Public Health, Affiliation Campus: Narita, International Univ. Health and Welfare, ²Dept. Infection Control, International Univ. Health and Welfare Narita Hospital)

2019年にセファゾリンの供給停止に端を発した抗菌薬の安定供給の問題は、その後、セファゾリンの供給が再開されても解決には至らなかった。むしろその後も他の多くの抗菌薬が不足し、供給不足は医薬品全体が抱える問題になってきている。抗菌薬の供給不足を招いている原因としては、継続的に下げられる薬価に対して、コストの安い海外に製造を委託する傾向が顕著となり、海外の製造所のトラブルなどがあるとすぐに供給が途絶えることが挙げられる。さらに国内では他国に比べて薬剤に高い品質が要求されており、その条件を満たす困難さもある。また、供給不足が見込まれる薬剤に対して各医療機関は確保を目的として通常よりも多い発注をし、需要と供給のバランスが崩れることも起こり得る。

抗菌薬に限らず、医薬品の供給不足を解決するためには、これらさまざまな課題をクリアしていく必要があり、簡単な問題ではない。そこで、日本化学療法学会を始めとする4学会は **Key Drugs** を選定するとともに、「抗菌薬の安定供給に向けた提言」を厚労大臣宛に提出し、薬価の再評価や国内での生産体制の整備を求めた。厚生労働省は「医療用医薬品の安定確保に関する関係者会議」を立ち上げ、さまざまな角度から問題の解決策を議論している。また、国は抗微生物薬を半導体などとともに特定重要物資と定め、β-ラクタム系抗菌薬の原薬の国内製造を進めている。

本学会では国が新たに公開した AMR アクションプランの概要に触れ、それを支える抗菌薬の安定供給の問題やその対応について解説する予定である。