

第82回日本細菌学会総会「優秀ポスター賞」

理事長 野田公俊
学術支援・評価委員会

第82回日本細菌学会総会において、学生会員によるポスター発表を審査し、下記の諸君に「優秀ポスター賞」を授与しました。今後の研究の発展を期待します。

3月12日受賞者

氏名	ポスター番号	所属
小林加直	P1-003	広島大学大学院医歯薬総合研究科 腎泌尿器科学
木村友美	P1-045	大阪大学微生物病研究所 細菌感染分野
山本真衣	P1-051	岡山県立大学保健福祉学部栄養学科 山本研究室
本田尚子	P1-078	東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 感染病態学
田中将之	P1-119	高知大学農学部生物資源科学科 植物工学研究室
天羽友美	P1-167	徳島文理大学大学院薬学研究科機能形態学教室
松永哲郎	P1-229	山口大学農学部生物機能科学科
池田 太	P1-239	東京薬科大学薬学部医療衛生薬学科 免疫学教室

3月13日受賞者

氏名	ポスター番号	所属
金 恵珍	P2-012	徳島大学工学部生物工学科
市川和哉	P2-077	名城大学大学院薬学研究科 微生物学研究室
小野久弥	P2-090	岩手大学農学部獣医学科
森 有可	P2-131	大阪大学大学院歯学研究科 口腔細菌学教室
米田 佳那子	P2-141	山口県立大学生活科学部 生活環境学科微生物学研究室
星 朱香	P2-169	東京大学大学院農学生命科学科 植物病理学研究室
常見和彦	P2-194	岡山大学大学院自然科学研究科 遺伝子工学研究室
小林里美	P2-233	千葉大学大学院薬学研究院 微生物薬品化学研究室

優秀ポスター賞：タイトル・抄録

ポスター番号：P1-003

多剤耐性緑膿菌の *bla*_{IMP-1} インテグロンカセットに存在する新規アミノグリコシド耐性遺伝子の解析

小林 加直^{1,2,3}, 甲田 俊太郎^{1,2,3}, 加藤 文紀^{1,2}, 藤原 環^{1,2}, 菅井 基行^{1,2} (広島大・院・医歯薬・院内感染症プロジェクト研究センター¹, 広島大・院・医歯薬・細菌², 広島大・院・医歯薬・腎泌尿器科³)

【目的】多剤耐性緑膿菌 (MDRP) は、院内感染の重要な原因菌の1つである。中でも近年メタロβラクタマーゼ (MBL) 産生型のMDRPの分離が増加しつつある。広島大学病院の同一病棟入院患者4名から分離されたMDRPを含む緑膿菌9株について、ゲノタイピング、MBLインテグロンカセットの解析を目的とした。

【方法】ゲノタイプ解析にはパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いた。MBL遺伝子の検出、インテグロンタイピングにはPCR法を用いた。

【結果と考察】緑膿菌9株の染色体DNAを制限酵素 *Spe I* で切断後、PFGEを行った結果、全ての泳動パターンが一致した。よって、これらの株は1クローンのMDRPによる多発感染事例の結果と判明した。このうちのMDRP1株は *bla*_{IMP-1} 陽性で、*bla*_{IMP-1} の5'側および3'側に AAC (6') 遺伝子様 *orf* を保有していた。3'側 *orf* は、5'側 *orf* のN末端側から8塩基が欠落した構造であった。それぞれの *orf* を大腸菌で発現させた結果、5'側 *orf* を含む大腸菌のみが多くのアミノグリコシド系抗菌薬に高いMIC値を示した。新規の *orf* を含む *bla*_{IMP-1} インテグロンは、接合実験で移ることからプラスミド上にあると考えられた。この *orf* は167個のアミノ酸をコードし、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ AAC (6')-Iz と42%の相同性を示すことから、新規のAAC (6') と考えられる。精製した組換えタンパクで処理したアミノグリコシドの薄層クロマトグラフィー及び質量分析の結果、アセチル化を確認した。

(非学会員共同研究者：板羽秀之，大毛宏喜，松原昭郎)

ポスター番号：P1-045

腸炎ビブリオT3SSエフェクター分泌に必須のシャペロンの同定

木村 友美¹, 明田 幸宏^{1,2}, 児玉 年央¹, 飯田 哲也³, 本田 武司¹ (阪大・微研・細菌感染¹, 阪大・微研・感染症国際研究センター・臨床感染症学², 阪大・微研・感染症国際研究センター・ゲノム病原細菌学³)

【目的】腸炎ビブリオの病原性には3型分泌装置 (T3SS) により宿主細胞に注入されるエフェクタータンパク質が関与していることが明らかとなっている。多くのT3SSにおいて、エフェクターはそれぞれ分泌に必須のシャペロンを有していることが報告されているが、腸炎ビブリオのシャペロンはいまだ同定されていない。そこで、腸炎ビブリオの大染色体上に存在するT3SS1より分泌されるエフェクター分子の一つであるVP1686のシャペロン

の同定を行い、同定されたシャペロンのエフェクター分泌への関与について検討を行った。

【方法】VP1686遺伝子上流に存在するシャペロン様タンパク質VP1687の遺伝子欠損株を作製し、T3SS1によるVP1686の分泌をWestern blottingにより検討するとともに、VP1687欠損株をHeLa細胞に感染させ、VP1686により引き起こされる感染細胞の形態変化等の有無からVP1687欠損株の宿主細胞へのVP1686注入能について検討を行った。またRT-PCRによりVP1687のVP1686発現への影響を確認した。さらに、Pull down assayによりVP1686とVP1687の結合能を検討した。

【結果と考察】VP1687欠損株ではVP1686の分泌および細胞への注入が見られなかった。また、VP1687はVP1686との結合能を有することが分かった。以上の結果から、VP1687はVP1686に結合し、分泌の制御等に関わっていると考えられ、VP1687はT3SS1によるVP1686の分泌に必須なシャペロンであることが明らかになった。

ポスター番号 : P1-051

STM法で得られた *V. vulnificus* 弱毒化株とトランスポゾン挿入遺伝子

山本 真衣¹, 細原 浩平¹, 瀬川 理恵¹, 井上 美幸¹, 横田 憲治², 小熊 恵二³, 山本 耕一郎¹ (岡山県立大・保健福祉・栄養¹, 岡山大院・保健², 岡山大院・医歯薬学総合³)

我々は *Vibrio vulnificus* の病原因子をSignature-tagged mutagenesis (STM)法を用いて検索し、マウスに対しての感染性が低下したトランスポゾン挿入変異株を得ている。今回は、より正確に感染力を測定する目的で、感染に対する感受性増強に必要な鉄投与を、これまでの腹腔注射ではなくよりマイルドな皮下注射で行い、鉄剤の量、有効時間など実験条件を検討した。さらに弱毒化株における挿入遺伝子についても検討したので報告する。

マウス (ICR) に菌に対しする感受性を与えるために、鉄デキストランを250 mcg/g体重当たりマウスの皮下に投与し、0.5, 1, 2, 4, 8時間後に *V. vulnificus* を腹腔注射したところ、菌注射前4時間に鉄剤投与したものでマウスは36時間以内に全て斃死した。また、鉄剤0.25 mg/g体重を皮下注射で感受性化した後、5時間後に菌を投与したマウスは全てが斃死したが、0.025, 0.005 mg/g体重で感受性化したものでは全く斃死させることができなかった。この条件を用いて、スクリーニングした弱毒化株の毒性を再度測定したところ、さらに多くの弱毒化株が得られた。殊に2株においては最少致死量が 10^6 cfuと10万分の1に低下した変異株も見出された。その一株を生菌ワクチンとして用いたところ、免疫後、著しい感染防御効果を示した。変異株のトランスポゾン挿入周辺をpUC18にクローン化し塩基配列を決定し、遺伝子データベースの *V. vulnificus* 染色体遺伝子との相同性検索を行ったところ、挿入遺伝子はIMP dehydrogenaseの遺伝子であった。他の弱毒変異株でも同じ遺伝子に挿入されている株も分離したが、弱毒化はS10-T79株には及ばなかった。

ポスター番号 : P1-078

腸管出血性大腸菌におけるLEE遺伝子群のマスターレギュレーターPchのLrhAによる発現

制御

本田 尚子^{1,2}, 伊豫田 淳², 山本 章治², 渡邊 治雄^{1,2} (東大・院医・感染病態学¹, 感染研・細菌第一²)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157が保有する病原性遺伝子群LEEの発現は、LEE内部にコードされるセントラルレギュレーターLerによって正の制御を受ける。*ler*の転写はゲノム上の異なる領域に位置する3つのパラログPchA, B, Cによって正に制御される。EHECに特異的なLEEの発現制御因子のうち、Pchは発現制御カスケードの最上位に位置すると考えられており、LEEの発現制御を理解する上で*pch*の転写制御機構の解明は必須である。*pch*の転写を制御する遺伝子を同定するため、*pchA-lacZ*の転写融合体を染色体上で構築し、この活性を指標にTn5挿入変異によって*pchA*の転写活性が低下する変異株をスクリーニングした。その結果、LysRタイプの転写制御因子をコードする*lrhA*遺伝子を同定した。EHEC O157の*lrhA*欠損株では*pchA*の転写量が野生株の約10%, *B*が約50%に低下し、*C*は変化しなかった。LEEにコードされる3型分泌蛋白質の発現量は*lrhA*欠損株で顕著に低下し、LrhAの構成的発現によって相補されたことから、LrhAは*pchA*および*B*を介してLEEの発現を制御すると考えられる。5'-RACE法によって*pchA*, *B*, *C*の転写開始点を決定後、*pchA*の転写調節領域を*lacZ*に融合させたレポータープラスミドを構築して欠失解析を行った。その結果、LrhAの転写活性化に必要な領域は転写開始点上流390bp付近に存在し、この領域を含むDNAプローブにLrhAが結合することをゲルシフトアッセイおよびフットプリンティングにより証明した。この領域に加え、プロモーター-35領域上流にもLrhAが結合したことから、LrhAは*pch*の転写調節領域の複数箇所に結合することで、それらの転写を直接制御しているものと考えられる。

ポスター番号 : P1-119

*Pseudomonas cichorii*の病原性分化に対するPathogenicity island1の関与

田中 将之¹, 大西 浩平², 木場 章範¹, 曳地 康史¹ (高知大・農・植物工学¹, 高知大・総合研究センター・遺伝子実験施設²)

【目的】 *Pseudomonas cichorii* SPC9018株 (Pc) は、ナスとレタスそれぞれに褐斑細菌病と腐敗病を引き起こす。Pcが有するタイプ3分泌系 (T3SS) をコードする*hrp*遺伝子群 (*hrp*) は、*P. viridiflava* (Pv) のPAI-IIの*hrp*と高い相同性を示す。Pcのナスに対する病原性は*hrp*依存であるが、レタスに対する病原性は*hrp*に依存しない。本研究では、pathogenicity island (PAI) に存在する*hrp*以外の遺伝子のPcの病原性への関与について解析を行った。

【方法と結果】 Pvと同様に、Pcの*hrp*の上流に位置するLysR-type transcription regulator 遺伝子、aldehyde dehydrogenase (Aldh) 遺伝子およびphosphinothricin N-acetyltransferase遺伝子の発現は、*hrp*発現を制御するHrpLによる制御下にはなかった。LysR-type transcription regulator遺伝子のPc変異株はナスとレタスに対して病原性を保持した。一方、*aldh*とphosphinothricin N-acetyltransferase遺伝子それぞれの

Pc変異株はナスに対する病原性を喪失したが、レタスに対する病原性は保持した。さらに、*aldh*変異株の病原性は、Pvのみならず*P. syringae* pv. *tomato* DC3000株と*P. aeruginosa* PAO1株の*aldh*によっても相補された。また、塩基配列を基にした系統解析の結果、*aldh*と*hrp*は*gyrB*と独立した系統進化したと判断された。

【考察】*Pseudomonas*属細菌間での*aldh*とphosphinothricin N-acetyltransferase遺伝子の塩基配列の高い保存性と*aldh*の機能相補性から、Pcは、水平伝搬により*aldh*とphosphinothricin N-acetyltransferase遺伝子を*hrp*とともに獲得し、pathogenicity islandを形成し、病原性を分化したと考えられた。

ポスター番号 : P1-167

ウエルシュ菌FnBPs変異株における病原性の変化

天羽 友美¹，井上 正久¹，瀬津 弘順¹，秋田 昌彦¹，阿部 友美¹，永浜 政博²，小田 真隆²，櫻井 純²，清水 徹³，大谷 郁³（徳島文理大・薬・機能形態¹，徳島文理大学・薬・微生物²，金沢大・医・細菌³）

【目的】当研究室では、ウエルシュ菌のガス壊疽感染症における好中球浸潤阻害は、産生するα毒素による血管内皮細胞のP-selectin発現抑制が原因であることを報告してきた。一方、Fibronectin-binding-proteins (FnBPs)は、接着因子の一つで、菌体の接着や浸潤に関与する事が知られている。本研究ではウエルシュ菌におけるFnBPsの役割を明らかにするため、FnBP遺伝子変異ウエルシュ菌を用い、組織学的、生化学的に検討した。

【方法】A型ウエルシュ菌 strain13 wild type (W.T.)およびFnBPAまたはFnBPB変異株1×10⁶個/0.1mLを6週齢ddyマウスの大腿部に投与した。6時間後に感染組織を摘出し、H.E.染色、P-selectinに対する免疫組織化学的染色を行った。また、各菌株の毒素活性をegg-yolk寒天培地、Fn結合率をELISA法にて測定し、比較検討した。

【結果と考察】組織学的観察より、FnBPAとBの両変異株ともにW.T.と同程度の筋組織障害が認められた。一方、FnBPA変異株ではW.T.と同様に好中球浸潤は認められなかったが、FnBPB変異株では菌周囲に好中球浸潤が認められた。さらに、血管内皮細胞におけるP-selectinの発現は、FnBPB変異株においてのみ観察された。また、各菌株間でα毒素産生能に変化は認められなかったが、各菌株間のFn結合能を比較すると、W.T.よりFnBPB変異株では低下し、FnBPA変異株では、結合能の低下は認められなかった。以上の結果より、Fnへの結合にはFnBPAよりもFnBPBの関与が強いと考えられる。さらに、ウエルシュ菌のFnへの結合は、筋組織障害に対して大きな影響を与えないが、P-selectinの発現を介した好中球浸潤阻害に深く関与していると推察される。

ポスター番号 : P1-229

歯周病関連細菌*Eikenella corrodens*のデンタルプラークからの高病原化株の検出

松永 哲郎¹，阿座上 弘行¹，恵比須 繁之²（山口大・農・生物機能¹，阪大院・歯・保存²）

*Eikenella corrodens*は歯周病関連細菌の一つで、その病原性には菌体表層のGalNAc特異的レクチンが大きく関与している。近年、我々は臨床分離株の一つに約8.7kbのプラスミドDNAを発見し、その解析を行った。その結果、プラスミド上にコードされたリコンビナーゼがゲノム上のタイプ4線毛遺伝子領域に組換えを起こし、レクチン活性やバイオフィーム形成能を著しく増加させることを明らかにした。ゲノムの組換えが起こった株からタイプ4線毛遺伝子領域をクローニングしその塩基配列を解析したところ、タイプ4線毛の構造遺伝子 (*ecpA*) 内で組換えが起こり、新たな線毛遺伝子が出現していることがわかった。また、リコンビナーゼ遺伝子の導入の有無による本菌の口腔上皮細胞への付着や侵入能力の変化について調べた。導入により上皮細胞への付着活性の顕著な増加が見られた。一方、侵入については、導入株ではほとんど見られなくなった。したがって、本菌の上皮細胞への付着には菌体表層レクチンが寄与するが、侵入にはタイプ4線毛が寄与することが示唆された。これらの結果より、プラスミドによるゲノムの再編によって *E. corrodens* が高病原化する可能性が示唆された。そこで、リアルタイムPCRを用いて、ゲノム上の線毛遺伝子に組換えが起こっている株の検出を試みた。プライマー配列の検討により、線毛遺伝子の組換えを検出できるようになった。この方法により、臨床分離株からの組換え株の検出頻度と病態との相関について今後調べる予定である。

(会員外共同研究者：仲行あゆみ、中原彩、斉藤悠希、加藤昭夫)

ポスター番号：P1-239

*Candida albicans*の培養処理条件とdectin-1介在性免疫応答との関連性に関する研究

池田 太，安達 禎之，石橋 健一，三浦 典子，大野 尚仁（東京薬科大・薬・免疫）

Candida albicans (*C. albicans*) の培養環境と宿主応答との関連性を解析する目的で、細胞壁の主要多糖である β -グルカン及びその受容体であるdectin-1に着目し、菌体の培養及び処理条件の差異によるdectin-1との結合性、マクロファージ (M ϕ) 刺激性の変化を検討した。

C. albicans NBRC1385とdectin-1との結合性を定量的に評価するため、可溶性dectin-1のIgG-Fc融合タンパク (sDec1-Fc) を作成し、様々な条件で調製した死菌体へのsDec1-Fcの結合性を比較した。その結果、27 $^{\circ}$ Cよりも37 $^{\circ}$ Cで培養した菌体への結合性が高かった。また、Potato dextrose培地よりも合成培地（ショ糖，無機塩，ビオチン）で培養した菌体への結合性が高かった。加熱処理による菌の固定によってもsDec1-Fcの結合性は増大した。これらの菌体はdectin-1 transfectantのNF- κ B及びNF-ATの活性を上昇させた。さらに、野生型マウス (WT) 及びdectin-1 KOマウス (KO) のチオグリコレート培地誘導腹腔M ϕ をGM-CSF処理し、死菌体と作用させ、M ϕ への結合及びサイトカイン産生を比較したところ、KOM ϕ では菌体の結合量及びサイトカイン産生量がWTM ϕ より著しく低下した。また、sDec1-Fcと結合性の高い菌体ほどWTM ϕ によるTNF- α 産生量が高い傾向を示した。

以上のことから、*C. albicans*培養条件の違いが、細胞壁 β -グルカンの表出とdectin-1介在性の自然免疫応答に影響を及ぼしうることが示された。なお、本研究は『生研センターイノ

バージョン創出事業』として行われているものである。

(会員外共同研究者：東京大学医科学研究所，岩倉洋一郎，西城忍)

ポスター番号：P2-012

融合PCRイムノクロマトグラフィーによる迅速細菌検査

金 恵珍¹，友安 俊文¹，田端 厚之¹，菅井 基行²，赤松 優³，長宗 秀明¹（徳島大院・STS・ライフシステム¹，広島大院・医歯薬総合・細菌²，大塚製薬・診断³）

【序論】感染症の診断や食品の汚染検査には，迅速，簡便，安価でかつ十分な感度と精度を持つ検査法が求められる。このような要求から，対象微生物の特徴的遺伝子を検出する手法が多用されるようになった。しかし多くの手法では特定の単一遺伝子を検査するため，複数の形質を備えた特殊な微生物の検出には多項目の並列検査が必要となる。そこで，複数の特性を持つ菌株の簡便検査法として，一度のPCRで複数の遺伝子を増幅融合させ，それをイムノクロマト紙（IC）により迅速に検出する手法を検討した。

【結果と考察】先ず5'末端に各々異なる標識をしたPCRプライマーを用い単一遺伝子を増幅してICで検出する際の特異性と感度を確認するため，サルモネラ菌（Sm）の*invA*遺伝子，*S. intermedius*（Si）の*ily*遺伝子を指標とした菌種同定実験を行ったところ，Smの供試した全血清型株やSi株を特異的に高感度で検出できることを確認した。次にメチシリン耐性及び感受性黄色ブドウ球菌（MRSA及びMSSA）の全58株を対象とし，黄色ブドウ球菌の指標（フェレドキシン依存性Glu合成酵素遺伝子）及びメチシリン耐性の指標（*mecA*）を特異的に増幅する各プライマー対の一方を，両遺伝子融合化PCRプライマー対とし，合計4本のプライマーを用いた一度のPCRで検討を行った結果，MRSA株を特異的に検出できた。また感度はSmやSiの検出時と同等に高感度であり，融合PCRイムノクロマトグラフィーが複雑な形質の微生物の簡便検査法として有用なことが確認された。

非会員協力者：澤田千恵子，下野生世（徳島県保健環境C）

ポスター番号：P2-077

*Mycobacterium intracellulare*のVariable Numbers of Tandem Repeats型別解析法の開発
市川 和哉^{1,2}，八木 哲也³，稲垣 孝行^{1,2}，打矢 恵一¹，二改 俊章¹（名城大学・薬・微生物¹，NHO東名古屋病院・臨床研究部²，名古屋大学医学部付属病院・中央感染制御部³）

【目的】*Mycobacterium intracellulare*は，近年増加する肺*Mycobacterium avium* complex（MAC）症の原因菌の一つである。しかし同じMAC症の原因菌である*M. avium*とは異なり，分子疫学解析のための簡便で有用なツールが開発されていなかった。そこで*M. intracellulare*を遺伝学的に解析する簡便なツールとしてVariable Numbers of Tandem Repeats（VNTR）型別解析法の開発を行い，この方法の有用性の検討を行った。

【対象・方法】*M. intracellulare* ATCC13950ゲノムデータよりTandem Repeat Finderを用いVNTR領域を検索し，それぞれのVNTR領域のFlanking RegionにPCRプライマーを設

計した。この設計したプライマーセットを用いてVNTRの有用性を基準株*M. intracellulare* ATCC13950 1株及び、肺MAC症患者由来臨床分離*M. intracellulare* 74株で検討を行った。

【結果と考察】in silico 解析において*M. intracellulare* ATCC13950ゲノムデータより25のVNTR領域が見つかった。そのうちの16領域が臨床検体でin silico解析と相同性を示し、それぞれの領域のAllelic Diversityは0.066～0.69であり、VNTR型別解析法の多様性指数(HGDI)は0.988であった。現在、臨床検体を増やし検討中である*M. intracellulare*のVNTR型別解析法の分子疫学ツールとして有用性を報告する予定である。

会員外共同研究者（NHO東名古屋病院・呼吸器科;小川賢二，中川 拓，名城大・薬・微生物；森山 誠）

ポスター番号：P2-090

ブドウ球菌エンテロトキシンAの腸管内動態

小野 久弥^{1,2}，重茂 克彦^{1,2}，胡 東良³，中根 明夫³，品川 邦汎^{1,2}（岩手大・農・獣医¹，岐阜大・院・連合獣医学²，弘前大・院医・感染生体防御³）

黄色ブドウ球菌の産生するブドウ球菌エンテロトキシンA（SEA）は嘔吐活性とスーパー抗原活性を併せ持ち、食中毒および毒素ショック症候群を引き起こす。近年のジャコウネズミ(*Suncus murinus*)を用いた研究により、SEAは腸管でのセロトニン(5-HT)放出を誘導し、迷走神経の5-HT₃レセプターを介して上行性に刺激が嘔吐中枢に伝達されることにより嘔吐を誘発することが示唆されている。しかしながら、SEAの腸管内での動態やセロトニン放出を誘導するメカニズムは全く解明されておらず、SEAによる嘔吐発症機序は未だ不明な点が多い。今回、我々はジャコウネズミ嘔吐モデルを用い、*in vivo*におけるSEAの腸管内動態を検討した。ジャコウネズミにSEA (100 µg/animal)を胃内投与し、投与後15分、30分、60分および90分に腸管を摘出・固定し、形態学的解析に供した。抗SEA抗体を用いた免疫染色により腸管におけるSEAの挙動を観察したところ、投与後15分でSEAの腸管上皮細胞への結合が認められ、投与後30分、60分および90分では粘膜下組織に存在する細胞へのSEAの集積が認められた。さらに投与後60分および90分では固有層においても抗SEA抗体によって強く染色される細胞が認められた。これらの結果より、*in vivo*において腸管内腔に到達したSEAは腸管上皮バリアを通過した後、絨毛内部を経て標的細胞へと集積することが示唆された。現在、粘膜下組織および固有層に存在するSEAが特異的に結合する細胞の同定を進めている。

会員外協力研究者：山本欣郎（岩手大・農・獣医）

ポスター番号：P2-131

Streptococcus pneumoniae enolaseは好中球の細胞死を誘導する

森 有可¹，寺尾 豊¹，山口 雅也¹，浜田 茂幸²，川端 重忠¹（阪大院・歯・口腔細菌¹，日大院・総合科学²）

【目的】 *Streptococcus pneumoniae*を起因菌とする肺炎では、肺胞に好中球が顕著に浸潤するにも関わらず、*S. pneumoniae*の間質組織への移行が認められる。そこで、*S. pneumoniae*が好中球の貪食を回避する機構を有するとの仮説を立て、好中球に作用する同菌由来の分子を検索し、その機能解析を行った。

【方法】好中球様に分化させたTHP-1細胞の表層画分に結合する*S. pneumoniae*由来の分子を、リガンドブロット法ならびに質量分析装置を用いて同定した。当該分子の同菌における局在は、ウェスタンブロット法を用いて調べた。次に、同定した菌由来分子がヒト好中球に及ぼす影響を検索するために、走査型電子顕微鏡による細胞形態の観察を行い、さらに細胞外へ漏出したLDHとDNAをそれぞれ定量した。

【結果】リガンドブロット法および質量解析から、好中球様THP-1細胞と結合する*S. pneumoniae*の分子はenolaseであると同定された。抗enolase 抗血清を用いたウェスタンブロット分析では、enolaseが菌体表層画分と培養上清から検出された。enolaseによって刺激した好中球では、細胞外へのLDHとDNAの遊離、および網状構造物の漏出を伴う細胞構造の破壊が認められた。さらにプルダウン実験から、enolaseに対するTHP-1細胞の受容体として、機能未知のタンパク質myoblast antigen 24.1D5が同定された。ヒト好中球を抗myoblast antigen 24.1D5抗血清で処理した後にenolase刺激したところ、上清中へ漏出する細胞由来のDNA量は有意に減少した。

【考察】*S. pneumoniae*はenolaseと好中球表層のmyoblast antigen 24.1D5を介して結合し、好中球に細胞傷害を誘導する可能性が示唆された。

ポスター番号 : P2-141

*Helicobacter pylori*の走化性トランスデューサー三重変異株作成法の確立

米田 佳那子, 渡部 菜保, 青木 園佳, 溝手 朝子 (山口県立大学・生活・微生物)

【目的】*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の持続感染には走化性機構が大きく関与している。*H. pylori*において、環境因子を感知しシグナルを伝達する走化性トランスデューサー様タンパク質は相同性検索によりTlpA, TlpB, TlpC, TlpDの4つが推定されているが、詳細な機能については未解明である。これまでに一重、二重変異株を作成し機能解析を行ってきたが、複数のトランスデューサーが協働している可能性が示唆され、各々のトランスデューサー機能の確定には至っていない。そこで本研究では、唯一野生型の遺伝子を有する変異株分離を目的として三重変異株作成法の確立に着手した。

【方法】(1) 使用菌株: *H. pylori* ATCC43504, (2) プラスミド: pCJ511 (*tlpC*::Km, *sacB*), pCJ512 (*tlpC*::del500 bp), pHPS807 (*tlpA*::Cm), pSUS275 (*tlpD*::Km), (3) 培養条件: Blucella培地に3% HSerum, 既定の抗生物質を添加し, N₂ 85%, CO₂ 10%, O₂ 5%, 37°Cで培養した。non-marker欠失変異株作成時には5% Sucrose含有Heart Infusion培地を用いた。(4) PCR primer: (*tlpC*検出用) TAAAGATCTTCAGCTACAAGGTTGAAAGC(F), AATAGATCTGACTTGTAAGAATGATTTGC (R)

【結論】 ATCC43504にpCJ511に続いて*tlpC*のORF内を約500 bp欠損させたpCJ512 を形質転換して*tlpC*にnon-marker遺伝子破壊株を作成した。*tlpA*及び*tlpD*は、それぞれKM及びCM耐性遺伝子を挿入して破壊し、三重変異株を作成した。これにより*tlpB*のみを野生型として持つ三重変異株の作成に成功した。現在、この手法を用いて*tlpA*, *tlpC*, *tlpD*を唯一の野生型遺伝子として保有する変異株を作成中。これにより、各走化性トランスデューサー固有の機能解析が可能になる。

ポスター番号 : P2-169

アジサイの花器官におけるファイトプラズマの局在解析

星 朱香, 川西 剛史, 石井 佳子, 柿澤 茂行, 大島 研郎, 難波 成任 (東京大学・農・植物病理学)

【目的】 ファイトプラズマは、700種以上の植物に感染し、農業生産上甚大な被害をもたらす植物病原細菌である。アジサイ葉化病ファイトプラズマ(Japanese Hydrangea phyllody phytoplasma ; JHP)は、アジサイに感染し、その花器官に緑化、葉化、突き抜け等の形態異常を引き起こす。本研究ではファイトプラズマの分布と病徴との関連性について明らかにするため、花器官におけるファイトプラズマの局在を免疫組織化学的手法を用いて解析した。

【方法】 植物宿主内におけるファイトプラズマの分布を解析するために、JHPの主要抗原膜タンパク質(Antigenic membrane protein : Amp)に対する抗体を作出し、葉化したアジサイの花器官について免疫組織化学的解析を行った。

【結果】 JHP感染アジサイ及び健全アジサイの花器官より作製した切片について免疫組織化学的解析を行ったところ、JHP感染植物ではシグナルが認められたが、健全植物からは認められなかった。切片を詳細に顕微鏡観察したところ、JHP感染アジサイでは、心皮の基部に子房に替わって新しい維管束が形成されており、その維管束の篩部組織からJHP-Amp特異的なシグナルが検出された。加えて、葉化した萼片の葉脈や、葉化した柱頭に形成された篩部組織からもシグナルが認められた。一方、篩部組織以外の組織からはシグナルは認められなかった

【結論】 本研究より篩部組織でのみJHP の局在が認められたことから、JHPは花器官の分化を司る茎頂分裂組織に侵入して直接的に分化を制御するのではなく、篩部組織において間接的に花器官から葉への転換を誘導する可能性が示唆された。

ポスター番号 : P2-194

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* ハーピンの病原性における役割

常見 和彦, 田口 富美子, 一瀬 勇規 (岡山大・自然科学・遺伝子工学)

【背景・目的】 植物病原細菌*Pseudomonas syringae*の*hrp*遺伝子クラスターはタイプIII分泌機構(T3SS)を構成するタンパク質やその調節因子などをコードし、防御応答を抑制する

エフェクタータンパク質はT3SSを介して分泌される。*Hrp*遺伝子の一つ*hrpZ*はT3SSを介して細胞外に分泌されるタンパク質エリクターハーピンをコードする。ハーピンは、タバコなどの植物に過敏感反応を誘導する。他の全ての*P. syringae*と異なり、*P. syringae* pv. *tabaci* (*Pta*)の*hrpZ*はOpen Reading Frame内における内部欠損とフレームシフトにより機能しないことを見出した。そこで本研究では、*Pta*ハーピンの病原性における役割を解析した。

【方法】*P. syringae* pv. *ptsi*の*hrpZ*をクローニングし*Pta*に導入した。ハーピンの生産・分泌はウエスタンブロットにより解析した。宿主タバコに接種した後、病原性は病徴の発現と菌数の増殖で解析し、抵抗性の誘導はカロースの沈着や防御応答遺伝子の発現により解析した。

【結果・考察】野生株では、ハーピンは発現しないが、*hrpZ*導入株ではハーピンの合成・分泌が確認された。*hrpZ*導入株をタバコに接種しても病徴は現れず、病原性の著しい低下が観察された。また、*hrpZ*導入株をタバコに接種するとカロースの沈着が観察され、防御応答遺伝子の発現が誘導されたが、野生株の接種ではこれらの応答は顕著ではなかった。以上の結果から、*Pta*はタバコがハーピンを認識し、過敏感反応を誘導するため、それを回避する為に*hrpZ*遺伝子を欠損させることで抵抗性を回避し、病原性を維持したと推察した。

ポスター番号：P2-233

SPI1によるマクロファージアポトーシスと炎症性サイトカイン産生制御

小林 里美, 高屋 明子, 都竹 奈巳, 原 貴史, 山本 友子 (千葉大院・薬・微生物薬品化学)

サルモネラは*Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1)によりマクロファージカスパーゼ-1を活性化しIL-1 β 分泌とピロトーシスを誘導する。一方我々はLon欠損株がSPI1を過剰に発現しカスパーゼ-3活性化とアポトーシスを誘導することを見出した。今回はLon欠損株によるカスパーゼ-3活性化経路を検討した。カスパーゼ-3活性化を導くカスパーゼ-8とカスパーゼ-9の活性を測定したところ、Lon欠損株感染により両活性はSPI1依存的に増加した。又、カスパーゼ-8とカスパーゼ-9の阻害剤で処理した細胞ではカスパーゼ-3活性は誘導されなかった。更に、カスパーゼ-8阻害剤処理時にはカスパーゼ-9活性も増加しなかったことから、Lon欠損株はSPI1依存的にカスパーゼ-8を活性化しカスパーゼ-9を介してカスパーゼ-3を活性化することが明らかとなった。SPI1にはカスパーゼ-8活性化作用があると示唆されたため、野生株感染時のカスパーゼ-8活性を測定した。するとSPI1依存的な活性が見られたがそのレベルはLon欠損株感染時より低くカスパーゼ-3を活性化しなかった。又、カスパーゼ-8活性化にはマクロファージ内での新規タンパク質合成が必要だった。以上よりサルモネラはマクロファージ内でSPI1合成量を適切に制御しカスパーゼ-8活性レベルを調節すると示唆された。更に、野生株によるカスパーゼ-8活性化の意義を検討した。カスパーゼ-8阻害剤を処理すると野生株時のIL-1 β mRNA量、分泌量が低下したことからカスパーゼ-8活性化はIL-1 β 遺伝子発現を誘導すると考えられる。