

18th November 2023



第 76 回日本細菌学会 関西支部総会予稿集

第76回日本細菌学会関西支部総会開催のご案内

今年になり、多くの国内や国際学会において対面形式での会議が再開され、改めて対面での研究討議の重要性を感じている方も多いのではないかと思います。昨年引き続き、今年に関西支部総会は、対面での開催を予定しております。ショート発表（学生の方々を中心）とロング発表の二つの形式を考えております。学生さん、若手研究者も含め多くの先生方の間で活発な研究交流が行われることを願っております。また、情報交換会も久しぶりに開催する予定です。

皆様の積極的なご参加をお待ちしております。

第 76 回日本細菌学会関西支部総会

総会長 西野邦彦

事務局：大阪大学産業科学研究所 生体分子制御科学研究分野内

第 76 回日本細菌学会関西支部総会 事務局 山崎、田口、西、西野（林）、鳥取

第76回日本細菌学会関西支部会

総会・学術講演会

2023年11月18日（土）

大阪大学吹田キャンパス

銀杏会館（3F 阪急電鉄・三和銀行ホール）

開催要項

2023年11月18日（土）

総会長：西野 邦彦（大阪大学産業科学研究所）

会場：銀杏会館（大阪大学医学部学友会館・医療情報センター）

<http://www.office.med.osaka-u.ac.jp/icho/index.html>

参加費：一般2000円、学生（学部生・大学院生）無料、

当日一般3000円

抄録はpdfの配布のみにいたします。

対面方式で行います。

情報交換会（懇親会）18:00～

会場：レストランミネルバ（銀杏会館2階）

参加費：6000円

アクセス

大阪大学 銀杏会館

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

銀杏会館は大阪大学吹田キャンパス内、医学系研究科医学科の北側に位置します。



大阪モノレール彩都線「阪大病院前」駅から：徒歩5分程度。

JR京都線「茨木」駅・阪急京都本線「茨木市」駅から：近鉄バス「阪大病院・阪大本部前」行きに乗車。「阪大医学部病院前」下車、徒歩5分程度。

北大阪急行電鉄・大阪モノレール本線「千里中央」駅から：阪急バス「阪大本部前」または「茨木美穂ヶ丘」行きに乗車。「阪大医学部病院前」下車、徒歩5分程度。

阪急千里線「北千里」駅から：徒歩25～30分程度（平日昼間のみ阪急バス「阪大医学部病院前」行きが1時間に1本程度運行。）

スケジュール

スケジュール	演題番号	開始	終了
開会の辞		8:50	8:55
一般演題1	1-S	8:55	9:05
	2-S	9:05	9:15
	3-S	9:15	9:25
	4-S	9:25	9:35
	5-L	9:35	9:50
休憩			
一般演題2	6-S	10:00	10:10
	7-S	10:10	10:20
	8-L	10:20	10:35
	9-L	10:35	10:50
休憩			
一般演題3	10-S	11:00	11:10
	11-S	11:10	11:20
	12-S	11:20	11:30
	13-L	11:30	11:45
	14-L	11:45	12:00
支部幹事会		12:05	12:55
支部総会		13:00	13:30
一般演題4	15-S	13:30	13:40
	16-S	13:40	13:50
	17-S	13:50	14:00
	18-L	14:00	14:15
	19-L	14:15	14:30
休憩			
一般演題5	20-S	14:40	14:50
	21-S	14:50	15:00
	22-S	15:00	15:10
	23-L	15:10	15:25
	24-L	15:25	15:40
休憩			
一般演題6	25-S	15:50	16:00
	26-S	16:00	16:10
	27-L	16:10	16:25
	28-L	16:25	16:40
休憩			
特別講演		16:50	17:50
閉会の辞		17:50	17:55

発表者・参加者へのご案内

一般演者の方へ

- 全ての一般演題について口頭での発表とします。口頭発表時間は、ショートトーク(S: 8分間)、ロングトーク(L: 13分間)で、それぞれ2分間の質疑応答の時間を設けております。
- 発表にあたり、ご自身のパソコンをご準備下さい。次演者の方は、前の方の発表が始まったときに、次演者席で移動をお願いします。
- PCの接続については、VGA端子、HDMI端子双方の利用が可能です。コネクターは用意しておりませんので、各自でご準備ください。

座長の方へ

質疑応答の時間は、2分間を目安に設定しております。スケジュールがタイトなため、質疑の多い場合は個別に休憩時間をお願いする、質疑の少ないときに無理に引き延ばさないなどし、進行にご協力いただきますようお願いいたします。

参加者の方へ

当日の録音、録画、撮影はご遠慮くださいますようお願いいたします。来訪者向けの無線LAN環境も整備されており、eduroam、もしくはodins-visitor-1xをご利用することが可能です。odins-visitor-1xの利用に必要なビジターIDは受付で配布しております（記名要）。

ランチが可能な店がございますので、御昼食にご利用ください（当日簡単なマップを受付に準備いたします）。

幹事会について

幹事会につきましては、12:05より銀杏会館 3F 会議室 C にて開催予定です。幹事会に出席の方は昼食費を別途ご持参いただきますようお願いいたします。

評議員会・総会について

13:00より銀杏会館 3F 阪急電鉄・三和銀行ホールにて開催いたします。

第76回日本細菌学会関西支部総会プログラム

一般演題1 (演題番号1~5)

座長：八尋 錦之助 (京都薬科大学)

1-S 腸管出血性大腸菌の*swpAB* toxin-antitoxinシステムは酸化ストレスに応答して活性化する

彦田明日花、海老原慎也、岡本成史、戸邊亨

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 生体病態情報科学講座

2-S 腸管出血性大腸菌のOmpTによる外膜小胞産生調節機構

高橋茉莉子、岡本成史、戸邊亨

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 生体病態情報科学講座

3-S Role of Spiroplasma fibril protein suggested with synthetic bacterium, syn3

Ali Ahsan, Hana Kiyama, Yuya Sasajima, Makoto Miyata

Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University

4-S Morphological change of JCVI-syn3B cell caused by *Mycoplasma pneumoniae*-gliding type cytoadherence regulatory locus

Muhammad Algiffari¹, Hana Kiyama¹, Daisuke Nakane², Tsuyoshi Kenri³, Makoto Miyata^{1,4}

¹Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ.

²Grad. Sch. of Informatics and Engineering, Electro-Communications Univ.

³Dept. Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Japan

⁴OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.

5-L Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on *Fusobacterium periodonticum*

Chao Wang¹, Takayuki Nambu², Hiroki Takigawa², Hugo Maruyama², Chiho Mashimo², Toshinori Okinaga²

¹Graduate School of Dentistry (Bacteriology) Osaka Dental University, Japan.

²Department of Bacteriology, Osaka Dental University, Japan.

一般演題2 (演題番号6~9)

座長：山崎 伸二 (大阪公立大学)

- 6-S パルミトレイン酸による黄色ブドウ球菌臨床株の発育抑制と耐性について
門田華¹、中畑友里¹、小野祥子²、高田由紀子¹、呉紅¹、坂口翔一¹、
森脇真一²、中野隆史¹
¹大医薬大 医 微生物学・感染制御学
²大医薬大 医 皮膚科学
- 7-S *Helicobacter pylori* VacA の菌体内ナノ輸送システムにおける輸送ルートと
MreB 線維の関係について
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 生命理工学院 生命理工学系
- 8-L A positive regulatory loop of a virulence regulator expression linked by read-through
transcription ensures pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*
Dhira Saraswati Anggramukti¹, Eiji Ishii^{1,2}, Andre Pratama¹, Mohamad Al kadi³,
Tetsuya Iida^{1,2}, Toshio Kodama⁴, Shigeaki Matsuda^{1,2}
¹Department of Bacterial Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka
University
²Osaka University Center for Infectious Disease Education and Research
³Human Immunology, Immunology Frontier Center, Osaka University
⁴Department of Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
- 9-L RyDEN によるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) mRNA フレームシフト 阻
害の分子機構の解析
鈴木陽一¹、森慶真¹、川島生¹、郭義生¹、村川武志²、江見晶野¹、坂口翔一¹、
呉紅¹、中野隆史¹
¹大阪医科薬科大学医学部 微生物学・感染制御学教室
²大阪医科薬科大学医学部生化学教室

一般演題3 (演題番号10~14)

座長：神谷 重樹 (大阪公立大学)

- 10-S 大阪府下の河川水における *Escherichia albertii* の汚染状況の調査
田上綾¹、日根野谷淳¹⁻⁵、徐炳婷²、畑中律敏¹⁻⁵、Sharda P. Awasthi³⁻⁵、
山崎伸二¹⁻⁵
¹大阪府大・生命環境・獣医
²大阪府大院・生命環境
³大阪公大院・獣医
⁴大阪公大・アジア健康科学研究所
⁵大阪公大・大阪国際感染症研究センター
- 11-S 腸内優占 *Bacteroides* 属細菌由来 BT3106 スルファターゼ
南秀磨、老木紗予子、渡辺大輔、高瀬隆一、小倉康平、橋本涉
京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻
- 12-S 合成細菌における 2つの MreB タンパク質による *Haloplasma* 運動能の
再構築
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、
André Antunes⁴、宮田知子⁵、牧野文信⁵、難波啓一⁵、宮田真人^{1,6}
¹大阪公大・院理
²理化学研究所・バイオリソース
³産総研・生物プロセス
⁴マカオ科技大
⁵大阪大
⁶大阪公大・複合先端
- 13-L 百日咳菌の BvgAS システムを不活性化する化合物、ロニダミン
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
- 14-L パラ百日咳菌の産生する新規咳誘発毒素 DAT の同定と機能解析
平松征洋¹、西田隆司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

一般演題4 (演題番号15~19)

座長：岡本 成史 (大阪大学)

- 15-S 急速凍結法によるグラム陰性菌のペプチドグリカン構造の可視化
田原悠平、宮田真人
大阪公大・院理
- 16-S *Mycoplasma mobile* 細胞内滑走装置の構造
福島秀実¹、豊永拓真^{1,2}、田原悠平¹、中根大介³、宮田真人^{1,2}
¹大阪公大・院理
²大阪公大・複合先端
³電通大・院情報理工
- 17-S 腸内細菌叢が潰瘍性大腸炎モデルマウスの疾患重症度に与える影響の検討
池田恵莉¹、山口雅也^{1, 2, 3, 4}、川端重忠^{1,4}
¹大阪大学 大学院歯学研究科 微生物講座
²大阪大学 大学院歯学研究科 バイオインフォマティクス研究ユニット
³大阪大学 微生物病研究所附属バイオインフォマティクスセンター
⁴大阪大学 感染症総合教育研究拠点
- 18-L Synchronization of the germination-to-outgrowth process in *Bacillus subtilis* spores under nutrient-limited conditions
Masami Miyake¹, Rana Okawaki¹, Mayo Yasugi¹, and Satoshi Sekimoto²
¹Osaka Metropolitan University
²Mitsubishi Chemical Co.
- 19-L リボソーム関連遺伝子が欠損した大腸菌は 亜鉛排出トランスポーターZntAの増加により亜鉛耐性を示す
白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子生物学分野

一般演題5 (演題番号20~24)

座長：三宅 眞実 (大阪公立大学)

- 20-S JCVI-syn3Bを用いたらせん反転をもたらす MreB4とMreB5の繊維構造解析
Haruka Yuasa¹, Yuya Sasajima¹, Hana Kiyama¹, Daichi Takahashi¹, Takuma Toyonaga^{1,2}, Tomoko Miyata³, Fumiaki Makino³, Keiichi Namba³, Makoto Miyata^{1,2}
¹Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University
²The OMU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka Metropolitan University
³Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University
- 21-S アルボウイルス生存戦略におけるベクターの役割
刀祢睦月、鈴木夏織、中川歩美、松尾栄子
神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座
- 22-S リアソートメントウイルスを用いた流行性出血病ウイルス中和抗体検出法の改良
中川歩美、松田梢、刀祢睦月、松尾栄子
神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座
- 23-L ミニマル細菌に再現するらせん細菌遊泳運動
木山花¹、柿澤茂行²、高橋大地¹、宮田真人^{1,3}
¹ 大阪公大・院理
² 産総研・生物プロセス
³ 大阪公大・複合先端
- 24-L オートトランスポーターBafA を介したバルトネラ属細菌の血管新生促進機構
塚本健太郎
大阪大学 微生物病研究所人獣共通細菌感染症研究グループ

一般演題6 (演題番号25~28)

座長：垣内 力 (岡山大学)

25-S 尿路病原性大腸菌におけるシャペロン・アッシャー型線毛の網羅的探索
井上陽晴¹、和田崇之^{2,3}

¹大阪市立大学 生活科学部

²大阪公立大学大学院 生活科学研究科

³大阪国際感染症研究センター

26-S Behavior of MreB proteins causing helical motility in a synthetic bacterium

Yoshiki Tanaka¹, Hana Kiyama¹, Makoto Miyata¹

¹Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University

²The OMU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka Metropolitan University

27-L 類鼻疽菌の細胞内寄生性に関与する Bsv locus の機能解析

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

28-L トリテルペノイドによる多剤耐性黄色ブドウ球菌の薬剤感受性の増強作用
蔦本さくら¹、岡真優子¹、篠原明莉¹、Dendi Krisna Nugraha²、中川一路³、
堀口安彦²

¹京都府立大学大学院・生命環境・食環境安全性学,

²大阪大学微生物病研究所・分子細菌学

³京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学

特別講演

AIナノポアを用いた細菌・ウイルス検査

谷口正輝

大阪大学産業科学研究所

特別講演

AI ナノポアを用いた細菌・ウイルス検査

谷口 正輝

大阪大学産業科学研究所

E-mail: taniguti@sanken.osaka-u.ac.jp

ナノポアは、シリコン基板の上の直径数 μm 以下の貫通孔である。シリコン基板の上下に設置された電極間に電圧を加えると、ナノポアを通して、イオン電流が流れる。ナノポアにウイルスや細菌が入ると、ウイルスや細菌に固有のイオン電流波形が観察される。イオン電流波形は、ナノポアを通過する物質の体積・構造・表面電荷の情報を持つ。イオン電流波形を AI で学習することで、1 個単位で、ウイルスや細菌を識別するのが、AI ナノポアである(図 1a)。AI ナノポアを用いると、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、細菌などの種類が、高精度に識別される^{1,2}。AI ナノポアは、ウイルスや細菌そのものを計測するため、複雑な前処理を必要とせず、迅速検査を可能にする。また、計測システムのハードウェアを変更することなく、ターゲットの計測データを AI で学習するだけで、新たな検査法を開発できる特徴を持つ。

ナノポアと免疫反応を組合わせたのが、免疫ナノポアである(図 1b)。ウイルスや細菌の抗原を抽出し、抗体修飾したナノ粒子と混合すると、ナノ粒子の凝集体が形成される。全ての免疫反応に応用可能であるため、AdaPore(AdaptivePore)と呼ばれる。AdaPore は、1 個単位で凝集体を検出できるため、ELISA の約 1000 倍の感度を持つ。

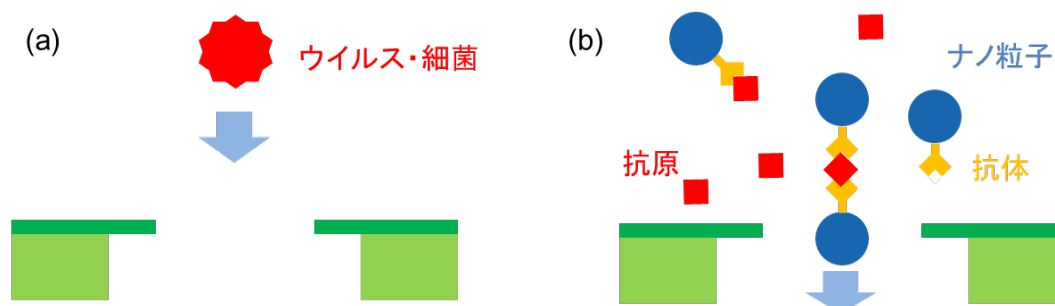


図. a, AIナノポアと、b, 免疫ナノポア(AdaPore)の概念図

References

- (1) Taniguchi, M.; et al. Combining Machine Learning and Nanopore Construction Creates an Artificial Intelligence Nanopore for Coronavirus Detection. *Nat. Commun.* **2021**, 12, 3726.
- (2) Murakami, K.; et al. High-Precision Rapid Testing of Omicron SARS-CoV-2 Variants in Clinical Samples Using AI-Nanopore. *Lab on a chip*. in press.

一般演題

腸管出血性大腸菌の *swpAB* toxin-antitoxin システム

は酸化ストレスに应答して活性化する

彦田 明日花、海老原 慎也、岡本 成史、戸邊 亨

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 生体病態情報科学講座

E-mail: u791274h@ecs.osaka-u.ac.jp

Toxin-antitoxin (TA) システムは、菌自身の増殖を抑制する Toxin とその活性を抑える Antitoxin で構成されるシステムで、菌には複数のシステムが存在し、ほとんどの菌に広く保存されている。Toxin の活性は Antitoxin により抑制されているが、Antitoxin が失活すると Toxin が活性化する。我々は、腸管出血性大腸菌 EHEC 0157 Sakai 株において、新規に *swpAB* TA システムを見出し、SwpA の活性化は菌の増殖や病原性遺伝子の発現を抑制することを明らかにしてきた。しかし、この遺伝子が発現誘導されるストレス条件は未解明であった。そこで、我々は SwpB が失活し SwpA が活性化する環境条件について調べることにした。SwpB Antitoxin は *swpAB* オペロンプロモーター (P_{swpA}) を負に制御する抑制因子であることから、 P_{swpA} 活性を測定することで、SwpB の失活を検出した。EHEC に酸化ストレス、酸性ストレス、浸透圧ストレスを与えて *swpA* プロモーター活性を測定したところ、酸化ストレスでのみプロモーター活性が上昇した。また、細菌内で酸化ストレスを引き起こすことが知られている抗生剤 norfloxacin (Nor) への暴露によってもプロモーター活性が顕著に増加し、活性酸素 ROS の産生を抑える薬剤の添加によりプロモーター活性の上昇がみられなくなった。続いて、SwpB Antitoxin の存在量をウェスタンブロットで確認したところ、未添加では増殖とともに増加したが、Nor 添加では増加していなかった。またタンパク質の新規合成を阻害する抗生剤 chloramphenicol (Cm) を同時に添加し、SwpB の分解を検討したところ、Nor 添加による SwpB 量の減少は認められなかった。続いて、SwpA Toxin の活性化により発現量低下が報告されている病原性遺伝子 EspB の産生量を確認したところ、Nor の添加により産生量が低下した。以上のことより、酸化ストレスは、SwpB の新規合成を阻害し、SwpA が相対的に過剰となることで、SwpA を活性化することが示唆された。最後に、酸化ストレス耐性における *swpAB* システムの役割を検討した。野性株では、Nor の添加により酸化ストレス耐性が上昇した。しかし *swpAB* 欠失変異株でも同様の上昇が認められた。一方、*swpB* 遺伝子の発現を特異的に抑制する CRISPRi システムを導入した菌株では、酸化ストレス耐性が上昇した。これらの結果は、*swpAB* は酸化ストレス耐性に貢献しているが、EHEC が持つ酸化ストレス耐性システムの一部にすぎないことを示唆している。

腸管出血性大腸菌の OmpT による外膜小胞産生調節機構

高橋茉莉、岡本成史、戸邊亨

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 生態病態情報科学講座

E-mail: u059011e@ecs.osaka-u.ac.jp

外膜小胞 OMVs は、腸管出血性大腸菌 EHEC を含むほとんどのグラム陰性菌が菌体表面から分泌している小胞である。OMVs は外膜タンパク質、ペリプラズム成分、外膜成分である LPS などの脂質で構成されており、病原因子の輸送、遺伝情報の伝達などに関与していると考えられている。また、OmpT タンパク質は、大腸菌が保有する外膜タンパク質で OMVs の外膜に提示されている。我々は、EHEC の OMVs 産生における OmpT タンパク質および外膜成分の一つであるカルジオリピン（以下 CL と略す）の関与について検討した。まず、*ompT* 遺伝子の発現を段階的に上昇させた時の OmpT タンパク質と OMVs 産生量の変化について観察したところ、菌体中の OmpT タンパク質はある段階で増加が止まったのに対して、OMVs 量は増加し続けた。すなわち、菌体中の OmpT タンパク質の増加には限界があるが、OMVs 量は *ompT* 遺伝子の増加に伴い増加し続けると考えられる。続いて、CL が OMVs 産生に与える影響について検討した。CL は、外膜の内側に存在するリン脂質成分の一種であり、膜中に偏在してマイクロドメインを形成し、膜の湾曲やタンパク質との相互作用に関与していることが知られている。外膜への CL 輸送機能欠損株 *pbgA* Δ C 変異株を用いて野生株と比較すると、*pbgA* Δ C 株で OMVs 産生が減少した。また、変異株に野生型 *pbgA* 遺伝子を持つプラスミドを導入すると OMVs 産生量が回復した。OMVs 産生における OmpT と CL の相互依存性については調べるために、*pbgA* Δ C 株における *ompT* 遺伝子欠損変異および *ompT* 遺伝子発現上昇の効果を観察した。その結果、*pbgA* 野生型と比較して *pbgA* Δ C 変異を持つ株では、OmpT に依存した OMVs 産生量増加がほとんど認められなかった。また、*ompT* 遺伝子発現上昇による OMVs の産生増加は、*pbgA* Δ C 株では野生株と比較してほとんど認められなかった。一方、*pbgA* Δ C 変異は OmpT タンパク質の産生量に影響を与えていなかった。以上の結果は、OmpT による OMVs 産生増加には外膜の CL が重要であることを示唆している。

Role of Spiroplasma fibril protein suggested with synthetic bacterium, syn3

Ali Ahsan¹, Hana Kiyama¹, Yuya Sasajima¹, Makoto Miyata¹

1. Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan.

Email: aliahsan514@gmail.com

Spiroplasma swims by switching the handedness of the internal ribbon structure composed of fibril, and five MreB proteins belonging to the actin superfamily. Previously, our group succeeded in reconstructing the helical cell morphology and the swimming in a synthetic minimal bacterium, JCVI-syn3B, by expressing only MreB4 and MreB5 proteins¹. In the present study, we focused on the role of fibril protein composed of 512 amino acids. Additional expression of fibril protein in the reconstituted system using the native promoter changed the helix width from 1.0 to 0.40 μm , which is closer to 0.23 μm , that of the original *Spiroplasma* cell. The syn3 cells swimming by MreBs4 and 5 showed clearer helix outline and slightly faster migration by additional expression of fibril. The syn3 cells expressing fibril showed left handedness configuration, although syn3 cells expressing only MreBs were right handed. These results may suggest that the cell helicity is supported by fibril and switched by MreB proteins. To elucidate the mechanism of the helicity shift, we introduced random mutations in the fibril and analyzed syn3 cells expressing only fibril protein. Five of 23 mutants with single amino acid substitution showed altered cell helicity. K415E and V488I mutations decreased helical pitch from 0.87 μm of the wild type to 0.49 μm and 0.53 μm , respectively. A region including these amino acid is possibly related to the helicity shift.

- (1) Kiyama, H.; Kakizawa, S.; Sasajima, Y.; Tahara, Y. O.; Miyata, M. Reconstitution of a Minimal Motility System Based on Spiroplasma Swimming by Two Bacterial Actins in a Synthetic Minimal Bacterium. *Sci Adv* **2022**, *8*, eabo7490. <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abo7490>.
- (2) Sasajima, Y.; Kato, T.; Miyata, T.; Kawamoto, A.; Namba, K.; Miyata, M. Isolation and Structure of the Fibril Protein, a Major Component of the Internal Ribbon for Spiroplasma Swimming. *Front Microbiol* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1004601>.

Morphological Change of JCVI-syn3B Cell Caused by *Mycoplasma pneumoniae*-gliding Type Cytadherence Regulatory Locus

Muhammad Algiffari¹, Hana Kiyama¹, Daisuke Nakane², Tsuyoshi Kenri³, Makoto Miyata^{1,4}

¹Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ.,

²Grad. Sch. of Informatics and Engineering, Electro-Communications Univ.,

³Dept. Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Japan,

⁴OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.

E-mail: algif.mu@gmail.com

The attachment organelle of *M. pneumoniae*-type gliding is essential for gliding motility. The organelle that consists of a number of proteins including P65, HMW2, P41, P24 are coded in cytodherence regulatory locus (*crl*) on the genome¹. To clarify the function of proteins coded in *crl*, we expressed the *crl* proteins of *M. pneumoniae* and their homologs of *M. genitalium* in a non-motile minimal synthetic bacterial cell, JCVI-syn3B (syn3B)². The *crl* was transcribed by a strong promoter *ldh* (lactate dehydrogenase) derived from syn3B. Replacement of RBS (ribosome binding site) was necessary for translation of *M. genitalium* genes. The syn3B cells that expressed *crl* showed elongated morphology and frequencies elongated cell with an aspect ratio 1.5 times longer than their short axis, were 1%, 34%, and 21% for original syn3B, syn3B with *M. pneumoniae* *crl*, and syn3B with *M. genitalium* *crl*, respectively. The cells also exhibited branching morphology, with frequencies of branching cells were 0%, 4.1%, and 10.5% for original syn3B, syn3B with *M. pneumoniae* *crl*, and syn3B with *M. genitalium* *crl*, respectively. We also visualized localization of the HMW2 of *crl* by fluorescence microscopy. The analyzed of gene deletion mutants suggested that HMW2 is a key protein for morphological change in syn3B.

Keywords: syn3B, *crl*, microscopy, RBS.

References

- (1) Nakane, D.; Kenri, T.; Matsuo, L.; Miyata, M. Systematic Structural Analyses of Attachment Organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. *PLoS Pathog* **2015**, *11* (12), e1005299. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005299>.
- (2) Hutchison, C. A.; Chuang, R. Y.; Noskov, V. N.; Assad-Garcia, N.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Gill, J.; Kannan, K.; Karas, B. J.; Ma, L.; Pelletier, J. F.; Qi, Z. Q.; Richter, R. A.; Strychalski, E. A.; Sun, L.; Suzuki, Y.; Tsvetanova, B.; Wise, K. S.; Smith, H. O.; Glass, J. I.; Merryman, C.; Gibson, D. G.; Venter, J. C. Design and Synthesis of a Minimal Bacterial Genome. *Science* (1979) **2016**, *351* (6280). <https://doi.org/10.1126/science.aad6253>.

Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on *Fusobacterium periodonticum*

Chao Wang¹, Takayuki Nambu², Hiroki Takigawa², Hugo Maruyama², Chiho Mashimo², Toshinori Okinaga²

¹Graduate School of Dentistry (Bacteriology) Osaka Dental University, Japan.

²Department of Bacteriology, Osaka Dental University, Japan.

E-mail: wang-c@cc.osaka-dent.ac.jp

Periodontitis is a chronic infectious disease that causes gingival atrophy and potential tooth loss via alveolar bone resorption. *Fusobacterium periodonticum* is a key species involved in chronic periodontitis. Therefore, controlling the abundance of *F. periodonticum* is vital for the prevention and treatment of periodontal diseases. Photodynamic therapy (PDT) combined with 5-aminolevulinic acid (5-ALA) exerts bactericidal effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Here, we investigated the bactericidal potential of 5-ALA combined with PDT (ALA-PDT) against *F. periodonticum*.

We used *F. periodonticum* JCM12991 and a 410-nm light-emitting diode in this study. First, we evaluated the bactericidal effects of ALA-PDT on *F. periodonticum*. Then, we explored its underlying mechanisms by analyzing the fluorescence, enzymatic activity, and membrane integrity of *F. periodonticum*.

Culture with 0.5% 5-ALA phosphate for 20 h confirmed the significant bactericidal effects of ALA-PDT against *F. periodonticum*. Fluorescence analysis revealed that *F. periodonticum* produced excitable photosensitive substances after the addition of 5-ALA. Furthermore, cell membrane disruption was observed in *F. periodonticum* following ALA-PDT.

Overall, ALA-PDT exerted antibacterial activity against *F. periodonticum* in this study. If further studies confirm these results, this protocol could be an effective strategy for reducing the prevalence of periodontitis.

パルミトレイン酸による黄色ブドウ球菌臨床株の発育抑制と耐性について

門田華¹, 中畑友里¹, 小野祥子², 高田由紀子¹, 呉紅¹,
坂口翔一¹, 森脇真一², 中野隆史¹

1. 大医薬大 医 微生物学・感染制御学, 2. 大医薬大 医 皮膚科学

E-mail: ompu51121069@s. ompu. ac. jp

アトピー性皮膚炎 (AD) はさまざまな要因で増悪するが、そのひとつに黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) の存在が知られている。一方、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, SE) は皮膚のバリア機能をサポートすることがわかっている。これらより、黄色ブドウ球菌のみの増殖を選択的に抑制できれば、AD の症状改善が期待される。パルミトレイン酸 (POA) は不飽和脂肪酸のひとつで、抗炎症作用が報告されている。POA とブドウ球菌標準株を用いた実験では SA を選択的に抑制し、SE の増殖は抑制しないことがわかっている。そこで我々は、POA の患者由来ブドウ球菌分離株に対する効果を検討した。

大阪医科薬科大学病院皮膚科外来患者のうち、軽症 AD と診断された患者および健常者それぞれ 20 名より採材した。最初に腕部および頸部の角質水分量および表皮水分蒸散量を測定し、隣接部位 5 x 5 cm² を滅菌綿棒で擦過し、採材した。滅菌綿棒をハートインフュージョン寒天培地で皮膚常在菌を一次培養後、マンニット食塩培地でブドウ球菌を二次培養した。ランダムに選んだコロニーについて PCR を行い、SA および SE の臨床分離株とした。さらに、それぞれの株について、POA に対する MIC 測定を行なった。

角質水分量と表皮水分蒸散量それぞれの平均値は患者で 27.5 U±9.1 と 26.9 g/h/m²±12.5、健常者で 38.7 U±14.5 と 28.3 g/h/m²±11.1 であった。マンニット陽性のコロニーは患者 19 名、健常者 11 名から得られた。SA と SE の POA に対する MIC を測定した結果、SA 株は POA 8~16 µg/ml で発育が抑制される一方、すべての SE 株は発育抑制されなかった (> 64 µg/ml)。一部、POA に耐性 (> 64 µg/ml) を示す SA 株がみられた。

以上の結果より、軽症 AD 患者では角質水分量が少なく、臨床症状と一致していたが、表皮水分蒸散量には差がみられなかったことから、表皮水分蒸散以外の原因で角質水分量が減少していると考えられた。皮膚スワブの培養では軽症 AD 患者の多くと健常者の一部から SA が分離培養されたが、SA が臨床症状にどのように影響したのかについてはさらなる検討が必要である。POA に対する MIC 測定の結果、POA は SA の臨床分離株に対して抑制的に作用したことから、POA を含有する外用薬は患者の皮膚でも SA の増殖を抑制することが期待される。一方、POA に耐性を示す SA の臨床分離株が存在したことから、AD 患者が POA 耐性 SA を常在菌として保有する場合があります。こうした患者に対する POA の効果は限定的であると予想される。今後、SA の POA に対する耐性機序について明らかにしたい。

Helicobacter pylori VacA の菌体内ナノ輸送システムにおける輸送ルートと

MreB 線維の関係について

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 生命理工学院 生命理工学系

E-mail: hong.wu@ompu.ac.jp

我々は、細菌菌体外からの刺激に反応して、菌体内物質を細胞膜に向かって輸送するナノ輸送システム(*ibNoTS*)を発見した。これまでに我々は免疫電子顕微鏡法を用いて *H. pylori* MreB 線維が CagA の *ibNoTS* 輸送ルートに関係するのに対し、*urease* *ibNoTS* 輸送ルートには MreB ではなく FtsZ 線維が関与することを明らかにしている。しかし、*H. pylori* の病原因子である VacA の *ibNoTS* について、その輸送ルートのメカニズムはまだ解明されていない。本研究では、菌体内線維構造を可視化する凍結融解法及び免疫電子顕微鏡法を用いて、*H. pylori* VacA の *ibNoTS* における菌体内輸送ルートが MreB などの線維と関連するのかを明らかにすることを目的とした。

被験菌として *H. pylori*, ATCC43504 株を用いた。作製した MreB 抗体を用いて、二重染色の免疫電子顕微鏡法により VacA と MreB 分子が近接しているかを確認した結果、両者は近接していることが分かった。そして、MreB 線維の重合阻害剤である A22 を用いて、*H. pylori* VacA の *ibNoTS* に与える影響を免疫電子顕微鏡法で確認した結果、VacA の *ibNoTS* が A22 に障害されたということが形態学的に明らかとなった。さらに、A22 が VacA の産生や分泌に影響することを EIA で確認した。また、凍結融解による菌体内線維様構造を可視化する方法を用いて露出させた線維に MreB と VacA が近接して存在していることも確認した。

これらの結果から、VacA *ibNoTS* の輸送ルートと MreB 線維には関連があると示唆された。*H. pylori* VacA の *ibNoTS* 輸送ルートと MreB 線維との関係の解明は、種々病原因子の *ibNoTS* のメカニズム解明への重要な一步になると考えた。

A positive regulatory loop of a virulence regulator expression linked by read-through transcription ensures pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*

Dhira Saraswati Anggramukti¹, Eiji Ishii^{1,2}, Andre Pratama¹, Mohamad Al kadi³, Tetsuya Iida^{1,2}, Toshio Kodama⁴, Shigeaki Matsuda^{1,2}

¹Department of Bacterial Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University,

²Osaka University Center for Infectious Disease Education and Research,

³Human Immunology, Immunology Frontier Center, Osaka University,

⁴Department of Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

E-mail: dhira@biken.osaka-u.ac.jp

Vibrio parahaemolyticus is the leading cause of seafood-borne gastroenteritis in humans worldwide. The major virulence determinant responsible for the enterotoxicity of this pathogen is the type III secretion system 2 (T3SS2) encoded on the pathogenicity island (Vp-PAI), whose expression is governed by the OmpR-family transcriptional regulator VtrB. Here, we report a positive autoregulatory feature of *vtrB* transcription, as often seen among the transcriptional regulators of bacteria, but not in a canonical way dependent on its own promoter. Instead, this autoactivation was mediated by a two-step mechanism: first, VtrB activates the promoter of the VtrB-regulated operon located upstream of *vtrB*, and second, transcription from the distal promoter overcomes the terminator located upstream of the *vtrB* gene, resulting in transcription read-through with read-in transcription of the *vtrB* gene. The perturbation of this read-through transcription impaired T3SS2-associated gene expression, and also attenuated T3SS2-mediated pathogenicity. Thus, our study offers new insights into how *V. parahaemolyticus* controls its virulence gene expression to ensure pathogenicity, and also provides a framework for further exploring the analogous mechanisms for autoactivation of transcription factor gene expression in bacteria.

RyDEN によるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) mRNA フレームシフト

阻害の分子機構の解析

鈴木陽一¹⁾, 森慶真¹⁾, 川島生¹⁾, 郭義生¹⁾, 村川武志²⁾,

江見晶野¹⁾, 坂口翔一¹⁾, 呉紅¹⁾, 中野隆史¹⁾

大阪医科薬科大学医学部 微生物学・感染制御学教室¹⁾, 生化学教室²⁾

E-mail: youichi.suzuki@ompu.ac.jp

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の感染に必要な逆転写酵素そしてインテグラーゼが含まれる Pol 前駆体タンパク質の発現には, Gag-Pol 遺伝子をコードする mRNA のフレームシフト機構 (programmed -1 ribosomal frameshifting: -1PRF) が必須である。我々はこれまでに, デングウイルスの増殖を抑える新規のインターフェロン誘導性因子として RyDEN (C19orf66/SHFL) を同定したが, その後 RyDEN は, HIV-1 Gag-Pol mRNA の-1PRF も抑制することが明らかになった。そこで本研究では, HIV-1 mRNA の-1PRF 阻害を引き起こす RyDEN の分子的な特徴を明らかにすることを目的とした。

終止コドンをもたない Renilla luciferase (Rluc) 上流遺伝子と, 終止コドンをもつ Firefly luciferase (Fluc) 下流遺伝子の間に, -1PRF に必要な slippery site (UUUUUUA) とそれに続くステムループ構造を含む HIV-1 の 101 塩基を挿入し, -1PRF 依存的に Fluc タンパク質が発現する DualLuc プラスミドを構築した。-1PRF 効率の解析は, DualLuc プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞における Rluc 活性と Fluc 活性をそれぞれ測定することでおこなった。

DualLuc プラスミドと RyDEN 発現プラスミドの co-transfection 実験により, RyDEN の-1PRF 阻害活性が確認された。次に, AlphaFold2 によって構築された立体構造モデルをもとに, RyDEN の機能維持に重要だと考えられる 12 アミノ酸残基を選択した。そしてそれらの残基をアラニンに置換した RyDEN 変異体を DualLuc アッセイに用いたところ, -1PRF の抑制には RyDEN アミノ酸配列のほぼ中央に存在する核移行シグナル様 (NLS-L) 配列と, それを構成する Zinc ribbon (CXXC(H)-15/17-CXXC) モチーフに含まれるシステイン残基が重要であることがわかった。重要なことに, NLS-L 領域を介して RyDEN に会合する細胞性因子 PABPC1, そして PABPC1 がリクルートすることによって mRNA の翻訳停止を誘導するリボソーム解離因子 eRF3 は, とともに HIV-1 -1PRF に阻害的に働くことが明らかとなった。以上の結果より, RyDEN は PABPC1 や eRF3 とともに翻訳停止複合体を形成し, HIV-1 Gag-Pol mRNA からリボソームを解離させることによって-1PRF を抑制する可能性が示された。

大阪府下の河川水における *Escherichia albertii* の汚染状況の調査

田上 綾¹、日根野谷 淳¹⁻⁵、徐 炳婷²、畑中 律敏¹⁻⁵、Sharda P. Awasthi³⁻⁵、山崎 伸二¹⁻⁵
大阪府大・生命環境・獣医¹、大阪府大院・生命環境²、大阪公大院・獣医³、
大阪公大・アジア健康科学研究所⁴、大阪公大・大阪国際感染症研究センター⁵

E-mail: scc01022@st.osakafu-u.ac.jp

【背景】*Escherichia albertii* はヒトに消化器症状を引き起こす新興人獣共通感染症菌であり、我が国では集団食中毒事例が複数報告されている。本菌の自然宿主の1つとしてアライグマが同定されたが、どのように食品が本菌に汚染されるのかは明らかとなっていない。予備調査により、アライグマの生息環境を流れる河川水中に本菌が検出されることを見出した。そこで本研究では、河川水が環境中での本菌の拡散および食品汚染の経路になる可能性を考え、大阪府下の野生動物生息環境を流れる河川水を対象とした本菌の分子疫学調査を行った。

【材料・方法】大阪府下で2022年8月～2023年9月に採取した河川水62検体（河川Aとその支流17地点37検体、その他水源の異なる22河川25検体）を供した。河川水1Lを滅菌ガーゼに通した後、保持粒子径5 μm定性ろ紙でろ過し、孔径0.45 μmのメンブレンフィルターで吸引ろ過した。メンブレンフィルターと300 mLの滅菌水で洗い流したろ紙を、半分に切断しそれぞれ2種の本菌選択培地で増菌し、増菌培養液から鋳型DNAを作製し、*E. albertii* 特異的 real-time PCR によって本菌を検出した。陽性検体から *E. albertii* 選択分離培地で分離後、本菌特異的 PCR により同定した。分離株は ERIC-PCR により検体内遺伝学的多様性を調べた。異なる各 ERIC 型から1株ずつ選び、PFGE で検体間の多様性を検証した。また、EAOg 型別マルチプレックス PCR により分離株の O 抗原遺伝子型を決定した。

【結果・考察】河川別に見ると、*E. albertii* の検出率は56.5% (13/23) であった。河川Aについて中流から上流に向かって17地点で採水したところ、水源付近を含む13地点で *E. albertii* が検出された。また、同水源付近の地点において3か月間で4度採水を行ったところ、常に本菌が検出された。延べ62検体中47検体(75%)で本菌陽性となり、そのうち38検体(河川A27検体、その他11検体)から本菌を分離できた。ERIC-PCRの結果、29検体からは2種類以上の遺伝子型をもつ株がそれぞれ分離され、PFGEの結果、計60株の分離株は52種類のPFGE型に型別されたことから、大阪府下の河川中に多様な *E. albertii* が存在することが示唆された。加えて、継続的に行った定点調査では、2か月程度で分離株のPFGEパターンが変化することもわかった。O抗原遺伝子型別では、60株は19種類のEAOg型および型別不能(25株)を示し、アライグマ(EAOg16、EAOg18等)および臨床分離株(EAOg12、EAOg18等)で報告のあるEAOg型もそれぞれ認められた。これらのことから、大阪府下の河川水中には本菌が高率に存在し、アライグマを含む野生動物が河川水を汚染している可能性、また河川水中に存在する本菌がヒトへの病原性を有する可能性が示された。現在、分離株の病原遺伝子プロファイルを解析中である。

腸内優占 *Bacteroides* 属細菌由来 BT3106 スルファターゼ

南 秀磨、老木 紗予子、渡辺 大輔、高瀬 隆一、小倉 康平、橋本 渉
京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻
E-mail: minami.shuma.66x@st.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】動物の腸管内腔にはグリコサミノグリカン（GAG）やムチンといった細胞外粘液物質が存在する。粘液物質は上皮細胞を保護する役割をもつ一方で、腸内細菌の定着の場としても機能している。当研究室では、ヒト腸内優占*Bacteroides*属細菌がGAGやムチンを栄養源として利用し、必須アミノ酸や短鎖脂肪酸を分泌することを明らかにした¹⁾。GAGやムチンは、その構造に多数の硫酸基を有しており、スルファターゼによる硫酸基の除去は糖鎖の分解を補助し、細菌の腸内定着に重要な役割を担うことが示されている^{2,3)}。腸内優占種として知られる*Bacteroides thetaiotaomicron*はゲノムに29のスルファターゼをコードしており、その中には粘液物質構成糖を基質とするスルファターゼが存在することが明らかにされている³⁾。本研究では、スルファターゼと腸内定着の関連を解明するため、機能解析が未だ行われていないBT3106の活性評価を行った。

【方法・結果】嫌気性細菌由来のスルファターゼが活性を示すには、嫌気性スルファターゼ成熟酵素（anSME）による翻訳後修飾が必要である。そのため、発現宿主である大腸菌由来の anSME では *B. thetaiotaomicron* 由来スルファターゼの翻訳後修飾が機能しない可能性が考えられた。そこで、共発現用ベクターpCOLADuet-1 に His タグを導入したスルファターゼ BT3106 遺伝子と *B. thetaiotaomicron* 由来の anSME である BT0238 遺伝子を組み込み、大腸菌共発現系を構築した。IPTG 誘導により共発現した組換え大腸菌の細胞抽出液を金属アフィニティクロマトグラフィーに供し、BT3106 を精製した。スルファターゼ活性の評価のため、4-硫酸-p-ニトロフェニル（pNPS）を基質に用い、硫酸基が脱離した反応産物である p-ニトロフェノールを波長 405 nm における吸光度で測定した。その結果、BT0238 と共発現した BT3106 において pNPS に対するスルファターゼ活性が確認された。

【考察】グルコースに対し、硫酸化 GAG であるヘパリンを炭素源とする最少培地において、BT3106 の発現量が上昇していることが示されている⁴⁾。このことから、BT3106 が宿主粘液構成糖であるヘパリンの硫酸基除去に寄与し、*Bacteroides* 属細菌の腸内定着に貢献している可能性が考えられる。

References

- (1) Sato *et al.* *bioRxiv* (2020)
- (2) Benjdia *et al.* *J. Biol. Chem.* (2011)
- (3) Luis *et al.* *Nature* (2021)
- (4) Martens *et al.* *Cell Host Microbe* (2008)

合成細菌における 2 つの MreB タンパク質による

Haloplasma 運動能の再構築

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, André Antunes⁴,
宮田知子⁵, 牧野文信⁵, 難波啓一⁵, 宮田真人^{1,6}

¹大阪公大・院理、²理化学研究所・バイオリソース、³産総研・生物プロセス、
⁴マカオ科技大、⁵大阪大、⁶大阪公大・複合先端

E-mail: monehaloplasma@gmail.com

以前、我々のグループでは、球状で運動能を持たない合成細菌 JCVI-syn3B において、MreB をペアで発現させることで、らせんの向きを反転させる *Spiroplasma* 細菌の遊泳を再構築した⁽¹⁾。*Spiroplasma* 細菌は、細胞壁を持たないことやゲノムの縮退などで知られるモリクテス綱細菌に属する。MreB は、細胞壁を持つ細菌では細胞壁合成の足場となり、運動とは関わりのない細菌アクチンタンパク質である。本研究では、系統的にモリクテス綱の起源や、フィルミクテス門細菌に近いと考えられている *Haloplasma contractile* における MreB タンパク質に注目した。*Haloplasma* 由来の 7 つの MreB タンパク質 (HMreB) は、*Spiroplasma* の MreB と系統的に離れており、アミノ酸配列比較により、3 つのグループに分けられた。その中でも異なる系統グループの HMreB のペアでの発現により、syn3B において *Haloplasma* の運動を再構築することに成功した。特に、HMreB1 と HMreB2 の組み合わせの発現により、*Haloplasma* のようなコイル化運動を示した (Fig. 1)。これらの結果から、モリクテス綱の進化において、少なくとも 2 種類の MreB 依存的な運動能が発達したことが示唆される。

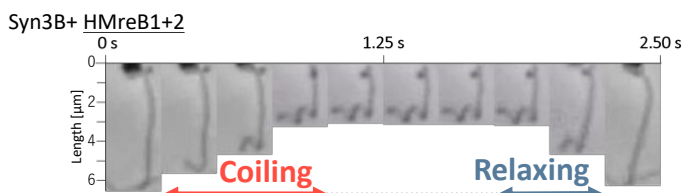


Fig. 1 *Haloplasma* motility reconstituted in syn3B

References

- (1) Kiyama H.; Kakizawa S.; Sasajima Y.; *et al.* Reconstitution of a minimal motility system based on *Spiroplasma* swimming by two bacterial actins in a synthetic minimal bacterium. *Sci Adv.* 2022. 8: eabo7490.

百日咳菌の BvgAS システムを不活性化する化合物、ロニダミン

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

E-mail: n-ota@biken.osaka-u.ac.jp

百日咳は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって起こる呼吸器感染症である。近年、日本を含む世界各国で、本症に対する第一選択薬であるマクロライド系抗生物質に耐性を有する百日咳菌の分離例が報告されていることから、既存の抗生物質に頼らない百日咳菌の新たな感染制御法の開発が求められているところである。そこで我々は、百日咳菌の病原性が単一のマスターレギュレーター (BvgAS 二成分制御系) によって調節されていることに着目し、このシステムを化合物等で人為的に不活性化することによって本菌を非病原性化する感染制御法の開発を計画した。BvgAS システムが活性化状態の時、菌は病原性を示し (Bvg⁺相)、不活性化すると非病原性化する (Bvg⁻相)。硫酸マグネシウム (30 mM ~) やニコチン酸 (20 mM ~) が百日咳菌の BvgAS システムを不活性化することが知られているが、臨床応用を考慮すると、さらに低濃度で有効な化合物の探索が必要である。

本研究では、百日咳菌を Bvg⁻相に誘導する化合物を探索するため、Bvg⁺相で特異的に発現する遺伝子 (*fhaB*, *ptx*) および Bvg⁻相で特異的に発現する遺伝子 (*vrgX*, *vrg73*) のそれぞれのプロモーター領域の下流に *gfp* 遺伝子を挿入したプラスミドを百日咳菌に導入し、GFP の蛍光強度を指標に BvgAS の活性を評価するレポーターアッセイ系を確立した。*vrgX* のプロモーター活性を指標に FDA 承認済み化合物 1,134 種類の一次スクリーニングを実施した結果、5 種類のヒット化合物が得られた。さらに、*fhaB*, *ptx*, *vrg73* のプロモーター活性を指標とした二次スクリーニングにより、低濃度 (50 nM ~) のロニダミンが百日咳菌を Bvg⁻相に誘導することを見出した。ロニダミンは百日咳菌の実験室株、臨床分離株および百日咳類縁菌 (気管支敗血症菌、パラ百日咳菌) の全ての株に対して、病原遺伝子の発現低下作用と Bvg⁻特異的遺伝子の発現上昇作用を示した。また、結合実験の結果から、ロニダミンは BvgAS システムを構成する BvgS センサーキナーゼのペリプラズムドメイン (VFT2) に結合することが分かった。現在、百日咳菌のマウス感染モデルを用いて、ロニダミンの本菌に対する感染阻害効果を検討中である。

パラ百日咳菌の産生する新規咳誘発毒素 DAT の同定と機能解析

平松征洋¹, 西田隆司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

E-mail: yhiramatsu@biken.osaka-u.ac.jp

百日咳は激しい咳発作を主症状とするヒトの呼吸器感染症である。主な原因菌として百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) が知られているが、パラ百日咳菌 (*B. parapertussis*) も百日咳様の激しい咳発作を引き起こす。私たちはこれまでに、百日咳菌の産生するリポド A と Vag8 が協調して炎症性メディエーターであるブラジキニンの産生を増強し、さらにブラジキニンによるイオンチャネル TRPV1 の興奮感受性亢進を百日咳毒素が増幅することにより、宿主に咳発作を誘発させることをマウスモデルを用いて解明した¹⁾。一方、パラ百日咳菌は、LPS (リポド A を含む) と Vag8 を産生するが、百日咳毒素を産生しない。百日咳菌感染において、百日咳毒素は、ブラジキニン 2 型受容体 (B2R) に共役する三量体 G タンパク質 $G\alpha_i$ を ADP リボシル化することにより G_i の機能を不活化する。そこで私たちは、パラ百日咳菌が百日咳毒素に代わる G_i 不活化毒素を産生していると考え、その同定と機能解析を実施した。

百日咳毒素は、ブラジキニン存在下で B2R と G_i を脱共役させることによって、細胞内の cAMP 濃度を間接的に増加させる。この cAMP 濃度の増加を指標にして、パラ百日咳菌の G_i 不活化作用を調べた結果、菌体抽出液および培養上清中に G_i 不活化因子が含まれることが分かった。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび質量分析を組み合わせた解析により、機能未知のタンパク質 BPP0449 が G_i を不活化していることを見出した。BPP0449 (deacylating autotransporter toxin, DAT と命名) は、オートトランスポーターに属するタンパク質であり、菌体外に分泌されるパッセンジャードメインが脱アシル化酵素活性を有していた。この活性により $G\alpha_i$ が脱ミリスチル化されるため、下流のエフェクターであるアデニル酸シクラーゼと $G\alpha_i$ との相互作用が阻害される結果として、 G_i 情報伝達系が遮断されることが分かった。このことから、パラ百日咳菌は百日咳毒素の代わりに DAT を産生することで G_i を不活化し、咳発作を誘発すると考えられた。

References

- (1) Hiramatsu Y, Suzuki K, Nishida T, Onoda N, Satoh T, Akira S, Ikawa M, Ikeda H, Kamei J, Derouiche S, Tominaga M, Horiguchi Y. The mechanism of pertussis cough revealed by the mouse-coughing model. *mBio*. 2022, 13(2):e0319721

急速凍結法によるグラム陰性菌のペプチドグリカン構造の可視化

田原 悠平、宮田 真人

大阪公大・院理

E-mail: taharayuhei@omu.ac.jp

バクテリアの細胞壁であるペプチドグリカンは、密度が低く柔軟性があるため、全体の構造の可視化は困難であった。急速凍結ディープエッチング電子顕微鏡法は、試料を液体ヘリウム温度にした金属ブロックに接着させることで凍結固定し、試料表面を金属でコーティングしたレプリカ膜を透過型電子顕微鏡で観察する方法である。以前の研究でこの方法によりグラム陽性菌である *Bacillus subtilis* のペプチドグリカンの全体像を可視化した¹⁾。

本研究では、グラム陰性菌に分類される *Escherichia coli*、*Flavobacterium johnsoniae*、*Myxococcus xanthus* の3種のペプチドグリカン層を可視化した。

菌体を SDS とプロテアーゼで処理してペプチドグリカン層を単離した。*E. coli*、*F. johnsoniae* では、単離したペプチドグリカン層の表面に 10 ~ 30 nm² の網目状の穴が全体に均一に分布した似た構造を持っていた。*M. xanthus* では、約 100 nm² のさまざまなサイズの網目構造を持ち、細胞の両末端に約 100 nm² の穴が局在していた。

E. coli、*F. johnsoniae* では穴は面積比で 5~8% 占めており、*M. xanthus* では 15% であった。これらペプチドグリカンの構造の違いは、3種の細菌の運動装置の違いを反映し、*M. xanthus* の細胞の柔軟性と分泌装置への関連が考えられる。

References

- (1) Tulum I, Tahara YO., Miyata M. Peptidoglycan layer and disruption processes in *Bacillus subtilis* cells visualized using quick-freeze, deep-etch electron microscopy. *J. Microscopy*. **2019**, 68 (6), 441-449.

Mycoplasma mobile 細胞内滑走装置の構造

福島秀実¹, 豊永拓真^{1,2}, 田原悠平¹, 中根大介³, 宮田真人^{1,2}

¹大阪公大・院理, ²大阪公大・複合先端, ³電通大・院情報理工

mikanpan.part4@gmail.com

Mycoplasma mobile は細胞壁を持たない寄生性細菌である。*M. mobile* は宿主細胞表面のシアル酸を足場に運動をする。この運動はマイコプラズマ属の4種にのみ見られるユニークなメカニズムによるものである¹。*M. mobile* 細胞内にはクラゲのような形をした運動装置が存在する。クラゲの傘に相当する部分はベルと呼ばれるお椀状の構造である。クラゲの触手に相当する部分は、滑走モーターと呼ばれる複合体が、鎖状に連なった構造である²。滑走モーターは、F型ATPaseが二量体化した構造で、滑走のための力を生じている³。本研究では、*M. mobile* 運動装置を構成する各複合体の繋がりに着目し、電子線トモグラフィによる観察を行った。トモグラフィとは、試料を様々な角度から撮影することで、立体的な情報を取得する手法である。その結果、運動装置を構成する複数の新奇構造が見つかった。連なった滑走モーターの間に、細胞膜に対し垂直方向に伸びる構造が見つかった。滑走モーターの鎖どうしは、滑走モーターのF₁ATPase様六量体側面から伸びる柔軟な繊維構造により繋がっていた。また、滑走モーターの鎖末端には、ベルの内壁に沿って伸びるくさび状の構造が存在し、ベルと鎖を繋いでいた。これらの構造は、運動装置の組み立てや、細胞膜への固定、細胞表面タンパク質との結合などに関与している可能性がある。

References

- (1) Tulum I, Kimura K, Miyata M. Identification and sequence analyses of the gliding machinery proteins from *Mycoplasma mobile*. *Sci Rep.* 2020;10:3792.
- (2) Nishikawa MS, Nakane D, Toyonaga T, Kawamoto A, Kato T, Namba K, Miyata M. Refined mechanism of *Mycoplasma mobile* gliding based on structure, ATPase activity, and sialic acid binding of machinery. *mBio.* 2019;10: e02846-19.
- (3) Toyonaga T, Kato T, Kawamoto A, Kodera N, Hamaguchi T, Tahara YO, Ando T, Namba K, Miyata M. Chained structure of dimeric F₁-like ATPase in *Mycoplasma mobile* gliding machinery. *mBio.* 2021;12:e0141421.

腸内細菌叢が潰瘍性大腸炎モデルマウスの

疾患重症度に与える影響の検討

池田恵莉¹、山口雅也^{1, 2, 3, 4}、川端重忠^{1,4}

¹大阪大学 大学院歯学研究科 微生物講座

²大阪大学 大学院歯学研究科 バイオインフォマティクス研究ユニット

³大阪大学 微生物病研究所附属バイオインフォマティクスセンター

⁴大阪大学 感染症総合教育研究拠点

E-mail: ikeda.eri.dent@osaka-u.ac.jp

潰瘍性大腸炎は下痢や腹痛を繰り返す炎症性疾患であり、完治することがない国の指定難病である。遺伝学的素因、食事、衛生状況などの環境因子が複合的に関与し、腸内細菌叢に対する免疫の異常な亢進によって進行すると考えられている。しかしながら、1000種類以上の細菌種で構成される複雑な腸内細菌叢が、どのように腸炎の発症や進行に関与しているかは不明な点が多い。さらに、腸内細菌は、発酵分解によって代謝物を産生して腸管生理や代謝に影響を与える。中でも、短鎖脂肪酸は腸管粘膜のバリア機能を有している。

潰瘍性大腸炎のマウスモデルとしてデキストラン硫酸ナトリウム塩 (dextran sulfate sodium: DSS) 誘導性腸炎マウスが広く用いられている。本研究では、同マウス系統内の亜系統差がDSS誘導性腸炎の重症度に与える影響を検討するとともに、それぞれのマウスの腸内細菌叢を比較した。

BALB/c 野生型マウスを国内ブリーダー3社から入手し、DSSの飲水投与によって急性腸炎を引き起こした。腸炎の臨床的所見である体重減少、軟便、腸管からの出血を経時的に観察したところ、1社のマウスは腸炎が十分に誘導されず疾患抵抗性を示し、体重減少や疾患活動性は残り2社のマウスと有意な差があった。次に、3社間でのマウスの腸内細菌叢を16S rRNAによるメタゲノム解析で比較したところ、マウス飼育業者によって3社における腸内細菌叢は腸炎誘導前から大きく異なっていた。さらに、短鎖脂肪酸の一種である酪酸を産生する *Roseburia* 属の細菌の割合が、疾患抵抗性を示すマウスで腸炎誘導後に増加していた。また、腸炎を十分に誘導しない1社のマウスと重症化するブリーダーのマウスを co-housing したところ、どちらのマウスも同等に腸炎が引き起こされた。

以上の結果から、DSS誘導性腸炎に抵抗性を示す亜系統が存在し、亜系統間の腸炎の疾患重症度の違いは、主に腸内細菌叢が誘導することが示唆された。

Synchronization of the germination-to-outgrowth process in *Bacillus subtilis* spores under nutrient-limited conditions

Masami Miyake¹, Rana Okawaki¹, Mayo Yasugi¹, and Satoshi Sekimoto²

¹Osaka Metropolitan University and ²Mitsubishi Chemical Co.

E-mail: masamimiyake@omu.ac.jp

Bacterial spores are mostly dormant in environments. But once they are placed under growth promoting conditions, they enter to “germination” process, where they begin sequential biological reactions toward propagation as vegetative cells. One of the notable morphological changes at the early phase of the process is called “darkening”. The whitish bright spores become blackish and darker under phase contrast microscopy (PCM). The darkened spores thereafter do not show any noticeable morphological changes until the “emergence” of a part of vegetative cell body from hatched spore’s shell, although several intracellular biological processes are supposed to occur, such as energy production, biomolecule metabolism, and so on. In this study we aimed to unveil the biological phenomena during the morphological “eclipse” phase and started a trial to synchronize the germination-to-emergence (G-to-E) process. The synchronization was thought to be necessary because the different spores behave very differently in a heterologous manner (as shown below).

We prepared spores from a *B. subtilis* ATCC 11774 strain and observed their morphological changes during the G-to-E process under PCM. Time-lapse images were captured and subjected to the image analysis on a single cell basis. We then recorded the following times for each spore; i) time from the start of incubation until the completion of darkening (T_D), ii) time of the G-to-E process (T_{GE}). We also employed a strong germination inducer, AGFK (arginine, glucose, fructose, KCl, at 100 mM each) for synchronization experiments.

When the spores were incubated in nutrient broth at 37°C, observed T_D of each spore extensively varied from ca. 10 min to 6 hr. Concomitantly, the times until the emergence from spores also varied from 90 min to more than 8 hr. This indicates that each spore behaves differently, showing heterologous wide-range variations of times until they start to germinate. Next we tried to synchronize the G-to-E process using a combination of AGFK and nutrient broth. AGFK induced rapid and strong spore germination; the 90% of observed T_{DS} fit between 2 to 90 min. Because AGFK alone did not induce “emergence” probably because of a limited nutrient supplementation, we changed the incubation media, from AGFK to nutrient broth at 120 min after incubation. We found the spores began to emerge from 60 min post medium change. The 90% of T_{GES} of the spores fell into a narrow range between 180 and 300 min. The results indicate that the synchronization technique enables us to separate the germination phase from the emergence phase, which was not possible under the unsynchronized conditions. We propose that this technique will be a valuable tool for understanding biological phenomena inside the spores during whole G-to E process.

リボソーム関連遺伝子が欠損した大腸菌は

亜鉛排出トランスポーターZntAの増加により亜鉛耐性を示す

白川 璃子、石川 一也、古田 和幸、垣内 力

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子生物学分野

E-mail: ph430118@s.okayama-u.ac.jp

亜鉛は細菌にとって必要不可欠であると同時に、過剰量では毒性を示す。そのため細菌は取り込みや排出の調節によって細胞内亜鉛濃度を維持している。我々はこれまでに、大腸菌リボソームタンパク質 RpmJ の遺伝子欠損株が亜鉛に対して耐性を示すことを見出した(1)。rpmJ 欠損株では過剰な亜鉛の存在下において、細胞内亜鉛濃度が野生株に比べて低下していた(1)。さらに、rpmJ 欠損株以外のリボソームタンパク質欠損株や、リボソームにおけるタンパク質合成に必要な翻訳伸長因子の欠損株も亜鉛耐性となることを発見した(1)。このことから、rpmJ をはじめとしたリボソーム関連遺伝子の欠損株には、細胞外への亜鉛の排出を促進することによって亜鉛耐性を獲得する共通のメカニズムが存在すると考えられた。本研究では、この亜鉛耐性に亜鉛排出トランスポーターが関与しているのではないかと考え、主要な亜鉛排出トランスポーターである zntA に着目して解析を行った。

まず、ZntA による亜鉛排出が rpmJ 欠損株の亜鉛耐性に寄与しているかを知るために、rpmJ と zntA の二重欠損株を作製し、その亜鉛耐性を検討した。その結果、rpmJ と zntA の二重欠損株は亜鉛感受性を示し、その亜鉛感受性の程度は zntA 単欠損株と同程度であった。このことから、rpmJ 欠損株は zntA に依存して亜鉛に耐性化していることが示唆された。次に、rpmJ 欠損株において、zntA の mRNA 量とタンパク質量が変動しているかを調べた。その結果、zntA の mRNA 量は、野生株と rpmJ 欠損株の間で同程度であった。それに対し、ZntA タンパク質量は、野生株に比べ rpmJ 欠損株において増加していることが見出された。

以上の結果から、rpmJ 欠損株は、mRNA の発現増加を伴わずに ZntA タンパク質量を増加させることによって、亜鉛耐性を獲得していることが示唆された。また rpmJ 欠損株以外の亜鉛耐性株であるリボソーム関連遺伝子の欠損株について ZntA タンパク質の定量を行った結果、rpmJ 欠損株と同様に ZntA 発現が増加していた。以上の結果から、これらのリボソーム関連遺伝子の欠損株には何らかの共通した異常があり、その異常が ZntA タンパク質発現を増加させることで亜鉛耐性を引き起こすことが示唆された。

References

(1) Shirakawa R, Ishikawa K, Furuta K, Kaito C.

Knockout of ribosomal protein RpmJ leads to zinc resistance in *Escherichia coli*.

PLOS ONE 18(3):e0277162. (2023)

JCVI-syn3B を用いたらせん反転をもたらす MreB4 と MreB5 の繊維構造解析

Haruka Yuasa¹, Yuya Sasajima¹, Hana Kiyama¹, Daichi Takahashi¹, Takuma Toyonaga^{1,2}, Tomoko Miyata³, Fumiaki Makino³, Keiichi Namba³, Makoto Miyata^{1,2}

¹Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University.

²The OMU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA),
Osaka Metropolitan University.

³Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University.

E-mail: se23659e@st.omu.ac.jp

スピロプラズマはらせん形の細胞であり、右巻きと左巻きを交互に反転させることで、高粘度溶液中を遊泳する。らせん反転は細胞内繊維構造によってもたらされ、スピロプラズマに特有の Fibril と細菌のアクチンと呼ばれる 5 種類の MreB で構成されている。これまでに、私たちの研究室はミニマル合成細菌 JCVI-syn3B (syn3B) に MreB4 と MreB5 を発現させることでらせん反転遊泳運動の再構成に成功した。しかし、その詳細な遊泳の仕組みは未解明のままである。本研究では、遊泳していたと考えられる syn3B の細胞内繊維構造をクライオ電子線トモグラフィー法により可視化した。その結果、細胞膜にそってシート状の構造が並んでいる様子が観察された。また、二次元平均化を行ったところ、繊維内のサブユニットは約 5 nm 周期で並んでいることがわかった。今後の目標は MreB4 と MreB5 を区別することである。

アルボウイルス生存戦略におけるベクターの役割

刀祢睦月、鈴木夏織、中川歩美、松尾栄子

神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座感染症制御学教室

E-mail: 236a204a@stu.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】アルボウイルスはヒトなどの脊椎動物に加え、節足動物でも増殖可能なウイルスの総称であり、特に吸血性節足動物の吸血行動によって脊椎動物—節足動物間で生活環が成立しているウイルスを指す。しかし、アルボウイルス的生活環の分子基盤、すなわち無脊椎動物である節足動物と脊椎動物の両方で増殖を可能にする分子メカニズムは不明である。そこで本研究では、ヌカカを介してウシやスイギュウに感染し、発熱や泡沫性流涎、嚥下障害を主徴とするイバラキ病を引き起こす、イバラキウイルス (IBAV) を用い、脊椎動物細胞、もしくは媒介節足動物細胞に強制的に適応させた IBAV に起こる性状の変化を調査した。ウイルス力価は BHK-21 細胞を用いた TCID₅₀ 法によって算出した。

【方法】リバーシジェネティクス法により作出した IBAV をハムスター腎細胞 (BHK-21 細胞) で 5 回継代したものを哺乳動物型 IBAV (IBAV_BHK) とした。IBAV_BHK を、シマカ由来細胞 (C6/36 細胞) で 10 回継代し、各継代時における IBAV の BHK-21 細胞および C6/36 細胞に対する感染性の変化を解析した。

【結果・考察】継代 4 回目まで、C6/36 細胞で継代した IBAV_BHK は C6/36 細胞に感染させても、細胞変性効果を示さなかった。しかし、継代 4 回目の IBAV_BHK を C6/36 細胞に感染させると、著しい細胞変性効果 (CPE) が現れ、細胞が死滅した。以降、10 代目まで全てのウイルスは C6/36 細胞に激しい CPE を起こした。一方、5~10 代目のウイルスは、BHK-21 細胞に対する CPE が減弱し、感染性ウイルス力価は、1~4 代目と比べて明らかに低下していた。よって、C6/36 細胞への適応が進んだ IBAV_BHK は BHK-21 細胞への適応能力が減弱する可能性がある。ウイルス RNA 力価の変動などの性状変化についても報告する。

リアソートメントウイルスを用いた

流行性出血病ウイルス中和抗体検出法の改良

中川歩美、松田梢、刀祢睦月、松尾栄子

神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座

E-mail: aym.nkgw2402@gmail.com

【背景・目的】流行性出血病ウイルス（EHDV）はウシを含む反芻動物に感染し、発熱や食欲不振を主徴とする流行性出血病を引き起こす。国内においても度々感染が確認されており、畜産業界に甚大な被害を及ぼしているが、未だ不明な点が多く、有効な治療薬も存在しない。また、国内で血清型 2 型（EHDV-2）以外の EHDV 株を保有している研究所や検査機関はほとんどないため、未報告の EHDV が流行した際に、迅速な診断方法の一つであるウイルス中和試験を用いることができない。さらに、現行のウイルス中和試験では細胞変性効果によって中和抗体価を判定するが、サンプルの状態やウイルスの血清型によっては判定が困難である。そこで、本研究ではリバーシジェネティクス法および蛍光遺伝子を用いて中和抗体検出法の改良を試みるとともに神戸大学附属農場飼育牛（黒毛和種）における抗 EHDV 中和抗体保有状況を調べた。

【方法】EHDV2 の日本分離株である IBAV No.2 株のゲノムを基にし、外殻タンパク質をコードする分節（S2、S6）を含む複数の分節を血清型 6 型（EHDV6）、7 型（EHDV7）由来のものに置き換えたリアソータントウイルスをリバーシジェネティクス法により作出した。また、全てのウイルスの S9 分節に緑色蛍光タンパク質 UnaG 遺伝子を導入した。各リアソータントウイルスのハムスター腎細胞（BSR 細胞）での増殖性を比較し、最も増殖効率の良いウイルスを選出し、ウイルス中和試験に用いた。神戸大学附属農場飼育牛から採取した血液の中和抗体価の測定には細胞変性効果による方法と、感染細胞の蛍光発光による方法を用いた。

【結果・考察】EHDV6 においては外殻タンパク質に加えて非構造タンパク質 NS3 をコードする分節を置き換えたもので増殖性が最も高く、EHDV7 においては外殻タンパク質のみを組換えたもので増殖性が最も高かった。よって、増殖性の良くなる分節の組合せが血清型ごとに異なる可能性がある。また、これらのリアソータント EHDV は、通常の EHDV よりも中和抗体価検出の正確性が高いことを示唆する結果が得られた。リアソータント EHDV を用いた中和抗体検出法による EHDV の母牛から仔牛への移行抗体の解析についても併せて報告する。

ミニマル細菌に再現するらせん細菌遊泳運動

木山 花¹、柿澤茂行²、高橋大地¹、宮田真人^{1,3}

¹大阪公大・院理、²産総研・生物プロセス、³大阪公大・複合先端

E-mail: hana.choco.8733@gmail.com

植物や節足動物に寄生するらせん細菌スピロプラズマは、らせんの向きを交互に反転して推進するユニークな遊泳運動を示す。この運動には 5 種類の細菌アクチン MreB (MreB1-5) が関わる可能性が示唆されていたが、遺伝子操作ができないなどの障壁から決定的な証拠は得られていなかった。ミニマル細菌 JCVI-syn3B はマイコプラズマのゲノムを元に遺伝子を限界までそぎ落としたゲノムを持つ^(1,2)。本研究では、JCVI-syn3B への遺伝子操作によってスピロプラズマ遊泳運動のメカニズムを解明することを試みた。もともと運動能を持たない JCVI-syn3B に MreB1-5 を含む遊泳に関わると考えられていた 7 つの遺伝子を導入したところ、スピロプラズマに似たらせん状の形態と運動能が再現された⁽³⁾。さらに、さまざまな組み合わせでこれらの遺伝子を導入したところ、JCVI-syn3B における形態と運動は MreB4 と MreB5 の 2 種類によって十分再現されることがわかった。また、2 種の MreB による遊泳メカニズムについて調べるため、様々な変異を導入した MreB4 および MreB5 を発現した JCVI-syn3B の挙動を解析した。その結果、MreB5 の膜結合能がらせん形成ならびに遊泳に重要であることと、MreB4 と MreB5 の ATPase 活性が右巻きから左巻きへの反転に重要であることが示唆された。以上の結果に基づいて、スピロプラズマ遊泳運動の最新のメカニズムについて議論する。

References

- (1) Hutchison, C. A., 3rd; Chuang, R. Y.; Noskov, V. N.; Assad-Garcia, N.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Gill, J.; Kannan, K.; Karas, B. J.; Ma, L.; *et al.* *Science*. **2016**, 351 (6280), aad6253.
- (2) Nishiumi, F.; Kawai, Y.; Nakura, Y.; Yoshimura, M.; Wu, H. N.; Hamaguchi, M.; Kakizawa, S.; Suzuki, Y.; Glass, J. I.; Yanagihara, I. Blockade of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by *Ureaplasma parvum* vacuolating factor. *Cell. Microbiol.* **2021**, 23 (12), e13392.
- (3) Kiyama, H.; Kakizawa, S.; Sasajima, Y.; Tahara, Y. O.; Miyata, M. Reconstitution of a minimal motility system based on *Spiroplasma* swimming by two bacterial actins in a synthetic minimal bacterium. *Science Advances*. **2022**, 8 (48), eabo7490.

オートトランスポーターBafA を介したバルトネラ属細菌の血管新生促進機構

塚本 健太郎

大阪大学 微生物病研究所人獣共通細菌感染症研究グループ

E-mail: tsukamoto@biken.osaka-u.ac.jp

バルトネラ属細菌はグラム陰性の通性細胞内寄生性細菌であり、これまでに 40 菌種以上に分類されている。バルトネラは様々な哺乳類や吸血性節足動物に保菌されており、各菌種によって病原性や宿主特異性は異なる。その中でもヒトに感染症を起こす代表的なものとしては *Bartonella henselae*、*Bartonella quintana*、*Bartonella bacilliformis* の 3 菌種が挙げられる。これらはいずれもヒトの体内では血管内皮細胞に感染し、自身の感染細胞である血管内皮細胞の増殖を促進させて宿主内での感染の場を拡げる。これはバルトネラ特有の感染戦略であり、菌が誘導する血管内皮細胞の増殖亢進に伴って血管新生が惹起され、バルトネラ感染症で見られる血管腫などの病態が形成される。

最近我々は、猫ひっかき病の原因菌 *B. henselae* からオートトランスポーターBafA を同定し、これが血管新生の直接要因であることを明らかにした¹。BafA はその N 末端領域が菌体外に分泌され、血管内皮細胞膜上に存在する血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体に結合し、下流の MAPK シグナルを亢進させる。また、先に挙げたヒト病原性バルトネラ 3 菌種も BafA を有するのに加えて、それら以外にもほとんどのバルトネラに BafA のオルソログが存在し、各菌種ごとに活性の高さや発現レベルが異なることを示してきた^{2,3}。さらに、*B. henselae* の種々の菌株について、コアゲノム SNPs による分子系統解析を実施し、加えて BafA のアミノ酸配列、血管内皮細胞への増殖促進能について比較した。その結果、コアゲノム SNPs による遺伝子型と BafA の配列型は相関し、菌株によって血管内皮細胞への増殖促進能の強さに違いが見られた。現在、これらの菌株間で見られた差異が菌の感染性や病原性に関与しているのかどうか明らかにするため、Organ-on-a-chip を利用した新たなバルトネラ感染モデルの構築を試みている。

References

- (1) Tsukamoto, K.; Shinzawa, N.; Kawai, A.; et al. The *Bartonella* autotransporter BafA activates the host VEGF pathway to drive angiogenesis. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 3571.
- (2) Tsukamoto, K.; Kumadaki, K.; Tatematsu, K.; et al. The passenger domain of *Bartonella bacilliformis* BafA promotes endothelial cell angiogenesis via the VEGF receptor signaling pathway. *mSphere* **2022**, *7* (2), e0008122.
- (3) Kumadaki, K.; Suzuki, N.; Tatematsu, K.; Doi, Y.; Tsukamoto, K. Comparison of Biological Activities of BafA Family Autotransporters within *Bartonella* Species Derived from Cats and Rodents. *Infect Immun* **2023**, *91* (3), e0018622.

尿路病原性大腸菌におけるシャペロン・アッシャー型線毛の網羅的探索

井上陽晴¹、和田崇之^{2, 3}

¹大阪市立大学 生活科学部、

²大阪公立大学大学院 生活科学研究科、³大阪国際感染症研究センター

E-mail: a20ha004@st.osaka-cu.ac.jp

【背景と目的】尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) による感染は、腸管からの細菌が尿道周囲開口部を汚染し、尿路を遡上することによって引き起こされる。尿路感染が成立するためには、尿路粘膜上皮細胞への感染細菌の付着が必要であり、接着因子 (Colonization Factors, CFs) は重要な病原因子の一つである。UPEC の CFs は 1 型線毛、P 線毛、および S/F1 線毛、Afa/Dr などが代表例としてあげられ、これらはすべてシャペロン・アッシャー型 (Chaperone-Usher, CU) 線毛に属している。¹そこで、本研究では UPEC における細胞接着および CU 線毛のレパートリー²に着目し、UPEC における CU 線毛の多様性を網羅し、そこから未知の CFs を探索することを目的とした。

【方法】当研究室で保有する UPEC (90 株) を HEp-2 細胞に 3 時間感染後、ギムザ染色を行った。培地には MαDM (0.5%) を添加し、マンノース接着能を示す 1 型線毛の影響を抑制した。顕著な細胞接着が認められた菌株をゲノム解析対象とし、MiSeq による短鎖配列を取得後にアセンブルを行った。ここから、代表的な CU 線毛タンパク質 (アッシャー) のアミノ酸配列²を用いた相同性検索によって各株の CU 線毛遺伝子を網羅的に抽出し、それらの系統的特性を検証した。

【結果と考察】本研究に供試した UPEC のうち 4 株 (4.4%) が接着した。これらのゲノム配列は VirulenceFinder に基づく病原因子の検出³により、*in silico* でも UPEC として判定された。CU 線毛の網羅的検索では、2 株において既知の CFs (P 線毛、凝集接着因子 *agg*) が確認され、分散接着像を呈した 1 株においては未報告の CU 線毛遺伝子が 2 組見出された。CU 線毛の多様性と接着能に関する検証は、感染性大腸菌の病原性に新たな知見をもたらすものと考えられる。

References

1. Matthew MA. Adhesion and Entry of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2002, 4(5), 257–71.
2. Nuccio SP, Bäumlér AJ. Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007, 71(4), 551–75.
3. Malberg Tetzschner AM, *et al.* *In Silico* Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol.* 2020, 58(10), e01269-20.

Behavior of MreB proteins causing helical motility in a synthetic bacterium

Yoshiki TANAKA¹, Hana KIYAMA¹, Makoto MIYATA^{1,2}

¹Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University

²The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka Metropolitan University

E-mail: myosin-bio@outlook.jp

Spiroplasma, parasitic bacteria swim by switching its handedness of helical cell body. Previously, our group reconstituted this motility in JCVI-syn3B, a minimal synthetic bacterium, by expressing bacterial actin proteins MreB4 and MreB5 of five MreBs, which are involved in *Spiroplasma* swimming (1). In the present study, MreB5 behaviors were traced by mCherry fusion in the swimming synthetic cell. Helical and moving parts of the cell always exhibited fluorescence. MreB polymerization inhibitor, A22 stopped the movement and straightened the helix while A22 did not straighten the cell expressing only MreB5. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) showed slow fluorescence recovery in both moving and non-moving cells. These results suggest that the formation and reversal of the helix involves ATP dependent subunit displacements, but, not obvious subunit replacement inside the filament.

References

- (1) Kiyama, H., et al., Reconstitution of a minimal motility system based on *Spiroplasma* swimming by two bacterial actins in a synthetic minimal bacterium. *Sci Adv*, 2022. 8(48): p. eabo7490.

類鼻疽菌の細胞内寄生性に関与する *Bsv locus* の機能解析

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

E-mail: t-nishida@biken.osaka-u.ac.jp

類鼻疽は類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*; Bps) の感染によって引き起こされる致死率が数十%にも及ぶ感染症である。細胞内寄生細菌であるBpsは貪食細胞に取り込まれた後、III型分泌装置 (T3SS) によってファゴソームから細胞質へと脱出し、細胞質内で増殖する。さらに隣接する細胞へと感染することで細胞同士を融合させ、特徴的な多核巨細胞を形成する。この一連の細胞内寄生機構は、Bpsの近縁種でヒトやマウスに病原性を示さない*B. thailandensis* (Bt) にも共有されており、Btは*in vitro*においてはBpsと同様に細胞内で増殖し細胞融合を引き起こす。私たちはこれまでに、Btの細胞内増殖にはT3SSが必要だが、BpsはBtにはない約25kbpの遺伝子座 (Bps-specific virulence gene locus; *Bsv locus*) によって、T3SSを欠損させても細胞内で増殖することを明らかにした (第75回日本細菌学会関西支部総会)。今回は、*Bsv locus*の機能解析を試みた。

Bpsの野生株、T3SS欠損株 (Bps Δ T3SS)、*Bsv locus*内の遺伝子 (*bsvB*) 欠損株および二重欠損株 (Bps Δ *bsvB* Δ T3SS) をマウス由来のマクロファージであるRaw264.7細胞に感染させ、4時間後の細胞内局在及び増殖性をそれぞれ検討した。蛍光顕微鏡下で、リソソームマーカーであるLamp-1と菌の局在を確認したところ、Bps Δ T3SSとBps Δ *bsvB* Δ T3SSはどちらもLamp-1と共局在したが、Bps Δ T3SSでのみLamp-1⁺小胞での増殖像が認められた。一方、酸性オルガネラのマーカーであるLysoTrackerとの共局在は、他の菌株と比べてBps Δ *bsvB* Δ T3SSにおいて高率に観察された。野生株はLamp-1ともLysoTrackerともほとんど共局在せず、細胞内での増殖が認められた。また、LLOMe (リソソーム膜損傷剤) またはバフィロマイシン (V-ATPase阻害剤、ファゴソームの酸性化を阻害する) 存在下で感染8時間後の細胞内菌数を測定したところ、両阻害剤処理細胞では未処理細胞に比べてBps Δ *bsvB* Δ T3SSの細胞内菌数が増加した。Bps Δ T3SSの菌数は阻害剤を加えても増減しなかった。細胞内における*bsvB*の発現量は野生株よりもBps Δ T3SSで高く、またBpsを酸性条件で培養すると*bsvB*の発現が上昇した。以上の結果からBpsは、T3SSが機能せずファゴソームから脱出できない場合、ファゴソームの酸性化に応じて*Bsv locus*の遺伝子群を発現し、さらなる酸性化を阻害することでリソソームによる消化を回避すると考えている。今後は*Bsv locus*依存的に産生される物質の同定とその機能解析を進めていく予定である。

トリテルペノイドによる多剤耐性黄色ブドウ球菌の薬剤感受性の増強作用

葛本さくら¹⁾, 岡 真優子¹⁾, 篠原明莉¹⁾, Dendi Krisna Nugraha²⁾, 中川一路³⁾, 堀口安彦²⁾

¹⁾京都府立大学大学院・生命環境・食環境安全性学,

²⁾大阪大学微生物病研究所・分子細菌学, ³⁾ 京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学

E-mail: mayuko-oka@kpu.ac.jp

【背景・目的】*Panax ginseng* (オタネニンジン) の根を蒸して加工したコウジンに含まれるトリテルペノイドのジンセノイド類は、protopanaxadiol (PPD) または protopanaxatriol (PPT) をアグリコンとする配糖体からなり、これまで 30 種類以上が分離されている。我々は、PPD 系 Rg3 (10 µg/mL) による黄色ブドウ球菌の二成分制御因子 SaeS/R の阻害と α -ヘモリジン毒素産生の抑制作用を報告した。また、Rg3 (>12.5 µg/mL) は、多剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対して ampicillin 感受性を増強させたが、他の PPD 系および PPT 系ジンセノイドによる増強作用はなかった。そこで、Rg3 による MRSA の抗菌薬耐性におよぼす作用機序を解析した。

【方法・結果】MRSA IID1677 株および BAA-1717 株では、Rg3 は β -lactam 抗菌薬 (oxacillin、ampicillin、carbenicillin、cefazolin) と aminoglycoside 抗菌薬 (kanamycin、gentamicin) の最小発育阻止濃度 (MIC) を 1/2–1/32 に低下させたが、fosfomycin および tetracycline の MIC には影響しなかった。一方、MRSA の β -lactam 抗菌薬の感受性を増強することが知られている界面活性剤 triton X-100 は、aminoglycoside 抗菌薬、fosfomycin および tetracycline の感受性を増強したため、Rg3 の抗菌薬感受性の増強作用は限局的で、Triton X-100 とは異なる作用機序によるものと考えた。次に、Rg3 をビオチン標識し、ストレプトアビジンビーズを使って MRSA のライセートから Rg3 の標的分子を探索した結果、Rg3 と結合する 26 kDa の膜輸送体を同定した。黄色ブドウ球菌は、他の細菌よりマクロファージ内で死にくいとされているため、マクロファージ内の MRSA に対する Rg3 と抗菌薬の相乗作用を検討した。THP-1 マクロファージに GFP 発現 USA300 株を感染直後と比較して、12 時間後の細胞内に取り込まれた MRSA は、gentamicin (0.625 µg/mL; 1/4 MIC) 単独では約 400 倍に増大したが、Rg3 および gentamicin 存在下では 3.5 倍であった。

【結論】ジンセノイド Rg3 は、黄色ブドウ球菌に対する抗毒素作用と抗菌薬感受性増強作用をもち、これまでの抗生物質とは異なる作用機序を示す抗菌物質である。

References

- (1) Raychaudhuri D, Chatterjee NA. 1985. Use of Resistant Mutants to Study the Interaction of Triton X-100 with *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 164:1337–1349.
- (2) Komatsuzawa H, Suzuki J, Sugai M, Miyake Y, Suginaka H. 1994. The effect of triton X-100 on the in-vitro susceptibility of methicillin-resistant staphylococcus aureus to oxacillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 34:885–897.

歴代開催地

回	開催年		開催地	会長	回	開催年		開催地	会長
	昭和	西暦				昭和	西暦		
1	昭和23年	1948	大阪	谷口 腴二	39	昭和61年	1986	下呂	三輪谷 俊夫
2	昭和24年	1949	京都	木村 簾	40	昭和62年	1987	京都	谷野 輝雄
3	昭和25年	1950	名古屋	木村 簾	41	昭和63年	1988	大阪	佐川 寛典
4	昭和26年	1951	京都	鈴木 成美	42	平成元年	1989	神戸	本間 守男
5	昭和27年	1952	神戸	田部井 和	43	平成2年	1990	大阪	矢野 郁也
6	昭和28年	1953	枚方	大澤 忍婦	44	平成3年	1991	吹田	井上 公蔵
7	昭和29年	1954	高槻	山中 太木	45	平成4年	1992	京都	今西 二郎
8	昭和30年	1955	岐阜	栗木 珍彦	46	平成5年	1993	奈良	竹田 美文
9	昭和31年	1956	大阪	桑島 謙夫	47	平成6年	1994	吹田	松田 守弘
10	昭和32年	1957	名古屋	小川 透	48	平成7年	1995	大津	瀬戸 昭
11	昭和33年	1958	枚方	梅本 芳夫	49	平成8年	1996	和歌山	宮本 博行
12	昭和34年	1959	津	堀川 高大	50	平成9年	1997	吹田	浜田 茂幸
13	昭和35年	1960	大阪	藤野 恒三郎	51	平成10年	1998	西宮	田村 俊秀
14	昭和36年	1961	京都	田部井 和	52	平成11年	1999	吹田	土肥 義胤
15	昭和37年	1962	和歌山	加藤 定吉	53	平成12年	2000	京都	西野 武志
16	昭和38年	1963	橿原	小谷 尚三	54	平成13年	2001	津	伊藤 康彦
17	昭和39年	1964	神戸	堀田 進	55	平成14年	2002	大阪	本田 武司
18	昭和40年	1965	京都	鈴木 成美	56	平成15年	2003	奈良	喜多 英二
19	昭和41年	1966	大阪	大澤 忍婦	57	平成16年	2004	京都	光山 正雄
20	昭和42年	1967	京都	田部井 和	58	平成17年	2005	神戸	堀田 博
21	昭和43年	1968	吹田	天野 恒久	59	平成18年	2006	高槻	佐野 浩一
22	昭和44年	1969	津	塩見 俊郎	60	平成19年	2007	大阪	杉本 央
23	昭和45年	1970	大阪	梅本 芳夫	61	平成20年	2008	京都	西淵 光昭
24	昭和46年	1971	大阪	桑島 謙夫	62	平成21年	2009	泉佐野	小崎 俊司
25	昭和47年	1972	高槻	山中 太木	63	平成22年	2010	枚方	藤澤 順一
26	昭和48年	1973	京都	菅沼 惇	64	平成23年	2011	堺	三宅 眞実
27	昭和49年	1974	橿原	櫻葉 周三	65	平成24年	2012	神戸	大澤 朗
28	昭和50年	1975	堺	阪口 玄二	66	平成25年	2013	吹田	堀口 安彦
29	昭和51年	1976	大阪	大山 昭夫	67	平成26年	2014	西宮	筒井 ひろ子
30	昭和52年	1977	吹田	川俣 順一	68	平成27年	2015	山科	後藤 直正
31	昭和53年	1978	京都	伊藤 洋平	69	平成28年	2016	大阪	西川 禎一
32	昭和54年	1979	西宮	庄司 宏	70	平成29年	2017	大阪	山崎 伸二
33	昭和55年	1980	大阪	増井 正幹	71	平成30年	2018	大阪	川端 重忠
34	昭和56年	1981	大阪狭山	山口 淳二	72	令和元年	2019	吹田	戸邊 亨
35	昭和57年	1982	大津	尾崎 良克	73	令和2年	2020	吹田	飯田 哲也
36	昭和58年	1983	大阪	近藤 雅臣	74	令和3年	2021	online	中野 隆史
37	昭和59年	1984	神戸	岸田 鋼太郎	75	令和4年	2022	京都	中川 一路
38	昭和60年	1985	宝塚	中井 益代	76	令和5年	2023	吹田	西野 邦彦

日本細菌学会関西支部会則

(総則)

第1条 この会則は、日本細菌学会会則（以下「学会会則」という。）第32条の規定に基づき日本細菌学会関西支部（以下「支部」という。）の運営について定めるものとする。

(会則)

第2条 支部会員は、学会会則第4条に規定する関西支部に所属する正会員、学生会員、名誉会員、賛助会員とする。他に支部功労会員を置くことができる。
2 功労会員は、支部に特に功労のあった支部会員で、別に定める功労会員選考細則によって選ばれた者である。

(目的)

第3条 本会は細菌学及びその関連領域の科学の進歩に寄与し社会に貢献する事を目的とする。

(役員)

第4条 支部には次の役員を置く。

- 一 支部長
- 二 幹事 10名以内
- 三 監事 2名
- 四 支部評議員 若干名

(支部長)

第5条 支部長は幹事の互選により選出する。
2 支部長の任期は3年とし、再任することはできない。
3 支部長は支部を代表し、支部会務を統括する。

(支部評議員・支部評議員会)

第6条 支部評議員を若干名置く。新評議員の選任は支部学術総会において十年以上学会活動もしくは同等の能力を持っている者について評議員 3名以上の推薦を受け、評議員会の議決を経て決定する。
2 評議員の任期は定めない。ただし、特別な理由の届出なしに評議員会を連続3回以上欠席した者は評議員の資格を失う。止むを得ず評議員会を欠席する場合にはあらかじめ支部長にその理由を届出るものとする。
3 評議員会は評議員をもって組織し、支部の重要事項を審議決定する。
4 評議員会に議長、副議長を置く。議長、副議長は評議員の互選によりこれを定める。

第7条 評議員会は、年次学術支部総会の会期中を含め、年1回以上開催し、支部長がこれを招集する。
2 議会は、出席者の過半数をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。

(幹事)

- 第8条 幹事は次の各号に掲げる者とする。
- 一 評議員の互選により選出されたもの8名以内。
 - 二 正会員のうちから、支部長が前号の幹事と協議して推薦するもの2名以内。
- 2 幹事の任期は3年とし、再任を妨げない。
ただし、その任期は、継続して6年をこえることはできない。
- 3 補欠の幹事の任期は、前任者の残任期間とする。
 - 4 幹事は、庶務、会計その他の業務を分掌する。

(幹事会)

- 第9条 幹事会は必要に応じ、支部長がこれを招集する。
- 2 幹事会の議長は、支部長をもってあてる。
 - 3 幹事会は、前条第1項により選出された幹事、および支部所属の理事をもって構成する。
 - 4 幹事会は、過半数の出席がなければ議事を開くことはできない。
 - 5 幹事会の議事は、出席者の過半数によって決し、可否同数の場合は、議長がこれを決する。

- 第10条 幹事会は、支部会務を執行する。
- 2 幹事会のもとに、会務総会を置く。

(会務総会)

- 第11条 会務総会は、年次学術支部総会の会期中に開くものとする。
- 2 会務総会は、支部長から支部の会務運営に関する報告をうけるものとする。

(年次学術支部総会)

- 第12条 年次学術支部総会は年1回開催し、細菌学および関連領域の研究の公表、討議を行う。

(監事)

- 第13条 監事は、評議員の互選により選出する。
- 2 監事の任期は3年とし、再任することはできない。
 - 3 監事は、幹事会の業務執行および資産状況を監査する。

(総会長)

- 第14条 毎年、次年度および次々年度総会長を会員のうちから、幹事会の推薦に基づき、評議員会の議を経て決定する。
- 2 総会長は、年次学術支部総会を主宰する。

(支部会計)

第15条 支部の経費は、本部援助金、資産より生ずる利息、寄付金その他の収入をもってこれにあてる。

2 会計年度は、1月1日から12月31日までとする。

(所在地)

第16条 本支部は支部長が幹事会の議を経て定めた場所に置く。

附則

この会則は、昭和 53 年 10 月 28 日から施行する。

2 この会則および会費の変更は、評議会の議決を経て、全会員の5分の1以上の出席する支部会務総会において、過半数の同意により成立する。

附則

この会則は、昭和 59 年 11 月 17 日から施行する。

この会則は、平成 30 年 10 月 28 日から施行する。

この会則は、令和 3 年 11 月 13 日から施行する。

功労会員選考細則

(目的)

1 この細則は、日本細菌学会関西支部会則第2条第2項に規定された功労会員の選出方法を規定する。

(選出方法)

2 功労会員候補者の推薦は、支部評議員5名以上の連名推薦届を支部長に提出することによって成立する。

3 功労会員候補者は支部幹事会において選考し、支部評議員会の議を経て功労会員に決定される。

(候補者の資格)

4 長年にわたり支部会員として、微生物学の進展及び支部会の運営に著しい貢献をした者であること。

附則

この細則は、昭和 59 年 11 月 17 日から施行する。