

し、37℃で1時間、96穴プレートに coating した。

②プレートを蒸留水で3回洗浄後、0.1% BSA で blocking した。

③プレートを蒸留水で3回洗浄後、希釈した上記各サンプルをプレートに加え、37℃で1時間 incubate した。④プレートを蒸留水で3回洗浄後、Biotin 化した P2-IgG (5 μ g/ml) をプレートに加え、37℃で1時間 incubate した。

⑤プレートを蒸留水で3回洗浄後、Vector 社の Alkaline phosphatase streptavidin を加え、室温で1時間 incubate した。

⑥プレートを蒸留水で3回洗浄後、substrate (Sigma 社、FAST p-nitrophenyl phosphate tablet set) をプレートに加えて発色させ、405 nm の吸光度を測定した。

5.供試菌株：9血清型261株のサルモネラ属菌と陰性コントロールとして大腸菌 MC1061 株を用いた。

6.サンプル調整：各菌株をそれぞれ LB 培地に接種し、37℃で一昼夜振盪培養した。遠心集菌後、菌体を蒸留水に懸濁して超音波破碎し、これらの遠心上清を検査サンプルとした。

C. 実験結果

1.構築した Sandwich ELISA の特異性の検討：S. Enteritidis 363 株（陽性コントロール）と大腸菌 MC1061 株のサンプルを段階希釈して、その反応性を比較検討した。図5に見られるように、2倍希釈まで両者の間には有意の差が見られ、今回、構築した Sandwich ELISA の特異性を証明した。

2.サルモネラ属菌の Stn 産生の検討：1で、構築した Sandwich ELISA の特異性が証明できたので、9血清型261株のサルモネラ属菌における Stn の産生性を調査した。その結果、サルモネラ属菌における Stn の産生性は様々である事が分かった（表3）。

D. 考察と結論

今回、構築した Sandwich ELISA は陰性コントロールである大腸菌 MC1061 株と比較して、特異的に Stn を検出できることが分かった。このサンドイッチELISAを用いて、患者および食肉由来の9血清型261株のサルモネラ属菌のエンテロトキシン産生の検討を行った。この結果、全ての菌株はPCR法により *stn* 遺伝子の存在が確認されている事より、*stn* 遺伝子が存在していても Stn が必ずしも産生されている訳ではないことが分かった。Stn 産生には非産生から高度産生までの違いが見られた事から、1) *stn* 遺伝子自体の変異、2) transcriptionの量的差異、及び3) Stn 産生を規定する調節系の存在等が考えられる。現在、これらの点に関して検討を行うと共に、この検出系を用いて Stn のホロ毒素の精製を行っており、Stn が実際に下痢原性に関与しているか否かの検討を行う予定である。サルモネラ属菌の汚染は恒常的に起こっており、臨床の現場ばかりではなく生産や流通の現場でも簡便に検査が行われる必要がある。今回、Stn に対する特異的な免疫学的同定法を確立できたことで、Stn のホロ毒素を精製する際に不可欠な検査法を手に入れることが出来た。このシステムを用いて、現在、Stn のホロ毒素の精製を行っている。将来的には Stn のホロ毒素の精製を完了して、これに対する抗血清を調整し、どのようなサンプルに対しても、更にどのような場所でも、Stn の検出が可能な迅速診断法（スティック法等）の確立を目指す。

環境への配慮

菌株の取り扱い、培養およびサンプル調整は全て P2 実験室で行い、汚染物は全てオートクレーブによる滅菌を施し、環境への汚染を排除した。

表1. *stn*遺伝子の臨床及び食肉分離サルモネラ属菌における分布

Serovar (Number)	Source		
	Human	Foods	Total
<i>S. Anatum</i> (34)	28	6	34
<i>S. Derby</i> (52)	48	4	52
<i>S. Enteritidis</i> (67)	34	33	67
<i>S. Paratyphi B</i> (16)	3	13	16
<i>S. Typhimurium</i> (17)	13	4	17
<i>S. Weltevreden</i> (69)	66	3	69
Other serovars (308)	240	68	308
<i>C. freundii</i> (52)	0	0	0
<i>E. coli</i> (39)	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (17)	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i> (31)	0	0	0
other species (85)	0	0	0

表2. 使用したサルモネラ属菌の血清型及びそのSource

Serovar	Sources	
	Cattle	Fowl
<i>S. Agona</i>	1	3
<i>S. Anatum</i>	1	-
<i>S. Bredeney</i>	3	-
<i>S. Cerro</i>	-	3
<i>S. Dublin</i>	16	-
<i>S. Enteritidis</i>	6	-
<i>S. Give</i>	-	7
<i>S. Hadar</i>	2	-
<i>S. Infantis</i>	1	2
<i>S. Montevideo</i>	-	3
<i>S. Newport</i>	2	-
<i>S. Panama</i>	1	-
<i>S. Senftenberg</i>	-	5
<i>S. Typhimurium</i>	21	2
Other serovars	5	2
Unidentified	3	-
Total	62	27

Serotypes containing more than 2 isolates were shown in this Table.
 -: not isolated.
 Unidentified; undefined serotype.

表3. サルモネラ属菌のStn産生の検討

Serotype	Stn production					
	Human isolates			Meat samples		
	-	±	+	-	±	+
Agona	0	0	13	0	0	10
Anatum	1	0	16	0	0	16
Choleraesuis	9	0	0	2	0	0
Derby	1	21	16	0	4	10
Enteritidis	0	9	12	1	31	14
Rissen	4	0	0	11	6	0
Stanley	0	13	2	0	7	1
Typhimurium	3	0	0	4	5	3
Virchow	9	1	1	3	2	0

- :MC1061株と同程度の反応
 ±:MC1061株の2倍程度の反応
 +:MC1061株に対して有為な反応

図1. *stn*遺伝子検出用プライマー及びoligo probeの*stn*遺伝子上の位置

```

TTGTTAATCCTGTTGTCTCGCTATCACTGGCAACCAGATAGTAAAGACCGCGCCTTACC
CTCAATACTTTTACCTTAATCGCGCCGCCATGCTGTTTCGATGATATTTGCACCACAGC
CAGCCCCAGGCCTGTCCCGTCAGCTTGGTTCGTAATAAGCGGTAAAAATCGCCTCCAG
                                144          164
                                Upstream
CTGATCCGGGGCGATCCCTTTCCCGCTATCGGTACAGTGTGATAACGGGTCGGTCCC
                                251          280
ACTTTCTTTTGCCTCTACGCTAATCGTTCCTCGCGGCCAATCGCATGAATAGCGTTCAG
                                Probe for Southern blot hybridization
GTACAGATTCAACAGCACCTGAGTCAGCCTGTCCGGGTCAGCCTGAATACGCTTAAGCGT
                                384          403
CTCATTCCGGCGTAATCTCAACTGAATCTCTCTGCTTTGGGCATCCTGACTGACCAGATT
                                Downstream
CAGGGAGTGAGTAATAATATCATTGAGGTTAACCGTCTGGAGCGTCAGATGCGCGGGCTT
TACCAGTTCGAGCAATTCGCTTACCACCCGGTTCAAACGGTCGGCCTCTTTGGCCATCAC
    
```

図2. 各種サンプルにおけるPCR産物のProfile

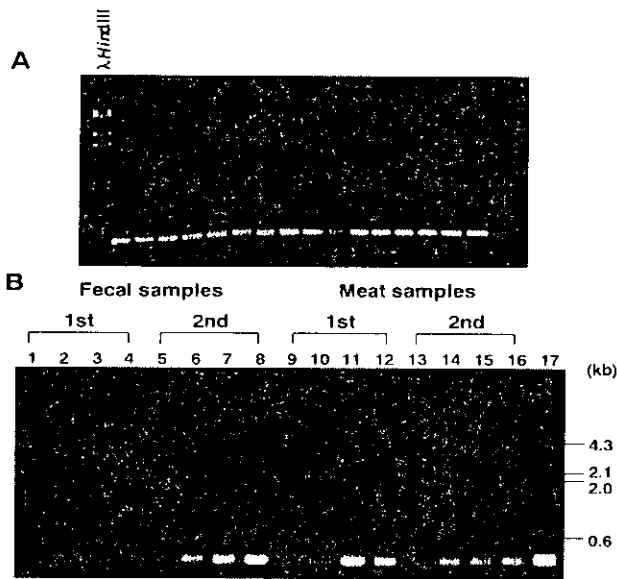


図3 合成ペプチドのStn上の位置

```

                                11          24
LLILLSRYHWQPDSKDRAFTLNTFHLNRAAMLFDDILHHSQ
PQACPVSFGRKIRRNRLQLIRGDPEPAIGNSDDNAVGPFFFLY
ANRSLAANRMNSVQVQIQHLSQPVRVSLNTLKRILIRRESQLNLS
ALGILTDQIQGVSNIIIEVNRLEQRMRGLYQFEQFAYHPVQTVGL
                                193          207
FGHHLRQFMRLAAGRRALGKVFROPFDGRERVTNFVRDARR
QMPHRHQFFTLHCIKQFSVRALITLMPKKRQ
    
```

図4 構築したSandwich ELISAの模式図

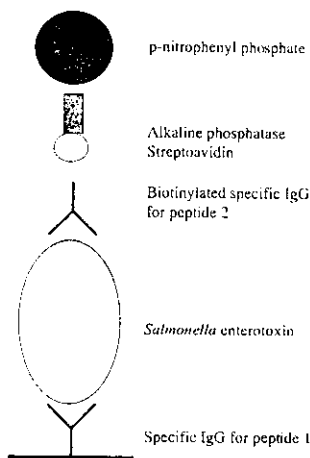
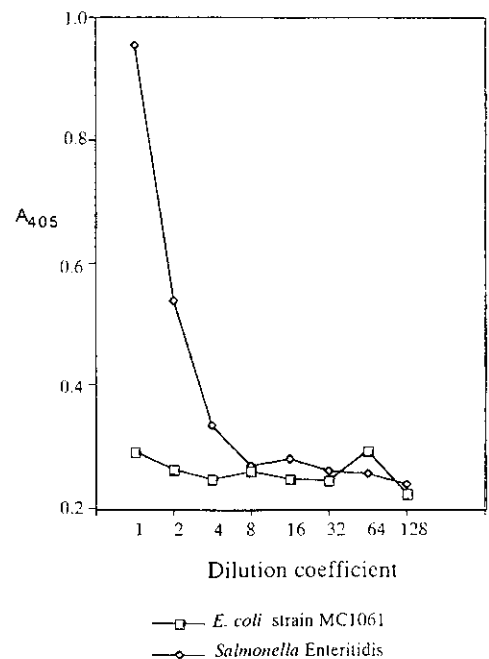


図5 構築したSandwich ELISAの検定



研究発表 (原著論文)

1. Makino, S-I., H. Kurazono, M. Chongsa-nguan, H. Hayashi, H. Chun, S. Suzuki, T. Shirahata: Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. J. Vet. Med. Sci. 1999, 61: 1245-1247.
2. Tapchaisri, P., P. Wangroongsarb, W. Panbangred, T. Kalambaheti, M. Chongsa-nguan, P. Srimanote, H. Kurazono, H. Hayashi, W. Chaicumpa: Detection of *Salmonella* contamination in food samples by Dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. 1999, Asian Pac. J. Allergy Immunol. 17: 41-51.
3. Nagata, H., A. Wada, H. Kurazono, K. Yahiro, D. Shirasaka, T. Ikemura, N. Aoyama, W. Ai-ping, K. Makiyama, S. Kohno and T. Hirayama: Application of Bead-ELISA method to detect *Helicobacter pylori* VacA. Microb. Pathog. 26: 103-110, 1999.
4. Yahiro, K., T. Niidome, M. Kimura, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, K. Imagawa, A. Wada, J. Moss, and T. Hirayama: Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa-protein, receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) b. J. Biol. Chem. 274: 36693-36699, 1999.
5. Shirasaka, D., N. Aoyama, K. Satonaka, K. Shirakawa, H. Yoshida, T. Sakai, T. Ikemura, Y. Shinoda, M. Sakashita, M. Miyamoto, K. Yahiro, A. Wada, H. Kurazono, T. Hirayama, M. Kasuga: Analysis of *Helicobacter pylori* vacA gene and serum antibodies to VacA in Japan. Digestive Diseases and Sciences. 45(4): 789-795, 2000.
6. Kurazono, H., S. Yamamoto, M. Nakano, G.B. Nair, A. Terai, W. Chaicumpa, and H. Hayashi: Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. Microb. Pathog. 28(3): 183-189, 2000.
7. Srimanote, P., W. Ittiprasert, B. Sermsart, U. Chaisri, P. Mahannop, Y. Sakolvaree, P. Tapchaisri, W. Maleewong, H. Kurazono, H. Hayashi, and W. Chaicumpa: *Trichinella spiralis*-specific monoclonal antibodies and affinity-purified antigen-based Diagnosis. Asian Pac. J. Allerg. Immunol. 18: 37-45, 2000
8. Yamamoto, M., H. Kiyono, Mi-Na, Kweon, S. Yamamoto, K. Fujihashi, H. Kurazono, K. Imaoka, H. Bluethmann, I. Takahashi, Y. Takeda, M. Azuma, and J. R. McGhee: Enterotoxin adjuvants have direct effects on T cells and antigen-presenting cells that result in either Interleukin-4 dependent or -independent immune responses. J. Infect. Dis. 182 (1): 180-190, 2000
9. Ittiprasert, W., P. Butraporn, V. Kitikoon, K. Klongkamnuankarn, K. Pholsena, V. Vanisaveth, Y. Sakolvaree, M. Chongsa-nguan, P. Tapchaisri, Y. Mahakunkijcharoen, H. Kurazono, H. Hayashi, and W. Chaicumpa: Differential diagnosis of schistosomiasis mekongi and trichinellosis in human. Parasitol. Int. 49: 209-218, 2000.
10. Yamamoto, S., M. Nakano, A. Terai, K. Yuri, K. Nakata, G. B. Nair, H. Kurazono, O. Ogawa: The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection as determined by experimental mouse model. J. Urol. 165(3): 1347-1351, 2001.

11. Ogushi, K., A. Wada, T. Niidome, N. Mori, K. Oishi, T. Nagatake, A. Takahashi, H. Asakura, S-I. Makino, H. Hojo, Y. Nakahara, A. Ohsaki, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, J. Moss, T. Hirayama: *Salmonella enteritidis* FilC (flagella filament protein) induces human β -defensin-2 (hBD-2) mRNA production by Caco-2 cell. J. Biol. Chem. 2001, 276: 30521-30526.
12. Asakura, H., O. Tajima, M. Watarai, T. Shirahata, H. Kurazono, S-I., Makino: Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chicks. J. Vet. Med. Sci. 2001, 63: 1221-1224.
13. Hamanaka, Y., M. Nakashima, M. Ito, A. Wada, H. Kurazono, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Kohno, T. Hirayama, I. Sekine: Expression of human β -defensin-2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori*-induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against for *H. pylori*. Gut. 49(4): 481-487, 2001
14. Urai, C., M. Nagata, H. Kurazono, H. Horie, P. Tongtawe, H. Hayashi, T. Watanabe, P. Tapchaisri, M. Chongsa-nguan, W. Chaicumpa: Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. Microb. Pathog. 31(2): 59-67, 2001.
15. Nakano, M., S. Yamamoto, A. Terai, O. Ogawa, S. Makino, H. Hayashi, G.B. Nair, H. Kurazono: Analysis of the gene organization of the new pathogenicity island detected in uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 27: 71-76, 2001.
16. Sonjai K., R. Soisangwan, Y. Sakolvaree, H. Kurazono, M. Chongsa-nguan, P. Tapchaisri, Y. Mahakunkijcharoen, G. B. Nair, H. Hayashi, W. Chaicumpa: Validation of salmonellosis and shigellosis diagnostic test kits at a provincial hospital in Thailand. Asian Pac. J. Allerg. Immunol. 2001, 19: 115-127.
17. Takahashi, A., K. Ogushi, A. Wada, K. Maeda, T. Kawahara, K. Mawatari, H. Kurazono, J. Moss, T. Hirayama, Y. Nakaya: Production of β -defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. FEBS Lett. 508(3): 484-488, 2001.
18. Saengjaruk P., W. Chaicumpa, G. Watt, P. Tapchaisri, C. Sittinont, K. Tomnakan, MAL. Wambongco, M. Chongsa-nguan, Y. Mahakunkijcharoen, T. Kalambaheti, Y. Sakolvaree, P. Naigowit, H. Kurazono, H. Hayashi: Diagnosis of human leptospirosis by Monoclonal antibody based-antigen detection in urine. J. Clin. Microbiol. 40 (2): 480-489, 2002.

研究発表 (学会発表)

1. 倉園久生、寺井章人、山本新吾、中野政之、林英生：尿路病原性大腸菌の産生する ZOT (Zonula Occludens Toxin) 様蛋白の尿路病原性への関与。第 72 回日本細菌学会総会 (砂防会館別館、全共連ビル会議室、東京都千代田区平河町) 1999.3.24-26.
2. 八尋錦之助、和田昭裕、Philip Padilla、木村美幸、新留琢郎、畠山智充、倉園久生、青柳東彦、平山壽哉：*Helicobacter pylori* の空胞化毒素 VacA の宿主受容体蛋白質の解析。第 72 回日本細菌学会総会 (砂防会館別館、全共連ビル会議室、東京都千代田区平河町) 1999.3.24-26.
3. 林俊治、下村裕史、倉園久生、林英生、和田昭裕、平山壽哉、横田憲治、小熊恵二、平井義一：*Helicobacter pylori* の各増殖期における菌体構成成分および上清中の VacA

- 量の変化。第 72 回日本細菌学会総会（砂防会館別館、全共連ビル会議室、東京都千代田区平河町）1999.3.24-26.
4. 牧野壮一、朝倉宏、白幡敏一、倉園久生、塚本定三、池田徹也、武士甲一：種々の動物由来腸管出血性大腸菌の性状。第 72 回日本細菌学会総会（砂防会館別館、全共連ビル会議室、東京都千代田区平河町）1999.3.24-26.
 5. Hirayama, T., Yahiro, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Imagawa, I., Moss, J., and Wada, A.: Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250kDa receptor protein, Tyrosine phosphatase (RTP) beta. 99th General Meeting of American Society for Microbiology (McCormic Place, Chicago, USA) 1999.5.30-6.03.
 6. 平山壽哉、和田昭裕、八尋錦之助、Philip Ian Padilla、木村美幸、倉園久生、今川健一、新留琢郎、青柳東彦、Joel Moss: *H. pylori* VacA毒素の受容体、Protein Tyrosine Phosphatase b (RTPb/PTPz) の証明、第 5 回日本ヘリコバクター学会（新潟市民芸術文化会館、新潟県新潟市）1999. 6. 17-18.
 7. Tongtawe, P, Chaisri,, U, Kai, A, Chongsanguan, M, Tapchaisri, P, Kurazono, H., Hayashi, H, and Chaicumpa, W: Detection of *Escherichia coli* O157 antigen and shiga-like toxin in clinical specimens using monoclonal antibodies. 第 40 回日本熱帯医学会・第 14 回日本国際保健医療学会合同大会（国立国際医療センター、東京都新宿区戸山）1999.9.3.-5.
 8. 倉園久生、山本新吾、中野政之、由里和世、中田勝久、片江宏巳、寺井章人、林英生：尿路病原性大腸菌の新しい Pathogenic island。第 52 回日本細菌学会中国・四国支部総会（出雲医師会館、島根県出雲市）1999.10.21-22.
 9. 中野政之、山本新吾、由里和世、中田勝久、片江宏巳、寺井章人、林英生、倉園久生：尿路病原性大腸菌の新しい病原因子の同定とその解析。第82回日本細菌学会関東支部総会（サンレイク土浦、茨城県土浦市）1999. 11. 18-19.
 10. Kurazono, H., Yamamoto, S, Nakano, M, Nair, GB, Terai, A, Chaicumpa, W, and Hayashi, H: Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program; Thirty-fifth Joint Conference on Cholera and other Bacterial Enteric Infections Panel (Radisson Hotel, Baltimore, USA) 1999. 12.3-5.
 11. Makino, S-I., M. Chongsa-nguan, H. Kurazono, H. Hayashi: Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples.第 40 回日本熱帯医学会・第 14 回日本国際保健医療学会合同大会。国立国際医療センター、東京都新宿区戸山、1999 年 9 月 3 日 5 日。
 12. Wada, A., K. Ogushi, PI. Padilla, M. Se, H. Kurazono, J. Moss, T. Hirayama. *Salmonella* species induce β -defebisin-2 mRNA expression in human Caco-2 cell line. The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program: Thirty-fifth Joint Cofferece on Cholera and other Bacterial Enteric Infections Panel. 1999, 3-5 December, Radisson Hotel, Baltimore, U.S.A.
 13. Kurazono, H., Yamamoto, S, Nakano, M, Nair, GB, Terai, A, Chaicumpa, W, and Hayashi, H: Characterization of a putative virulence island in the chromosome of

- uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program; Thirty-fifth Joint Conference on Cholera and other Bacterial Enteric Infections Panel (Radisson Hotel, Baltimore, USA) 1999. 12.3-5.
14. 山本新吾、寺井章人、倉園久生、小川修：尿路病原性大腸菌における新しい病原因子uropathogenic specific protein (USP)の分布および血清型との関連性の検討。第74回日本感染症学会総会（アクロス福岡、福岡市）2000. 4. 20-21.
 15. Yamamoto S, Terai A, Nakano M, Yuri K, Nakata K, Nair GB, Kurazono H, Ogawa O: Assessment of a putative virulence factor of uropathogenic *Escherichia coli* in experimental urinary tract infection model. 95th Annual Meeting of American Urological Association (Atlanta, USA) 2000.4.29-5.4.
 16. 山本新吾、寺井章人、中野政之、由里和世、中田勝久、G. Balakrish Nair、倉園久生、小川 修：大腸菌尿路病原因子uropathogenic specific protein (USP)のマウス腎盂腎炎モデルにおける病原性の検討。第88回日本泌尿器科学会総会（ロイトン札幌、北海道札幌市）2000. 6. 7-10.
 17. 大串賢一、和田昭裕、新留琢郎、畠山智充、青柳東彦、倉園久生、平山壽哉：*Salmonella enteritidis*のhuman β -defensin-2発現誘導物質の精製とその性状解析。第73回日本細菌学会総会、2000年5月29日 31日、京王プラザホテル札幌、北海道札幌市。
 1. 八尋錦之助、和田昭裕、新留琢郎、青柳東彦、倉園久生、藤澤順一、木村貴弘、平山壽哉：*H. pylori*の空胞化致死毒素(VacA)受容体解析：RTP β 遺伝子の導入と毒素感受性獲得。第73回日本細菌学会総会（京王プラザホテル札幌、北海道、札幌市）2000. 5. 29-31.
 19. 下村裕史、林俊治、斎藤慎二、倉園久生、平山壽哉、横田憲治、小熊恵二、平井義一：*Helicobacter pylori* (HP) の球状化における脂質成分およびVacA量の変化。第73回日本細菌学会総会（京王プラザホテル札幌、北海道札幌市）2000. 5. 29-31.
 20. Masayuki Nakano, Hisao Kurazono, Shingo Yamamoto and Hideo Hayashi: Characterization of a novel uropathogenic specific gene (*usp*) in uropathogenic *Escherichia coli*. 2000 joint scientific meeting and exhibition of the Australian society for Microbiology, Cairns, Australia, 2000.7.8-13.
 21. 倉園久生、山本新吾、中野政之、寺井章人、林英生、小川修：尿路病原性大腸菌の Pathogenic island の解析。第47回毒素シンポジウム（倉敷公民館、岡山県倉敷市）2000.7.25-27.
 22. 倉園久生、山本新吾、中野政之、由里和世、中田勝久、寺井章人、小川修、牧野壮一：人および愛玩動物由来の尿路病原性大腸菌の新しい Pathogenic island の解析（ワークショップ；局所免疫と感染症）。第130回日本獣医学会学術集会（大阪府立大学、大阪府堺市）2000.10.7-9.
 23. 倉園久生、山本新吾、中野政之、寺井章人、林英生、小川修：尿路病原性大腸菌の Pathogenic island の解析。第53回日本細菌学会中国・四国支部総会（サンピア福山、広島県福山市）2000.10.7-9.
 24. Chaisri, U., M. Nagata, H. Horie, P. Tongtawe, H. Kurazono, H. Hayashi, T. Watanabe, P. Tapchaisri, M. Chongsa-Nguan, and W. Chaicumpa: Localization of Stx(s) in intoxicated mice and hemolytic uremic syndrome (HUS) patients. XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney, Australia, 2000.10.15-20.

25. Chongsa-nguan, M., G. B. Nair, T. Ramamurthy, S. Yamasaki, U. Chaisri, P. Tongtawe, P. Tapchaisri, Y. Sakolvaree, Y. Mahakunkijcharoen, H. Kurazono, H. Hayashi, Y. Takeda, and W. Chaicumpa: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from cattle in Bangkok. 4th International symposium and workshop on "Shiga toxin (Verocytotoxin) - producing *Escherichia coli* infections". Kyoto, Japan, 2000.10.29-11.2.
26. 大串賢一、和田昭裕、新留琢郎、畠山智充、青柳東彦、倉園久生、牧野壯一、平山壽哉：*Salmonella enteritidis*の*FilC*によるhuman β -defensin-2発現誘導機序の解析。第74回日本細菌学会総会、2001年4月2日 4日、コンベックス岡山、岡山県岡山市。
27. 八尋錦之助、和田昭裕、木村美幸、新留琢郎、青柳東彦、木村貴弘、倉園久生、藤澤順一、平山壽哉：*Helicobacter pylori* VacA毒素の毒性発現：受容体RTPbetaの変異と毒素感受性。第74回日本細菌学会総会（コンベックス岡山、岡山市）、2001. 4. 2-4.
28. 山本新吾、中野政之、牧野壯一、寺井章人、林英生、倉園久生：人および愛玩動物由来の尿路病原性大腸菌(UPEC)に存在するPathogenic islandの解析。第74回日本細菌学会総会（コンベックス岡山、岡山市）、2001. 4. 2-4.
29. 倉園久生、M. Chongsa-nguan、W. Chaicumpa、G.B. Nair、太田敏子、林英生、牧野壯一：サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの検出法の確立。第48回毒素シンポジウム、2001年7月25日 27日、千葉大学けやき会館、千葉県千葉市。
30. 八尋錦之助、和田昭裕、木村美幸、木村貴弘、新留琢郎、青柳東彦、倉園久生、藤澤順一、平山壽哉：*Helicobacter pylori*の産生するVacA毒素の宿主受容体(RTP β)の構造活性相関。第48回毒素シンポジウム

2001年7月25日 27日、千葉大学けやき会館、千葉県千葉市。

31. Kurazono, H., M. Chngsa-nguan, W. Chaicumpa, G. B. Nair, T. Ohta, H. Hayashi, S-I. Makino: Establishment of the detection system for *Salmonella* enterotoxin.平成13年度日米医学協力会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会総会、2001年8月27日、国立感染症研究所、東京都新宿区戸山。
- 32.倉園久生、太田敏子、林英生、牧野壯一：サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの検出法の確立。第54回日本細菌学会中国・四国支部総会、2001年10月18日 19日、三光荘、岡山県岡山市。

知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興研究事業）
分担研究報告書

遺伝子ノックアウト法を使った *Salmonella* の病原性の解析および Micro PCR 法の開発

分担研究者 江崎孝行 岐阜大学医学部微生物学講座

研究要旨

Salmonella の迅速診断法として、enterotoxin *stn* と侵入因子 *invA* を指標として、その Primer セットを利用した 384Well を用いた Real Time Capillary PCR 法を開発した。*Salmonella enteritidis* の検出には *rfbE* と *fliC* の *gmp* 抗原を増幅する 2 つの Primer で特定が可能である。血清型の迅速診断法として、O 抗原合成遺伝子群から 11 種を選び、その Primer セットを利用した 384Well を用いた Real Time Capillary PCR 法を開発した。この方法では食品などに混入した菌の存否を 1 時間以内で、血清型の予測は 2 時間程度で可能になる。この結果をさらに確認する場合には、別に作製した約 600 種類の遺伝子の DNA チップを用い、増幅した DNA 断片の遺伝子確認が可能であるが、更に半日を要する点にやや難点がある。

Salmonella の病原因子として Vi 抗原について検討した。Vi 抗原欠損株は血中では、正常血清中に存在する殺菌因子により殺菌され増殖出来ない。すなわち Vi 抗原は血中に棲息し、マクロファージなどの貪食細胞内で増殖するためには必須因子であり、敗血症を呈するにはこの Vi 抗原が重要な病原因子となる。高浸透圧で培養した菌は Vi 抗原の発現は抑制されるが、鞭毛抗原や SipC（分泌タンパク）が多量に産生される。この状態の菌を 2 週間にわたって静脈栄養で飼育したラットに経口摂取すると、腸管の Peyer's Patch が速やかに傷害され出血斑が生じた。すなわち、鞭毛抗原や SipC は上皮細胞への侵入と、機能障害には必須であることが判明した。しかし、SipC の変異株は貪食細胞内では野生株以上に増殖することから、SipC は細胞内増殖能には関与しないことがわかった。

約 600 種類の遺伝子断片を用いて Homologous Recombination 法で変異株を作製し、DNA チップで各遺伝子機能を解析した。OmpR 変異株の解析から、低浸透圧では多くのタンパク合成系（mRNA として）が抑制されるが、高浸透圧では野生株は速やかに各種のタンパク合成が上昇するものの、変異株では遅れて合成が起こることがわかった。すなわち、浸透圧感受性調節機構には Omp 系以外の調節系があることが示唆された。この DNA チップは今後病原遺伝子の機能解析にきわめて有用である。

各種変異株の解析から、いわゆる教育用に安全な *Salmonella* の作製を試みた。その結果、*vi*、*invA*、*invB*、*rpoS* の 4 遺伝子を破壊すれば、殆ど病原性は欠落することがわかり、これを教育用菌株として利用することを提唱した。

A. 研究目的

Salmonella 属の菌種は遺伝学的に均一であるが鞭毛抗原と糖鎖の抗原により 2000 種類以上の血清型に細分されている。この中の特定の血清型が特定の動物に特異的な感染を起こすがその理由は解明されていない。

1. 我々はチフス菌を用いて菌種が特異的にヒトに病気を起こす理由を解析するため、侵入における様々な分泌蛋白と表面抗原の役割を解析することを目的として様々な遺伝子欠損株を作成し解析する実験法を作成した。2. 侵入及び、食細胞内での増殖に関与する遺伝子を解析するためサルモネラの遺伝子チップを作成し食細胞内でのサルモネラの mRNA の発現を解析するシステムの作成を計画した。この成果は将来のワクチン開発の基礎データを提供することができるかと予測している。
3. サルモネラ感染症の迅速診断および汚染食品の迅速診断のために遺伝子を 15 分で増幅できる capillary PCR 法、及び 384 well を使用した微量で迅速な検出方法を検討した。

B. 研究方法

1. チフス菌の表面抗原である Vi 抗原の合成遺伝子群および侵入に関与する蛋白とその発現調節遺伝子群を homologous recombination 法で in frame deletion mutants を作成し、培養細胞を用いた感染実験、およびラットの腸管を使った感染実験を行い

野生株と比較し、機能を解析する。

2. サルモネラの遺伝子約 600 種類を選択しチップに固定するための primer を作成する。
遺伝子は 3 末端から 5 末端に向けて原則として 1000 塩基の長さになるようにデザインした。
3. *Salmonella* の O 抗原の合成遺伝子、vi 遺伝子、および鞭毛の flagellin 遺伝子を使いヒトに病気を起こす主要は *Salmonella* の血清型を同定検出する 11 種類の primers セットを作成した。この primer を使用して Real time PCR を 384 well で実施し微量化と迅速化を図る方法を作成した。

C. 研究結果

1. チフス菌は環境の変化を認識してその表面抗原を巧みに変化させ病原性を発揮している。環境指標として食塩濃度を選択して、食塩濃度の違いによってどのようにチフス菌が病原因子の発現をコントロールしているかを解析した。食塩濃度がうすい環境でチフス菌は病原因子である Vi きょう膜抗原を発現させた。それと同時に鞭毛抗原の発現量を減少させ、さらに分泌蛋白量を減少させていた。塩濃度が低い環境では培地中に分泌される蛋白のほとんどは鞭毛抗原で占められていた。一方食塩濃度を 200 mM まで増やすと Vi 抗原の発現は抑制され、逆に鞭毛抗原の量が増加した。さらに分泌蛋白の量も著しく増加していた。

2. 分泌蛋白はチフス菌が腸管で上皮細胞に接触した際に分泌されるとされているが、高い食塩濃度の環境で培養すると上皮細胞との接触とは無関係に SipC 蛋白を大量に分泌していた。この環境で培養したチフス菌は組織侵入性が高まっていた。ラットは本来、チフス菌には抵抗性で一億個の細菌を腸管に投与しても何の変化も起きず感染しない。ところが2週間静脈栄養を行ったラットに 200 mM で培養したチフス菌を培養液と一緒に投与すると 15 分で明らかにパイエル板の M 細胞から侵入した。約 30 分後にはパイエル板の構造を破壊した。上皮細胞だけでなく基底膜も破壊され点状出血が肉眼で確認できるまで出血が拡大した。

一方これらの変異株は食細胞にどん食させると野生株以上に食細胞内でよく増殖したことから、分泌蛋白は食細胞内での増殖にはマイナスの因子であることがわかった。また食細胞内では野生株は Vi を大量に発現しており、分泌蛋白の生産は抑制されていた。Vi 欠損株は食細胞内では増殖ができなかったことから食細胞内での増殖には Vi の発現が不可欠であることがわかった (文献1)。

この研究を通じて作成した様々な病原因子の欠損変異株を作成した。変異株の作成には基本的には遺伝子をノックアウトさせた株を作成したため double, あるいは triple の遺伝子ノックアウトが容易に実施できる。そのため将来、ワクチン株の候補になる可能性を持った株が作成できた。特に Vi 欠損株に RpoS, InvA, SipB の欠損株を作成し、医師の教育や臨床検査の標準株として安全に使用できる株を作成した。Vi を欠損させることでこの株は血清に感受性になり速やかに血清中では死滅するが、組

織侵入性があがったため侵入に関与する InvA, および invB を欠落させた (文献2)。さらにこの3つの遺伝子の欠損株でも日和見感染をおこすことが考えられるため、RpoS 変異株を作成し、過酸化水素、及びストレスに感受性になり食細胞内で増殖できなくした。(投稿準備中)

3. 昨年度の研究で作成した primer を使用してサルモネラのマイクロアレイを作成した (補遺参照)。

このマイクロアレイを利用しては各種条件で培養したチフス菌の野生株と変異株 mRNA の発現をチップで定量し比較する実験を行った。低浸透圧で培養したチフス菌と ompR 変異株を腸管と同じ条件の高浸透圧になるように食塩を加え 300 mM の環境におき、15 分ごとに mRNA の発現の違いを比較した。低浸透圧状態では両菌株とも mRNA の総量は著しく抑制されていたが、高浸透圧条件にシフトさせ 15 分後には野生株では速やかに mRNA の発現が変化した。一方 ompR 欠損株では高浸透圧にシフト後およそ 1 時間で野生株と同じレベルに mRNA の発現量の総量が快復した。このことから浸透圧センサーといわれる ompR の欠損株は環境応答が悪くなるが、時間の経過とともに ompR を介しない調節系が作動し、新しい環境に適応していることがわかった。

4. 作成した primer で各 *Salmonella* の血清型の遺伝子を特異的に増幅することを確認した (補遺参照)。現在一般に行われている 96 well での PCR を 384 well で微量化するための実験を行った、この方法をとれば 10 種類の primer を使用しても従来の一本分に相当するコストで可能となる。今後は Capillary 法による検出系の感度の測定が残されている。

InvA および Enterotoxin の primer は *Salmonella* 全体の検出に、*S. enteritidis* の検出には *rfbE* 遺伝子と *fliC* の *gmp* 抗原を増幅する 2 つの primer の組み合わせで検出系が作成できることが確認された。増幅産物の確認には 3 つの可能性を検討した、一つは real time PCR で増幅しながら産物を確認するため増幅時間は 20 分と最も迅速に結果を判定できる。二つ目は増幅産物をプラスチックの容器の上で微量電気泳動を 1 分で行い迅速に PCR 産物のサイズを計測する方法を作成した。この方法では人に疾病をおこす主要なサルモネラの血清型が類推できた。もう一つの方法は増幅終了 DNA マイクロアレイに固定し、増幅産物をマイクロアレイで確認する方法を作成した。この方法は PCR 終了後さらに 2 時間程度の確認の時間が必要になるが、電気泳動で増幅産物のサイズを確認するよりより正確に産物を同定できる (投稿準備中)。

D. 考察

Salmonella は腸管、食細胞内で表面抗原、分泌蛋白の発現を調節し巧みの環境に適応し生育している。これらの現象の全容を解析するには多数の mRNA を幅広く解析できる DNA チップを使った解析が不可欠である。チフス菌の野生株と変異株を使った遺伝子発現の解析では mRNA の発現量を時間経過を追ってモニターするシステムを構築できたことから、生菌ワクチンが有効とされる *Salmonella* のワクチン開発にもこれらの DNA チップを使った食細胞内での発現遺伝子の解析は重要な貢献ができると考えている。

Salmonella の食品汚染が進行している中で capillary PCR を使った迅速同定、検出法の開発は社会的には重要なテーマである。

CapillaryPCR 法では sample 中の *Salmonella* の量も 20 分程度で real time で定量できることから、新鮮な食品を迅速に出荷しなければならない市場にも重要な貢献ができると期待している。サルモネラの診断用 DNA チップは結果が得られるまで数時間と迅速性では Capillary 法に劣るが、半日で検出と血清型が推測できることから十分に実用的なレベルに達していると考えている。

これらの研究を通して作成された変異株のうち、3 ~ 4 遺伝子の欠損株はバイオセーフティレベルを下げる事が出来ると考えており、教育施設の安全性が十分に確保されていない我が国の教育用の菌株として重要な貢献が出来る。

F. 研究成果発表

論文

1. Zhao, L. H. H. Hirose, Z.H. Li, Y. Kawamura, and T. Ezaki.2000. Vi-suppressed or deleted *Salmonella typhi* mutants produce massive invasion protein and become hyperinvasive to destruct ileal Peyer's patches and lamina propria. *Microbiol. Immunol.* 45 : 149-158
2. Licheng Zhao, Yoshiaki Kawamura, Takayuki Ezaki .Construction of virulent defective mutants of *Salmonella typhi* and their phenotypic description as candidates for educational purpose *Microbiol.Cult. Coll.* 17: 13-21
3. Hirose, K. Ken-ichiro Itoh, Hiroshi Nakajima, Takayuki Kurazono, Masanori Yamaguchi, Kazuo Moriya, Takayuki Ezaki, Yoshiaki Kawamura, Kazumichi Tamura and Haruo Watanabe.2001. Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB* and *fliC* genes by

multiplex PCR for identification of *Salmonella* enterica serovar Typhi, and Paratyphi A. J. Clin. Microbiol. 140, (In press)

(参考)

Sakamoto, K., H. Hirose, T. Ezaki, Y. Kawamura, A. Onizuka, M. Hayashi, T. Yamada, and T. Sago. 2000. Translocation of *Salmonella typhimurium* in rats; effect of enteral and parenteral nutrition. Eur. J. Surg. 166:814-817.

Sakamoto, K. H. Hirose, A. Onozuka, M. Hayashi, N. Futamura, Y. Kawamura, and T. Ezaki. 2000. Quantitative study of changes in intestinal morphology and Mucus gel on total parenteral nutrition in rats. J. Surgical Research. 94(2): 99-106.

総説

波多宏幸 2001. 核酸を用いた抗酸菌の同定法
BIO Clinica 16, 147:57-63, 2001

波多宏幸 2001. DNA マイクロアレイを用いた細菌の検出および同定.臨床検査.45 : 776-778, 2001.

江崎孝行 2001. 医学細菌の分類命名の情報..遺伝学的な種の決定方法の有効性と限界.
感染症学雑誌. 75: 833-836,

江崎孝行 2001 ゲノム解析と臨床微生物への応用. 臨床と微生物 28 : 735-743.

山田博子、江崎孝行. 2001. 遺伝子検査による迅速な微生物検査法. 食品と開発.37 : 6-8.

補遺

遺伝子ないし DNA を標的としたサルモネラの検出・同定法

サルモネラにおいて試みた遺伝子同定法の一部を示す。

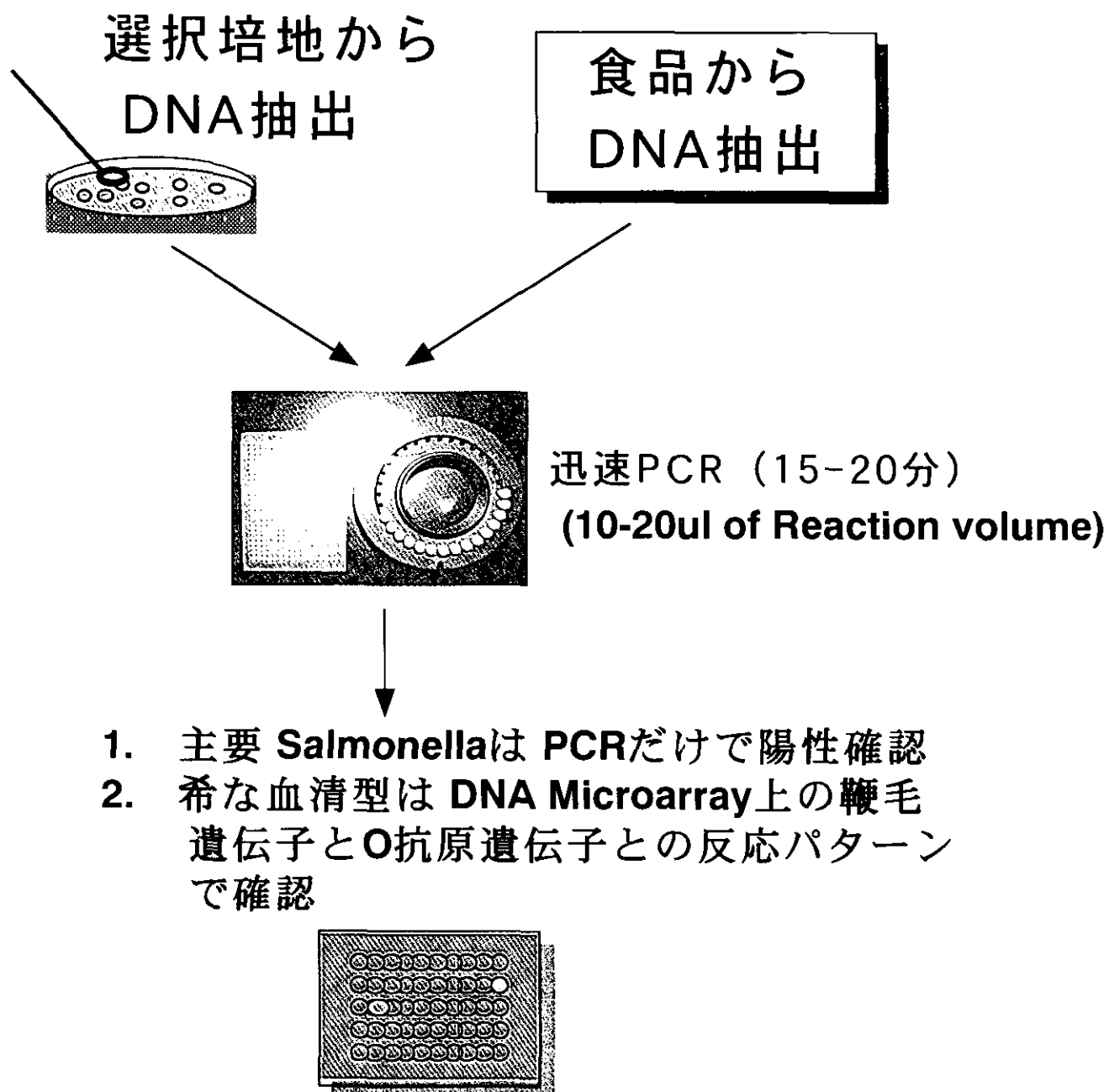
図—1は PCR 法を用いた迅速菌種同定法の概略である。*Salmonella* のみを指標とした場合には、標的遺伝子を *stn* と *invA* とし、そのプライマーを用いてリアルタイム PCR を行うか、通常の PCR で増幅させた断片をゲル電気泳動のサイズを検出する。この方法であれば、20分から2時間で菌の存否は検定できる。

図—2はサルモネラの血清型を PCR で同定する方法をしめす。サルモネラの血清型は2000種類以上あり、それは即ち細胞外膜 (O 抗原) の多糖体のエピトープ構造が2000種類以上あることを示す。ここに挙げた例は、ヒトに寄生性のあるサルモネラの O 抗原の合成に関与する酵素の一例と、鞭毛の特異的な蛋白遺伝子との組み合わせで血清型を同定する方法である。これらの酵素遺伝子の特定部位をプライマーとし PCR で検出する。図—3はプライマーの配列例をしめす。

図—4は分離コロニーから血清型を遺伝子レベルで特定する方法をしめす。コロニーを釣菌し、前処理後、図—3に示す混合プライマーで迅速 DNA 断片計測法、マイクロアレイ、あるいは通常のゲル電気泳動法で検出するものと、マイクロキャピラリー法でリアルタイムで検出する方法をしめす。図5、図6および図—7はこれらの方法で実際に測定した例をしめす。ヒト病原性のある主要な血清型はかなり明確に検出される。

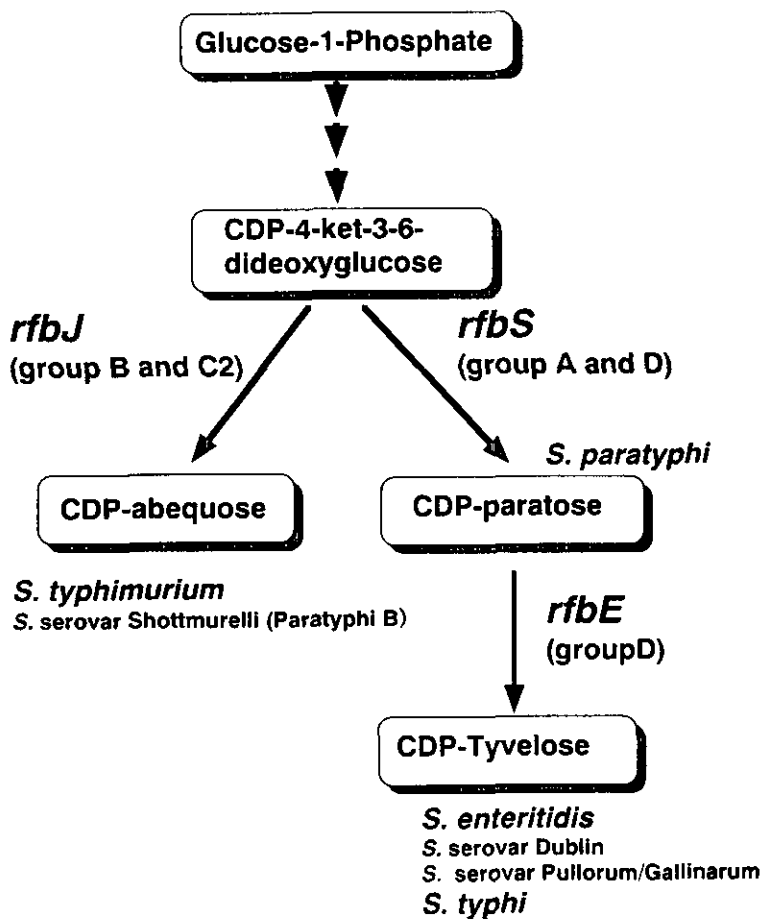
図—8は DNA アレイによる遺伝子機能の解析法の例を示す。表—1に挙げた遺伝子をアレイに固定し、これに変異株や特定のストレスを負荷して抽出した mRNA とハイブリダイゼーションを行う。アレイ上のスポットの強弱を比較して、顕著な差が見られる遺伝子を指標として、さらに詳細な解析が可能となる。

図—1 迅速PCRによる菌種と血清型の同定



図—2 PCR法で血清型を同定するための標的遺伝子

特異抗原合成酵素の経路

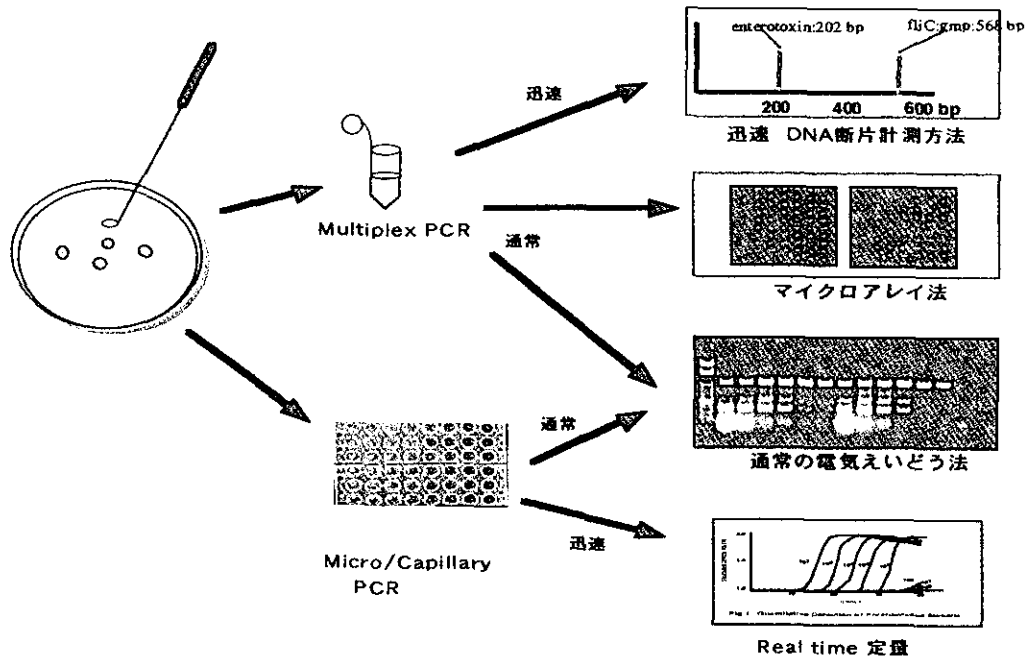


図—3 Salmonella serovar Primers

Primer	Up	Down	Amplicon
rfb E (O9):D	5'-ctt-ggg-agt-aat-ctt-gcc-3	5'-tat-act-gcc-gla-ctg-cct-3	307 bp
rfb J (O4) :B	5'-aat-tgl-cag-tgg-ggc-ttc-3	5'-tcg-atg-aac-ctg-gca-tca-3	733 bp
rfb S (O2):A	5'-cct-act-tcg-aaa-gtc-gac-3	5'-cac-gaa-ttg-ata-tcg-cct-3	600 bp
FliC:a	5'-aag-tca-cgc-ctl-cgg-cta-cat-3	5'-agc-ata-aat-atc-agc-ccc-aac-3	448 bp
FliC:b	5'-aca-gga-tgc-cta-tac-gcc-aa-3	5'-ccc-gca-tca-gta-act-ttg-cc-3	430 bp
FliC:c	5'-tgc-tgt-agc-tgc-ttc-cta-3	5'-agc-tac-gtg-cgc-cag-att-3	460 bp
FliC:d	5'-atg-cct-aca-ccc-cga-aag-aa-3	5'-acc-ctc-ttt-tgt-tac-ttc-agc-3	353 bp
FliC:i	5'-ctg-caa-ctg-tta-cag-gat-atg-3	5'-tca-cat-cct-cag-ttg-ctg-3	284 bp
FliC:gmp	5'-ctt-ggc-ctt-gat-ggg-ttc-aa-3	5'-cca-aat-cag-aaa-gtt-tcg-cac-3	559 bp
VipR (VI)	5'-gtg-aac-cta-aat-cgc-tac-ag-3	5'-ctt-cca-tac-cac-ttt-ccg-3	307 bp

図—4

血清型の決定方法

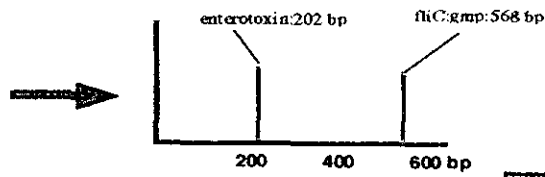


図—5

迅速な人由来サルモネラ血清型の決定

Primer Mixture 1

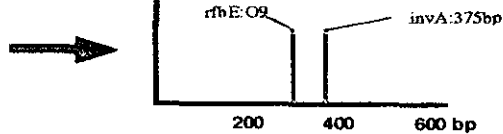
- fliB:Z66 (178bp)
- fliC:a (449bp)
- fliC:b (232bp)
- fliC:c (463bp)
- fliC:d (344bp)
- fliC:grp (568bp)
- fliC:i (285bp)
- vipR (603bp)
- enterotoxin (202bp)



→ *S. enteritidis*

Primer Mixture 2

- invA (375bp)
- rfbE:O9 (307bp)
- rfbS:O2 (600bp)
- rfbJ:O4 (734bp)

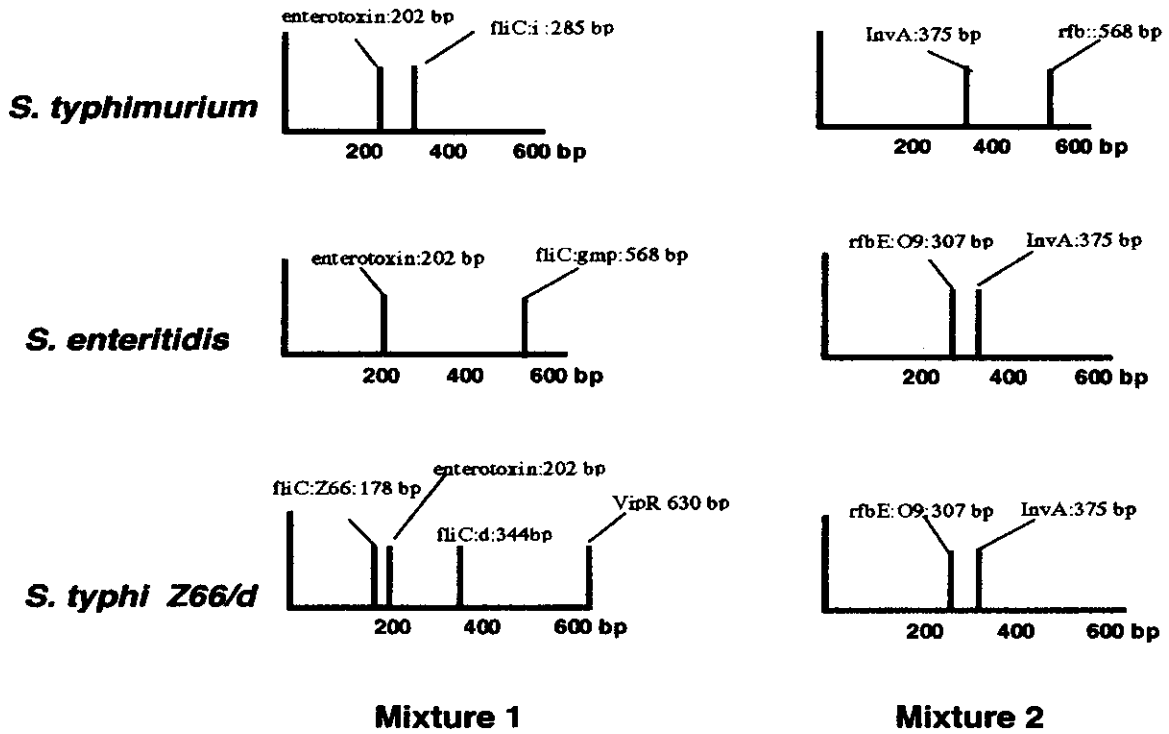


Micro-PCR による増幅
(20分)

Rapid Electrophoresis
によるサイズの確認
(1分)

血清型 遺伝子の
確定

图—6

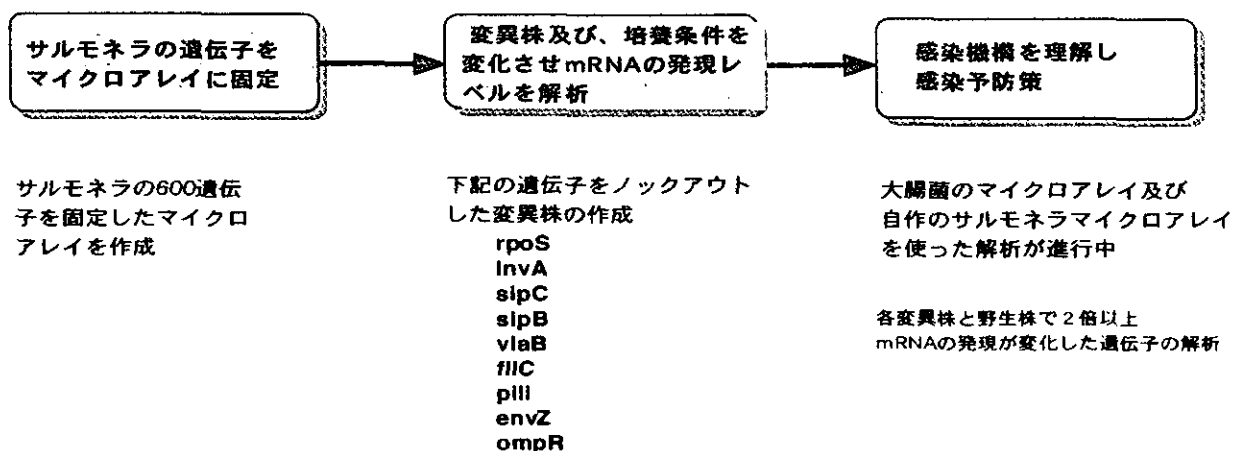


图—7

Identification of major pathogenic *Salmonella* serovars

Serovar	O antigen	Flagellar	PCR Amplification				
			antigen :H1	rfbE :O9	rfbS :O2	rfbJ :O4	Vi
Schottmuellei	B (1,4,5,12)	b	-	-	+	-	-
Typhimurium	B (1,4,12)	i	-	-	+	-	-
Paratyphi C	C1 (6,7, (Vi))	c	-	-	-	+	-
Choleraesuis	C1 (6,7)	c	-	-	-	-	-
Typhi	D1 (9,12,Vi)	d	+	+	-	+	-
Enteritidis	D1 (1,9,12)	g.m	+	+	-	-	+
Dublin	D1 (1,9,12, (Vi))	g.p	+	+	-	-	+

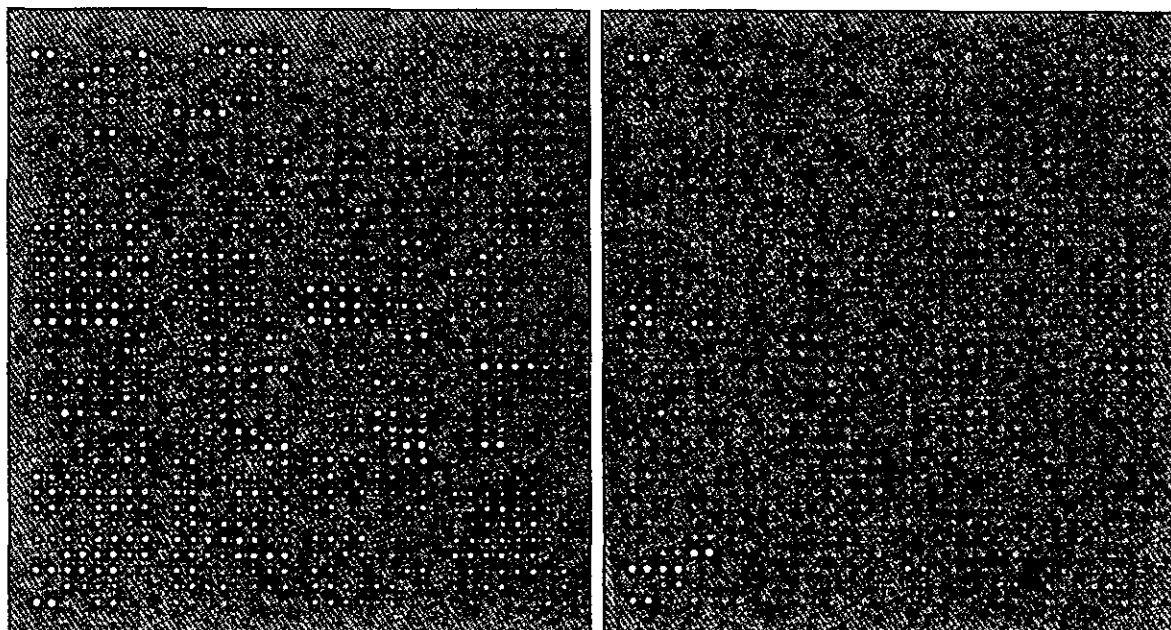
図—8 DNA アレイによる遺伝子機能解析法



図—9

S.typhi 10007- 250 mM条件で培養

S.typhi10007 ompR株を250 mM条件で培養



サルモネラチップを使用したチフス菌とその変異株のmRNAの発現量を比較した例

表一 1 DNA アレイに固定したサルモネラの遺伝子

番号	遺伝子 (略)	遺伝子名	Accession No	番号	遺伝子 (略)	遺伝子名	Accession No
1	accA	acetyl-CoA carboxylase	M96394	79	cbiQ	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobinamide precursor	L12006
2	ack	acetate kinase	U67435	80	cbiT	precorrin decarboxylase cobalamin (vitamin B12) bios	L12006
3	ada	Inducible DNA repair system	U67435	81	cdt	cdt (E.coli)	U89305
4	adhE	reduced survival in macrophage	U68173	82	cheA	chemotaxis	J03611
5	adk	adenylate kinase	L26246	83	cheR	chemotaxis	J02757
6	agfA	Agfa	AJ000514	84	cheY	Chemotaxis	M12131
7	agfB	Expression of thin aggregative fimbriae	AJ000514	85	cheZ	Chemotaxis	M16691
8	ahpC	alkyl hydroperoxide	J05478	86	cigR	pathogenicity island SPI-3	AF106566
9	ahpF	Alkyl hydroperoxide reductase	J05478	87	cirA	cirA	AE000304
10	aipl	anaerobically induced outer membrane protein necessity	AF145591	88	citA	Citrate	D90203
11	alkB	alkylation(E.coli)	J02607	89	cid	Chain length determinant	Z17278
12	alr	alanine racemase	M12847	90	clpA	ATP-dependant protease (E.coli)	M31045
13	amiB	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase activity(E.coli)	L19346	91	clpP	ClpP protease:Heat shock protein	AB033628
14	amiB-up	amiB-up urf1(E.coli)	L19346	92	clpX	clpX: ATPase subunit:Heat Shock Genes	AB033628
15	amiB-up	upstream amiB (urf2)	L19346	93	cmk	Cytidylal kinase	D90728
16	ampC	ampicillin resistance	Y16410	94	coaA	Coenzyme A	AF170176
17	ampG	beta-lactamase induction signal transducer.	S67816	95	cobA	Cobalamin	L08890
18	ampG-orf1	beta-lactamase induction signal transducer	S67816	96	cobB	Cobalamin	U89687
19	arnsI	Protein-tyrosine-phosphatase	D90735	97	cobD	Cobalamin	U90625
20	amtA	resistance to 3-amino-1,2,4-triazole(E.coli)	M55170	98	cobS	Cobalamin Cobalamin:anaerobically-induced promoter	L12006
21	amyA	amylase	L01643	99	cobT	Cobalamin:anaerobically-induced promoter for the cob	L12006
22	ansB	L-asparaginase(E.coli)	M34277	100	cobU	Cobalamin Cobalamin:anaerobically-induced promoter	L12006
23	ant	Enterochelin	AF203817	101	copR	copR:sopB regulatory peptide	AF060858
24	apbA	alternative pyrimidine biosynthetic pathway	U09529	102	copS	copS:sopB regulatory protein	AF060858
25	apeE	acyl peptidase esterase	AF047014	103	corA	Cobalt resistance	L11043
26	aphA	nonspecific acid phosphatase II	AJ237788	104	corB	Cobalt resistance	AF130857
27	appA	Acid phosphatase (EC 3.1.3.2) precursor	D90735	105	corC	Cobalt resistance	AF116773
28	appA-orf	Membrane-associated ATP-hydrolase amsA	D90735	106	corD	Cobalt resistance	U24176
29	araA	arabinose	M11047	107	cpdB	cpd, 2,3'-cyclic phosphodiesterase	X54009
30	arcA(sfrA)	E.coli	AE000510	108	cpxA	cpxA (E.coli)	M36795
31	arcB	E.coli	X53315	109	Crp	Crp	M13770
32	argA	arginine(E.coli)	Y00492	110	crr	Factor III	X05210
33	argB	arginine (E.coli)	U00006	111	csiE	Stationary phase-inducible gene under the control of sigma	L77687 L46719
34	argG	arginine(E.coli)	U18997	112	cspA	Cold shock protein	AF052579
35	argR	arginine	M75913	113	cspE	cspE (E.coli)	D28497
36	argT	arginine	J01805	114	cspG	Cold shock protein(E.coli)	AE000201
37	aroA	aromatic (S. gallinarum)	M62801 M62801	115	cspH	cold-shock protein	AF006035
38	aroB	aromatic	Y08642	116	cutE	apolipoprotein N-cayltransferase	AF116773
39	aroC	aromatic	M27715	117	cyaA	cAMP	AE000456
40	aroD	aromatic	X54546	118	cysA	Cysteine	M32101 M38050
41	aroE	aromatic (E.coli)	Y00710	119	cysB	Cysteine	M15040
42	aroF	aromatic (E.coli)	K01989	120	cysC	cysC:APS kinase	M74586
43	aroG	aromatic (E.coli)	J01591 J01591	121	cysD	cysD:ATP surfulylase	M74586
44	aroH	aromatic(E.coli)	J04221	122	cysE	cysE	A00198
45	aroP	aromatic (E.coli)	U87285	123	cysG	cysG	M64606
46	asd	asd (E.coli)	V00262 V00262	124	cysH	cysH:PAPS sulfotransferase	M22007
47	aspA	aspartate (E.coli)	X02307	125	cysK	Cysteine	M21450
48	aspC	aspartate(E.coli)	X89757/X03629	126	cysM	cysM	X59595
49	asrA	anaerobic sulfite reductase	M57706	127	cysN	ATP sulfurlyase (cysD and cysN)	M74586
50	avrA	avrA secreted protein by type III apparatus	AF013573	128	cysP	Cysteine (E.coli) thiosulfate binding protein (cysP)	M32101
51	avtA	avtA (E.coli)	Y00490	129	cysQ	Cysteine (E.coli)	M80795
52	bfpB	boundle-forming pill (E.coli)	Z68186	130	cysT	sulfate permease (cysT)	M32101 M38050
53	bfpT	bfpT (E.coli)	L42638/Z48561	131	cysW	Cysteine (E.coli) sulfate permease (cysW)	D90872
54	bioC	biotin (E.coli)	A11534	132	cysZ	Cysteine	M21450
55	blrA	biotin repressor (E.coli)	M15820	133	cytR	Regulatory gene for deo operon and udp and cdd genes	AF085239
56	bolA	possible regulator of murein genes	AE000149 U00096	134	cyxA	Cytochrome bd-II oxidase subunit I:cyxA=appC-cbdA	D90735 AB001340
57	btuB	B12 utilization	M89481	135	cyxB	Cytochrome bd-II oxidase subunit II, appB-cbdB-cyxB	D90735 AB001340
58	btuC	B12 utilization (E.coli)	M14031	136	dadA	D-alanine dehydrogenase (E.coli)	D90753
59	cadA	cadaverine	U37109	137	dadB	Catabolic alanine racemase	K02119
60	cadC	cadaverine(E.coli)	AF020388/M67452	138	dadR	non(E.coli)	D90753
61	carA	carbamy phosphate synthase	AF012246/U81260	139	Dam	DNA adenin methylase	U76993
62	carB	carbamy phosphate synthase	U81260	140	dapB	Diaminopimelate (E.coli)	M10611
63	cbiA	cbiA operon	L12006	141	dapD	Diaminopimelate	K02870
64	cbiQ	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	142	dapF	Diaminopimelate	X12968
65	cbiA	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobinamide precurs	L12006	143	dcd	dCTP deaminase	M90069
66	cbiB	cbiB cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes	L12006	144	dcm	dcm gene for DNA-cytosine methyltransferase	X13330
67	cbiC	cbiC cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes	L12006	145	dcp	Dipeptidyl carboxypeptidase	M84575
68	cbiD	cbiD cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes	L12006	146	dctA	Transport of dicarboxylic acids	X91397
69	cbiE	cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes	L12006	147	ddiA	ddiA	M20793
70	cbiF	cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes	L12006	148	deoC	Deoxyribose	X03224
71	cbiG	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	149	deoD	Deoxyribose (E.coli)	M60917
72	cbiH	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	150	dgo	D-Galactonate utilization(E.coli)	AE000446
73	cbiJ	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	151	dgt	dGTP triphosphohydrolyase(E.coli)	M31772
74	cbiK	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	152	dhuA	D-Histidine	J01799
75	cbiM	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	153	dkxA	dkxA	AF010249
76	cbiN	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	154	dnaA	DNA	M17352
77	cbiO	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	155	dnaB	DNA (E.coli)	K01174
78	cbiP	anaerobically-induced promoter for the cobalamin bios	L12006	156	dnaC	DNA synthesis initiation and cell division uncoupling	AF001396
				157	dnaE	DNA	M29701
				158	dnaG	DNA	M14427