

159	DnaJ	DnaJ	U58360	239	frd	Fumarate reductase (E.coli)	J01611
160	DnaK	DnaK	U58360	240	fruA	Fructose (E.coli)	M23196
161	dnaN	DNA	AF034747	241	fruK	Fructose (E.coli)	X53948
162	dnaQ	DNA	U77465	242	fruR	Fructose Fructose	X55456
163	dnaX	DNA polymerase III gamma subunit	U66040	243	ftsE	ftsE (E.coli)	AE000422
164	dnaZ	DNA (E.coli)	X04487	244	ftsZ	ftsZ(E. coli)	X55034 M10429
165	dpp	Dipeptide permease (E.coli)	X58051	245	fucA	Fucose (E.coli)	M31059
166	dsd	D-Serine sensitivity (E.coli)	X86379	246	fumA	Fumarate (E.coli)	AE000256
167	dskA	homolog multicopy suppressor of the dnaK mutation	AF010249	247	fumC	fumC (E.coli)	AE000256
168	dsrA	dsrA putative anti-silencer dsrA gen	AF090431	248	Fur	Fur low PH and Iron responder (E.coli)	X02589
169	ecpD	periplasmic protein (ecpD and htrE)	L00680	249	fusA	Fusidic acid	X64591
170	endA	Endonuclease I (E.coli)	X65169	250	galE	Galactose	X83927
171	eno	Enolase (E.coli)	X82400	251	galF	Galactose	M84642
172	entF	entF (E.coli)	M60177	252	galK	Galactose	M33681
173	envA	Envelope (E.coli)	M19211	253	galP	Galactose (E.coli)	AE000377
174	envD	Envelope (E.coli)	X57948	254	galR	Galactose (E.coli)	V00280
175	envF	envelope protein; putative lipoprotein	U31849	255	galS	Galactose (E.coli)	X62529
176	envZ	Envelope	X78270	256	galU	Galactose (E.coli)	M98830
177	espB	espB (E.coli)	Z21555	257	GapA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene	M66859
178	eutB	Ethanolamine utilization	J05518	258	gcv	glycine cleavage (E.coli)	L20872
179	eutD	Ethanolamine utilization	AF093749	259	gdhA	gdhA	M24021
180	eutE	Ethanolamine utilization	U18560	260	gleP	gleP	D00332
181	eutG	Ethanolamine utilization	U18560	261	glgA	Glycogen (E.coli)	J02616
182	eutH	Ethanolamine utilization	U18560	262	glgC	Glycogen (E.coli)	S58224
183	fabB	Fatty acid biosynthesis (E.coli)	M24427	263	glgS	glycogen synthesis; rpoS-dependant gene	Z11885
184	fabI	Fatty acid biosynthesis (E.coli)	AE000227	264	glmU	glmU (E.coli)	AE000450
185	fabZ	Fatty acid biosynthesis (E.coli)	M19334	265	glnA	Glutamine (E.coli)	M13746
186	fdhF	Formate dehydrogenase-H (E.coli)	AE000481	266	glnD	Glutamine (E.coli)	M96431
187	fepA	fepA F3+, enterobactin (E.coli)	M13748	267	glnE	Glutamine (E.coli)	AE000387
188	fhlA	Formate hydrogenlyase	U16278	268	glnH	Glutamine (E.coli)	X14180
189	fhuA	fhuA	Y14025	269	glnP	Glutamine (E.coli)	X14180
190	fhuD	Ferric hydroxamate uptake (E.coli)	Ferric hydroxamate AE000124	270	glpA	Glycerol phosphate (E.coli)	M20938
191	fic	phenotype; Cell division*	M32355	271	glpD	Glycerol phosphate (E.coli)	M55989
192	fidL	pathogenicity island SPI-3	AF106566	272	glpF	Glycerol phosphate (E.coli)	M55990
193	fimA	fimA (E.coli)	U20815	273	glpQ	Glycerol phosphate (E.coli)	X56907
194	fimC	Fimbriae	X74602	274	glpR	Glycerol phosphate (E.coli)	M54940
195	fimH	Fimbriae (E.coli)	AF088840	275	glpT	Glycerol phosphate (E.coli)	Y00536
196	fis	Factor for inversion stimulation	U03101	276	glpT	Glutamate (E.coli)	M74162
197	figA	figA p-ring assembly	D25292	277	gltS	Glutamate (E.coli)	X17499
198	figB	figB rod protein	D13703	278	glyA	Glycine (E.coli)	J01620
199	figC	Flagella	D13703	279	glyS	Glycine (E.coli)	J01622
200	figD	Flagellar hook capping protein	D25293	280	gnd	gnd	M64332
201	figE	Flagellar hook protein	X51737	281	gpsA	gpsA (E.coli)	AE000439
202	figF	Flagellar	X52094	282	GroEL	GroEL shaperone	U01039
203	figH	Flagellar	M24466	283	GroES	GroES chaperone (E.coli)	X07899
204	figI	Flagellar	M24466	284	GrpE	GrpE nucleotide exchange factor (E.coli)	X07863
205	figK	figK:flagellar hook-associated protein	X51738	285	gsk	gsk (E.coli)	L35149
206	figL	Flagellar	Y09990	286	guaA	Guanine (E.coli)	M10102
207	figM	figM antistigmafactor	M74222	287	guaB	Guanine (E.coli)	M10102
208	figN	Flagellar	U03631	288	guaC	Guanine (E.coli)	X07917
209	fliA	Flagellar (E.coli) Flagellar Flagellar	U88319	289	gyrA	Gyrase (E.coli)	Y00544
210	fliB	fliB export apparatus (E.coli)	U88319	290	gyrB	Gyrase	Z68167
211	fliC	Flagellar	D43640	291	hemA	Heme (E.coli)	X17434
212	fliD	fliD:Flagellin expression	AF029300	292	hemB	Heme (E.coli)	M24488
213	fliE	Flagellar	D32203	293	hemC	Heme (E.coli)	X04242
214	fliA	Flagellar	AB010947	294	hemD	Heme (E.coli)	M17360
215	fliA:sigma28	fliA: Flagellar specific sigma factor sigma 28	X52624	295	hemF	Heme	L19503
216	fliB	fliB	Z54217	296	hemG	Heme (E.coli)	X68660
217	fliC	flagellin gene fliC (E.coli)	AF169323	297	hemH	Heme (E.coli)	AE000153
218	fliD	fliD filament cap (E.coli)	M85240	298	hemK	Heme (E.coli)	AE000219
219	fliE	Flagellar basal body protein	M84993	299	hemL	Heme	M60064
220	fliF	fliF M-ring flagella export	M24462	300	hemM	Heme (E.coli)	AE000219
221	fliG	Flagellar (E.coli)	U46011	301	hemN	Heme	U06779
222	fliH	ATPase; flagellar export protein	M62408	302	hilA	hyper Invasion associated locus	AF154678
223	fliI	Flagellar export apparatus	M62408	303	hilC	hilC	AF124397
224	fliJ	FliJ:ATPase; flagellar export protein	M62408	304	hilD	hilD	AF124398
225	fliK	Flagellar	L43492	305	hin	H inversion	V01369
226	fliL	fliL	M24463	306	hisA	Histidine	SG10157/P10372
227	fliM	Flagellar	M24463	307	hisB	Histidine	X13464
228	fliN	Flagellar (E.coli)	M26294	308	hisC	Histidine	J01804
229	fliO	Flagellar	L49021	309	hisD	Histidine	J01804
230	fliR	fliR	L49021	310	hisF	Histidine	X13464
231	fliT	Flagellar	M85241	311	hisG	Histidine	J01804
232	fliU	Flagellar	L06520	312	hisH	Histidine	X13464
233	fliY	FliY down stream of fliA	AB010947	313	hisI	histidine	X13464
234	fliZ	FliZ down stream of fliA	AB010947	314	hisJ	Histidine	V01372
235	fliA	Flagellar	D26168	315	hisM	Histidine	V01373
236	fliB	Flagellar	U17177	316	hisP	Histidine	V01373
237	fnr(oxrA)	fnr(oxrA):anaerobic induction of genes for anaerobic m	U05668	317	hisS	Histidine	AF047040
238	fol	Folate (E.coli)	J01609	318	hns	H-NS	M37891

319	hsdM	Host specificity	L02507	399	misL	pathogenicity island SPI-3,	AF106566
320	hsdS	Host specificity (Escherichia coli)	AJ132566	400	rntH	NRAMP manganese transport protein MntH	AF161317
321	htrA	htrA (E.coli)	M36536	401	moeA	Molybdenum	U53178
322	htrE	periplasmic protein under the control of rpoS	L00680	402	motA	motA	AF026300 D43640
323	hupA	hupA	M22975	403	motB	motB:flagellar rotation	D43840
324	hupB	hupB	X07844	404	msgA	msgA	U31849
325	hyaB	hydrogenase 1	D90735 AB001340	405	murB	murB	L14816
326	hyaC	hydrogenase 1	D90735 AB001340	406	murC	UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase	X55034 M10429
327	hyaD	Hydrogenase-1 operon protein hyaD	D90735 AB001340	407	mutH	Mutator	AJ005754
328	hyaE	Hydrogenase-1 operon protein hyaE	D90735 AB001340	408	mutL	Required for Methyl-directed DNA Mismatch Repair	Z11831
329	hyaF	Hydrogenase-1 operon protein hyaF	D90735 AB001340	409	mutS	Mutator; mismatch repair protein	M18965
330	hydA	Hydrogenase(Escherichia coli)	D28595	410	mutT	Enzyme; 2'-Decyribonucleotide metabolism	AE000119 U00096
331	hydG	Hydrogenase	M64988	411	mvIA	MvIA low PH responder	U53173
332	hypD	Hydrophobic peptide auxotrophy(E.coli)	X54543	412	nadC	Nicotinamide	L07292
333	iacP	acyl carrier protein	U40013	413	nanH	Neuramidase	M55342
334	iagA	iagA	X80892	414	narK	Nitrate reductase	X69189
335	iagB	iagA and iagB genes Involved in invasion of HeLa cells	X80892	415	narL	narL:nitrate reductase(E. coli)	X69189
336	icd	icd	AF017618	416	narV	narZYWV DNA for nitrate reductase	X17110
337	iclR	iclR	X52950	417	narW	narZYWV DNA for nitrate reductase	X17110
338	iicA	Induced intracellularly A	AF164435	418	narX	narX:nitrate reductase (E. coli)	X69189 X17110
339	ilvA	Isoleucine-valine	M25498	419	narY	nitrate reductase subunits:narZYWV	X17110
340	ilvB	Isoleucine-valine(Escherichia coli)	J01633	420	narZ	nitrate reductase	X17110
341	ilvE	Isoleucine-valine(E.coli)	X02413	421	nirB	Nitrite reductase	AE000412
342	intC	intC	L11254	422	nirC	Energy metabolism, carbon: Anaerobic respiration*	AE000412 U00096
343	invA	invasion associated gene invA	M90846	423	nirD	Energy metabolism, carbon: Anaerobic	AE000412 U00096
344	invB	Invasion genes InvB and invC:	U08279	424	nlpD	non	Y17610
345	invC	invasion genes invB and invC	U08279	425	nmpC	New membrane protein	D26057
346	invE	invasion associated gene invE	U43274	426	nrdA	Ribonucleoside diphosphate reductase	X72948
347	invF	invF	U08280	427	nrdE	Ribonucleoside diphosphate reductase	X73228
348	invG	ivasion associated gene invG	X75302	428	ntrB	Nitrogen regulation	X85104
349	invH	Invasion	Z17242	429	nuoE	NADH ubiquinone oxidoreductase	L22504
350	invI	nvasion genes invI and invJ a	U10872	430	nuoF	NADH dehydrogenase subunit	L22504
351	invJ	nvasion genes invI and invJ	U10872	431	nuoG	NADH dehydrogenase	L22504
352	katG	katG	X53001	432	nusA	transcription factor	M61008
353	kbl	kbl	U06472	433	nusG	nusG(E.coli)	AF170176
354	kdpA	Potassium-transporting ATPase	D90709 AB001340	434	oadA	Oxalacetate decarboxylase	M96434
355	kdpB	Potassium-transporting ATPase	D90708 AB001340	435	oafA	O-antigen factor :O-antigen acetylase (oafA) gene	U65941
356	kdpC	putative osmosensor associated	D90708 AB001340	436	ompA	Outer membrane protein	AF234270
357	kdpD	putative osmosensor	D90708 AB001340	437	ompC	ompC:outer membrane protein	X07835
358	kdpE	kdpEDC :] osmosensor	D90708 AB001340	438	ompF	ompF	X89757
359	kdsA	ketodeoxyoctonate synthesis	X05552	439	ompH	Outer membrane protein	J05101
360	kgpP	alpha-ketoglutarate permease	AE000345 U00096	440	OmpR	ompR osmolarity regulator	X78270
361	lamB	Lambda	X54282	441	ompS1	ompS1:outer membrane protein S1.	X73237
362	lep	lep	X54933	442	opdA	Oligopeptidase	M84574
363	leuA	Leucine	X51583	443	oppA	Oligopeptide permease	X04194
364	leuO	leuO	AF053353	444	oppF	Oligopeptide permease	X05491
365	leuS	Leucine(E.coli)	AE000168	445	ORF3	Orf3	D25282
366	lexA	lexA	M83220	446	orf3(dublin)	orf3 inPathogenic island	AF060858
367	lgt	umpA	L13259	447	Orf45	Orf45; similar to tail fiber assembly proteins from P2-III	AF153829
368	livA	branched-chain amino acid permerases	D12589 D01215	448	orfE	orfE :E.coli	X57166
369	livE	branched-chain amino acid permerases,	D12589 D01215	449	orfG	OrfG; similar to protein G from phage 186 and other P	AF153829
370	livF	Leucine, Isoleucine, valine	D12589	450	orfG1	A secreted protein	AF013574
371	lplC	lplC	U18559	451	orfH	orfH:	AF153829
372	lpxA	lpxA	Z25462	452	orfI	orfI:similar to tail tube proteins from P2-like bacterioph	AF153829
373	lrp	lrp	U02273	453	orfJ	orfJ:similar to tail sheath proteins from P2-like bacterio	AF153829
374	malB	Maltose:malI(malB)	X54292	454	orfR	orfR	AF153829
375	malE	Maltose maltose/maltodextrin transport	X54292	455	orgA	Oxygen-regulated gene	U21676
376	malK	Maltose	X54292	456	oriC	Origin	X67656
377	malM	Maltose	X54292	457	osmB	Osmotically inducible lipoprotein; resistance to osmotic	M22859
378	manA	Mannose	X57117	458	otsA	trehalose-6-phosphate synthase:trehalose biosynthesis:	AF213176
379	manB	Mannose-1-phosphate guanylttransferase phosphom	X58686 M77511	459	otsB	trehalose-6-phosphate phosphatase:Trehalose biosynl	AF213176
380	manC	Capsule:mannose-1-phosphate guanylttransferase	X58686 M77511	460	oxd-6	Oxygen dependent putative transmembrane protein	U94729
381	marA	marA	AF228275	461	oxd-6a	Oxygen dependent substrate-binding protein (oxd-6a)	U94729
382	marT	pathogenicity island SPI-3,	AF106566	462	oxd-6c	Oxygen inducible putative transmembrane protein	U94729
383	mdh	Malate dehydrogenase	M95049	463	oxd-6d	Oxygen inducible putative ATPase	U94729
384	melB	Melibiose	X62101	464	oxd-6e	Oxygen inducible, putative ATPase	U94729
385	menA	Menaquinone (E.coli)	U56082	465	oxd-putative	Oxygen Inducible hypothetical protein	U94729
386	menG	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methy	U56082	466	OxyR	OxyR :positive: regulatory gene of a regulon for an ad.	X18531
387	metA	Methionine	M74188	467	pabA	p-Aminobenzoate	X02603
388	metB	Methionine(E.coli)	K01546	468	pabB	p-Aminobenzoate	M22079
389	metF	Methionine	X07689	469	pag	pag	I95842
390	metG	Methionine	U00007	470	pagC	phoP-activated gene	M55546
391	metR	Methionine	M17356	471	pagJ	pagJ:PhoP-PhoQ activated genes	AF013776
392	mgIA	Methyl galactoside	U40492	472	pagK	pagK	AF013775
393	mgIA	Magnesium transport	U07843	473	pagM	pagM	AF013775
394	mgIB	Magnesium transport	M57715	474	pagO	PhoP-PhoQ activated genes	AF013775
395	mgIC	mgIC:Magnesium transport, next to slsA	M57715	475	panB	E. coli alpha-ketopantoate hydroxymethyl transferase	L17086
396	mia	miaA(E.coli)	Z11831	476	panC	Pantothenic acid	AE000122 U00096
397	miaE	miaE	X73368	477	panD	Biosynthesis of cofactors, carriers: Pantothenate*asp	AE000122
398	min	Minicells; invasin-like SivH	Z26133	478	parA	Partition	M87752

479	parC	Partition	M68936	559	purD	Purine	M66160
480	parE	Partition	L05544	560	purG	Purine	U68728
481	pbpA	Penicillin-binding protein	U62714	561	purH	Purine	M66160
482	pduA	Propanediol utilization	AF026270	562	purI	Purine	U68765
483	pduE	Propanediol utilization	AF026270	563	purN	Purine	U68765
484	pduF	Propanediol utilization	AF026270	564	purR	Purine	AF040636
485	pduF (pudF)	pduF (pudF)Propanediol utilization	AF026270	565	putA	Proline utilization	X70843
486	PefA	PefA	L08613	566	putP	Proline utilization	L01135
487	pepB	Peptidase	AF201078	567	pyrB	Pyrimidine	X05641
488	pepE	Peptidase	U01246	568	pyrD	Pyrimidine	X55636
489	pepM	Peptidase	X55778	569	pyrE	Pyrimidine	X72920
490	pepN	Peptidase	AF147699	570	pyrF	Pyrimidine	X05382
491	pepT	Peptidase	M62725	571	pyrG	Pyrimidine	M12843
492	perA	perA(E.coli)	L42638/Z48561	572	pyrH	Pyrimidine	X78909
493	pexB	starvation-inducible DNA-binding protein	U73111	573	pyrI	Pyrimidine	K01472
494	pexB-orf1	high-affinity periplasmic glutamine binding protein	U73111	574	pyrL	Pyrimidine	AE000495
495	pexB-orf2	glutamine transport system permease	U73111	575	qor	quinone oxidoreductase	L02312
496	pexB-orf3	glutamine transport ATP-binding protein GLNQ	U73111	576	rbsB	Ribose	X82203
497	pfl	Pyruvate formate lyase	U89718	577	rci	site-specific recombinase :rci	AF000001 AF013957
498	pgi	Phosphoglucoase isomerase (E.coli)	U00006	578	Rck	Resistance to complement	M76130
499	pgtA	Phosphoglycerate	M13923	579	rcaA	rcaB through tvIA is involved in regulation of Vi antigen	X87687
500	pgtP	Phosphoglycerate	M21278	580	rcaB	regulation of Vi antigen synthesis	X87830
501	phoE	phoE	X74595	581	rcaC	involved in regulation of Vi antigen synthesis	X87830
502	phoM	Positive regulation for pho regulon	M13608	582	recA	Recombination	AF119245
503	phoM-orf1	phoM gene (positive regulation for pho regulon)	M13608	583	recB	Recombination	AF179304
504	phoM-orf2	phoM gene (positive regulation for pho regulon)	M13608	584	recD	Recombination	AE000365
505	phoM-orf4	hoM gene (positive regulation for pho regulon)	M13608	585	recF	Recombination	X62505
506	phoN	Phosphate	X59036	586	recJ	Recombination	M54884
507	phoP	Phosphate	M25241	587	recN	Recombination	Y00357
508	phoQ	Phosphate	AJ272210	588	recQ	Recombination	M30198
509	phoS	Phosphate	AF020805	589	RelA	RelA	J04039 J04039
510	phrB	Photoreactivation	D90709	590	repB	Replication	U64797
511	phsA	aniE, phs	L31538	591	rfa	rfa involved in OCA Enterobacterial common-antigen s	S75640
512	phsB	non	L32188	592	rfaC	Rough	M95927
513	phsD	non	L31538	593	rfaD	Rough	U06472
514	phsE	non	L31538	594	rfaE	Synthesis of ADP-glyceromannoheptose	AF163662
515	phsF	non	L31538	595	rfaF	Rough	U06472
516	pilL	pilus-encoding operon	AF000001 AF013957	596	rfaH	Rough	AF233324
517	PilQ	pilus-encoding operon	AF000001 AF013957	597	rfaI	Rough	X53847
518	pilV	pilL operon	AF000001 AF013957	598	rfaK	Rough	M73826
519	pipA	pipA	AF060858	599	rfaL	Rough	M73826
520	pipB	pipB	AF060858	600	rfaP	Rough (E. coli)	M80599
521	pipC	pipC	AF060858	601	rfaV	Rough	U04185
522	pipD	pipD	AF060858	602	rfaA	Rough (E. coli)	AF048343
523	pIdA	Phospholipase A	AF233324	603	rfaB	Rough (E.coli)	AF048343
524	pmrA	Polymyxin B resistance	L13395	604	rfaC	Rough (E. coli)	U09876
525	pmrB	Polymyxin B resistance	L13395	605	rfaD	Rough (E. coli)	D90842
526	pmrD	Polymyxin B resistance	U02281	606	rfaI	Rough	X56793
527	pncB	Pyridine nucleotide cycle	M55986	607	rfaK	Rough (E. coli)	L27632
528	pocR	regulatory protein	L12006	608	rfaM	Rough (E. coli)	L27632
529	poxA	Pyruvate oxidase	AF001831	609	rfaN	Rough	U04184
530	ppc	Phosphoenolpyruvate carboxylase	U00006	610	rfaP	Rough	U35434
531	ppsA	Phosphoenolpyruvate synthase	X59381	611	rfaX	Rough	M65054
532	prfA	Protein release factor	J04243	612	rfaC	Rough	M60066
533	prfB	Protein release factor	M38590	613	rfaE	Rough	AJ002275
534	prgH	prgH	U21676	614	rfaM	Rough	M95047 M95047
535	prgI	Salmonella typhimurium PrgH protein (prgH), PrgI prot	U21676	615	rhaA	Rhamnose (E. coli)	X60472 M95047
536	prgJ	Salmonella typhimurium PrgH protein (prgH), PrgI prot	U21676	616	rhaB	Rhamnose (E. coli)	X60472
537	prgK	Salmonella typhimurium PrgH protein (prgH), PrgI prot	U21676	617	rhaD	Rhamnose (E. coli)	X60472 M95047
538	proA	Proline Poline	AF139831	618	rhaF	Rhamnose (E. coli)	X06058
539	proM	Proline		619	rhaT	Rhamnose	M85157
540	proP	E. coli proline/betaine transporter (proP) gene,	M83089	620	rhaB	RNA helicase	AF233324 M95047
541	proV	Proline	X52693	621	rho	polarity suppressor	D10015
542	proY	Proline	X74420	622	rhuM	pathogenicity island SPI-3	AF106566
543	prpB	Propionate	U51879	623	rmbA	pathogenicity island SPI-3	AF106566
544	prsA	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	M19488	624	rnc	RNase	U48415
545	psiA	Phosphate starvation Indcible	AJ238399	625	rnhB	RNaseH (E. coli)	U70214
546	psiA-orf5	Phosphate starvation Indcible	AJ238399	626	rodA	Rod (E. coli)	M22857
547	psiB	Phosphate starvation Indcible	AJ238399	627	rph	RNase PH (E. coli)	U33324
548	psiB-orf6	Phosphate starvation Indcible	AJ238399	628	rplA	Ribosomal protein, large	AF170176
549	pssA	enzyme; Macromolecule synthesis, modification: Phos;	AE000345 U00096	629	rplE	Ribosomal protein, large (E. coli)	AE000408
550	pstJ	phosphotransferase system transcriptional regulator (U11243	630	rplS	Ribosomal protein, large	X74923
551	Pts operon	phosphotransferase system; pts operon; ptsH gene; pt	X14737	631	rpoA	RNA polymerase alpha subunit	M77750
552	ptsG	Phosphotransferase system	X74629	632	rpoB	RNA polymerase	X04642
553	ptsJ-orf120	ptsJ-orf120	U11243	633	rpoD	RNA polymerase	M14427 M95047
554	ptsJ-orf170	ptsJ down orf170	U11243	634	rpoE	rpoE	U05669 M95047
555	ptsJ-orf179	ptsJ-orf179	U11243	635	rpoN	Rna polymerase	U51879
556	ptsJ-up-orf2	ptsJ-up-orf287	U11243	636	rpoS(katF)	RNA polymerase	AF184104
557	ptsM	ptsM	J02699	637	rpsD	Ribosomal protein, small	AJ223236 M95047
558	purB	purine	M74924	638	rmD	rRNA	U65886

639	rmE	rRNA (E. coli)	X80728	719	spvD (virB)p	Salmonella plasmid virulence	Z11581
640	rmH	rRNA E. coli)	X80730	720	spvR(plasm)	Salmonella plasmid virulence	D14491
641	sapA	sensitive to antimicrobial peptides	X74212	721	srIA	Sorbitol (E.coli)	AE000354
642	sapF	Sensitive to antimicrobial peptides	X74212	722	srID	Sorbitol (E. coli)	AE000354
643	sapG	potassium transport; sapG gene	X80501	723	ssaD	type III secretion system	AJ224892
644	sbcB	Suppressor of recBC (E. coli)	X02641	724	ssaE	type III secretion system	AJ224892
645	sbcC	Suppressor of recBC (E. coli)	J15981	725	ssaG	type III secretion system	AJ224892
646	sbp	Sulfate-binding protein (E. coli)	X02519	726	ssaH	type III secretion system	AJ224892
647	scrY	scrY:Sucrose Channel	X57400 X57400	727	ssal	type III secretion system	AJ224892
648	sdIA	a putative quorum sensor;suppresses division inhibition	U88651	728	ssaJ	type III secretion	Y09357 AJ224892
649	secA	secA secretion apparatus(E.coli)	AE000119 U00096	729	ssaK	type III secretion	Y09357
650	secB	secB secretion apparatus (E. coli)	M24489	730	ssaL	type III secretion	Y09357
651	secD	secD secretion apparatus	AF100611	731	ssaM	secretion system apparatus	Y09357
652	secE	secE secretion apparatus	AF170176	732	ssaN	type III secretion	Y09357
653	secG	secG secretion apparatus	U18997	733	ssaO	secretion system apparatus	Y09357
654	secY	secY secretion apparatus (E. coli)	X01563	734	ssaP	Secretion system apparatus	Y09357
655	sefA	sefA	L11008	735	ssaQ	secretion system apparatus	Y09357
656	sefD	sefD	U07129	736	ssaR	type III secretion	X99944
657	selA	selenium (E> coli)	M64177	737	ssaS	secretion system apparatus X99944	
658	selB	selenium (E. coli)	X16644	738	ssaT	type III secretion	X99944
659	selC-other	selenium:selenocysteine tRNA	Y13864	739	ssaU	type III secretion	X99944
660	selD	selenium (E. coli)	M30184	740	ssaV	type III secretion	Y09357
661	seqA	seqA (E.coli)	U07651	741	ssb	Single-strand binding	AF000001
662	serA	Serine (E. coli)	A25268	742	ssb-psiB	single stranded DNA binding protein	AJ238399
663	serB	Serine (E. coli)	X03046	743	sscA	type III secretion chaperone	AJ224892
664	serC	Serine	Y10355	744	sscB	type III secretion chaperone	AJ224892
665	sicA	SicA	U25631	745	sseA	Type III effector protein	AJ224892
666	sicP	chaperone for the type III secreted protein SptP	AF060857	746	sseB	sseB:type III effector protein	AJ224892
667	sideropore	sideropore:putative periplasmic-binding protein	AF132545	747	sseC	sseC: type III secretion system pathogenicity island 2	AJ224892
668	Sigma32	RpoH Heat shock protein regulator	M20668	748	sseD	Type III effector protein: Salmonella pathogenicity island	AJ224892
669	Sigma38 (rp	RpoS (= Kalf, Transcription factor)(E. coli)	AE000358	749	sseE	type III effector protein	AJ224892
670	sinR	Salmonella insert regulator	AB029403	750	sseF	Type III effector protein	AJ224892
671	sipA	sipA	X92546	751	sseG	type III effector protein	AJ224892
672	sipB	sipB	U66877	752	SSP	Urgent starvation protein (SSP) gene	AF105252
673	sipC	sipC	X82670	753	sspH1	sspH1:similar to rhdD of E. coli;virulence for calves	AF013776
674	sipD	sipA gene; sipB gene; sipC gene; sipD gene; spaT ger	X82670	754	ssrA	ssrA:transcriptional activator of Salmonella Pathogenic	Z95891
675	sirA	salmonella invasion regulator A	U88651	755	ssrB	ssrB:transcriptional activator of Salmonella Pathogeni	Z95891
676	sirB	salmonella invasion regulator B (Orf1 and Orf2)	AF134855	756	str	Salmonella toxin	L18014
677	sitA	a putative iron transport system	AF128999	757	sucA	Succinate	AF093783
678	sitB	a putative iron transport system	AF128999	758	sugR	putative ATP binding protein SugR	AF106566
679	sitC	a putative iron transport system	AF128999	759	tar	tar aspartate chemoreceptor	J01809
680	sitD	a putative iron transport system	AF128999	760	tcfA	fimbrial operons	AJ242964
681	siv H	in vivo-induced genes; sivH	AF255658	761	tcfB	fimbrial operons:putative fimbrial subunit	AJ242964
682	sisA	pathogenicity Island SPI-3	AF106566	762	tcfC	Putative fimbrial biosynthetic protein	AJ242964
683	sit	Soluble lytic transglycosylase (E. coli)	M69185	763	tcfD	fimbrial operon	AJ242964
684	siyA	siyA: unknown ,upstream of magnesium transport(mgt)	AB010776	764	tcp	Transmembrane receptor	L06029
685	smpB	Small protein	AF139831	765	tcid	Tricarboxylate transport	AF029846
686	sms	repair of endogenous alkylation damage	X63155 S45923	766	tcie	Tricarboxylate transport	AF029846
687	smvA	methyl viologen resistant	D26057	767	tcie-orf1	similar to nickel transport gene (nixA)	AF029846
688	sodB	iron superoxide dismutase (E. coli)	J03511	768	tdk	Catabolic threonine dehydratase (E. coli)	X51523
689	sodC	sodC:superoxide dismutase	AF056931	769	tesA	apeA; thioesterasef (E. coli)	L06182
690	sopA	secreted effector protein (sopA) gene	AF121227	770	thiC	Thiamine (E. coli)	M88701
691	sopB	sopB	AF213333	771	thiD	Thiamine	U87940
692	sopD	secreted outer protein D	AF234267	772	thiE	Thiamine	AF170176
693	sopE	Salmonella outer protein E	AF153829	773	thiF	Thiamine	M88701
694	sopE-orfG	sopE-orfG operon:similar to protein G from phage 186	AF153829	774	thiH	Thiamine	AF154064
695	sopE-orfI	sopE-orfI:similar to tail tube proteins from P2-like bacte	AF153829	775	thiI	Thiamine	U94901
696	sopE-orfJ	sopE operon orfJ	AF153829	776	thrB	Threonine (E. coli)	L13601
697	SoxR	SoxRS regulator	X59593	777	thrC	Threonine (E. coli)	J01706
698	SoxS	soxR regulator	X59593	778	thyA	thymine (E. coli)	J01710
699	spaL	Surface presentation of antigens	X73525	779	tinR	putative transcriptional regulator	AJ242964
700	spaM	Invasion gene complex SpaM and SpaN genes.	U43300	780	tioA	fimbrial operon: function unknown	AJ242964
701	spaN	Surface presentation of antigens	U43300	781	tir	translocated Int/ImN receptor (E. coli)	AF113597
702	SpaO	SpaO	U29363	782	tkt	Transketolase (E. coli)	X68025
703	spaP	Surface presentation of antigens	U29362	783	tlpA	Prokaryotic coiled-coil protein	M88208
704	spaQ	Invasion protein SpaO (spaO), SpaP (spaP), and Spa	U29365	784	toiC	toiC	U25178
705	spaR	spaL gene; spaM gene; spaN gene; spaO gene; spaP	X73525	785	tonB	T-one	U97227
706	SpaS	SpaS	X73525	786	topA	Topoisomerase (E. coli)	X04475
707	spaT	Surface presentation of antigens	X82670	787	topB	Topoisomerase	AF000001
708	spiA	spiA	U51927	788	torA	Trimethylamine oxide reductase	X73888
709	spiB	a pathogenicity island required for Salmonella survival	U51927	789	traT	Transfer	X51994
710	spiC	pathogenicity island required for Salmonella survival I	U51927	790	treA	Trehalose (E. coli):Periplasmic protein	X15868
711	spiR	spiR:pathogenicity island required for Salmonella survi	U51927	791	treR	Trehalose	U07843
712	spoT (gmk)	Spot	AF140283	792	trkA	Transport of potassium (E. coli)	X52114
713	sprA	Salmonella pathogenicity island 1-encoded regulator	AF148689	793	trmA	tRNA (m5 U54) methyltransferase (E. coli)	M57568
714	sprB	Salmonella typhimurium pathogenicity island 1	AF148689	794	trmD	IRNA (m1 G37) methyltransferase	X74803
715	sptP	sptP	U63293	795	trpA	Tryptophan	V01376
716	spvA(plasm)	spvA(plasmid)	D14490	796	trpB	Tryptophan	V01377
717	spvB(plasm)	Salmonella plasmid virulence	D14490	797	trpC	Tryptophan	M30286
718	spvC(plasm)	Salmonella plasmid virulence	D14490	798	trpD	Tryptophan	M30285

799	trpE	Tryptophan	V01378
800	trpR	Tryptophan	L13768
801	trxA	Thioredoxin	Z21789
802	tsaA	nonspecific acid phosphatase	AB029403
803	tsaB	nonspecific acid phosphatase	AB029403
804	tsaC	nonspecific acid phosphatase	AB029403
805	tsaD	nonspecific acid phosphatase	AB029403
806	tsr	Chemotaxis receptor; serine specificity (E. coli)	V00373
807	tsx	T-slx	Z26657
808	ttr	Tetrathionate reductase	AJ224978
809	tufA	Protein chain elongation factor EF-TU	X55116
810	tufB	protein chain elongation factor EF-Tu (E. coli)	X57091
811	tyrA	tyrosine	AE000346
812	tyrR	tyrosine	U90141
813	tyrS	tyrosine (E. coli)	J01719
814	ubiG	ubiquinone (E. coli)	M87509
815	ubiX	ubiquinone (E. coli)	AE000320
816	udK	uridine kinase (E. coli)	X71492
817	udp	uridine phosphorylase	Y14282
818	ufo in pag g	UFO within pag gene family	AF013775
819	uhpA	utilization of hexose phosphate (E. coli)	M89479
820	uhpT	hexosephosphat transport (E. coli)	M89479
821	umuC	induction of mutations by UV; error-prone repair	M57431
822	upp	uracil phosphoribosyltransferase (E. coli)	X57104
823	ushA	UDP-sugar hydrolase	AF188732
824	ushB	UDP sugar hydrolase	X13380
825	uspS	uspS: function unknown	D43640
826	uvrA	repair of UV damage of DNA	M93014
827	uvrB	repair of UV damage to DNA	X03678
828	uvrC	repair of UV damage to DNA	U88651
829	uvrD	repair of UV damage to DNA	AF233324
830	valS	valine (E. coli)	J03497
831	vexA	VexA (wza)	D14156
832	vexE	vexE (wcdE)	D14156
833	viaB(ORF1)	VI synthesis	D14156
834	viaB(Orf11)	viaB(Orf11) VI synthesis	D14156
835	VipA	VipA (wcdA)	D14156
836	vipR	vipR	AB006132
837	virK	virK	AF029845
838	wcdA (ViaB)	VI synthesis (ViaB)	D14156
839	wcdB	VI synthesis (ViaB region)	D14156
840	wcdC	wcdC(ViaB) VI synthesis	D14156
841	wcdD(=vipC)	wcdD(=vipC) VI synthesis	D14156
842	wcdE	wcdE (viaB.vexE) VI synthesis	D14156
843	wza	wza(viaB) vi synthesis	D14156
844	wzI	wzI(viaB.vcdD) VI synthesis	D14156
845	wzm	wzm(viaB9) VI synthesis	D14156
846	wzI	wzI(viaB) VI synthesis	D14156
847	xylA	D-Xylose (E. coli)	K01996
848	xylB	D-Xylose (E. coli)	K01996
849	xylS	xylS	AF124397
850	yacA	unknown ori upstream of secA (E. coli)	AE000119 U00096
851	ybdG	ybdG	AF047014
852	yhfC	unknown	AE000412
853	ytl2	ytl2	AF000001 AF013957
854	zwf	zwf (E. coli)	M55005

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

サルモネラ菌の菌体内情報伝達を撓乱する抗菌治療法の開発に関する研究

分担研究者 中山周一 国立感染症研究所細菌部

研究要旨

Salmonella において侵入能を担う産物と *Shigella* のそのの相同性、その遺伝子発現制御様式の類似性に着目し、*Shigella* において侵入性遺伝子群を活性化する 2 成分制御系遺伝子 *cpxR-cpxA* の相同遺伝子が、*Salmonella* においても同じ役割を持つか検討した。

Salmonella の *cpxR*, *cpxA* それぞれの遺伝子破壊株を作製した。これら野生株、及び各破壊株で、1) 侵入能を担う産物の正の制御因子である *hilA* の発現レベル、2) 侵入能産物の 1 つ *SipC* 産物の（タンパク）量、3) 哺乳類培養細胞への侵入能、を培養 pH を変化させて測定、比較した。結果、*cpxA* 変異株において pH6.0 培養後にいずれも大きな低下が見られた。pH8.0 培養後は *hilA* 発現レベルで若干の低下が見られた以外、野生株との差は検出できなかった。*cpxR* 変異株では野生株との差異は検出できなかった。以上より、*cpxA* 遺伝子は、pH6.0 での培養条件での *hilA* 発現、従ってその制御下にある侵入能産物発現、最終的には細胞侵入能の活性化に強く関与すること、これに対し、*cpxR* はそれらに関与しないことが分かった。

cpxA による pH6.0 条件での *hilA* 発現活性化は、少なくともその一部は、*hilC*、*hilD* 遺伝子発現の活性化を通じて行なわれることがわかった。

また、この制御の具体的メカニズムを明らかにする目的で、*cpxA* 変異株のマルチコピーサプレッサーの分離を行ない、現在までに、*Salmonella* 染色体上の 3 つの領域を同定した。

A. 研究目的

Salmonella と *Shigella* の腸管上皮細胞への侵入性発現機構には類似点が多い。*Shigella* の場合、*ipaBCD* 遺伝子産物が菌の上皮細胞への侵入能を直接担う。*ipaBCD* 遺伝子は *virF*, *invE* という 2 つの制御遺伝子によって正に調節されることが明らかになっている。さらに、*virF* の発現は pH による制御を受け、それには 2 成分制御系遺

伝子 *cpxR-cpxA* が関与し、特に *cpxR* は *virF* の発現に必須な因子であることが分担研究者、中山らによって報告されている。*Salmonella* において侵入能を担う *sipBCD* は *ipaBCD* に相同性を示す。また、*sipBCD* 遺伝子の発現制御遺伝子 *hilA*, *invF* について、*invF* は *Shigella* の *virF* とある程度の相同性を示すことや、*hilA* 発現は *virF* 発現同様、pH による制御を受けること等が明らかに

された。このような背景から、両菌種間の侵入性遺伝子を環境条件依存的に活性化する因子も共通である可能性がある。本研究では *Salmonella* における *cpxR-cpxA* 相同遺伝子の *hilA*、*sipBCD* 遺伝子発現や、総体的病原性への関与の有無、及び、その関与の具体的機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

この目的のため、まず *Salmonella* の *cpxR-cpxA* 各遺伝子の変異株を昨年度の報告書で述べた方法で作製した。得られた各変異株について、*hilA* 遺伝子の発現をモニターした。*hilA-lacZ* 翻訳融合遺伝子を持つプラスミドを作製し、野生株、各変異株に保持させ、pH6.0 と pH8.0 での発現を測定した。これは、赤痢菌、大腸菌においては、*cpxR-A* が pH 依存的な遺伝子発現制御を行うことから、類似の現象がサルモネラでも起こる可能性を鑑みて試行した実験条件である。また、前記各変異株と野生株とで侵入に直接関与する遺伝子産物の1つ、SipC の培養上清中の量を上清を TCA 沈澱させたものをサンプルとして、SipC 抗体を用いたウエスタン法で観察した。この実験でも pH6.0 と pH8.0 の培養後のサンプルを使用した。また、各遺伝子変異株の実際の細胞侵入度をヒト上皮由来の培養細胞、INT407 Cell line を用いて測定した。各菌を MOI ~10 で細胞に感染させ、侵入した細菌数の Initial Inoculum に対する比率で侵入度を定量化した。この実験でも pH6.0 と pH8.0 の培養後の条件を設定した。また、後述のように、*hilA* 発現の低下が見られた、*cpxA* 変異株、pH6.0 の培養条件では、この発現低下のメカニズムを探る一環として、*hilA* 発現に関与することが既に報告されている、*sirA*、*phoP*、*hilC*、*hilD* 等の遺伝子発現を各遺伝子の *lacZ* 融合遺伝子を作製し

てモニターした。また、*cpxA* 変異株、pH6.0 の培養条件での *hilA* 発現の低下のメカニズムにアプローチする、もうひとつの方法として、この変異株、環境条件で *hilA* 発現を回復させるマルチコピーサプレッサーを *Salmonella* の total DNA library から isolation し、その DNA 領域の解析をおこなった。

C. 研究結果

上述の方法で作製した *Salmonella cpxR*、*cpxA* 各変異株での *hilA* 発現をモニターした。*hilA* 遺伝子の発現は、pH6.0 での培養後、*cpxA* 変異株においてのみ、野生株や、*cpxR* 変異株の約 40 分の 1 程度にまで低下した。pH8.0 では野生株、*cpxR* 変異株に対して約 4 分の 1 程度までの発現量低下にとどまった。*cpxR* 変異株では野生株との差が見られなかった。研究目的の項で述べたように、HilA 産物は *invF* を通じて *sipBCD* 発現を活性化するので、上記の結果から、*cpxA* 変異株では SipBCD 産物量が低下することが予想される。そこで、SipC に対するウエスタンハイブリダイゼーションを行なったところ、pH6.0 で SipC が検出限界以下まで減少していた。pH8.0 では野生株と同程度のシグナルが観察され、HilA 産物の 4 分の 1 程度までの減少では SipC 発現には大きく影響しないことが示唆された。また、*hilA* 発現測定の結果から予想できるように、*cpxR* 変異は SipC 産物量に影響していなかった。

SipBCD は宿主細胞侵入の直接のエフェクターであることから、上記の結果は、*cpxA* 変異が細胞侵入に影響することを予想させる。培養細胞 INT407 を用いた MOI=10 のアッセイ系で、pH6.0 での培養後の *cpxA* 変異株の細胞侵入能は野生株や *cpxR* 変異株の約 10 分の 1 まで低下した。また、SipC ウエスタンの結果から予想されるように

pH8.0での培養後は、侵入能低下は観察されなかった。*cpxR* 変異株では野生株との差は認められず、*hilA* 発現、SipC産物量測定の結果と良く一致している。

hilA 発現の低下が見られた、*cpxA* 変異株、pH6.0の培養条件で、この発現低下のメカニズムを探る一環として、*hilA* 発現に関与することが既に報告されている、*sirA*、*phoP*、*hilC*、*hilD* 等の遺伝子発現を各遺伝子の *lacZ* 融合遺伝子を作製してモニターした。この条件下で、*hilC* で約 1/3 まで、*hilD* で約 1/2 までの発現低下が見られた。*sirA*、*phoP* の発現量の変化は認められなかった。*cpxA* と cognate pair をなすレギュレーターと考えた *cpxR* は上記の遺伝子発現や表現型に関与するデータが得られなかった。このことから、この regulatory circuit において、センサーである *cpxA* と連絡し、直接転写活性化をおこなうレギュレーターは *cpxR* 以外のものであると考えられた。そこで、そのような遺伝子を同定することも含め、*cpxA* 変異株での *hilA* 発現の低下のメカニズムにアプローチする、もうひとつの方法として、この変異株、環境条件で *hilA* 発現を回復させるマルチコピーサプレッサーを *Salmonella* の total DNA library から isolation し、その DNA 領域の解析をおこなった。現在までに、3つの領域について解析を行なった。それらは、

- 1) 染色体上 96min. 付近にマップされ、HilC や HilD と相同性のある、新規 AraC type の転写因子をコードする遺伝子。
- 2) 既に *hilA* 発現の activator として報告のある *hilC* 遺伝子
- 3) 染色体上 76min. 付近にマップされる glycerol dehydrogenase 遺伝子群と高い相同性を示す遺伝子であった。

現在、1) と 3) の遺伝子について、その染色体上のコピーの機能を明らかにする目的で、それぞれの遺伝子破壊株を作製中で

ある。

D. 考察

C.の項より明らかなように、*cpxA* 遺伝子は、pH6.0での培養条件での *hilA* 発現、従ってその制御下にある *sipBCD* 発現、最終的には細胞侵入能の活性化に強く関与することが分かった。*cpxA* による *hilA* 発現の活性化は、少なくとも一部は、*hilA* の activator として報告されている、*hilC*、*hilD* の発現上昇を通じて達成されているが、*sirA* や *phoP* の発現段階を通じてはいないことがわかった。

また、*cpxA* と cognate pair をなすレギュレーターと考えた *cpxR* は上記の遺伝子発現や表現型に関与するデータが得られなかった。このことから、この regulatory circuit において、センサーである *cpxA* と連絡し、直接転写活性化をおこなうレギュレーターは *cpxR* 以外のものであると考えられ、それを同定することが次なる課題となった。現在、この目的のため、*cpxA* 変異株の表現型を相補するマルチコピーサプレッサーのクローニングを試行しており、すでに上述の3つの領域については解析を行なった。これらは分類上、2成分制御系レギュレーターではない転写因子、または酵素の遺伝子であるが、これら遺伝子の発現が目的とするレギュレーターの支配下にあり、最終的にこれら遺伝子産物が *hilA* の活性化に関与する可能性がある。特に glycerol dehydrogenase 様の遺伝子が、他の遺伝子の発現の活性化に関与するとすれば、非常に興味深く、この酵素の活性を阻害することで、*hilA* 発現を抑制できる可能性も考えられ、これについては特に、当該遺伝子破壊株の作製と表現型の確認を急いでいる。

また、染色体上 96min. 付近にマップされ、HilC や HilD と相同性のある、新規 AraC type の転写因子をコードする遺伝子

が、マルチコピーサプレッサーとして同定されたことは、*hilC* 遺伝子を破壊した時の *hilA* 発現低下がそれ程顕著ではない、という報告を考え合わせた時に非常に興味深い。即ち、*hilC* 遺伝子と、今回同定された新規 AraC type の転写因子の遺伝子とが、少なくとも実験室培養条件では、互いに余剰な関係にある可能性があるからである。このことを鑑み、この遺伝子の破壊に当たっては、*hilC* 変異との 2 重変異株も作製して表現型の解析を行なう予定である。

E. 結論

サルモネラ菌 *cpxA* 遺伝子は、少なくとも、ある条件下では細胞侵入能を司る遺伝子群のアクチベーター遺伝子、*hilA* の発現そのものを上昇させる機能を持っていることが分かった。この制御は、少なくとも、一部、*hilC*、*hilD* 発現の上昇を通じて達成されていること、*CpxA* に対応すると考えられた、2 成分制御系レギュレーター、*CpxR* はこれらに関与しないことがわかった。

マルチコピーサプレッサーの分離等の方法で、*cpxA* による、*hilC*、*hilD* を通した *hilA* 発現活性化のメカニズムにアプローチしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Genotypic variations of *Shiga* toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. Ro Osawa, Sunao Iyoda, Shu-ichi Nakayama, Akihito Wada, Shiro Yamai, and Haruo Watanabe (2000) J. Med. Microbiol. 49, 565-574

Activation of *hilA* and the invasion genes at low pH require *cpxA*, but not the putative cognate

response regulator *cpxR* in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Shu-ichi Nakayama, Akira Kushiro, Takashi Asahara, Ryu-ichiro Tanaka, Lan Hu, Dennis J. Kopecko, and Haruo Watanabe. (投稿中: Infect. Immun.)

2. 学会発表

cpxA, but not *cpxR* is required for full activation of the *hilA* expression and the consequent phenotype of invasiveness in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Shu-ichi Nakayama, Akira Kushiro, Kensuke Shimizu, Ryu-ichiro Tanaka, Lan Hu, Dennis J. Kopecko, and Haruo Watanabe (2001) The 36th Joint Conference of U.S.-Japan cooperative medical science program Cholera and other bacterial enteric infection panel. Jan. 2001, Osaka

Salmonella Typhimurium *cpxA* 変異株を相補するマルチコピーサプレッサーの解析 (中山周一、久代明、朝原崇、田中隆一郎、渡辺治雄)、第74回日本細菌学会総会、2001年4月、岡山

サルモネラ *cpxA* 変異を多コピーで相補する *hilF*、*gdh* 遺伝子の破壊とキャラクターゼーション (中山周一、久代明、田中隆一郎、渡辺治雄)、第75回日本細菌学会総会、予定 (要旨受理済み) 2002年4月、横浜

G. 知的所有権の取得状況

特許申請

二成分制御系遺伝子、ポリペプチド、組み換えベクター及びエルシニア属細菌感染症の予防・治療剤の選別法

(渡辺治雄、中山周一、ヤクルト研究所)

サルモネラの食品内における食塩抵抗性と VNC 状態への移行に関する研究

分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学教室助教授

研究要旨

1999 年、乾燥イカ菓子を原因食品とする *Salmonella* Oranienburg (以下 SO) 感染事例が我が国において広域的に発生した。原因食品であるイカ菓子の製造工程には漬込液への浸漬とそれに続く 2 度の乾燥工程が含まれていた。本製品は約 0.6 という低い水分活性であった為、通常では菌の増殖生存を抑制するものと考えられたが、疫学的検討から本事例に於ける原因菌はこうした強いストレス下にも生存し続けたものと推察された。サルモネラに代表される食品媒介感染症の原因病原菌は、一度発生してもなかなか食品中から検出されず、問題となっている。我々はこのような状況は食品中における病原細菌の生体がほとんど明らかになっていないことが原因であると考えている。今回の事例は、こうした強いストレス下において、サルモネラ菌が生存しえたのか解明することにより、食品汚染を防ぐ手がかりになると期待される。今回の結果から、食品由来 SO は高濃度の食塩水中でも生存していたが、患者由来 SO は 1-2 日後には培地上に全く発育しなくなってしまった。すなわちそれぞれは食塩耐性および感受性であると結論された。さらに、蛍光染色や蘇生試験を行ったところ、患者由来株は食塩水中で死亡しているわけではなく、ただ通常の栄養培地上に発育しなかっただけであると考えられ、いわゆる VNC (Viable but non-culturable cells) になっているものと結論された。しかし、全く病原性には変化はなく、環境中でサルモネラは容易にストレスに適応した形をとるものと考えられた。食品から原因菌を検出することは、通常の細菌学的検査方法では限界があるものと考えられた。

A. 研究目的

1999 年、乾燥イカ菓子を原因食品とする *Salmonella* Oranienburg (以下 SO) 感染事例が我

が国において広域的に発生した。原因食品であるイカ菓子の製造工程には漬込液への浸漬とそれに続く 2 度の乾燥工程が含まれ

ていた。本製品は約 0.6 という低い水分活性であった為、通常では菌の増殖生存を抑制するものと考えられたが、疫学的検討から本事例に於ける原因菌はこうした強いストレス下にも生存し続けたものと推察された。我々は何故こうした強いストレス下において、サルモネラ菌が生存しえたのか解明するため、本研究を企図した。

B. 研究方法

1. 菌株および培地

事例における原因食品及び患者より分離された SO 計 9 株、対照として同じ血清型に属する散発事例由来の 2 株を供試菌株として用いた。食塩感受性変化及び乾燥再現試験においては食塩を含まない Nutrient プロスを増菌培地として使用した。また、コロニー数算出には DHL および TSA 寒天培地を用いた。VNC からの蘇生についてはハーナーテトラチオン酸塩培地（以下 HTB）、ブレイン・ハート・インヒュージョン プロス（以下 BHI プロス）を増菌培地として用いた。

2. 乾燥再現試験

Nutrient プロスで一夜培養した SO 菌液 50 μ l を 450 μ l の生理食塩水中に添加し、48 穴マイクロタイタープレート中で蓋を軽く開けた状態で 45°C、24 時間培養した。乾燥後、500 μ l の滅菌水を加え、よく混和させた後、100 μ l を DHL 培地及び TSA 培地に接種し、コロニー数を算定した。

3. 食塩水中における SO の消長試験

0 20%の各食塩水 10 ml に対し、100 μ l の SO の一夜培養液を接種し、37°Cにて培養した。培養液から経時的に 100 μ l を TSA 培地に接種

し、コロニー数を算出、比較した。また、前述の乾燥再現試験や食塩水中、後述の以下の乾燥再現試験などで、SO の VNC（Viable but non-culturable cells；生きてはいるが通常の栄養培地上に発育しない状態の細菌）移行を観察する目的で BacLight LIVE/DEAD cell viability kit を用いた蛍光染色を行った。

4. PFGE

供試菌株の遺伝子解析を行うために、*Xba*I 及び *Bln*I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った。方法は、定法に従って行った。

5. マウスに対する病原性の比較

BALB/C マウスに食品および患者由来 SO 代表株を約 10^8 個づつ腹腔内接種し、感染後 1 日、1, 2, 3, 4 週間目に肝臓、脾臓、末梢血、糞便中より菌の検出の有無と菌数変化について DHL 培地を用いて行った。

6. 製造工程の再現試験と VNC からの蘇生

約 6.6×10^9 個の SO 一夜培養液を 5 g の生イカを含む 50 ml の 7% 食塩水中に添加し、4°C で 24 時間培養した。漬込後、イカを取り出し、45°C で 24 時間乾燥させ、5 ml の緩衝リン酸ペプトン水（pH 7.2）に懸濁して、37°C にて 1 時間静置して混和させた。次にこの培養液から 0.1 ml を直接 DHL 培地に接種した（直接培養）。また、1 ml およびその 10 倍、100 倍希釈した液を 10 ml の HTB に加え、37°C で 20 時間培養した後、最確数法（MPN 法）により生菌数を算出した。同時に、Santo Domingo らの報告に従い、SO 一夜培養液をフィルター濾過した上清

100 μ l を添加した 5% BHI ブロス 10ml に、それらの BPW 懸濁液および希釈液 1 ml を接種し、7 日間室温で培養した。増菌は DHL 及び TSA 培地上で確認し、同じく MPN 法により生菌数の算出を行った。

7. モルヒネ投与マウスにおける病原性についての検討

1 匹当たりモルヒネ 10mg を BALB/C マウスに皮下接種し、24 時間後に、経口的に VNC 懸濁液及び通常培養の SO 菌液を接種し、生残率について検討するとともに、臓器内からのサルモネラ菌の検出を DHL 培地を用いて行った。

C. D. 研究結果および考察

本研究ではまず製造工程を再現し、食品由来及び患者由来株の消長について観察した。その結果、これらの菌株は PFGE で同一のパターンであったにも拘わらず、製造工程中のストレス暴露によりその生存性に著しい差異を示した。すなわち食品由来株ではこうした工程後も相当数が生残していたのに対し、患者由来株では著しいコロニー形成能の喪失を認めた。この生存性に関わる因子について検討したところ、45℃ といった温度条件あるいは乾燥による食塩非存在下に於ける水分活性の低下に対して、SO 供試株は何れも強い抵抗性を示したが、食塩に因る浸透圧変化が重要な因子であると結論した。さらにこうした食塩感受性の差異が病原性に与える影響を調べたが、マウスにおける致死活性や臓器内での菌数に有意な差を認めなかった。こうしたストレス暴露後における患者由来株のプレート上でのコロニー形成能の喪失から VNC への移行が推察され、蛍光染色による検討の結

果、患者由来株は食品由来株とほぼ同様に 90% 以上の生存活性を認め、患者由来株は生存工程中に VNC へと移行することが強く示唆された。VNC 菌の復帰について検証したところ、サルモネラ検出に汎用される HTB を用いた増菌培養により菌は検出し得た。しかしながらその検出率は低く、約 17.76 cfu / g の検出率をみるにとどまった。より効率的な検出法について次に検討した。河川水中における VNC 状態のサルモネラ菌が培養上清中に含まれる bacterial cytokine により蘇生するとの報告があったことから、我々はこの方法を用いて食品中における VNC サルモネラ菌の検出を試みた。その結果、検出生菌数は 187.64 cfu / g と HTB の約 10-100 倍となることが実証され、食品中からの検出に対してもこの方法が有用であることが示された。又、VNC 菌の生体に対する病原性について検討する為、Balb/c マウスに BPW 懸濁液を接種したが、経口、腹腔いずれの方法によってもマウスに致死的影響を及ぼさなかった。しかしながら、モルヒネ投与 Balb/c マウスをモデルとして懸濁液を接種したところ、臓器内での菌の増殖とマウスへの致死活性が認められた。これらのことから VNC 状態に陥った場合にも、サルモネラ菌は病原性を依然として潜在的に保有しており、特に免疫力の弱い宿主体内においては復帰しやすいことが実証された。以上より、食塩暴露により VNC 状態となったサルモネラ菌は既存の培養法では検出が困難であるが、適切な培養法を用いることによって検出し得ること

が実証された。また、こうした VNC 状態にあるサルモネラ菌も決して体内で復帰しないわけではなく潜在的に病原性を保有し、ある条件においては復帰せしめることから、特に免疫力の低下した宿主においては十分に感染力を有する病原体として認識すべきものと思われる。こうした食塩及び乾燥といった処理は菌の増殖抑制に作用はするが死滅を必ずしも招かないものと考察され、食品衛生的見地からも潜在的な病原性を有するものとして十分な監視体制の強化が必要であるものと思われる。

E. 結論

1999 年、乾燥イカ菓子を原因食品とする *Salmonella* Oranienburg 感染事例が我が国において広域的に発生した。原因食品であるイカ菓子の製造工程には漬込液への浸漬とそれに続く 2 度の乾燥工程が含まれていた。本製品は約 0.6 という低い水分活性であった為、通常では菌の増殖生存を抑制するものと考えられたが、疫学的検討から本事例に於ける原因菌はこうした強いストレス下にも生存し続けたものと推察された。本研究において、この事例由来の食品および患者由来株は、それぞれは食塩耐性および感受性であると結論された。さらに、患者由来株は食塩水中で高頻度に VNC (Viable but non-culturable cells) になっているものと結論された。しかし、全く病原性には変化はなく、環境中でサルモネラは容易にストレスに適応した形をとるものと考えられ、食品から原因菌を検出することは、通常の細菌学的検査方法では限界があるものといえる。

F. 研究発表

論文

1. Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Mori, N., Oishi, K., Nagatake, T., Takahashi, A., Asakura, H., Makino, S-I., Hojo, H., Nakahara, Y., Ohsaki, A., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Moss, J. & Hirayama, T. 2001, *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human b-defensin-2 (hBD-2) mRNA production by Caco-2 cells. J. Biol. Chem 276, 30521-30526
2. Tamada Y., Y. Nakaoka, K. Nishimori, A. Doi, T. Kumaki, N. Uemura, K. Tanaka, S-I, Makino, T. Sameshima, M. Akiba, M. Nakazawa, and I. Uchida. 2001, Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis, J. Clin. Microbiol 39, 1057-1066
3. Asakura H., O. Tajima, M. Watarai, T. Shirahata, H. Kurazono and S. Makino. 2001, Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chicks. Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chicks. 63, 1221-1224

表 1. *S. Oranienburg* strains used in this study

Strains	Origin (age)	Symptom
Sa99001	Patient	asymptomatic
Sa99004	Patient	septicemia
Sa99026	Patient	septicemia
Sa99061	Patient	septicemia
Sa99073	Patient	asymptomatic
Sa9911T	Detected from bile Dried squid	-
Sa9912A	Raw materials	-
Sa9921K	Raw materials	-
Sa9937O	Raw materials	-
Sai-1	Patient	septicemia
Sai-2	Patient	diarrhea

Nine strains except Sai-1 and Sai-2 were associated with an outbreak caused by dried squid. The other 2 strains were isolated from sporadic outbreaks.

表 2. Survival of *S. Oranienburg* isolates through the dry-up process.

Strains	Culturable cell numbers (CFU/ml)			
	Initial dose	Dry-up in saline	Dry-up in water	Incubation in saline*
Patient-origin				
Sa99001	1.7×10^9	3.5×10^2	6.9×10^6	2.6×10^7
Sa99004	5.3×10^8	< 10	1.8×10^7	2.2×10^7
Sa99026	4.4×10^8	1.9×10^2	2.2×10^7	1.7×10^7
Sa99061	6.8×10^8	2.4×10^2	1.4×10^6	2.8×10^7
Sa99073	3.8×10^8	1.5×10^2	2.5×10^7	1.2×10^7
Food-origin				
Sa9911T	5.6×10^8	2.8×10^7	3.0×10^6	1.8×10^7
Sa9912A	3.7×10^8	8.9×10^5	1.0×10^7	2.5×10^7
Sa9921K	5.0×10^8	2.3×10^6	5.6×10^6	2.2×10^7
Sa9937O	9.4×10^8	7.2×10^6	1.4×10^7	2.7×10^7

*All isolates were incubated in saline at 45°C for 24 h.

Each value shows the standard values in the experiments performed in triplicate.

表 3 . Resuscitation of *S. Oranienburg* cell suspension in VNC state.

Enrichment procedures	Recovery of Sa99004 cells from*				MPN values [SD]
	1 ml	100 μ l	10 μ l	1 μ l	
Direct plating	· (0/25)	· (0/25)	· (0/25)	· (0/25)	0
HTB	+ (5/25)	+ (1/25)	· (0 /25)	· (0/25)	0-45 [17.76]
	+ (23/25)	+ (13/25)	+ (5/25)	· (0/25)	225-550 [187.64]

*One ml and its serial dilutions of the Sa99004 cells contaminated-BPW suspensions with dry-processed squids were used for each experiment as described in materials and methods.

In a total of 25 tubes, the numbers of which *Salmonella* cells were recovered *in vitro* were shown in the parenthesis.

+/- indicates that *Salmonella* cells can/ can not be recovered from the samples, respectively.

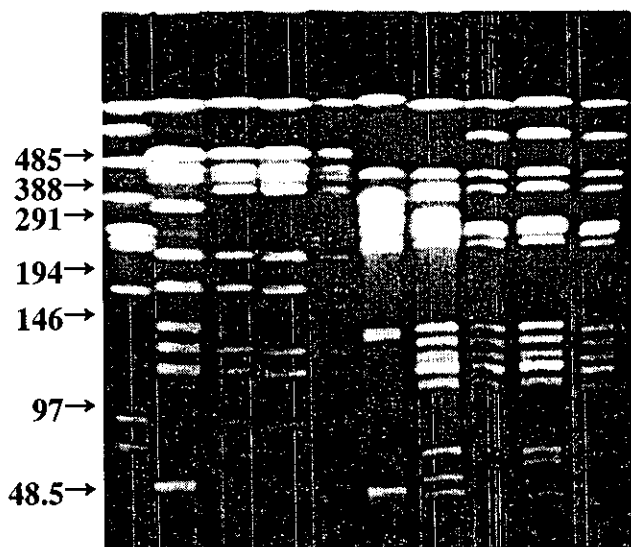


図1. パルスフィールドゲル電気泳動

レーン1と6；散発例由来株1、レーン2と7；散発例由来株2、レーン3と8；食品由来株、レーン4、5、9、10；患者由来株。レーン1 5；*Xba*I 切断。レーン6 10；*Bln*I 切断。

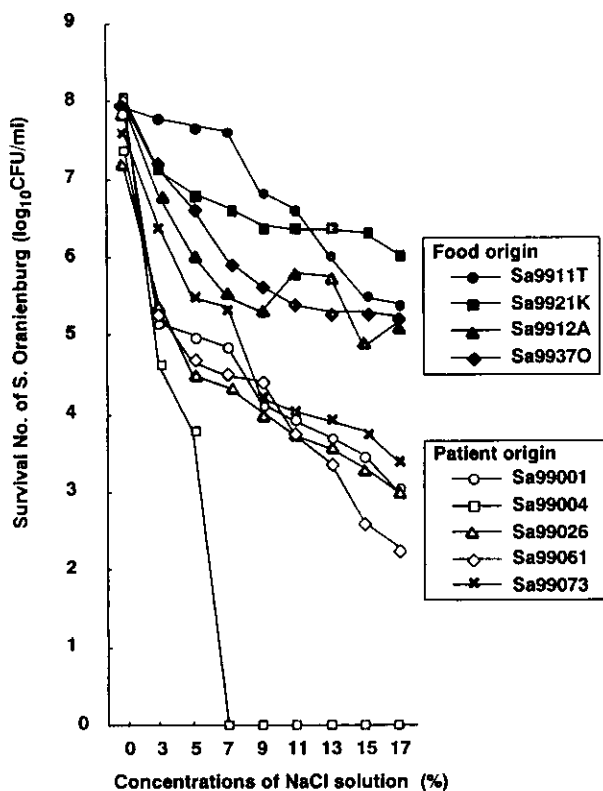


図2. サルモネラ株の各食塩濃度におけるプレート上の菌数の推移

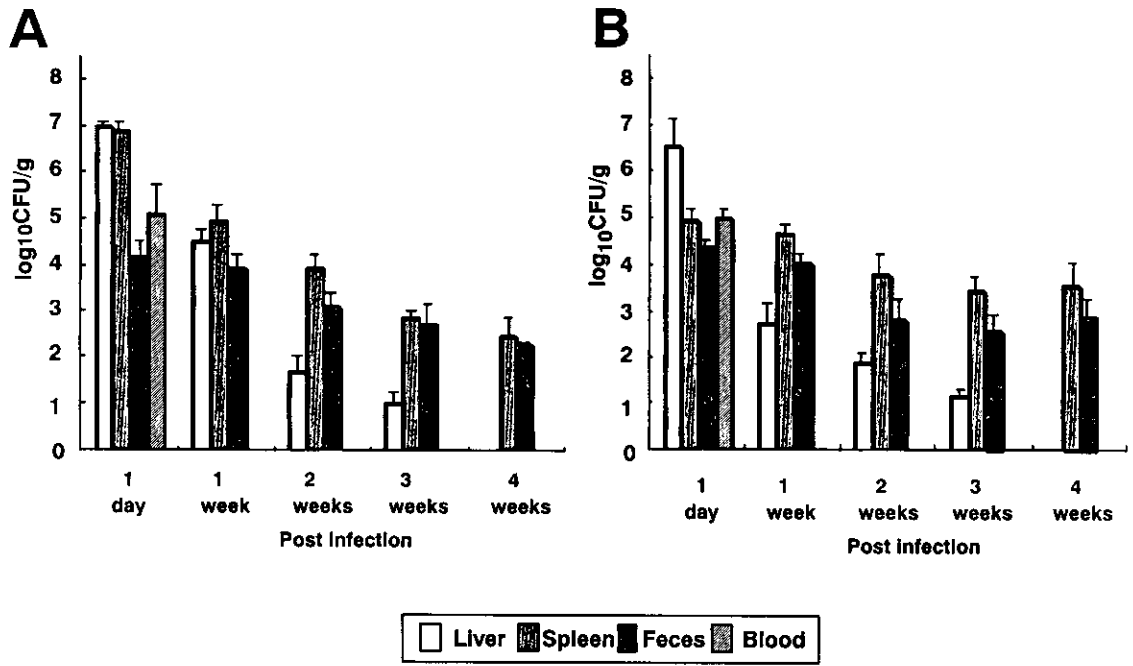


図 3. マウス感染実験

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧」

- I 論文発表 (発表予定を含む)
1. S. Makino, H. Kurazono, M. Chongsauguan, H. Hayashi, H. Cheun, S. Suzaki and T. Shirahata. 1999. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples J. Vet. Med. Sci. 61:1245-1247
 2. P. Tapchaisri, P. Wangroongsarb, W. Panbangred, T. Kalambaheti, M. Chongsa-nguan, P. Srimanote, H. Kurazono, H. Hayashi, and W. Chaicumpa. 1999. Detection of *Salmonella* Contamination in Food Samples by Dot-ELISA, DNA Amplification and Bacterial Culture. Asian Pasific Journal of Allergy and Immunology 17: 41-51.
 3. E. Yabuuchi and T. Ezaki. 2000. Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *S. choleraesuis* to *S. enterica* and the creation of word neotype species, and for conservation of *S. choleraesuis*. Int. J. System. Evolt. Microbiol. 50, 1693-1694.
 4. T. Ezaki, M. Amano, Y. Kawamura, and E. Yabuuchi. 2000. Proposal of *Salmonella paratyphi* sp. Nov., nom. Rev., and request for an opinion to conserve the specific epithet *paratyphi* in the binary combination *Salmonella paratyphi*. Int. J. System. Evolt. Microbiol. 50. 941-944.
 5. T. Ezaki, Y. Kawamura and E. Yabuuchi, 2000. Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, and *S. typhimurium*, and conservation of the specific epithets *enteritidis* and *typhimurium*. Int. J. System. Evolt. Microbiol. 50. 945-947
 6. K. Sakamoto, H. Hirose, T. Ezaki, Y. Kawamura, A. Onizuka, M. Hayashi, T. Yamada and T. Saga. 2000. Translocation of *Salmonella typhimurium* in rats; effect of enteral and parental nutrition. Eur. J. Surg. 166, 814-817.
 7. L. Zhao, Y. Kawamura and T. Ezaki. 2001. Construction of virulent defective mutants of *Salmonella typhi* and their phenotypic description as candidates for educational usage. Microbiol. Cult. coll. 17, 13-21.
 8. L. Zao, T. Ezaki, Z. Li., Y. Kawamura, K. Hirose and H. Watanabe. 2001. Vi-suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. Microbiol. Immunol. 42:149-158.

10. A. Takahashi, A. Wada, K. Ogushi, K. Maeda, T. Kawamura, K. Mawatari, H. Kurazono, J. Moss, T. Hirayama and Y. Nakaya. 2001. Production of b-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS Letters*. 508, 484-488.
11. K. Ogushi, A. Wada, T. Niidime, N. Mori, K. Oishi, T. Nagatake, A. Takahashi, H. Asakura, S. Makino, H. Hojo, Y. Nakahara, M. Ohsaki, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, J. Moss and T. Hirayama. 2001. *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human b-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 30521-30526.
12. Sonjai, K., R. Soisangwan, Y. Sakolvaree, H. Kurazono, M. Chongsauguan, P. Tapchaisri, Y. Mahakunkijcharoen, G.B. Nair, H. Hayashi and W. Chaicumpa. 2001. Validation of *Salmonella* and Shigellosis diagnostic kits at a provincial hospital in Thailand. *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.* 19. 115-127.
13. Y. Tamada, Y. Nakaoka, K. Nishimori, A. Doi, T. Kumaki, N. Uemura, K. Tanaka, S. Makino, T. Sameshima, M. Akiba, M. Nakazawa and I. Uchida. 2001. Molecular Typing and Epidemiological Study of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolates from Cattle by Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism Fingerprinting and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clinical Microbiology*. 1057-1066
14. T. Kumao, W. Ba-Thein, H. Hayashi. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella oranienburg* outbreaks. Revised version-JCM1469-01.
15. W. Ba-Thein, T. Kumaoh, M. Obata-Yasuoka, H. Hayashi. 2002. Cell-dependent serovar-specific expression of *Salmonella* fimbriae.
16. W. Ba-Thein, and H. Hayashi. 2002