

ら、本遺伝子の検出による毒素産生のモニタリングは困難と考えられた。

3) リアルタイム RT-PCR による q 遺伝子の mRNA レベルは、Stx2 産生量と極めて高い相関性を示し、毒素の定量に際する Biomarker として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1) 朝倉宏、藤田美幸、秋山奈美、牧野壮一、倉園久夫、中澤宗生、山本茂貴、五十君静信. 志賀毒素 (Stx) 産生を指標としたウシ腸管出血性大腸菌 O157 の検出法に関する研究. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 3 月. 茨城県つくば市.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

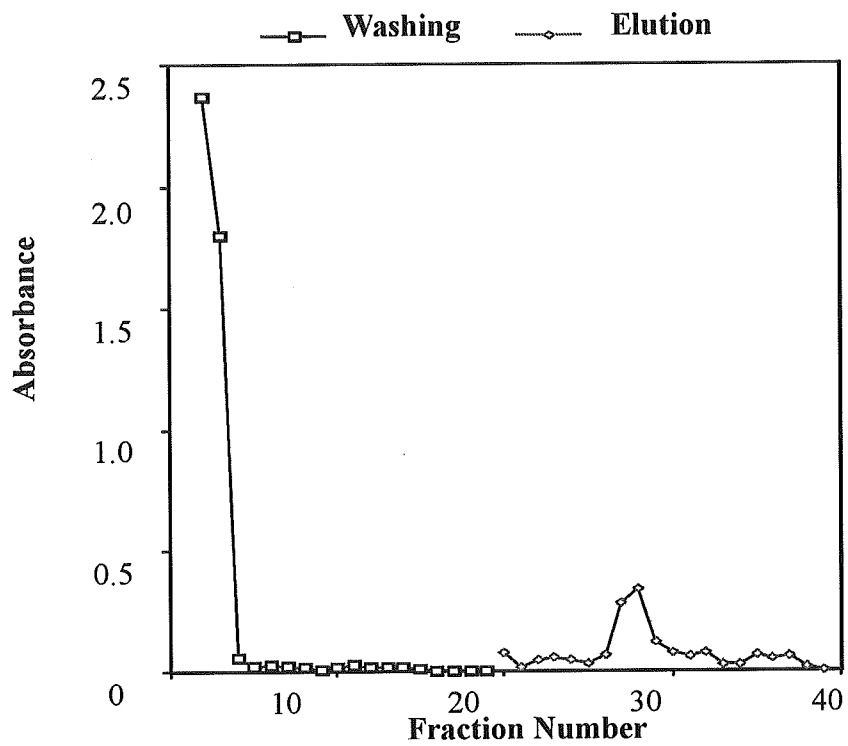
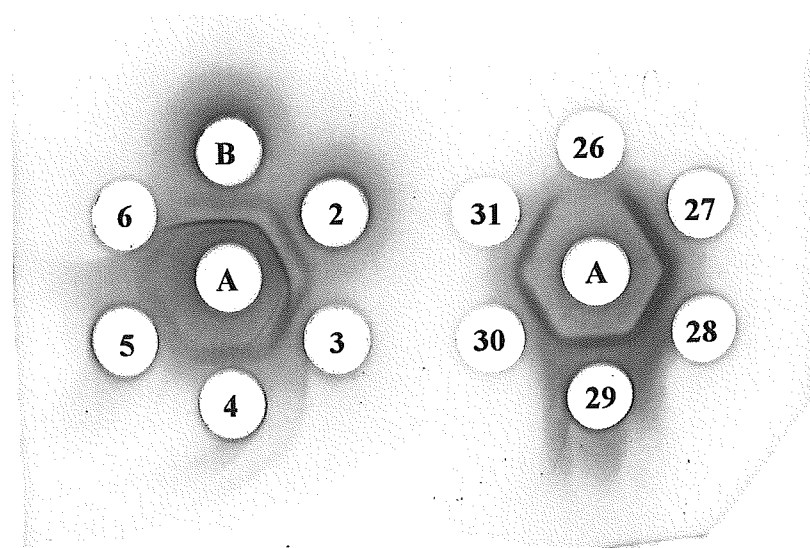


図1 アフィニティークロマトグラフィーによる Stx2 毒素の溶出



A: α -Stx2 rabbit serum
 B: Through-out from the column
 Fraction No.2-6: Washed fraction
 Fraction No.26-31: Elute

図2 ゲル内沈降反応

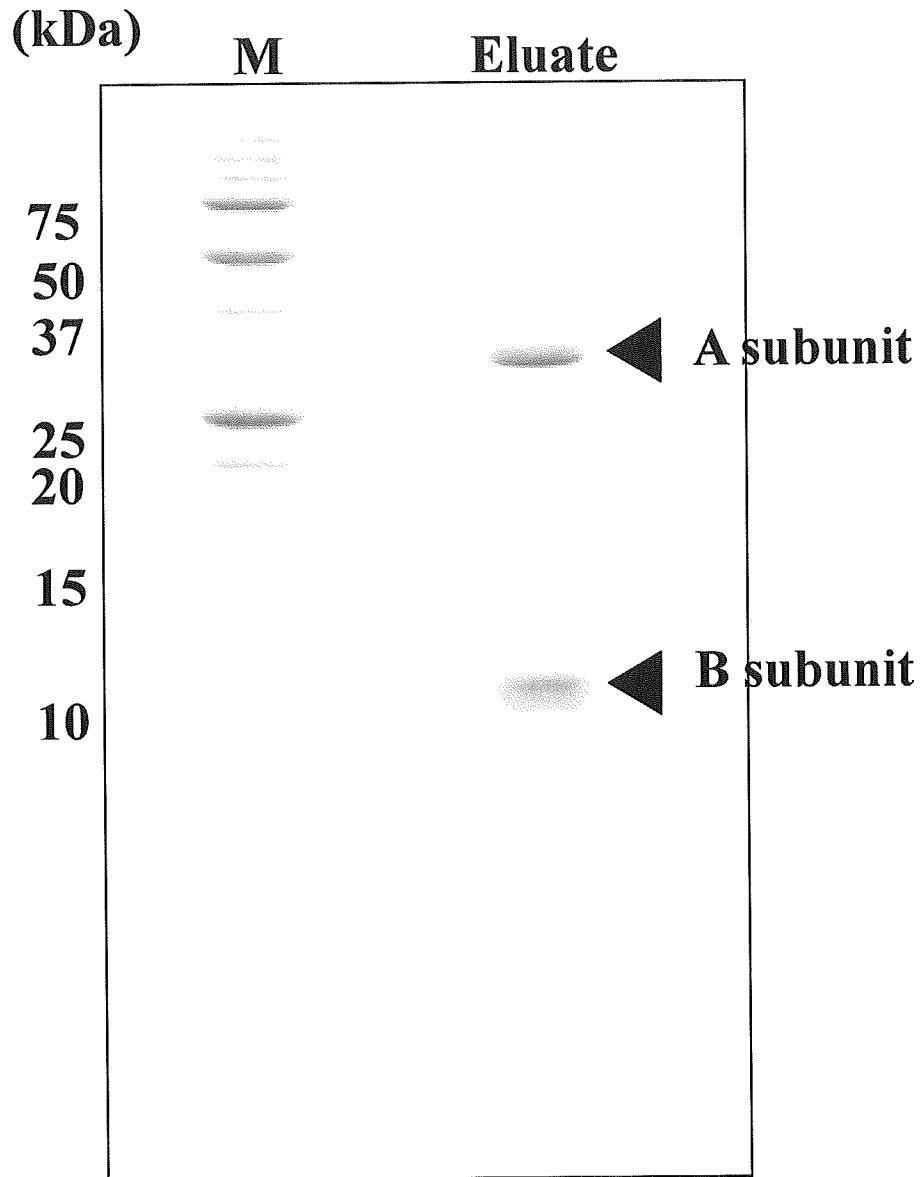


図3 Stx2 毒素の SDS-PAGE 像

精製 Stx2 を SDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動を行った。矢印は A および B サブユニットを示している。

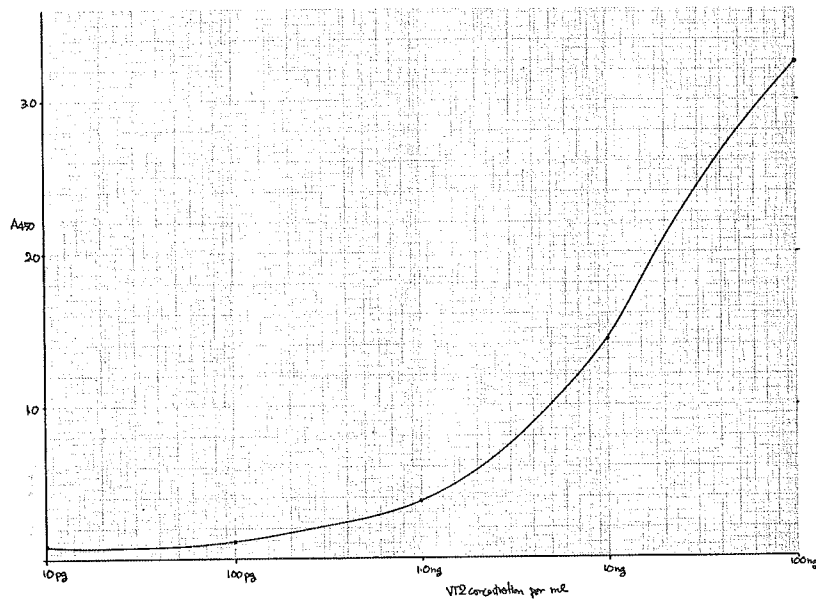


図4 精製毒素に対する ELISA 活性測定の結果

精製毒素について、10 倍段階希釈液(1.0 μ g/ml~10pg/ml)を作成し、作成した ELISA 系での反応性を確認した。吸光度に基づいて検量線を作成した結果、検出限界は 100 pg/ml であった。

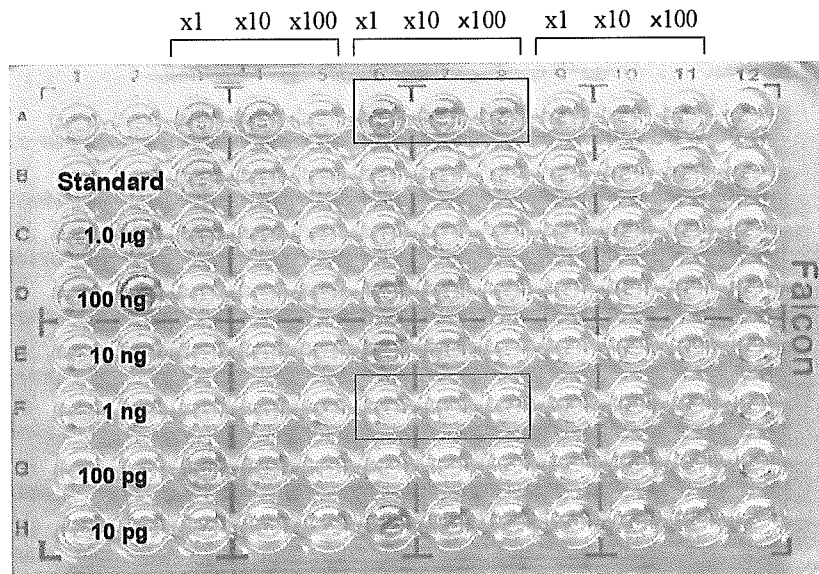


図5 Stx2 に対する ELISA の一例

O157 菌体由来サンプルは x 1、x10、x100 倍希釈を行い、試験に供した (Lane3-11)。Standard には 6 段階希釈(1.0 mg-10 pg)を行った Stx2 を用いた。

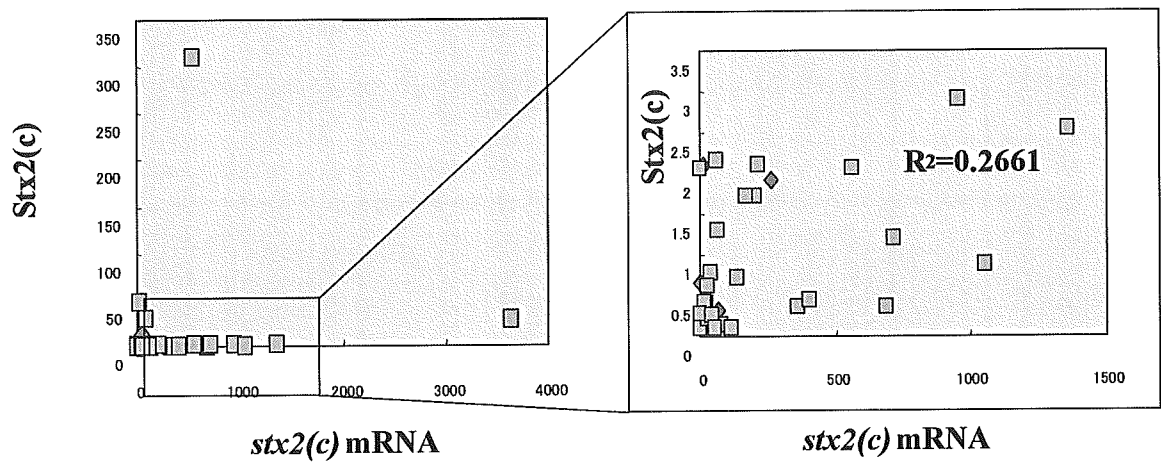


図7 毒素産生と *stx2* 遺伝子発現の相関性

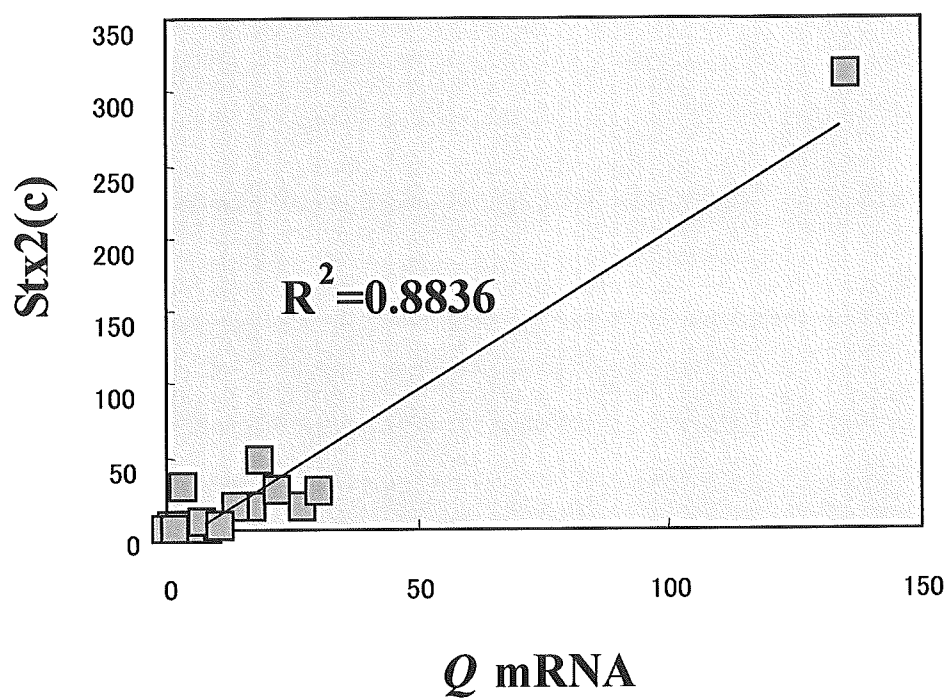


図8 毒素産生と *Q* 遺伝子の相関

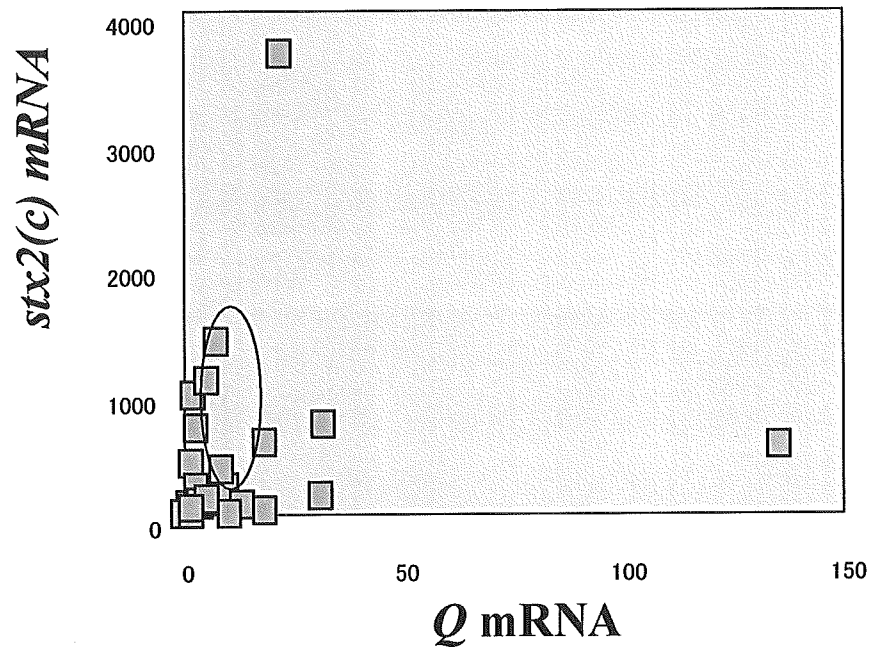


図 9 *stx2* 遺伝子および *Q* 遺伝子の発現比較

表 1 Stx2 産生量と *q* 遺伝子の保有状況

<i>stx</i> 型	菌株	ELISA	PCR		
			<i>stx</i>	<i>q</i> ₉₃₃	<i>q</i> ₂₈₅₁
2	364	0.044	0.003	+	-
	369	0.047	0.002	-	-
	442	0.041	0.003	-	-
	119	0.087	0.194	-	-
	120	1.911	260.409	-	-
2c	330	1.716	203.000	+	+
	331	0.141	74.056	+	+
	332	0.144	5.667	-	+
	353	0.718	134.000	-	+
	354	2.544	1357.778	+	+
	355	0.354	362.333	-	+
	356	0.781	36.833	+	-
	358	0.403	20.000	+	+
	359	0.137	7.889	+	+
	360	0.434	406.232	+	+
	365	0.355	687.449	+	-
	397	0.270	5.155	+	+
	418	1.730	170.667	-	+
	264	2.907	952.167	+	-
	266	2.057	560.000	+	+
	267	2.167	58.889	-	+
	122	27.718	3644.500	-	-
	118	1.203	715.556	-	small
	476	0.629	27.667	-	+
	465	2.091	215.333	-	+

次のページに続く

	173	0.879	1051.000	+	+
1, 2	357		2653.956	+	-
	361	0.116	37.542	+	-
	362	2.105	12.651	+	-
	363		159.576	+	-
	387	0.659	2.467	-	-
	438	0.125	1.000	-	?
	174	0.327	65.128	+	-
	175	13.877	51.222	+	-
1, 2c	350	0.255	24.667	+	+
	414	1.306	64.208	-	-
	416	0.429	18.095	-	+
	268	0.100	0.469	-	-
	474	0.222	28.800	-	-
	84	29.070	99.096	-	+
	81	309.989	548.333	-	+
2, 2c	367	0.099	116.414	+	+
	392	47.816	28.979	-	+
	265	2.057	0.003	+	+
	206	0.278	0.004	-	-
	208	0.270	41.417	+	+
1, 2, 2c	384	0.088	53.889	-	+

表 2 *q* 遺伝子の保有状況

由来	Stx2,2c (ng/ml)	<i>q</i> 遺伝子の保有状況(%)	
		<i>q</i> ₉₃₃	<i>q</i> ₂₈₅₁
ウシ(n=56)	< 1	30	47
	1~10	33	67
	10~100	100	100
	> 100	100	-

*q*₉₃₃ および *q*₂₈₅₁ はそれぞれ *stx2* および *stx2c*-ファージである EDL933W および phi2851 の DNA 配列を元に作成したプライマーを用いた PCR 検出結果を示している。

表 3 *stx* 遺伝子, *q* 遺伝子の相対検出値

<i>stx</i> 型	菌株	ELISA	real time RT-PCR		
			<i>stx</i>	<i>q</i> ₉₃₃	<i>q</i> ₂₈₅₁
2	364	0.044	0.003	0.000	ND
	369	0.047	0.002	0.002	ND
	442	0.041	0.003	0.002	ND
	119	0.087	0.194	0.004	ND
	120	1.911	260.409	5.676	ND
2c	330	1.716	203.000	ND	9.868
	331	0.141	74.056	ND	4.042
	332	0.144	5.667	ND	0.821
	353	0.718	134.000	ND	31.254
	354	2.544	1357.778	ND	7.293
	355	0.354	362.333	ND	8.558
	356	0.781	36.833	ND	1.633
	358	0.403	20.000	ND	0.964
	359	0.137	7.889	ND	0.130
	360	0.434	406.232	ND	1.782
	365	0.355	687.449	ND	2.781
	397	0.270	5.155	ND	0.002
	418	1.730	170.667	ND	2.654
	264	2.907	952.167	ND	2.302
	266	2.057	560.000	ND	18.282
	267	2.167	58.889	ND	1.000
122	27.718	3644.500	ND	21.849	
118	1.203	715.556	ND	31.624	

続次頁

	476	0.629	27.667	ND	1.902
	465	2.091	215.333	ND	2.958
	173	0.879	1051.000	ND	5.152
1, 2	357		2653.956	0.680	ND
	361	0.116	37.542	0.225	ND
	362	2.105	12.651	0.684	ND
	363		159.576	0.825	ND
	387	0.659	2.467	0.056	ND
	438	0.125	1.000	0.190	ND
	174	0.327	65.128	0.827	ND
	175	13.877	51.222	1.000	ND
1, 2c	350	0.255	24.667	ND	1.306
	414	1.306	64.208	ND	13.260
	416	0.429	18.095	ND	1.955
	268	0.100	0.469	ND	0.000
	474	0.222	28.800	ND	1.708
	84	29.070	99.096	ND	3.619
	81	309.989	548.333	ND	135.620
2, 2c	367	0.099	116.414	0.024	4.932
	392	47.816	28.979	0.002	18.784
	265	2.057	0.003	0.002	10.534
	206	0.278	0.004	0.067	1.879
	208	0.270	41.417	0.074	1.557
1, 2, 2c	384	0.088	53.889	0.010	1.810

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)

「ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究」

(4) EHEC O157 および *C. rodentium* における ETT2 保有状況に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 朝倉宏

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157(以下、EHEC O157)は動物あるいは環境など広範囲に分布しており、個々の病原性は多様であると考えられる。一方で EHEC O157 の病原性を評価するための動物モデルとしては、志賀毒素(Stx)による毒性発現によってしか見ることができず、ヒトにおける病態を明らかにする目的で用いることはできないのが現状である。前年度の研究により、我々は *E. coli* Type III secretion system 2 (ETT2)領域が O157 株はほぼ共通に保有しているものの、*E. coli* O55 あるいは *Salmonella* Typhimurium はこれらの一部分しか有していないことを明らかにした。本研究では、本菌の代替的病態モデルとして有用と考えられている、*Citrobacter rodentium* における当該遺伝子領域の保有状況を明らかにした。結果として、当該菌はこれを有しておらず、*C. rodentium* による病態の検証は、O157 による生体応答とは何らかの違いがあることを示唆している。

協力研究者

帯広畜産大学

牧野壮一

帯広畜産大学

川本恵子

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の中でも、とりわけ血清型 O157 はヒトに重篤な腸管病原性を顕すことから、その制御は公衆衛生上、重要である。

本菌の病原性の評価は培養細胞系あるいは無菌マウスや幼弱ウサギを用いた動物実験により行われているが、これらは本菌の産生する志賀毒素 (Stx) による毒性発現によるものであり、ヒトにおける腸管感染モデルとはなりえない。近年、これを代替する菌種として、*Citrobacter rodentium* が報告されており、当該菌は正常マウスに腸管感染性を示すことからその有用性が考察されている。

以前の研究において、われわれは *Salmonella* の SPI-2 と高い相同性を有し、ヒト由来 EHEC O157 株においてほぼ共通に保有する遺伝子領域として、*E. coli* Type III Secretion System 2 (ETT2) の存在を明らかにした。さらに、サザンプロットを用いた DNA 相同性解析により、ウシ由来株の一部では *eivF* 遺伝子の多形性を有することを示した。

本研究では ETT2 の生体に対する病原性への関与を *C. rodentium* 感染モデルを用いて検討することが可能か明らかにするため、*C. rodentium* における ETT2 遺伝子群の保有状況を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 菌株ならびに培地

本研究には、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 株として、98 年に生じたイクラ醤油漬を原因食品とする F2 株を用いた。また、*Citrobacter rodentium* XX 株をあわせて用いた。特に記載のない限り、本菌は L-broth (10g Trypton, 5g Yeast extract, 5g NaCl / liter) 中において 37°C で培養をおこなった。

2. PCR

一夜培養液 1ml より、DNA extraction キット (Qiagen) を用いて、DNA を抽出・精製した。DNA 溶液 1ul を鋳型として、反応液 (5ul 10x EX Taq, 4ul dNTP mixture, 0.5ul EX Taq, 1ul primer sets (each 20μM), 38.5ul DDW) を作成した。反応条件およびプライマー (表 1) は、Ren らの報告に従って調整した。PTS-200 cyclor (Bio-Rad Laboratories) を用いて PCR 反応を実施した後、1% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により増幅遺伝子の検出を行った。

C. 研究結果

1. O157 における ETT2 の保有状況

O157 菌株間における ETT2 遺伝子領域の多様性について検討するため、計 10 種のプライマーセットを用いて、検出を試みた。

供試 8 株の中で、1 株 (F2) のみ、領域 3 が検出されなかったが、そのほかの領域についてはいずれも検出され (図 1 および 2)、本遺伝子領域が O157 株間で保持されていることが明らかになった。

また、この結果は、前年度行ったサザンブロットによる *eivF* 遺伝子検出結果と同様であり、

2. *C. rodentium* における ETT2 の検出
C. rodentium における ETT2 遺伝子群の検出を試みたが、いずれの領域も検出されなかった。このことから、ETT2 遺伝子領域は、*E. coli* に特有であることが示唆された。

D. 考察

Type III secretion system (TTSS) は、多くの病原細菌において、病原性を顕すために必要な機構である。ETT2 は *Salmonella* の SPI-2 と高い相同性を有することが明らかとなっているがその機能についてはまだ明らかでない。ETT2 が EHEC と類似した病原性を有すると考えられている *C. rodentium* に認められなかったことから、*C. rodentium* は EHEC が生じる前に派生したと推察される。また、O157 菌株間における ETT2 領域の多様性については、前年度も検討したが、本年度は対象遺伝子群を拡大し、ETT2 領域と目される全領域のスクリーニングを行った。血清型 O157 でのこのような多様性が病原性に関与しているか、

今後、検討する必要があると思われる。

E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

- 1) Ren CP, Chaudhuri RR, Fivian A, Bailey CM, Antonio M, Barnes WM, Pallen MJ. The ETT2 Gene Cluster, Encoding a Second Type III Secretion System from *Escherichia coli*, Is Present in the Majority of Strains but Has Undergone Widespread Mutational Attrition. *J Bacteriol.* 2004. 186(11): 3547-6

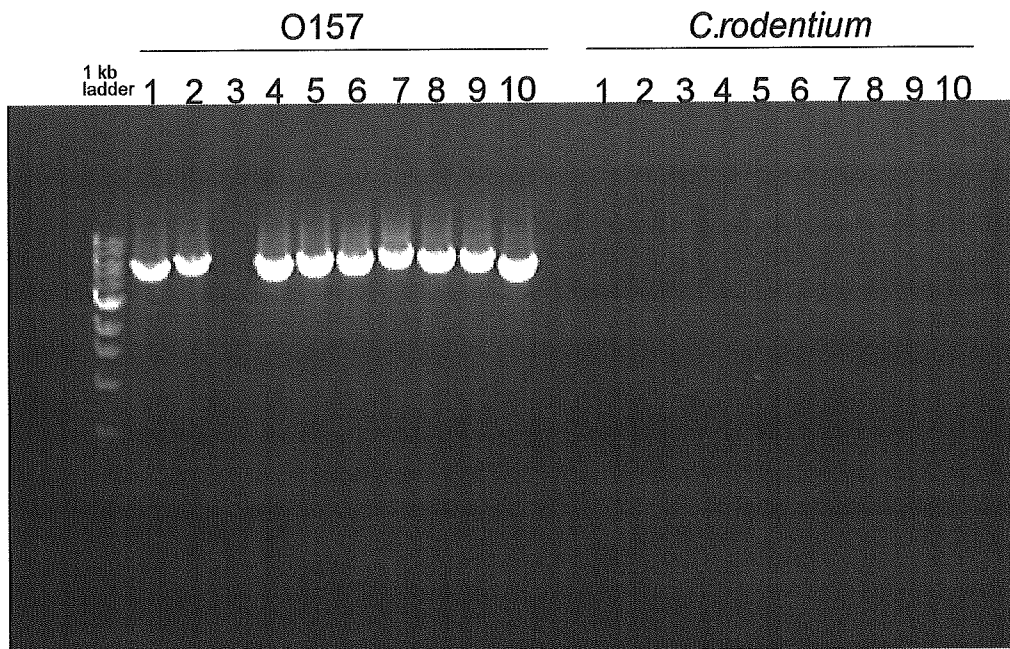


図1. EHEC O157および*C.rodentium*におけるETT2遺伝子群の検出結果

表1 PCRプライマー

Primer	Annealintg site	Sequence
ETT2-1F	ECs3693	GACCCAGCGCACCTGAGTAAGT
ETT2-1R	ECs3697	AAGAGCGCAGTGTTTTGCCTGT
ETT2-2F	ECs3696	GTGTGTTACCTCCGGGTCATCC
ETT2-2R	ECs3701	CGCCGGACGATTTAAAGATGAG
ETT2-3F	ECs3700	CGCACTGTGGATGCTCTGTCTT
ETT2-3R	ECs3706	CGACTCATGGATTTGCACCAGA
ETT2-4F	ECs3705	AATGACCAGGGACGAGCAAATC
ETT2-4R	ECs3711	TATCCATTGCAAAACCCGCATT
ETT2-5F	ECs3709	ATGTGCCTAACCCGCTCAAAAA
ETT2-5R	Intergenic	ACCGACCCTGATCTGGTTGTAA
ETT2-6F	ECs3719	GGGAAATTATCAGCAAGCCATGA
ETT2-6R	ECs3726	GCAGAAGAGAGTGGCAGCTGGT
ETT2-7F	ECs3726	AGCGCGCCATTTACACGTATCT
ETT2-7R	ECs3732	TGCACTTGATGCGAGTTGTTCA
ETT2-8F	ECs3731	GGTGGGCAATGGAATTATGAGC
ETT2-8R	ECs3737	AAACAGCGGCAGAAACCCACTA
ETT2-9F	ECs3736	TCGGTCACCTTTTTGCCAATCT
ETT2-9R	ECs3741	TCCCGTTAATGGTGCATTCGAT
ETT2-10F	ECs3740	AATTACGCCTGGCATTGTTGT
ETT2-10R	ECs3744	TCAGGCGAACGGTATCGTCATA

Isolation of Mini-Tn5Km2 Insertion Mutants of *Salmonella enterica* Serovar Oranienburg Sensitive to NaCl-Induced Osmotic Stress

Hiroshi Asakura^{*1,2}, Nantika Panutdaporn¹, Keiko Kawamoto¹, Shizunobu Igimi², Shigeki Yamamoto², and Sou-ichi Makino¹

¹Laboratory of Food Microbiology, Research Center for Animal Hygiene and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080–8555, Japan, and ²Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan

Received July 7, 2004; in revised form, October 5, 2004. Accepted October 6, 2004

Abstract: We previously reported that the viability of *Salmonella* Oranienburg strains under NaCl stress was variable and depended on the strain's origin; food strains were resistant and patient strains sensitive to NaCl. Therefore, we mutagenized a food strain with a mini-Tn5Km2 transposon. Of 2,400 mutants screened, 15 NaCl-sensitive mutants were isolated, and 7 genes associated with NaCl-sensitivity were identified. The intact genes complemented their own food-strain mutants, but not patient-strain mutants, suggesting that the difference in NaCl-sensitivity between food and patient *S. Oranienburg* strains might not arise from a single gene mutation, but from change in multiple osmoregulatory mechanisms in *Salmonella*.

Key words: *Salmonella* Oranienburg, NaCl-resistance, Transposon mutagenesis

A diffuse outbreak of septicemia and gastroenteritis caused by dry-processed squid contaminated with *Salmonella enterica* serovar Oranienburg occurred in 1999 in Japan, and affected over 1,500 people (15). We previously reported that strains isolated from the causative food (food-origin isolates) are resistant to NaCl, but those from patients (patient-origin isolates) are sensitive to it (1). In addition, food-origin isolates become NaCl-sensitive following passage through mice (1).

Here, to identify the genes associated with NaCl-sensitivity which changed during *in vivo* passage, transposon mutagenesis was performed in a food-origin strain, Sa9911T (resistant to NaCl), and a patient-origin strain, Sa99004 (NaCl-sensitive). First, to give a selectable marker to both strains for conjugation experiments, they were plated on trypticase soy agar (TSA; Nippon Becton Dickinson Co., Ltd., Tokyo) containing 100 µg/ml rifampicin (Rif), and Rif-resistant (Rif^r) strains were isolated, whose NaCl-sensitivity was almost the same as the parental strain (data not shown). Next, pUTmini-Tn5Km2, which contains the kanamycin-resistance gene (Km) within the mini-Tn5 (6), was introduced into the Rif^r *S. Oranienburg* Sa9911T and Sa99004 by con-

jugation with *Escherichia coli* SM17 λpir (7).

From strain Sa9911T, 2,400 independent insertion mutants were obtained in 50 conjugation experiments. To examine their viability, these transconjugants were grown in nutrient broth (NB; Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.) for 20 hr, and 0.1 ml of cells from each stationary phase was added to 1.0 ml of 7% NaCl in water and incubated at 37 C for 48 hr; the samples were then spread on TSA to enumerate survival numbers in the NaCl solutions. We observed that 15 of the insertion mutants incubated in the NaCl solutions were less viable than their parent strain, Sa9911T, but had similar viability to the NaCl-sensitive strain Sa99004 (Table 1). In contrast, among the 500 independent insertion mutants of the NaCl-sensitive patient strain Sa99004 that were obtained in 30 conjugation experiments, there were no NaCl-resistant mutants (data not shown), suggesting that the NaCl-sensitive cells might not be able to acquire NaCl-resistance.

Chromosomal DNA was extracted from the 15 Sa9911T-derived, NaCl-sensitive insertion mutants, and the DNA was completely digested with *EcoRI* or *PstI*. We next performed a Southern hybridization on a 0.8% agarose gel, using a 1.7-kb *BamHI* fragment of the

*Address correspondence to Dr. Hiroshi Asakura, Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, Kami-youga 1–18–1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Fax: +81–3–3700–9246. E-mail: hasakura@nihs.go.jp

Abbreviations: NaCl, sodium chloride; PCR, polymerase chain reaction; Tn, transposon.

Table 1. Survival of *Salmonella* Oranienburg mutants in NaCl solutions

Strain	Insertion	Relative survival rate in 7% NaCl solution ^{a)}							
		None	<i>crp</i>	<i>parF</i>	<i>dgoT</i>	<i>fliC</i>	<i>ugd</i>	<i>endA</i>	<i>ugtL</i>
Sa9911T	—	1.00	ND ^{b)}	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sa99004	—	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Sa9911T : : mini-Tn5Km2									
Class 1	<i>crp</i>	0.0021	0.68	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Class 2	<i>parF</i>	<0.0001	ND	0.44	ND	ND	ND	ND	ND
Class 3	<i>dgoT</i>	0.1115	ND	ND	0.35	ND	ND	ND	ND
Class 4	<i>fliC</i>	0.1158	ND	ND	ND	0.73	ND	ND	ND
Class 5	<i>ugd</i>	0.0008	ND	ND	ND	ND	0.55	ND	ND
Class 6	<i>endA</i>	<0.0001	ND	ND	ND	ND	ND	0.38	ND
Class 7	<i>ugtL</i>	0.0009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.42

^{a)} Each value gives the relative survival rate after 24 hr of incubation in 7% NaCl solutions, compared with that of the wild-type strain Sa9911T of food origin.

^{b)} ND: not determined.

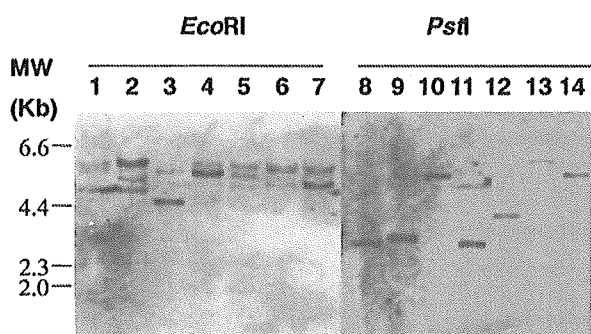


Fig. 1. Southern hybridization of chromosomal DNA from *Salmonella* Oranienburg using the mini-Tn5Km2 as the probe. Representative *EcoRI* (lanes 1–7) or *PstI* (lanes 8–14)-digested chromosomal DNA of classes 1 to 7 from 15 insertional mutants showing the NaCl-sensitive phenotype are shown. MW, λ /HindIII, lanes 1 and 8, class 1; 2 and 9, class 2; 3 and 10, class 3; 4 and 11, class 4; 5 and 12, class 5; 6 and 13, class 6; 7 and 14, class 7.

mini-Tn5Km2 transposon as the DIG-labeled probe. This procedure was performed according to the supplier's instructions under stringent conditions (Roche Diagnostics, Switzerland), and the results allowed us to divide the 15 clones into 7 classes (Fig. 1). To determine each insertional locus, total DNA was extracted from each mutant, digested with *EcoRI* or *PstI*, and ligated into pBluescript II KS+ (13) to obtain Km-resistant transformants. The DNA was then extracted from each transformant, and the DNA flanking locus of the mini-Tn5Km2 transposon was sequenced using the M13-20 (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') and RV-P (5'-GGAAACAGCTATGACCATGAT-TAC-3') primers. The Tn5 insertion sites were located in the *crp*, *parF*, *dgoT*, *fliC*, *ugd*, *endA*, and *ugtL* genes (classes 1–7 in Table 1). The sequences of these mutated genes (not including the mini-Tn5Km2 sequence)

have been deposited in the DNA Data Bank in Japan (DDBJ) under accession No. AB080996–081002 (Table 2).

The intact forms of these seven genes were amplified by PCR using primers specific to each gene, listed in Table 2, and were ligated into plasmid pCRII-TOPO, followed by transformation of *E. coli* Top 10F' α (Invitrogen, Calif., U.S.A.). The resultant plasmids were transferred into the 7 insertion mutants and NaCl-sensitive patient-origin Sa99004 by electroporation. Next, the viabilities of all the transformants in 7% NaCl were examined on agar plates. The intact genes complemented their own mutants (Table 1). However, the relative survival rates of these transformants did not reach exactly that of the parent strain (1.00, Table 1). A possible explanation was that the expression level of the plasmid-borne complementing gene was different from that of the corresponding chromosomal gene in the parent strain because the vector plasmid was a high-copy-number plasmid. This might have influenced the relative survival rates although the exact mechanism is unknown. In addition, even when each of the seven genes was introduced into strain Sa99004, the transformant remained NaCl-sensitive (Table 1). This suggests that the genes identified in the present study were associated with the NaCl-resistance in strain Sa9911T, but not with the phenotypic changing of NaCl-sensitivity in *Salmonella*. It is likely that the difference in NaCl-sensitivity between food- and patient-origin *S. Oranienburg* does not arise from a single gene mutation but from other causes, for example, transcriptional change in multiple osmoregulatory genes (14) affected by switching of σ factors (9) or DNA topology (12).

An examination of the normal functions of the mutagenized genes suggests a number of different mechanisms underlying the NaCl-resistant phenotype. The

Table 2. PCR primers used in this study

Class	Gene	Size (bp)		Sequences (5'-3')	Accession No. ^{a)}
1	<i>crp</i>	633	sense	ATGGTGCTTGGCAAACCGCA	AB080996
			antisense	TTAACGAGTGCCGTAAACGACGA	
2	<i>parF</i>	738	sense	ATGCTATATATTTTTTCGTCT	AB080997
			antisense	TTAAACCTTACCGGTCGCTT	
3	<i>dgoT</i>	688	sense	ATGTGATTTCCCTTTAACCTT	AB080998
			antisense	ATGACTCTCAATAAAACCGA	
4	<i>fliC</i>	1526	sense ^{b)}	GGCTCGAGATGGCACAAAGTCATTAAT	AB080999
			antisense	TTAACGCAGTAAAGAGAGGA	
5	<i>ugd</i>	1167	sense	ATGAAAATCAGATATCCGG	AB081000
			antisense	TTAATCACTACCGAAAAGAT	
6	<i>endA</i>	698	sense	ATGTACCGTTATTTGTCTATTGCT	AB081001
			antisense	TTAGCTCTTTCGCGCCTG	
7	<i>ugtL</i>	399	sense	ATGAAGAAATCAGATGGTGAA	AB081002
			antisense	TCACGGCGTGAAGAAACAT	

^{a)} The seven nucleotides that were determined were deposited into DDBJ (DNA Data Bank in Japan), and each accession number is shown above.

^{b)} The sequence contains the *Bam*HI fragment at the 5' end.

impaired NaCl-resistance in the class 1 insertion mutant, which was defective in *crp* (encoding cyclic AMP receptor protein, CRP), might have been due to its inability to produce complexes with cyclic AMP (cAMP). CRP-cAMP functions as an osmotically sensitive repressor of *proP* P1 transcription *in vitro* (11). In the class 2 and 6 mutants, *parF*, which encodes DNA topoisomerase IV (4), and *endA*, which cleaves supercoiled DNA into its linear form (17), were respectively deleted; these genes are associated with DNA topology. In these mutants, the DNA topology may not have been able to shift in response to NaCl osmotic stress, thus inducing the NaCl-sensitive phenotype. The class 3 mutated gene, *dgoT*, encodes galactonate dehydratase, which catalyzes the abstraction of the α -proton of a carboxylic acid to form an enolic intermediate (2); thus the *dgo* gene may play a role in metabolic protection against proton attack induced by osmotic shock. In the class 5 and 7 mutants, the mutated genes were *ugd* and *ugtL*, which respectively encode a putative UDP-D-glucose dehydrogenase that functions as a determinant of lipopolysaccharide chain length (3), and a putative membrane protein (10). The insertional mutation in these genes may induce changes in cell-surface molecules that cause membrane instability in response to osmotic stress.

Osmotic sensors, outer membrane proteins, and transcriptional factors, such as σ factors, have been genetically investigated as factors responsible for protecting *Salmonella* from osmolar changes. It was particularly interesting, however, that the *fliC* gene (class 4), which encodes flagellin, was associated with the NaCl-resistance in the present study. Indeed, NaCl-dependent flagellin expression has been reported in non-pathogenic

bacteria (5). Since the *fliC* gene is common to *Salmonella* spp. (16), and induces NF- κ B via Toll-like receptor 5 (TLR5) in mammalian hosts (8), the existence of NaCl in food and the environment may induce *fliC* expression, resulting in an increase in the virulence of *Salmonella* species in humans.

Salmonella cells that contaminate foods containing NaCl, which might reduce their survival, nonetheless have a potential risk of increased virulence in humans. The mechanism of NaCl-resistance among pathogenic bacteria should therefore be further elucidated from the viewpoint of food hygiene.

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (00001987-01, 12575029, 13576013, and 16613013) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare (Risk Analysis Research on Food and Pharmaceuticals), and by a grant from the 21st Century COE Program (A-1), Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

- Asakura, H., Makino, S., Takagi, T., Kuri, A., Kurazono, T., Watarai, M., and Shirahata, T. 2002. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**: 87-93.
- Babbitt, P.C., Mrachko, G.T., Hasson, M.S., Huisman, G.W., Kolter, R., Ringe, D., Petsko, G.A., Kenyon, G.L., and Gerlt, J.A. 1995. A functionally diverse enzyme superfamily that abstracts the alpha protons of carboxylic acids. *Science* **267**: 1159-1161.
- Bastin, D.A., Stevenson, G., Brown, P.K., Haase, A., and