

氏名（本籍）	岡田 由美子（埼玉県）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第81号		
学位授与年月日	平成19年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
学位論文題目	Studies on the Osmotolerance in <i>Listeria monocytogenes</i> (<i>Listeria monocytogenes</i> の食塩耐性に関する研究)		
審査委員	主査	岐阜大学	教授 山本茂貴
	副査	帯広畜産大学	教授 武士甲一
	副査	岩手大学	教授 品川 隼 汎
	副査	東京農工大学	教授 廣田好和
	副査	岐阜大学	教授 高鳥浩介
	副査	帯広畜産大学	教授 牧野壮一

論文の内容の要旨

Listeria monocytogenes（以下リステリア）はヒト及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こす通性嫌気性グラム陽性菌であり、河川水や動物の腸管内など自然界に広く分布している。本菌は食品の製造工程上での通常の加熱で死滅させることが可能な芽胞非形成菌であるが、4℃以下での低温増殖性及び20%もの高食塩濃度下でも生残可能な高塩濃度耐性を示す。また、製造ラインやスライサー等の製造環境への長期間の汚染がしばしば見られるため食品の製造、加工工程及び保存期間において本菌の1次及び2次汚染を防ぐことは困難となっており、アメリカでは近縁の *Listeria innocua* とともに食品工場の汚染指標菌として使われることもある。本菌の環境抵抗性についてはこれまでにいくつかの研究がなされている。

今回の研究では食品内での本菌の増殖を抑制する方法を探索するための基礎的研究として、リステリアの高食塩濃度耐性について分子遺伝学的解析を行った。第1に、トランスポゾンを含む温度感受性プラスミドを用いてランダムな遺伝子挿入変異株のライブラリー2000株を作成し、食塩添加培地での増殖性が低下した株を分離した。食塩感受性となった株のトランスポゾン挿入部位を染色体の塩基配列解析により特定したところ、大腸菌、枯草菌等多くの細菌でアミノ酸欠乏時の基本的応答である緊縮調節に関わる遺伝子 *rel* と高い相同性を示す遺伝子（全長2214塩基対）の第484及び485塩基間に挿入していた。アミノ酸塩基配列の比較から他のグラム陽性菌と同様に、*rel* にコードされるタンパク質はリステリアに於いても guanosine tetraphosphate (ppGpp) 及び guanosine pentaphosphate (ppGpp)（以下、合わせて (p)ppGpp とする）の合成と分解の両活性を持つと思われた。実際に薄層クロマトグラフィーの結果から、変異株に於いても親株と同様にアミノ酸欠乏に誘導された菌体内 (p)ppGpp の貯留が観察され、トランスポゾン挿入部位の上流に (p)ppGpp 合成活性があることが示された。

第2に、遺伝子発現を制御する重要な因子である RNA ポリメラーゼシグマサブユニット（以下シ

グマ因子)の食塩耐性に対する機能的役割について解析するため、シグマ因子コード遺伝子の欠失変異株を作成した。過去の研究によりシグマBが本菌の食塩耐性に関わっていることが知られているが、本研究ではシグマL(RpoN)のコード遺伝子 *rpoN* の in-frame 欠失変異株を作成したところ、既知の食塩耐性機構の一つである betaine および carnitine の利用に関して調べたところ、欠失変異株において最小培地内での carnitine の食塩耐性に対する効果が喪失していることが示された。一方、カルニチンのトランスポーターをコードする遺伝子 *opuC* の発現量は親株と変異株で差が見られず、放射性同位元素をもちいた菌体内への取込み実験でも両者とも同程度の食塩による取込み誘導が見られたため、RpoN のカルニチン利用能の低下は *opuC* の転写及び翻訳あるいは輸送能の低下によるものではないと思われた。更に、食塩及びカルニチン添加最小培地内での増殖開始時の菌量を低く設定した場合には菌体外カルニチンを利用した増殖が可能であることが示されたため、異なることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

Listeria monocytogenes (以下リステリア) はヒト及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こす通性嫌気性グラム陽性菌であり、河川水や動物の腸管内など自然界に広く分布している。本菌は食品の製造工程上での通常の加熱で死滅させることが可能な芽胞非形成菌であるが、4℃以下での低温増殖性及び20%もの高食塩濃度下でも生残可能な高塩濃度耐性を示す。また、製造ラインやスライサー等の製造環境への長期間の汚染がしばしば見られるため食品の製造、加工工程及び保存期間において本菌の1次及び2次汚染を防ぐことは困難となっており、アメリカでは近縁の *Listeria innocua* とともに食品工場の汚染指標菌として使われることもある。本菌の環境抵抗性についてはこれまでにいくつかの研究がなされている。

今回の研究では食品内での本菌の増殖を抑制する方法を探索するための基礎的研究として、リステリアの高食塩濃度耐性について分子遺伝学的解析を行った。第1に、トランスポゾンを含む温度感受性プラスミドを用いてランダムな遺伝子挿入変異株のライブラリー2000株を作成し、食塩添加培地での増殖性が低下した株を分離した。食塩感受性となった株のトランスポゾン挿入部位を染色体の塩基配列解析により特定したところ、大腸菌、枯草菌等多くの細菌でアミノ酸欠乏時の基本的応答である緊縮調節に関わる遺伝子 *rel* と高い相同性を示す遺伝子(全長2214塩基対)の第484及び485塩基間に挿入していた。アミノ酸塩基配列の比較から他のグラム陽性菌と同様に、*rel* にコードされるタンパク質はリステリアに於いても guanosine tetraphosphate(ppGpp) 及び guanosine pentaphosphate(pppGpp) (以下、合わせて(p)ppGppとする)の合成と分解の両活性を持つと思われた。実際に薄層クロマトグラフィーの結果から、変異株に於いても親株と同様にアミノ酸欠乏に誘導された菌体内(p)ppGppの貯留が観察され、トランスポゾン挿入部位の上流に(p)ppGpp合成活性があることが示された。

第2に、遺伝子発現を制御する重要な因子であるRNAポリメラーゼシグマサブユニット(以下シグマ因子)の食塩耐性に対する機能的役割について解析するため、シグマ因子コード遺伝子の欠失変異株を作成した。過去の研究によりシグマBが本菌の食塩耐性に関わっていることが知られているが、本研究ではシグマL(RpoN)のコード遺伝子 *rpoN* の in-frame 欠失変異株を作成したところ、既知の食塩耐性機構の一つである betaine および carnitine の利用に関して調べたところ、欠失変異株において最小培地内での carnitine の食塩耐性に対する効果が喪失していることが示された。一方、カルニチンのトランスポーターをコードする遺伝子 *opuC* の発現量は親株と変異株で差が見られず、放射性同位元素をもちいた菌体内への取込み実験でも両者とも同程度の食塩による取込み誘導が見られたため、RpoNのカルニチン利用能の低下は *opuC* の転写及び翻訳あるいは輸送能の低下によるものではないと思われた。更に、食塩及びカルニチン添加最小培地内での増殖開始時の菌量を低く設定した場合には菌体外カルニチンを利用した増殖が可能であることが示されたため、異なることが示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene
著 者 名 : Okada, Y., Makino, S., Tobe, T., Okada, N. and Yamazaki, S.
学術雑誌名 : Applied and Environmental Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 68(4):1541-1547, 2002

- 2) 題 目 : The sigma factor RpoN (σ 54) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*
著 者 名 : Okada, Y., Okada, N., Makino, S., Asakura, H., Yamamoto, S. and Igimi, S.
学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters
巻・号・頁・発行年 : 263(1):54-60, 2006

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Isolation of *Yersinia enterocolitica* serovar O8 from free-living small rodents in Japan
著 者 名 : Iinuma, Y., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M. and Hamasaki, S.
学術雑誌名 : Journal of Clinical Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 30(1) : 240-242, 1992

- 2) 題 目 : Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction
著 者 名 : Makino, S., Iinuma-Okada, Y., Maruyama, T., Ezaki, T., Sasakawa, C. and Yoshikawa, M.
学術雑誌名 : Journal of Clinical Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 31(3) : 547-551, 1993

- 3) 題 目 : PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications
著 者 名 : Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., Kaneko, S. and Sasakawa, C.
学術雑誌名 : Journal of Clinical Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 32 (1) : 65-69, 1994

- 4) 題 目 : Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR
著 者 名 : Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., Ishikawa, K., Takahashi, T., Nakamura, M., Ezaki, T. and Morita, H.
学術雑誌名 : Journal of Clinical Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 32 (6) : 1526-1531, 1994

- 5) 題 目 : Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from city-living crows captured in a zoo
著 者 名 : Otsuka, Y., Okada, Y., Makino, S. and Maruyama, T.
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Sciences
卷・号・頁・発行年 : 56(4) : 785-786, 1994

- 6) 題 目 : Diversity of DNA sequences among *Vibrio cholerae*
O139 Bengal detected by PCR-based DNA
fingerprinting
著 者 名 : Makino, S., Kurazono, T., Okuyama, Y., Shimada, T.,
Okada, Y. and Sasakawa, C.
学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters
卷・号・頁・発行年 : 126 (1) : 43-48, 1995
- 7) 題 目 : A new method for direct detection of *Listeria*
monocytogenes from foods by PCR
著 者 名 : Makino, S., Okada, Y. and Maruyama, T.
学術雑誌名 : Applied and Environmental Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 61(10) : 3745-3747, 1995
- 8) 題 目 : Overview of *Listeria monocytogenes* contamination
in Japan
著 者 名 : Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.
学術雑誌名 : International Journal of Food Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 93 (2) : 131-140, 2004
- 9) 題 目 : Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes*
infection in Japan
著 者 名 : Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.
学術雑誌名 : Epidemiology and Infection
卷・号・頁・発行年 : 132 (4) : 769-772, 2004
- 10) 題 目 : An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in
Japan, during 2001
著 者 名 : Makino S., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y.,
Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Igimi, S.
学術雑誌名 : International Journal of Food Microbiology
卷・号・頁・発行年 : 104 (2) : 189-196, 2005