

セレウス菌における PlcR 転写制御系の違いが
スフィンゴミエリナーゼ産生量に与える影響の解析

2021 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】微生物・感染制御学分野

横谷 篤

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程： 薬学専攻・博士課程

氏名（英字名）： 横谷 篤（Atsushi Yokotani）

学位論文題目： セレウス菌における PlcR 転写制御系の違いがスフィンゴミエリナーゼ産生量に与える影響の解析

序章

Bacillus cereus（セレウス菌）は、グラム陽性菌であり、リネンやタオル汚染、点滴ラインなどを通して、感染が広がる事がある。本菌は、食中毒の原因菌として有名である一方、免疫不全患者に敗血症などの重篤な感染症を引き起こす事がある。これまでの研究から、本菌が産生するスフィンゴミエリナーゼ（SMase）は、マクロファージの膜の流動性を低下させ、機能障害を引き起こし、セレウス菌の病原性に強く関与していると考えられる。多くのセレウス菌株は、SMase の遺伝子を保有しているにもかかわらず、SMase 産生菌株と産生しない非産生菌株に分類される。菌株間で SMase 産生量が異なる制御メカニズムに関する詳細な報告はされていない。セレウス菌では、SMase は、PlcR 転写制御系により制御されている。転写制御因子である PlcR は 34-kDa のタンパク質であり、対象遺伝子のプロモーター領域に存在する「PlcR box」と呼ばれる塩基配列に結合し、転写を活性化する。本論文では、セレウス菌における SMase 産生と PlcR 転写制御系の関係について研究を行った。

第 1 章：PlcR box 配列と SMase 産生量によるセレウス菌の分類

SMase の遺伝子はホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ（PCPLC）の下流に位置し、PCPLC とオペロンを組んでいる。オペロン内には、PCPLC のプロモーター領域に PlcR box（PCPLC-PlcR box）、SMase のプロモーター領域に PlcR box 様の配列（SMase-PlcR box）が存在する。特に、前者の PlcR box が、SMase を正に制御している事が分かっている。そこで、菌血症患者由来の臨床分離株 38 株と ATCC 由来のセレウス菌 2 株を用いて、PCPLC-PlcR box のシーケンス解析を行った。その結果、TATGAACATTTGCATA の配列を持つ Group I、TATGAAAATCTGCATA の配列を持つ Group II、TATGAACATTTACATA の配列を持つ Group III に分類できた。また、4 時間培養後の上清中 SMase 産生量と活性を測定したところ、Group I と Group II に属するセレウス菌の多くは産生量や SMase 活性が高かった一方で、Group III では SMase の産生量や活性が低かった。これらの結果より、PCPLC-PlcR box の配列が、セレウス菌の SMase 産生量に影響している事が示唆された。

第 2 章：定常期における SMase 産生の時間変化

SMase の産生は定常期開始点で最大を示し、定常期では時間依存的に減少する事が報告されており、SMase-PlcR box が SMase を負に制御している可能性も示唆されている。そこで、SMase-PlcR box のシーケンス解析を行った結果、Group I では ATACAATACATGGAGGTAT の配列を、Group II では ATACAC- - - ATGGAGGTAT、Group III では ATACAA- - - ATGGAGGTAT を持っていた。次に、定常期での SMase 活性の時間変化を調べた結果、Group

I の SMase 活性は、定常期開始点の培養 4 時間目で最大となり、その後、時間依存的に減少した。一方、Group II では、4 時間目までは Group I と同様の活性を示したが、4 時間目以降も SMase 活性が維持された。Group III は、4 時間目以降も活性が低かった。この結果より、PCPLC-PlcR box と SMase-PlcR box で SMase 産生を制御している事が示唆された。

第 3 章：PlcR box group 間におけるセレウス菌の病原性比較

次に、PlcR box group 間の SMase 産生の違いが、宿主に対する病原性に反映されるか比較検討を行った。まず、Balb/c マウスに ATCC14579, KPUM46, KPUM25, KPUM40 を腹腔内投与した。その結果、ATCC14579, KPUM46 (Group I) および KPUM25 (Group II) 感染マウスは 19 時間以内に 100%致死に至った。一方、KPUM40 (Group III) では致死に至らなかった。以前の研究で、セレウス菌が産生する SMase は、マクロファージの細胞膜に含まれるスフィンゴミエリンを加水分解することにより食食を抑制することが報告されている。そこで、セレウス菌を RAW264.7 と培養し、gentamicin で処理することにより食食抑制能を検討した。その結果、SMase 非産生菌株である KPUM40 が食食された菌数は、SMase 産生菌株である ATCC14579, KPUM46, KPUM25 に比べて劇的に多かった。つまり、SMase 産生菌株はマクロファージからの食食を回避することができる。これらの結果から、SMase 産生菌株である Group I および II の病原性が、非産生菌株である Group III よりも高いことが示唆された。

第 4 章：PlcR box 配列により SMase 産生が変化する要因の探索

これまでの結果から、PlcR box 配列が、SMase 産生に影響を与えている事が示唆されたことから、PlcR box 配列の違いが SMase 産生に与える要因の探索を行った。最初に、定常期における菌体中の SMase の mRNA 量の時間変化を調べた。その結果、Group I の mRNA は 4 時間目で最大量を示し、その後、減少した。Group II では、4 時間目から 8 時間目までに増加し、12 時間目では 4 時間目と同量程度まで減少した。また、Group III では、Group I や Group II と比較して、mRNA 量は少なかった。以上の事より、SMase 量と mRNA 量は相関しており、PlcR box 配列の違いが、SMase の転写に影響を与えている事が示唆された。次に、PlcR box と転写因子 PlcR との結合親和性を調べた。PCPLC-PlcR box では、Group III の結合親和性は Group I や Group II と比べて低かった。また、SMase-PlcR box では、Group I の結合親和性は Group II や Group III と比べて高かった。つまり、Group I では PCPLC-PlcR box (SMase を正に制御) と SMase-PlcR box (SMase を負に制御) が共に働き、Group II では PCPLC-PlcR box が Group I 同様に働くが、後者の働きが弱い。Group III では両者の働きが弱い事が示唆された。この結果は、SMase 産生の挙動と矛盾しない結果であると考えられる。

総括

PlcR box の配列の違いが SMase の産生に影響を与え、その結果、病原性が変化的ことが明らかとなった。加えて、PlcR box の配列によって転写因子との結合親和性が変化し、SMase の転写に影響する事が、SMase 産生が異なる要因の一端であると見出した。新たな知見である PlcR box 配列に基づく分類は、高病原性セレウス菌の検出に貢献するものと期待している。

本論文は以下の報告を総括したものである．なお，図の転載については出版社より許可済みである．

1. Atsushi Yokotani, Fumi Takahashi, Ryoko Aoyama, Go Kamoshida, Tadashi Kosaka, Masaki Nakanishi, Naohisa Fujita. Differences in the sequence of PlcR transcriptional regulator-binding site affect sphingomyelinase production in *Bacillus cereus*. *Microbiol Immunol*. “in press”.

目次

序論.....	1
第 1 章 PlcR box 配列と SMase 産生量によるセレウス菌の分類	
1. 緒言.....	6
2. 方法.....	6
3. 結果.....	10
4. 考察.....	13
第 2 章 定常期における SMase 産生の時間変化	
1. 緒言.....	15
2. 方法.....	15
3. 結果.....	19
4. 考察.....	23
第 3 章 PlcR box group 間におけるセレウス菌の病原性比較	
1. 緒言.....	25
2. 方法.....	25
3. 結果.....	27
4. 考察.....	29
第 4 章 PlcR box 配列により SMase 産生が変化する要因の探索	
1. 緒言.....	31
2. 方法.....	32
3. 結果.....	38
4. 考察.....	41
総括.....	43
結語.....	44
謝辞.....	45
参考文献.....	46
Supplementary Files.....	50

略語

AMR	Antimicrobial resistance
APS	Ammonium peroxodisulfate
ATCC	American type culture collection
BHI	Brain heart infusion
CBB	Coomassie brilliant blue
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
CFU	Colony forming units
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
GST	Glutathione S-transferase
HTH	Helix-turn-helix
IL-8	Interleukin-8
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MOI	Multiplicity of Infection
OppB	Oligopeptide permease B
PapR	Peptide activating PlcR
PBS	Phosphate-buffered saline
PCPLC	Phosphatidylcholine-specific phospholipase C
PlcR	Phospholipase C regulator
QS	Quorum sensing
SMase	Sphingomyelinase
TB	Terrific Broth
TBE buffer	Tris-borate-EDTA buffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine

序論

Bacillus cereus (セレウス菌) は、芽胞を形成するグラム陽性菌であり、埃、空気、水、土壌など、様々な環境中に広く存在する [1]. また、病院環境中にも存在しており、リネンやタオル、点滴ライン、カテーテルなどを通して、感染が広がる事がある [2,3]. 本菌は、食中毒の原因菌として有名である一方、日和見感染により、免疫不全患者に敗血症、肺炎、眼内炎、壊死性筋膜炎などの重篤な感染症を引き起こす事がある [2, 4-8]. 日本においては、2006 年に、タオルやシーツを介して、24 人の患者がセレウス菌に院内感染し、2 人が死亡、1 人が片目を失明するアウトブレイクが起こったことがある.

セレウス菌は、スフィンゴミエリナーゼ (Sphingomyelinase : SMase), ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C (Phosphatidylcholine-specific phospholipase C : PCPLC), ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C, ヘモリシン BL, セレオリジン, 非溶血性腸毒素などヒトに対する様々な病原性毒素を産生する [6, 9-11]. 様々な産生毒素の中でも SMase は、セレウス菌感染症の重症化における重要な病原因子であることが報告されている [12].

SMase は、セレウス菌以外にも, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌), *Bacillus anthracis* (炭疽菌), *Helicobacter pylori* (ピロリ菌), *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) など、様々な細菌が産生するタンパク質であることが報告されている [13-20]. SMase は溶血作用を示すとともに、スフィンゴミエリンをセラミドとホスホリルコリンに加水分解する (Figure 1). また、分解産物であるセラミドは、ストレス応答やアポトーシスなど、さまざまな細胞プロセスに関与する重要な分子である [21].

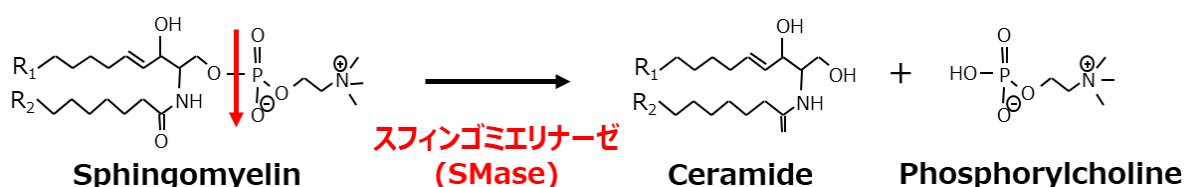


Figure 1. スフィンゴミエリナーゼによるスフィンゴミエリンの加水分解

細菌における SMase は、宿主の細胞傷害を引き起こす役割と細菌が免疫システムから逃れる免疫回避機構の役割を担っていることが報告されている. 黄色ブドウ球菌の産生する SMase である β -hemolysin は、ケラチノサイトに傷害を与え、細胞死を引き起こすことで、黄色ブドウ球菌の皮膚への定着を促進し、皮膚感染症発症に寄与していることが示唆されている [22]. また、血管内皮細胞におけるインターロイキン 8 (IL-8) の発現を阻害し、好中球の遊走の減少を引き起こすことや [19], 黄色ブドウ球菌のファゴソームからの逃避に貢献していると考えられている [23]. *L. ivanovii* の産生する SMase は、ファゴソーム膜を破壊して細胞質に逃れることや、マクロファージにおける細胞内生存と複製の促進に関与すると報告されている [14]. セレウス菌が産生する SMase も、マクロファージ膜中のスフィンゴミエリンをセラミドに分解することで、細胞膜の流動性を低下させ、マクロファージの貪食作

用を抑制することを報告している [12]. また, SMase 産生セレウス菌株を単独でマウスに腹腔内投与すると, マウスは致死に至ったが, 抗 SMase 中和抗体や SMase 阻害剤である SMY-540 を同時投与すると致死率を有意に低下させることが確認されている. 一方, SMase 非産生セレウス菌株を投与しても, 致死には至らなかった (Figure 2) [12, 24].

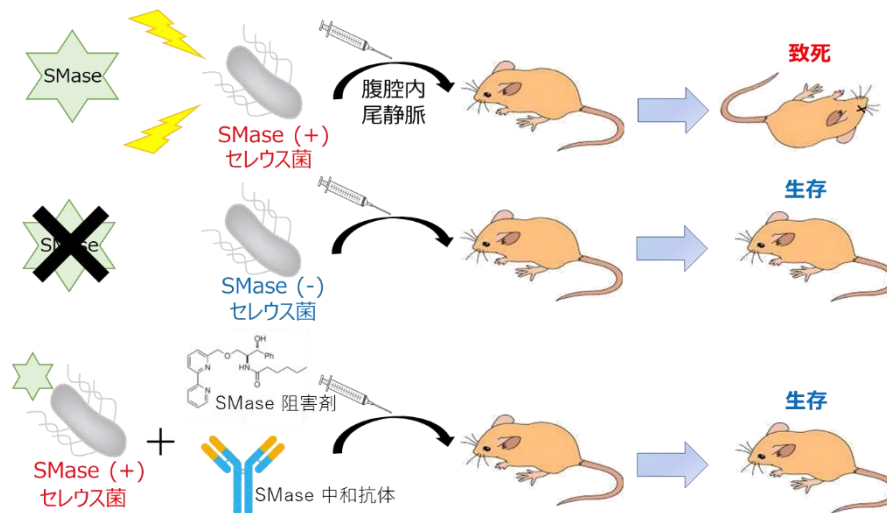


Figure 2. セレウス菌における SMase の病原性

これらのことから, 本菌が産生する SMase は, セレウス菌の病原性に強く関与している毒素であると考えられる. 実際に, 菌血症由来の患者から分離された臨床株は, SMase を産生する菌 (SMase 産生菌株) が多いことが報告されている [12]. そのため, SMase 産生セレウス菌株を早期に検出していくことが, セレウス菌感染症の重症化進展を予防するために重要である.

一方で, SMase を産生しない菌 (SMase 非産生菌株) を検出することも重要である. 患者の血液培養検査において, 環境中に存在するセレウス菌が, 汚染菌として混入することがあるが, 土壌などの環境中から分離された環境株は, SMase を産生しない菌 (SMase 非産生菌株) であり, 病原性が低いことが報告されている [12]. そのため, SMase 非産生セレウス菌株 (非病原性のセレウス菌) を検出することで, 患者への不要な抗菌薬の投与を防ぐことができる. このことは, 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランの一つである「医療機関における抗微生物薬の適正使用の推進」に繋がり, 薬剤耐性菌の発生を防ぐことにも貢献することができると思われる.

多くのセレウス菌株は, SMase をコードする遺伝子を保有しているにもかかわらず, SMase 産生菌株と SMase 非産生菌株に分類される [12]. しかし, セレウス菌株間で, SMase 産生量が異なるメカニズムは不明であることから, 臨床の現場で, セレウス菌の主要な病原因子である SMase 産生の有無を判別できるようにすることが重要である. 我々は, 個々の菌株の SMase 産生過程に, 特異な要因があると仮説を立て研究を進めることにした (Figure 3).

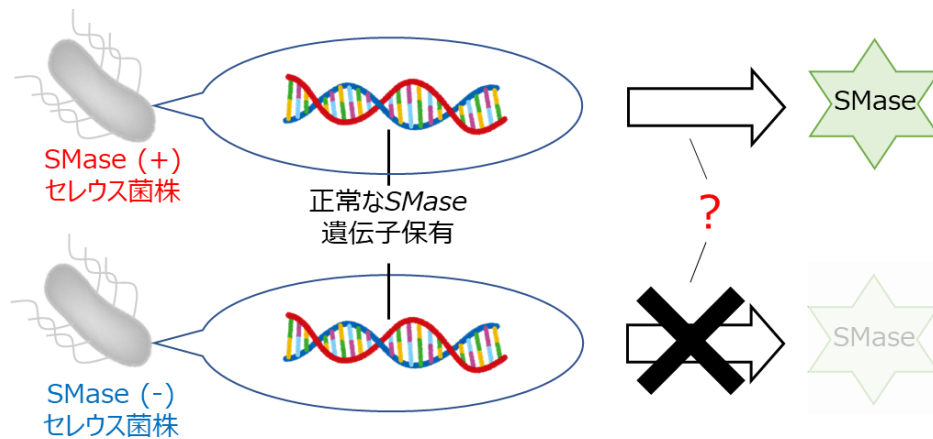


Figure 3. SMase 産生菌株と SMase 非産生菌株

セレウス菌における SMase の転写は、Phospholipase C regulator (PlcR) 転写制御系により制御される [25]. 1996 年に Lereclus らによって、*plcR* が毒素発現に必須な遺伝子であるという最初の PlcR 転写制御系に関する報告がなされた [26]. その後、PlcR は 34- kDa のタンパク質であり、SMase 以外にも、細胞外病原因子や細胞保護、環境条件の感知に関与するタンパク質をコードする 45 遺伝子を制御する転写制御因子であることが分かっている [25]. *plcR* を欠損させたセレウス菌株は、野生株と比較して、自身の増殖には影響を与えずに、毒素発現やマウスの致死などの病原性が抑制されることから [25-28], PlcR は、セレウス菌の病原性を制御する主要な転写制御因子の一つである.

2002 年には Slamti らによって、もう一つの重要な転写因子である Peptide activating PlcR (PapR) が同定された. *papR* 欠損株は、*plcR* 欠損株と同様、野生株と比較して、PlcR 転写制御系によって転写が制御されるレギュロン遺伝子の転写活性が抑制されることが確認されている [28]. この PapR は 24 アミノ酸から構成されるシグナルシーケンスを含む 48 アミノ酸で構成されており、菌体外に分泌される [28]. 菌体外で Neutral protease B (NprB) により、PapR の C 末端側 7 アミノ酸である PapR₇ に切断され活性体となった後、オリゴペプチド輸送体である Oligopeptide permease B (OppB) により、菌体内に再取り込みされる [28, 30, 31]. 再取り込み後、PlcR と PapR₇ は PlcR-PapR₇ 複合体となることで、PlcR の転写活性が増強される [28, 29].

PlcR-PapR₇ 複合体は、レギュロン遺伝子のプロモーター領域に存在する PlcR box と呼ばれる 16bp の塩基配列 (コンセンサス配列: 5'- TATGnAnnnnTnCATA -3') に結合することにより、そのレギュロン遺伝子の転写を活性化する [28,32]. また、PapR が一旦菌体外に放出されることと、*plcR* と *papR* 遺伝子のプロモーター領域には、PlcR box が存在し、PlcR と PapR がオートインデューサーであることから、PlcR 転写制御系はセレウス菌の持つクオラムセンシング (QS) 機構の一種として報告されている (Figure 4) [25, 26].

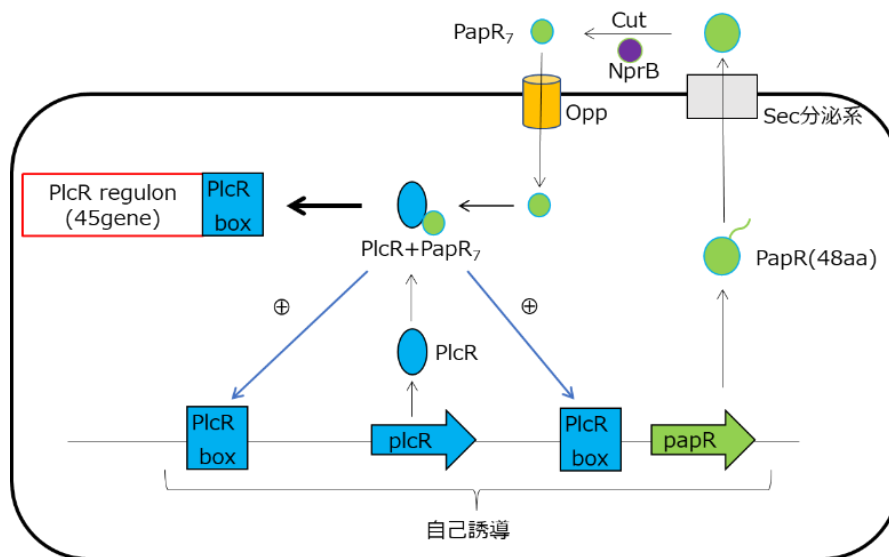


Figure 4. PlcR 転写制御系 概略図

Grenha らは、X 線結晶構造解析により、PlcR-PapR₇ 複合体と PlcR box の結合構造を決定した [33]. その結果、PlcR は N 末端に DNA 結合モチーフであるヘリックスターンヘリックス (HTH) 構造を有しており、結合する際は二量体を形成する. また、PapR₇ が PlcR の C 末端側に結合する事で、PlcR のコンフォメーションが変化し、PlcR 単体では閉じている HTH 構造が広がり、柔軟性が増すことで PlcR box 配列への結合親和性が向上することが分かった [33].

2018 年、Yehuda らは、PapR₇ の誘導体をセレウス菌に添加することで、PlcR 活性を 60-70% 減少させ、*papR* 欠損セレウス菌と同程度まで溶血を減少させた. PlcR の活性化に重要な領域を置換した PapR₇ 誘導体により、非活性な PlcR-PapR₇ が形成される事で、PlcR 転写活性が抑制されたことから、PlcR-PapR₇ 複合体の立体構造がレギュロン遺伝子の発現に重要であることが示唆された [34]. 以上のように、これまでに PlcR 転写制御系の基礎研究は行われてきたが、SMase 産生の有無と PlcR 転写制御系の関係について解析した報告は無い.

smase 遺伝子は *pcplc* 遺伝子の下流に位置し、これらの遺伝子はオペロンを形成している [32]. また、*plcR* 遺伝子欠損株では、SMase と PCPLC 活性が低下することから、このオペロンは PlcR 転写制御系の支配下にあることが分かっている [35]. PCPLC のプロモーター領域に PlcR box 配列 (PCPLC-PlcR box) が存在し [32], さらに SMase のプロモーター領域にも PlcR box 様配列 (SMase-PlcR box) が存在していることが報告されている (Figure 5) [35].

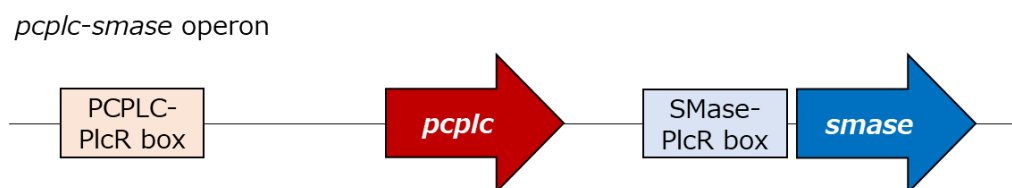


Figure 5. *plc-smase* オペロン

本研究は、臨床或いは環境由来のセレウス菌の SMase 産生量と PlcR 転写制御系の関係を調べ、セレウス菌株間での SMase 産生の違いが引き起こされるメカニズムを明らかにすることで、セレウス菌における SMase の病態発症における重要性と、その迅速診断の基盤となる遺伝子配列の解明を試みた。

第 1 章では、菌株間で SMase 産生量が異なる要因を探索するために、セレウス菌 40 株を用いて、PCPLC-PlcR box 塩基配列のシーケンス解析と、培養上清中の SMase 活性を測定した。その結果、PCPLC-PlcR box 塩基配列によって、セレウス菌を 2 つの SMase 産生菌株グループと 1 つの SMase 非産生菌株グループに分類することができたことを報告する。

また、第 2 章では、SMase-PlcR box 塩基配列のシーケンス解析と定常期における SMase 活性の時間変化を測定することで、SMase 活性の挙動を解析した。その結果、SMase-PlcR box 塩基配列により、1 つの定常期開始点で最大の SMase 活性を示し、定常期では活性が時間依存的に減少していくグループと、2 つの定常期開始点の SMase 活性が定常期中も維持されるグループに分類することができたことを報告する。

次に、第 3 章では、PlcR box により分類されたセレウス菌グループ間での SMase 産生の違いが、宿主に対する病原性に反映されるか確認するために、マウスへの腹腔内投与による致死と、マクロファージ貪食活性への影響を確認した。その結果、SMase 産生菌株グループでは、SMase 非産生菌株グループより、病原性が高かったことを報告する。

最後に、第 4 章では、PlcR box の配列の違いが、SMase の産生に与えるメカニズムを解明するために、転写因子である PlcR-PapR₇ と各 PlcR box との結合親和性を解析した。その結果、PlcR box 塩基配列によって、転写因子との結合親和性が異なることが、SMase の産生量が異なる要因であったことを報告する。

第1章 PlcR box 配列と SMase 産生量によるセレウス菌の分類

1. 緒言

多くのセレウス菌株は、SMase の遺伝子を保有しているにもかかわらず、SMase 産生菌株と産生しない非産生菌株に分類される。しかしながら、菌株間で SMase 産生量が異なる制御メカニズムに関する詳細な報告はされていない。制御メカニズムを解明するために、はじめに、PlcR 転写制御系の中でも、転写因子結合部位である PlcR box に着目した。

これまでの報告から、SMase の転写制御に関わる転写因子結合部位は、PCPLC-PlcR box と SMase-PlcR box の 2 つ存在し、特に、前者の PCPLC-PlcR box が、SMase を正に制御していることが分かっている (Figure 6) [25, 32, 35]。また、SMase の活性は、定常期開始点で最大となることが示唆されている [35]。

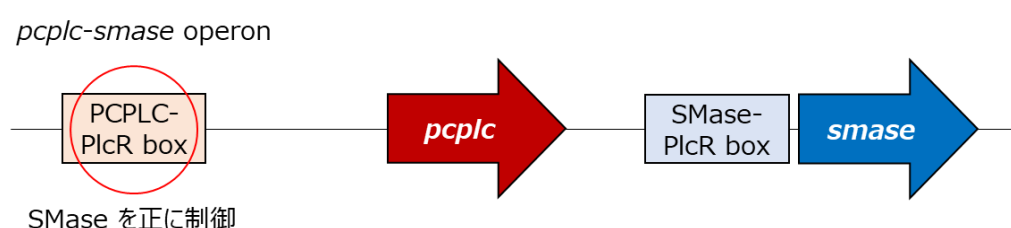


Figure 6. *pcplc-smase* オペロン内の PCPLC-PlcR box の働き

本章では、セレウス菌株間で SMase 産生量が異なる要因を明らかにするために、40 株のセレウス菌を用いて、PCPLC-PlcR box 塩基配列のシーケンス解析ならびに、定常期開始点である培養 4 時間目のセレウス菌培養上清中の SMase 活性を測定することで、SMase と PCPLC-PlcR box の関係を解析した。

なお、American Type Culture Collection (ATCC) 由来のセレウス菌 2 株 (ATCC14579, ATCC27522) と京都府立医科大学附属病院の菌血症患者由来の臨床分離株であるセレウス菌 38 株の合計 40 株を使用して、本研究を行った。

2. 方法

2-1. 菌血症患者由来の臨床分離株の選定：

選定基準として、① 2017 年 4 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日の間に京都府立医科大学附属病院に入院し、入院中にセレウス菌菌血症を発症した患者、② 年齢が 18 歳以上の患者、③ 性別不問の 3 条件を満たす患者から得られたセレウス菌株を使用した。

2-2. セレウス菌の培養条件：

セレウス菌は、ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) で 37 °C, 135 rpm の条件で一晩培養し、BHI 培地で 100 倍に希釈後、指定の時間まで 37 °C, 135 rpm の条件で培養した。

2-3. PCPLC-PlcR box のシーケンス解析：

最初に、NucleoSpin® Microbial DNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Dueren, Germany) を用いて、セレウス菌のゲノム DNA を抽出し、PCR により PCPLC-PlcR box を含む DNA 領域を増幅した。PCR 反応では、4 μ L の 2.5 mM dNTP mix, 10 μ L の 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer, 1 μ L の PrimeSTAR GXL DNA polymerase, 32 μ L の滅菌水、プライマーとして 1 μ L ずつの 100 pmol/ μ L の PCPLC PlcR box sequence F と PCPLC PlcR box sequence R (Table 1), 1 μ L のゲノム DNA を混合し、94 $^{\circ}$ C で 3 分加熱後、98 $^{\circ}$ C で 10 秒、55 $^{\circ}$ C で 15 秒、68 $^{\circ}$ C で 45 秒を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行い、68 $^{\circ}$ C で 5 分経過後、15 $^{\circ}$ C に冷却した。

得られた PCR 反応産物を NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) で精製し、ユーロフィンジェノミクス (Tokyo, Japan) にシーケンス解析を依頼した。

Table 1. PCPLC-PlcR box のシーケンス解析で使したプライマー

Primer	5'-3' sequence
PCPLC PlcR box sequence F	GAGATTGGGATTGGACTAGTGTTTGG
PCPLC PlcR box sequence R	GAGAGTTTATCTTCAGCAGACCAGCG

2-4. セレウス菌培養液からの培養上清の回収：

定常期開始点である 4 時間目まで培養したセレウス菌液を 1.5 mL tube に移し、15,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心して、回収した上清をセレウス菌培養上清とした。

2-5. SMase 活性の測定：

SMase 活性は、蛍光物質を封入したスフィンゴミエリン含有リポソームを用いて測定した。まず、リポソームの原料として、スフィンゴミエリン (Nagara science, Gifu, Japan) 0.74 mg とコレステロール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) 0.38 mg の混合物を準備した。

これらの混合物を N₂ ガス下で乾燥させ、ガラス試験管の壁面に脂質膜を形成させた。次に、5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) の調整を行った。4.5 mg の CF をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 0.01 mg/mL, pH 7.0) に溶解させ、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 に調整し、800 \times g で 10 分間遠心し、回収した上清を CF 溶液とした。

CF 溶液を脂質膜に添加し、55 $^{\circ}$ C でボルテックスすることにより、リポソーム懸濁液とした。封入されなかった 5(6)-カルボキシフルオレセインを除去するために、リポソーム懸濁液を 20,000 \times g で 20 分間遠心分離し、PBS で洗浄という工程を三回行い、得られリポソームを 220 μ L の PBS に懸濁した。

次に、リポソーム 5 μ L, 100 mM MgCl₂ 3 μ L, PBS 242 μ L, サンプル 50 μ L (セレウス菌サンプル:BHI で 8 倍希釈したセレウス菌培養上清 50 μ L, ネガティブコントロール:BHI broth

50 μ L, ポジティブコントロール: BHI broth 43 μ L, ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル 7 μ L) を混合し, 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後, 20,000 \times g で 5 分間遠心分離し, 壊れたりポソームから漏れ出た蛍光物質を含む上清を回収した.

回収した上清を黒色の 96 well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に入れ, Varioskan を用いて, 蛍光強度 (励起波長: 490 nm, 発光波長: 530 nm) を測定した. ポジティブコントロールの蛍光を 100 % とし, ネガティブコントロールの蛍光を 0 % として, セレウス菌サンプルの SMase 活性を算出した. 上記のプロトコルを以下に図示した (Figure 7).

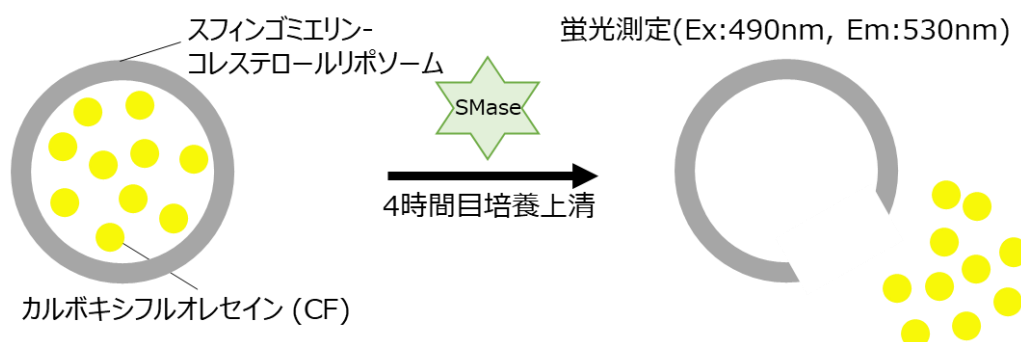


Figure 7. SMase 活性の測定方法

2-6. セレウス菌培養液の濁度測定:

セレウス菌培養液を回収し, 96 well plate (Thermo Fisher Scientific) に 100 μ L 入れ, Varioskan (Thermo Fisher Scientific) で OD₆₀₀ の測定を行った. 3 群間の比較に関しては, Tukey 法を用いて検定を行った.

2-7. SMase の系統解析:

はじめに, 2-3 で得られたゲノム DNA を用いて, PCR により PCPLC-PlcR box を含む DNA 領域を増幅した. PCR 反応では, 4 μ L の 2.5 mM dNTP mix, 10 μ L の 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer, 1 μ L の PrimeSTAR GXL DNA polymerase, 32 μ L の滅菌水, プライマーとして 1 μ L ずつの 100 pmol/ μ L の SMase-sequence-F と SMase-sequence-R (Table 2), 1 μ L のゲノム DNA を混合し, 94 $^{\circ}$ C で 3 分加熱後, 98 $^{\circ}$ C で 10 秒, 55 $^{\circ}$ C で 15 秒, 68 $^{\circ}$ C で 45 秒を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行い, 68 $^{\circ}$ C で 5 分経過後, 15 $^{\circ}$ C に冷却した. 得られた PCR 反応産物を NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up で精製し, ユーロフィンジェノミクスにシーケンス解析を依頼した.

Table 2. SMase のシーケンス解析で使したプライマー

Primer	5'-3' sequence
SMase-sequence-F	CTTTGGTTTGATACGTACGGAGATCG
SMase-sequence-R	CTCTCCTCTTCTCTATATGTCTTATAC

シーケンス解析後，それぞれの SMase 配列に基づいて，GENETYX（GENETYX CORPORATION, Tokyo, Japan）を用いて系統樹を構築した．

3. 結果

菌血症患者由来の臨床分離株の選定を行った結果、期間中に *Bacillus* 属の細菌が検出されたケースが 63 例存在し、その内、38 株がセレウス菌であった。この 38 株を菌血症由来の臨床分離株とした。また、ATCC 由来のセレウス菌 2 株 [ATCC14579：セレウス菌の基準株（その生物を定義する際に使用された菌株）、ATCC27522：土壌分離株] を加えた計 40 株のセレウス菌を本研究で使用した。

それぞれのセレウス菌が持つ PCPLC-PlcR box の配列に着目すると、3 種類の塩基配列パターンを見出すことができた。最初に、セレウス菌の基準株である ATCC14579 を含む Group I では、TATGAACATTTGCATA の配列を持っていた。また、Group II では、Group I と比較して、7 番目の塩基が A に、10 番目の塩基が C に変化している TATGAAAATCTGCATA の配列を持っていた。最後に、Group III では、Group I と比較して、12 番目の塩基が A に変化している TATGAACATTACATA の配列を持っていた (Table 3, Table S1)。セレウス菌 40 株の内訳としては、Group I に 21 株、Group II に 16 株、Group III に 3 株が分類された (Table S1)。

Table 3. セレウス菌の *pcplc* のプロモーター領域における PlcR box 配列

PlcR box group	Strain	PlcR box in promoter of <i>pcplc</i>
Group I	ATCC14579	TATGAACATT <u>T</u> TGCATA
	KPUM8	TATGAACATT <u>T</u> TGCATA
	KPUM46	TATGAACATT <u>T</u> TGCATA
Group II	KPUM15	TATGAAAATCTGCATA
	KPUM25	TATGAAAATCTGCATA
Group III	ATCC27522	TATGAACATT <u>T</u> TACATA
	KPUM40	TATGAACATT <u>T</u> TATATA

PlcR box 配列に基づいて、セレウス菌の臨床分離株および ATCC 菌株を 3 グループに分類した。40 株のセレウス菌のうち、各グループから代表株を選定し、その配列を示した。Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

次に、4 時間培養後のセレウス菌培養上清中の SMase 産生量と活性を測定したところ、Group I と Group II に属するセレウス菌の多くは SMase 活性が高かった一方で、Group III では SMase の活性が低かった (Figure 8A)。また、培養 4 時間目におけるセレウス菌培養液の菌濁度は、個々の菌株間での差はあるものの、PlcR group 間では有意な差が見られなかった (Figure 8B)。

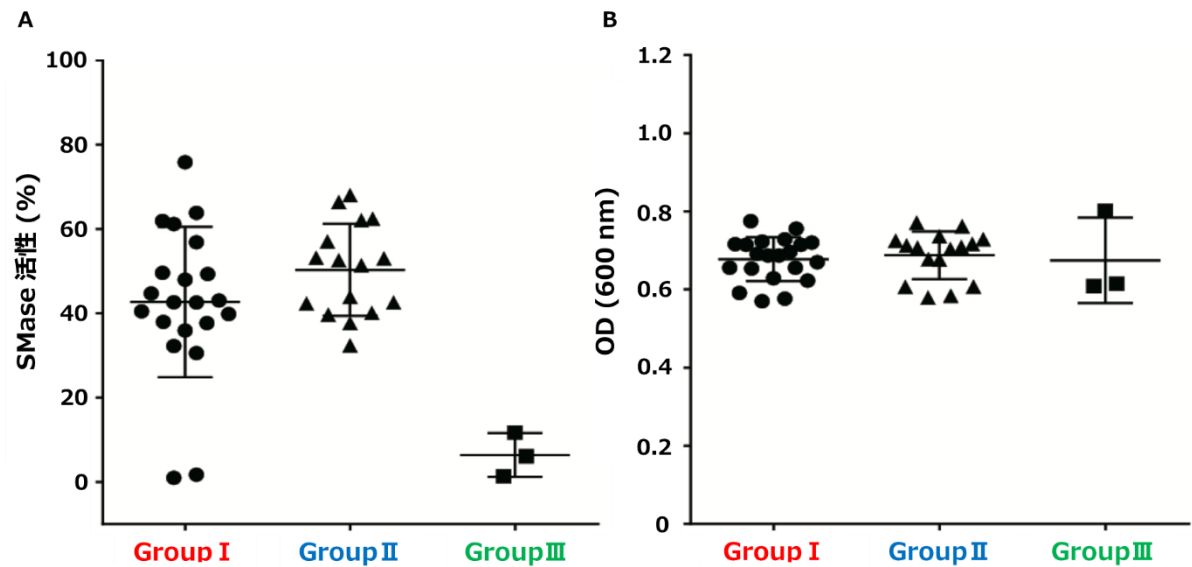


Figure 8. セレウス菌 40 株における SMase 活性と菌体増殖

(A) セレウス菌株を BHI 培地で 4 時間培養後、培養上清の SMase 活性を「方法 2-5」で記載した方法で測定した。エラーバーは標準偏差を示している (Group I : n = 21, Group II : n = 16, Group III : n = 3)。 (B) セレウス菌株を BHI 培地で 4 時間培養後、OD₆₀₀ を測定し、菌の増殖を観察した。エラーバーは標準偏差を示している (Group I : n = 21, Group II : n = 16, Group III : n = 3)。 Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

最後に、今回使用したセレウス菌の内、23 株（Group I：11 株，Group II：9 株，Group III：3 株）の *smase* の遺伝子配列を同定し（Figure S1），その塩基配列を基に系統解析を行った．その結果，セレウス菌の *smase* のクラスターは，PlcR box group と関連した（Figure 9）．

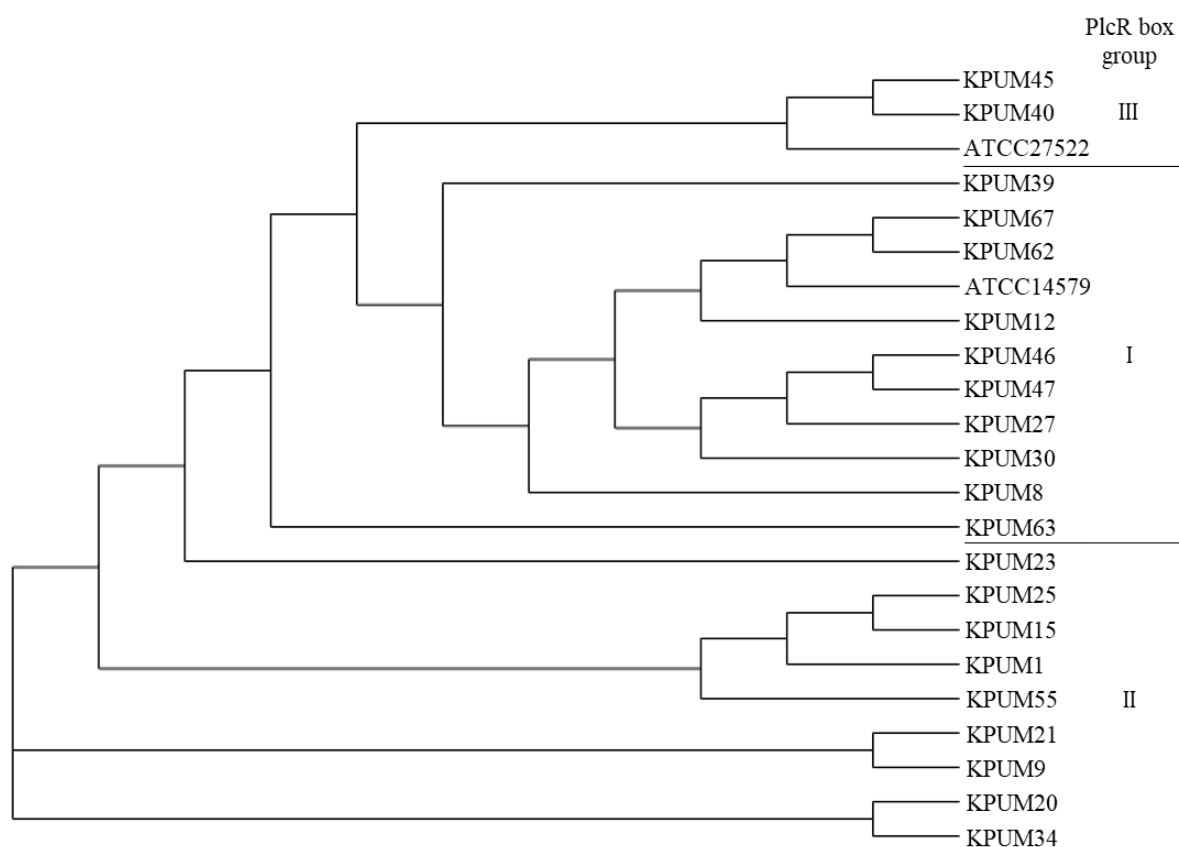


Figure 9. *smase* 遺伝子に基づく系統樹

この系統樹は，セレウス菌 23 株の *smase* 遺伝子に基づいて，GENETYX を用いて構築した．

以上の結果より，① PCPLC-PlcR box の塩基配列により，セレウス菌を 3 つのグループに分類することができ，Group I と Group II が SMase 産生菌株群，Group III が SMase 非産生菌株群であること，② PlcR box group 毎にアミノ酸配列が似た SMase を持っていることが明らかとなった．

4. 考察

PCPLC-PlcR box 配列の違いが、セレウス菌の SMase 産生量に影響していることが示唆された (Table 4). 一般的に、細菌を含む原核生物のオペロンでは、ポリシストロン性の mRNA が形成される. そのため、セレウス菌の *pcplc-smase* オペロンにおいても、*pcplc* のプロモーター領域内の PCPLC-PlcR box による転写制御が、下流に存在する *smase* の転写制御に関与している可能性は十分に考えられる.

Table 4. PCPLC-PlcR box の塩基配列に基づいた PlcR box group 分類と SMase 産生の関係

PlcR box group	PlcR box in promoter of <i>pcplc</i>	SMase 産生
Group I	TATGAACATTTCGCATA	(+)
Group II	TATGAAAATCTGCATA	(+)
Group III	TATGAACATTACATA	(-)

Yokotani A. et al. *Microbiol Immunol.* “in press”. を改変.

今回、Group I の PCPLC-PlcR box 配列と比較して、Group II の配列は 16 塩基中 2 塩基、Group III の配列は 1 塩基だけ異なった. 過去の報告では、セレウス菌において、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C をコードする *PlcA* のプロモーター領域に存在する PlcR box を人工的に点変異させたところ、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C の産生量に変化することが示されている [25]. 我々の見出した PlcR box 配列の異なる塩基数は 1-2 塩基であるが、この変異によって SMase の産生量が影響を受けている可能性は十分に考えられる.

次に、SMase のアミノ酸配列を解析した結果、ナンセンス変異は認められなかった (Figure S1). また、Group I に属する菌株である ATCC14579 を基準とすると、Group I では 98~99 %、Group II、Group III では 91-92 % の同一性であった. これまでに、SMase の活性に必須なアミノ酸として、28 番目のトリプトファン、53 番目のグルタミン酸、55 番目のフェニルアラニン、126 番目のアスパラギン酸、130 番目のアスパラギン、151 番目のヒスチジン、153 番目のグルタミン、156 番目のアスパラギン酸、195 番目のアスパラギン酸、197 番目のアスパラギン、200 番目のアスパラギン酸、232 番目のトリプトファン、233 番目のアスパラギン酸、295 番目のアスパラギン酸、296 番目のヒスチジンが報告されている [36,37]. SMase の配列は 最大で 10 % 程度異なるものの、SMase の活性に必須なアミノ酸には変異が無く、保存されていた (Figure. S1). そのため、今回検出した SMase 活性の違いは、SMase 産生量に依存していると考えられる.

smase の塩基配列を用いた系統樹 (Figure 9) では、セレウス菌の *smase* 遺伝子のクラスターと PlcR box group 分類の間に相関があることが示された. この結果より、*smase* 遺伝子 と

プロモーター領域に存在する PlcR box の塩基配列 は、同時に変化し、クラスターを作っている可能性が推察された。

この章では、PCPLC のプロモーター領域に存在する PlcR box の配列により、セレウス菌をグループ分類することができ、Group I と Group II が SMase 産生菌株群、Group III が SMase 非産生菌株群であることが明らかとなった (Table 4)。

第2章 定常期における SMase 産生の時間変化

1. 緒言

前章では、セレウス菌において、PCPLC-PlcR box の塩基配列と SMase の産生には相関があることが分かった。一方で、SMase の転写制御に関わる可能性のある PlcR box として、SMase のプロモーター領域内の SMase-PlcR box が存在するが、今回使用した菌株において、SMase-PlcR box が SMase の産生に与える影響は分かっていない。

過去の報告によると、PCPLC 活性は、セレウス菌の増殖と共に増大していく一方で、SMase 活性は、SMase を負に制御している可能性も示唆されている SMase-PlcR box の影響で、定常期開始点で最大となり、定常期では時間依存的に減少する事が報告されている (Figure 10) [35].

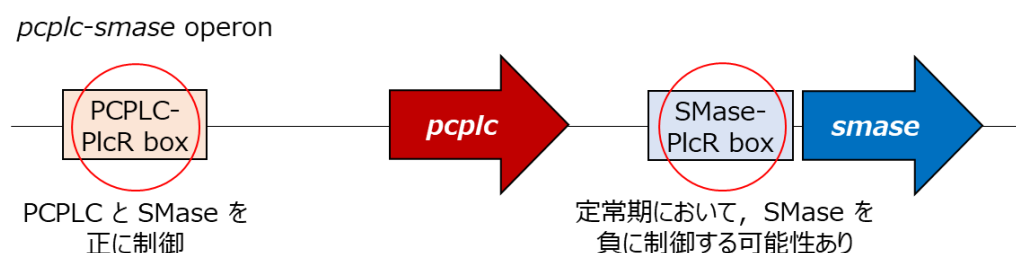


Figure 10. *pcplc-smase* オペロン内の PlcR box の働き

本章では、セレウス菌での SMase 産生に SMase-PlcR box が与える影響を明らかにするために、SMase-PlcR box 塩基配列のシーケンス解析ならびに、定常期におけるセレウス菌の培養上清を用いて SMase 産生量・活性と PCPLC 産生量・活性を測定することで、SMase と SMase-PlcR box の関係を解析した。

2. 方法

2-1. SMase-PlcR box のシーケンス解析：

はじめに、1章 2-3 で得られたゲノム DNA を用いて、PCR により SMase-PlcR box を含む DNA 領域を増幅した。PCR 反応では、4 μ L の 2.5 mM dNTP mix, 10 μ L の 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer, 1 μ L の PrimeSTAR GXL DNA polymerase, 32 μ L の滅菌水、プライマーとして 1 μ L ずつの 100 pmol/ μ L の SMase PlcR box sequence F と SMase PlcR box sequence R (Table 5), 1 μ L のゲノム DNA を混合し、94 $^{\circ}$ C で 3 分加熱後、98 $^{\circ}$ C で 10 秒, 55 $^{\circ}$ C で 15 秒, 68 $^{\circ}$ C で 45 秒を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行い、68 $^{\circ}$ C で 5 分経過後、15 $^{\circ}$ C に冷却した。

得られた PCR 反応産物を NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up で精製し、ユーロフィンジェノミクスにシーケンス解析を依頼した。

Table 5. SMase-PlcR box のシーケンス解析で使したプライマー

Primer	5'-3' sequence
SMase PlcR box sequence F	GGGTCTGGAATTGTAAATGATAATACGAAAGATTGG
SMase PlcR box sequence R	GGGTGCCGCCCAATTAAATCGGCACGCTGACTTTG

2-2. セレウス菌培養液からの培養上清の回収：

指定の時間まで培養したセレウス菌液を 1.5 mL tube に移し、15,000 × g, 4 °C で 2 分間遠心して、回収した上清をセレウス菌培養上清とした。

2-3. SMase 活性の測定

1 章 2-5 と同様の方法で、本章 2-2 で回収したセレウス菌培養上清の SMase 活性を測定した。

2-4. SMase 産生量の測定

セレウス菌培養上清中の SMase 産生量の測定は、Western blotting で検出した。泳動サンプルの準備として、15 µL のセレウス菌培養上清と 5 µL の 3-メルカプト-1,2-プロパンジオール含有の試料用緩衝液 (×4) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を混合し、98 °C で 5 分間加熱後、氷冷した。

準備したサンプルを、12.5 % ポリアクリルアミドゲル (分離ゲル組成：滅菌水 2 mL, 30 w/v % アクリルアミド/ビス混合液 (29 : 1) 2.5 mL, 分離ゲル用緩衝液×4 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 1.5 mL, 10 % 過硫酸アンモニウム (APS) 30 µL, テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 5 µL. 濃縮ゲル組成：滅菌水 2.4 mL, 30 w/v % アクリルアミド/ビス混合液 (29 : 1) 0.6 mL, 濃縮ゲル用緩衝液×4 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 1 mL, 10 % APS 20 µL, TEMED 10 µL) で電気泳動を行った。

その泳動ゲルを、100 mA, 15 V, 50 分の条件でポリフッ化ビニルデン (PVDF) 膜に転写をした。PVDF 膜を EzBlock Chemi (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) でブロッキング処理し、一次抗体 (Bc-anti-SMase) に 4 °C で 16 時間浸した。その後、TBST で 3 回洗浄し、二次抗体 (HRP 標識抗ウサギ IgG) に 40 分間浸し、TBST で 3 回洗浄した。

EzWestLumi plus (ATTO Corporation) で発光させ、WSE-6200H LuminoGraph II (ATTO Corporation) で検出し、写真撮影を行った。なお、使用した一次抗体の作製方法は、過去に報告している[12]。

2-5. PCPLC 活性の測定

PCPLC 活性は、蛍光物質を封入したホスファチジルコリン含有リポソームを用いて測定した。まず、リポソームの原料として、ホスファチジルコリン (NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan) 2.28 mg とコレステロール 1.72 mg の混合物を準備した。

これらの混合物を N_2 ガス下で乾燥させ、ガラス試験管の壁面に脂質膜を形成させた。次に、CF の調整を行った。4.5 mg の CF をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 0.01 mg/mL, pH 7.0) に溶解させ、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 に調整し、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し、回収した上清を CF 溶液とした。

CF 溶液を脂質膜に添加し、 $55^\circ C$ でボルテックスすることにより、リポソーム懸濁液とした。封入されなかった 5(6)-カルボキシフルオレセインを除去するために、リポソーム懸濁液を $20,000 \times g$ で 20 分間遠心分離し、PBS で洗浄という工程を三回行い、得られリポソームを 220 μL の PBS に懸濁した。

次に、リポソーム 5 μL , 100 mM $MgCl_2$ 3 μL , PBS 242 μL , サンプル 50 μL (セレウス菌サンプル: BHI で 2 倍希釈したセレウス菌培養上清 50 μL , ネガティブコントロール: BHI 培地 50 μL , ポジティブコントロール: BHI 培地 43 μL , ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル 7 μL) を混合し、 $37^\circ C$ で 30 分間インキュベートした後、 $20,000 \times g$ で 5 分間遠心分離し、壊れたリポソームから漏れ出た蛍光物質を含む上清を回収した。

回収した上清を黒色の 96 well plate に入れ、Varioskan を用いて、蛍光強度 (励起波長: 490 nm, 発光波長: 530 nm) を測定した。ポジティブコントロールの蛍光を 100 % とし、ネガティブコントロールの蛍光を 0 % として、セレウス菌サンプルの PCPLC 活性を算出した。上記のプロトコルを以下に図示した (Figure 11)。

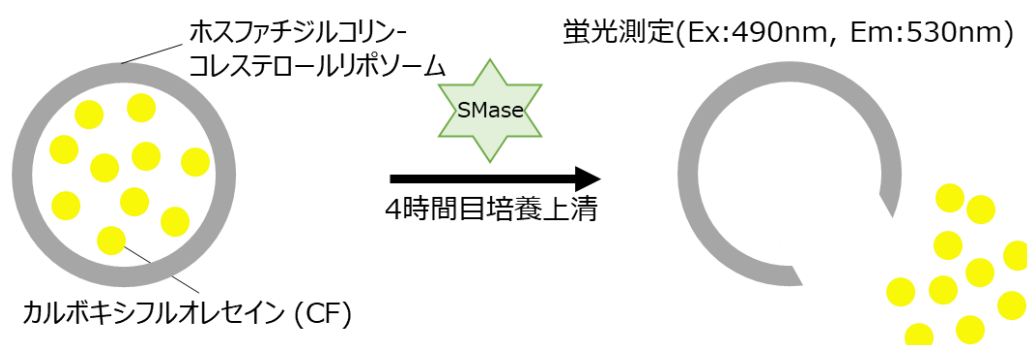


Figure11 . PCPLC 活性の測定方法

2-6. PCPLC 産生量の測定

セレウス菌培養上清中の PCPLC 産生量の測定は、Western blotting で検出した。泳動サンプルの準備として、15 μL のセレウス菌培養上清と 5 μL の 3-メルカプト-1,2-プロパンジオール含有の試料用緩衝液 ($\times 4$) を混合し、 $98^\circ C$ で 5 分間加熱後、氷冷した。

準備したサンプルを、12.5 % ポリアクリルアミド (分離ゲル組成: 滅菌水 2 mL, 30 w/v % アクリルアミド/ビス混合液 (29:1) 2.5 mL, 分離ゲル用緩衝液 $\times 4$ 1.5 mL, 10 % APS 30 μL , TEMED 5 μL . 濃縮ゲル組成: 滅菌水 2.4 mL, 30 w/v % アクリルアミド/ビス混合液 (29:1) 0.6 mL, 濃縮ゲル用緩衝液 $\times 4$ 1 mL, 10 % APS 20 μL , TEMED 10 μL) で電気泳動を行った。その泳動ゲルを、100 mA, 15 V, 50 分の条件で PVDF 膜に転写をした。PVDF 膜を EzBlock

Chemi でブロッキング処理し，一次抗体 (anti-PCPLC) に 4 °C で 16 時間浸した．その後，TBST で 3 回洗浄し，二次抗体 (HRP 標識抗ウサギ IgG) に 40 分間浸し，TBST で 3 回洗浄した．

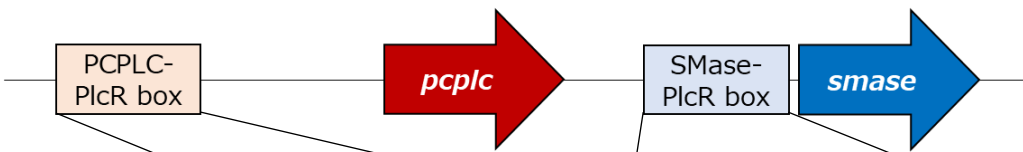
EzWestLumi plus で発光させ，WSE-6200H LuminoGraph II で検出し，写真撮影を行った．なお，使用した一次抗体の作製方法は，過去に報告している[12]．

3. 結果

最初に、セレウス菌 40 株の SMase-PlcR box 塩基配列をシーケンス解析したところ、ATCC14579 を含む Group I では、4 株を除いて、ATACA**ATAC**ATGGAGGTAT の配列を持っていた。ほとんどの Group II に属する菌株では、Group I と比較して、6 番目の塩基が C になり、TAC が欠損している ATACAC**---**ATGGAGGTAT の配列を持っていた。また、Group III に属する菌株では、Group I と比較して、TAC が欠損している ATACAA**---**ATGGAGGTAT の配列を持っていた (Table 6)。

Table 6. セレウス菌の *pcplc* と *smase* のプロモーター領域における PlcR box 配列

pcplc-smase operon



PlcR box group	Strain	PlcR box in promoter of <i>pcplc</i>	PlcR box in promoter of <i>smase</i>
Group I	ATCC14579	TATGAACATTTCGCATA	ATACA ATAC ATGGAGGTAT
	KPUM8	TATGAACATTTCGCATA	ATACA ATAC ATGGAGGTAT
	KPUM46	TATGAACATTTCGCATA	ATACA ATAC ATGGAGGTAT
Group II	KPUM15	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM25	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
Group III	ATCC27522	TATGAACATTTCACATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT
	KPUM40	TATGAACATTTCATATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT

PlcR box 配列を基に、セレウス菌の臨床分離株および ATCC 菌株を 3 グループに分類した。40 株のセレウス菌のうち、各グループから代表株を選定し、その配列を示した。配列中の “-” は、Group I の配列と比較し欠損している塩基を表している。

Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

定常期における SMase 活性と産生量の時間変化を調べるにあたり、各 PlcR box group から代表的な株を選定した。セレウス菌の基準株として ATCC14579, Group I から KPUM8 と KPUM46, Group II から KPUM15 と KPUM25, Group III から KPUM40 と ATCC27522 の合計 7 株を選定し、実験を行った。まず、今回用いたすべての代表的な菌株は 4 時間目で定常期に達しており、各菌株の増殖曲線に差は見られなかった (Figure 12)。

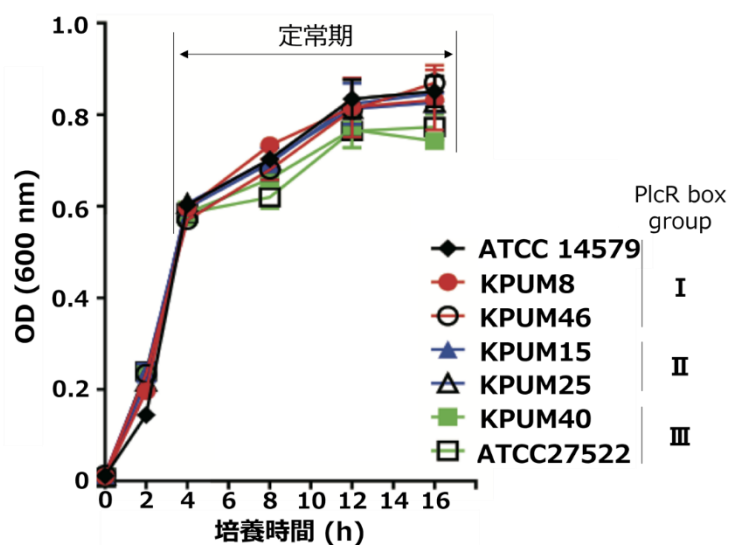


Figure 12. セレウス菌の代表株における増殖曲線

BHI 培地でのセレウス菌の増殖を OD600 で観察し、増殖曲線を作成した。エラーバーは標準偏差を示している (n=3). Yokotani A. et al. Microbiol Immunol. “in press”. を改変。

次に、定常期における SMase 活性と産生量の時間変化を調べたところ、ATCC14579 (基準株) の SMase 活性は 4 時間目で最大となり、その後、時間依存的に減少した。他の Group I に属する菌株も ATCC14579 と同様の SMase 活性を示した。Group II に属する菌株では、4 時間後に Group I と同様の SMase 活性を示したが、4 時間目以降も活性は減少しなかった。Group III に属する菌株では、4 時間目にほとんど活性を示さなかった。4 時間目以降の活性に関しては、KPUM40 は SMase 活性を示さなかったが、ATCC27522 では 12 時間目以降に SMase 活性が検出された (Figure 13A)。また、培養上清中に含まれる SMase の量を調べたところ、ATCC14579 と KPUM46 (Group I) では 4 時間と 8 時間に 34-kDa の SMase が検出されたが、16 時間には検出されなかった。また、KPUM25 (Group II) では、SMase の量は 4 時間目以降、時間依存的に増加した。一方で、KPUM40 (Group III) では、SMase は検出されなかった (Figure 13A)。これらのデータから、セレウス菌における SMase 活性の時間変化は、SMase 産生量の時間変化と一致することが示された。

次に、SMase の上流に存在する PCPLC 活性と産生量の時間変化を調べた。その結果、セレウス菌の基準株である ATCC14579 の PCPLC 活性は、SMase 活性と異なり、培養 4 時間目で最大となり、定常期中も維持された。他の Group I に属する菌株も ATCC14579 と同様

の PCPLC 活性を示した. Group II に属する菌株では, PCPLC 活性は SMase 活性と同じ時間変化を示した. Group III に属する菌株では, PCPLC 活性は, 4 時間では低く, 4 時間目以降にわずかに上昇した (Figure 13B). さらに, Western blotting 解析により, 培養上清中の PCPLC の発現量変化を調べた. その結果, PCPLC の量は, ATCC14579 と KPUM46 (Group I) と KPUM25 (Group II) では, PCPLC の量は時間依存的に増加したが, KPUM40 (Group III) では増加しなかった (Figure 13B). これらのデータから, セレウス菌における PCPLC 活性の時間変化は, PCPLC 産生量と一致することが示された.

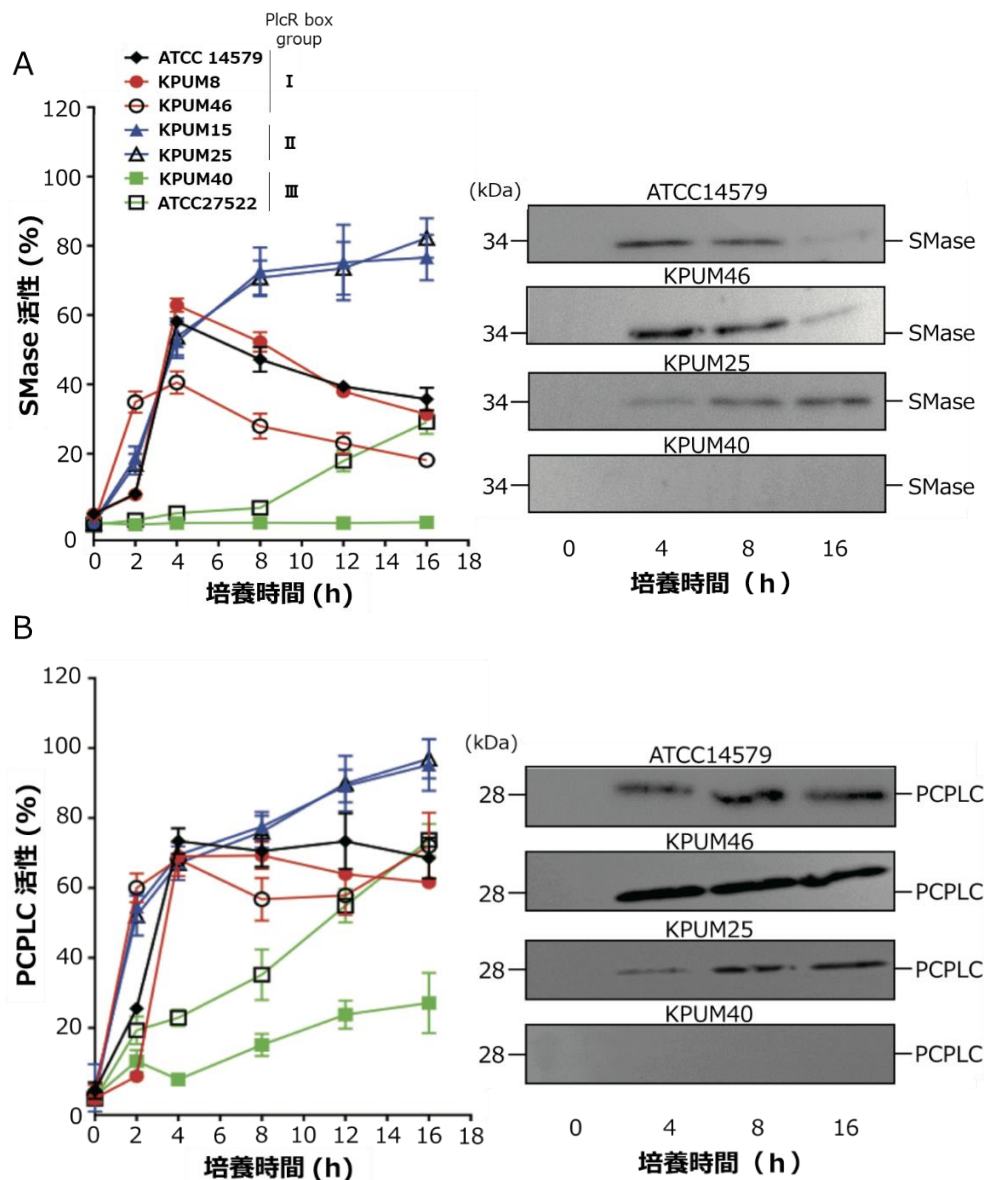


Figure 13. セレウス菌の代表株における SMase および PCPLC 活性と発現量の観察 (A) セレウス菌の上清を回収し, SMase 活性を測定した (左図). SMase の発現量を SMase の抗体を用いた Western blotting で検出した (右図). (B) セレウス菌の上清を回収し, PCPLC 活性を測定した (左図). PCPLC の発現量を PCPLC の抗体を用いた Western blotting で検出した (右図). Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変.

最後に、PlcR box の配列の違いが SMase および PCPLC の発現制御に関与しているかどうかを調べるために、セレウス菌 40 株を使用して、4 時間目または 16 時間目の培養上清における SMase 活性と PCPLC 活性を測定した。ATCC14579, KPUM8, KPUM46 で見られたように、2 株 (KPUM58, KPUM64) を除くほとんどの Group I 株で、SMase 活性は 4 時間目で検出され、16 時間目には減少していたが、PCPLC 活性は 4 時間目から 16 時間目まで維持された。Group II では、4 時間目から 16 時間目にかけて SMase 活性も PCPLC 活性も維持されていた。一方、Group III では、Group I や Group II と比較して、SMase 活性が非常に低いことが分かった (Figure 14)。さらに、Group I の SMase-PlcR box 配列を解析したところ、KPUM49 と KPUM63 は Group II と同じ配列 (Group I-II)，KPUM39 と KPUM65 は Group III と同じ配列 (Group I-III) であることがわかった (Table S1)。Group I における 16 時間目の SMase 活性は、4 時間目の 37 % であったが、Group I-II と Group I-III の SMase 活性の変化は 106 %，Group II の活性変化は 94 % であった。また、Group I，Group I-II と Group I-III，Group II における 16 時間目の PCPLC 活性は、それぞれ 4 時間後の 98 %，123 %，124 % であった。

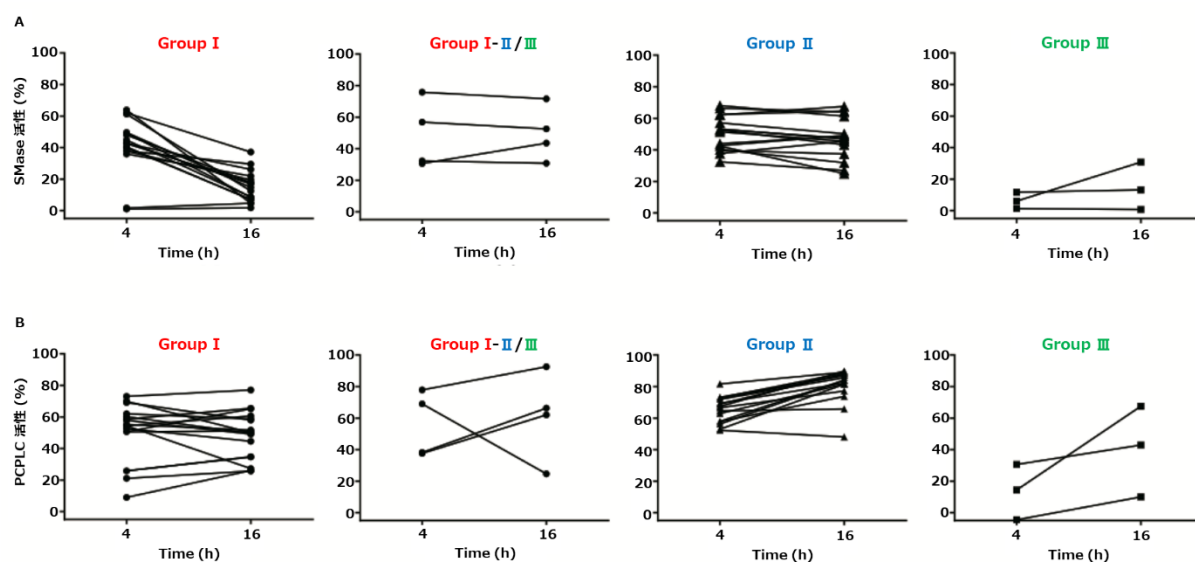


Figure 14. セレウス菌 40 株の定常期における SMase 活性および PCPLC 活性
 セレウス菌の臨床分離株と ATCC 株の 4 時間培養上清と 16 時間培養上清を回収し、
 SMase (A) および PCPLC (B) の活性を測定した。Group I の中でも、SMase-PlcR box
 が、グループ II またはグループ III である菌株を Group I-II / III とした。Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

以上の研究結果より、① SMase-PlcR box の塩基配列は、大きく分けて 3 種類存在し、定常期中における SMase 活性の時間変化に影響を与えること、② SMase 活性が、定常期開始点で最大となり、定常期では時間依存的に減少する菌株群 (Group I)，定常期中でも SMase の産生・活性が低下しない菌株群 (Group II)，SMase 非産生菌株群 (Group III) が存在することが明らかとなった。

4. 考察

セレウス菌を SMase-PlcR box の塩基配列を基に分類した結果、興味深いことに、第 1 章で PCPLC-PlcR box の配列を基に作製した PlcR box group 分類とほぼ一致した (Figure S1)。

セレウス菌の基準株を含む Group I に属するほとんどの菌株で、SMase の産生量と活性は、定常期開始点に最大となり、定常期中に減少した。一方で、PCPLC の産生量と活性は、定常期開始点で最大となったが、定常期中に減少することはない (Table 7)。この Group I に属する菌株での結果は、以前に報告された SMase と PCPLC 活性の時間変化と同様の結果であった。また、SMase や PCPLC の産生量が、活性と同様の時間変化を示すことを初めて報告した。このように SMase 産生の時間経過は PCPLC 産生の時間経過と異なっていることから、SMase のプロモーター領域に存在する SMase-PlcR box が定常期以降の SMase 産生に影響を与えていることが示唆された。

一方で、Group I とは対照的に、定常期に SMase の産生・活性が低下しないセレウス菌株 (Group II) を新しく見出した (Table 7)。

Table 7. セレウス菌の PlcR box 配列と、PCPLC 産生ならびに、SMase 産生

PlcR box group	PlcR box in promoter of PCPLC	PlcR box in promoter of SMase	PCPLC 産生 (定常期開始点)	PCPLC 産生 (定常期)	SMase 産生 (定常期開始点)	SMase 産生 (定常期)
Group I	TATGAACATTTCATA	ATACAATACATGGAGGTAT	(+)	(+)	(+)	(-)
Group II	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT	(+)	(+)	(+)	(+)
Group III	TATGAACATTTACATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT	(-)	(-)	(-)	(-)

Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

Group I に属する菌株の中でも、SMase-PlcR box 配列が Group II と同じである KPUM49 と KPUM63 (Group I-II) と、Group III と同じである KPUM39 と KPUM65 (Group I-III) を認めた (Table S1)。

上記の 4 株では、Group I とは異なり、定常期における SMase の産生と活性は低下しなかった。このことから、SMase-PlcR box が定常期以降の SMase 産生に影響を与えていることが示唆された。また、Group I のように 5'-ATAC-3' の配列を持つ SMase-PlcR box は、Group II や Group III の PlcR box よりも強く SMase 産生の抑制をすることが示唆された。

今回、PCPLC に存在する PCPLC-PlcR box で正の制御、SMase-PlcR box で負の制御と違う役割を担っている可能性を示唆した。大腸菌のラクトースオペロンでは、プロモーターの上流に存在する CAP 結合部位にアクチベーターである CAP が結合することで、オペロンの転写が活性化される。一方で、プロモーターの下流に存在するオペレーターに Lac リプレッサーが結合することで、オペロンの転写が抑制されることが知られている。セレウス菌の PCPLC-PlcR box は PCPLC のスタートコドンより 130 bp 程離れた -35 領域より上流に存在し、SMase-PlcR box は SMase のスタートコドンより 5 bp 離れた -10 領域より下流に存在する (Figure 15)。同じ PlcR box でも、PCPLC-PlcR box が SMase を正に制御し、SMase-

PlcR box が SMase を負に制御するという役割の違いには、それぞれの PlcR box が存在する位置が関与している可能性が考えられる。

今後、セレウス菌で働くプラスミドに、本研究で報告した様々な配列の PlcR box を組み込み、プロモーターアッセイを行うことで、より詳細な PlcR box の役割を解明できると考えている。

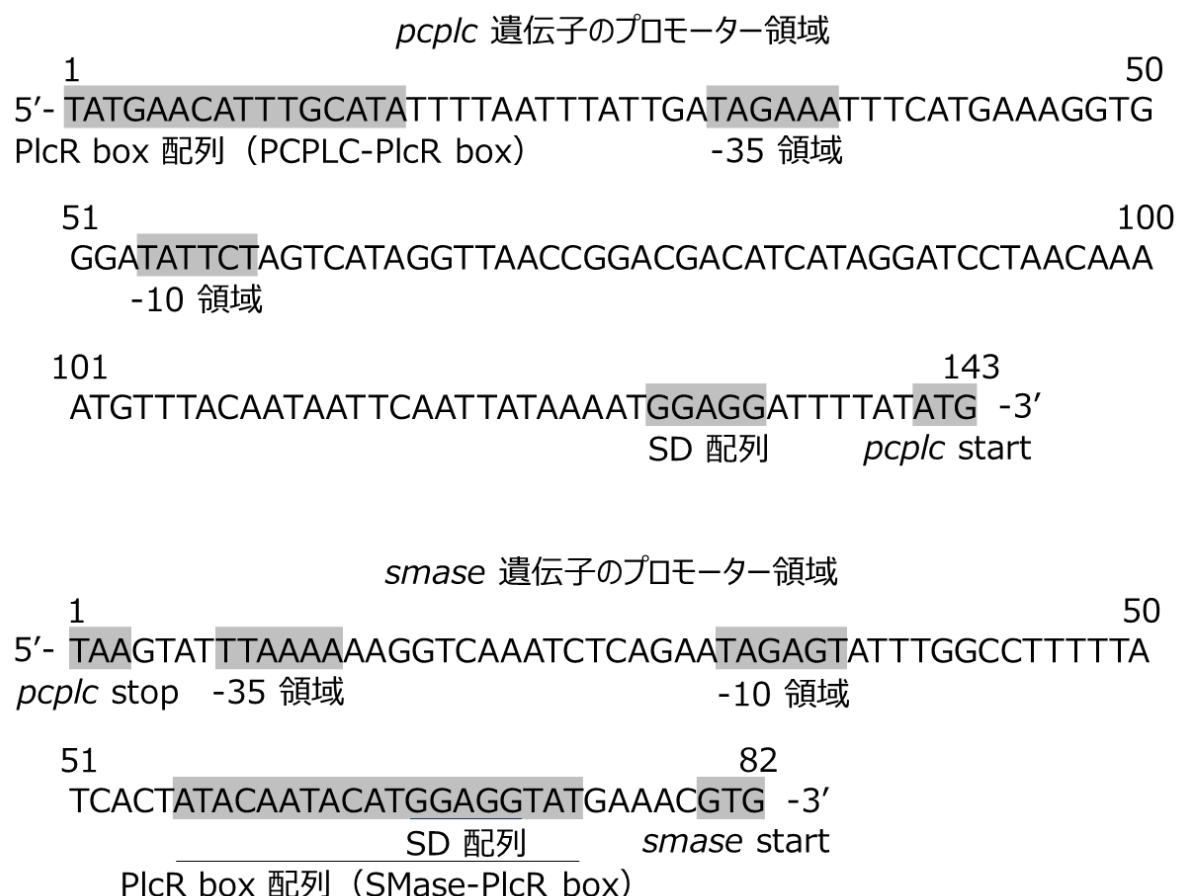


Figure 15. *pcplc-smase* オペロンの遺伝子配列 (ATCC14579)

第3章 PlcR box group 間におけるセレウス菌の病原性比較

1. 緒言

第2章までで、SMase の産生パターンが3種類あることを報告した。一方で、それぞれの産生パターンを示すセレウス菌が、病原性を示すかどうかは分かっていない。

これまでに、セレウス菌の産生する SMase の病原性としては、セレウス菌のマウスへの腹腔内投与で、マウスが死亡すること [12, 24], マクロファージ膜中のスフィンゴミエリンをセラミドに分解することで、細胞膜の流動性を低下させ、マクロファージの貪食作用を抑制することが報告されている (Figure 16) [12].

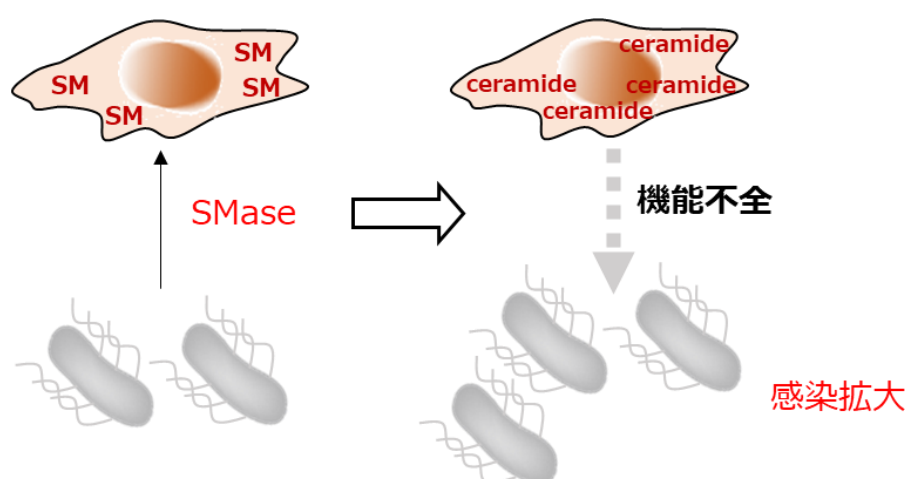


Figure 16. セレウス菌が産生する SMase の病原性

本章では、PlcR box group 間の SMase 産生の違いが、宿主に対する病原性に反映されるか確認するために、マウスへの腹腔内投与による致死確認ならびに、マクロファージ貪食活性を調べることで、PlcR box group 間の病原性の違いを比較検討した。

2. 方法

2-1. マウスへの腹腔内投与によるセレウス菌の病原性比較

投与するセレウス菌は、BHI 培地で 37 °C, 135 rpm の条件で 18 時間培養し、培養した菌液を 15 mL チューブに移した。

その培養液を、6500 × g で 15 分間遠心し、上清を取り除き、取り除いた上清と同量の PBS を加える工程を 2 回行った。その後、CO8000 Biowave (Cambridge, UK) で OD₆₀₀ の測定を行い、セレウス菌培養液の濃度が 3.0 × 10⁷ colony forming units (CFU) / 100 μL になるように調整した。

6 週齢のオスの Balb/c マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) に、調整したセレウス菌液を 100 μL 腹腔内投与し、マウスの生存率を観察した。なお、観察は投与後 48 時間まで継続した。本実験プロトコルは、京都薬科大学の動物実験委員会の承認を得ている (番号: 19-001, A21-025)。

2-2. 細胞培養とマクロファージの貪食活性測定

Ivanna らの方法を参考に実験系を組み立てた [38]. マウスのマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を ATCC 社から入手し, RPMI-1640 培地 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で培養し, 5.0×10^4 個の RAW264.7 細胞を 96 well plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した.

次に, BHI 培地で 37°C , 135 rpm の条件で 18 時間培養したセレウス菌を CO8000 Biowave (Cambridge, UK) で OD_{600} の測定を行い, セレウス菌培養液の濃度が 5.0×10^4 CFU / $10\ \mu\text{l}$ になるように調整した. 多重感染度 (Multiplicity of Infection : MOI) が 1 になるように, 調整したセレウス菌培養液を $10\ \mu\text{L}$ 投与し, 37°C , 5 % CO_2 条件下で 2 時間静置した.

細胞を $300\ \mu\text{L}$ の 37°C で温めた PBS で 2 回洗浄し, ゲンタマイシン (終濃度 : $1000\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下で 2 時間培養して, RAW264.7 細胞外にいるセレウス菌を死滅させた.

その後, 37°C で温めた PBS で 2 回洗浄し, 滅菌蒸留水を加えて, RAW264.7 細胞を溶解し, 26 ゲージ針で 6 回ホモジナイズした. ホモジナイズ溶液を BHI 寒天培地にプレーティングし, 37°C で一晚培養した後, コロニー数をカウントして生菌数 (貪食された菌数) を定量した.

3. 結果

本章の実験では、ATCC14579, KPUM46 (Group I), KPUM25 (Group II), KPUM40 (Group III) を使用した。セレウス菌をマウスに腹腔内投与した結果、感染マウスは感染後 8 時間で死亡し始め、ATCC14579, KPUM46 (Group I) および KPUM25 (Group II) は 19 時間以内に 100 % 死亡した。一方、KPUM40 (Group III) 感染マウスは 1 匹も死亡しなかった (Figure 17)。

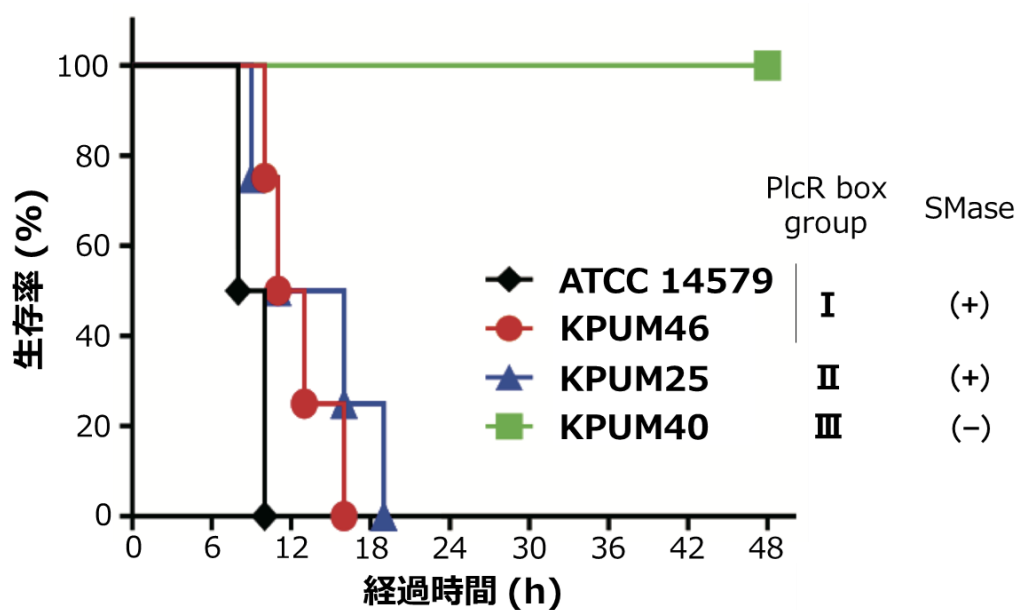


Figure 17. セレウス菌に感染したマウスの生存曲線

ATCC145579 (標準株, 黒菱形), KPUM46 (Group I, 赤丸), KPUM25 (Group II, 青三角), KPUM40 (Group III, 緑四角) を感染させたマウスの生存曲線。データは、2 つの独立した実験から収集した (1 グループあたり $n=4$)。Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

次に、各セレウス菌によるマクロファージの貪食能への影響を調べた。SMase 非生産菌株である KPUM40 (Group III) が貪食された菌数は、SMase 生産菌株である ATCC14579, KPUM46 (Group I) および KPUM25 (Group II) に比べて劇的に多かった (Figure 18)。つまり、SMase 生産菌株は、SMase 非生産菌と比較して、マクロファージからの貪食を回避することができていた。SMase はセレウス菌の貪食活性を阻害することが明らかとなった。これらの結果は、SMase を生産する Group I および II に属する菌株の病原性が Group III に属する菌株よりも高いことを示唆するものであった。

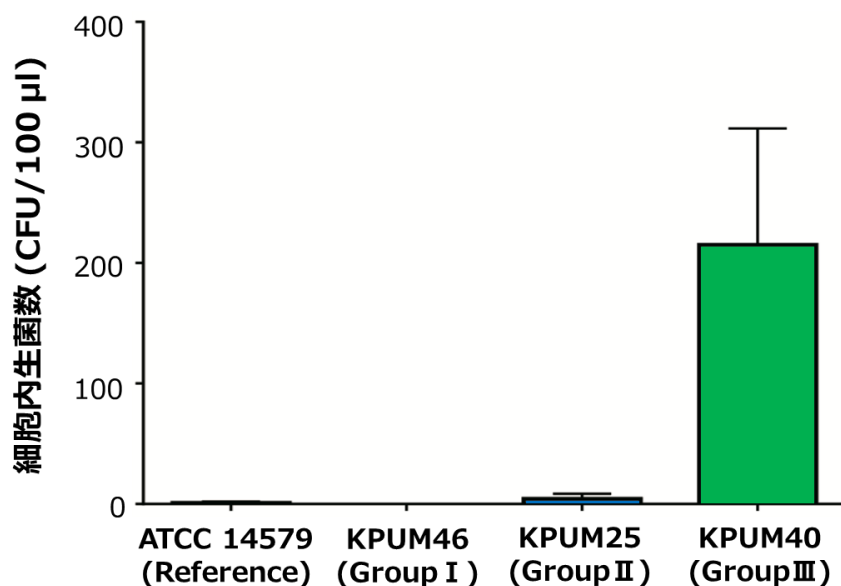


Figure 18. セレウス菌株によるマクロファージ貪食能の抑制

RAW264.7 マクロファージをセレウス菌株と 2 時間インキュベートし、ゲンタマイシンで 2 時間処理した後、細胞内細菌数 (CFU/100 µL) を測定した。エラーバーは標準偏差を示している (n = 3)。Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変。

以上の結果より、SMase を生産する Group I と Group II に属するセレウス菌は、SMase を生産しない Group III に属するセレウス菌より、マウスに対する致死活性とマクロファージに対する貪食抑制能が高いことが明らかとなった。

4. 考察

SMase 産生菌株である Group I および Group II に属するセレウス菌の病原性が，SMase 非産生菌株である Group III に属するセレウス菌よりも高いことが示唆された (Table 8)。

Table 8. セレウス菌の PlcR box 配列と，SMase 産生ならびに，病原性

PlcR box group	PlcR box in promoter of PCPLC	PlcR box in promoter of SMase	SMase 産生 (定常期開始点)	SMase 産生 (定常期)	病原性
Group I	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT	(+)	(-)	(+)
Group II	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT	(+)	(+)	(+)
Group III	TATGAACATTTACATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT	(-)	(-)	(-)

Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変.

これまでに，セレウス菌が産生する SMase の病原性として，マウスに対する致死活性とマクロファージの食食抑制能が報告されている [12]。一方で，黄色ブドウ球菌の産生する SMase である β -hemolysin では，皮膚のケラチノサイトに傷害を与えること，血管内皮細胞において IL-8 の発現を阻害することなど，細胞機能に傷害を与える作用も報告されている [19, 22]。セレウス菌の産生する SMase においても，今回確認したマウスとマクロファージに対する病原性以外にも，生体細胞へ様々な作用を与えられる。

血液培養検査において，バシラス属の検出は通常，環境から細菌が混ざった汚染サンプルだと考えられている [39, 40]。一方で，近年，日本において，菌血症や敗血症などの重症感染に関連する高病原性のセレウス菌も報告されており，これらのセレウス菌は，MLST 解析を用いた系統解析によると，Cereus III 系統と呼ばれる炭疽菌と近い系統のセレウス菌であることが示されている [41]。本研究で用いたセレウス菌の臨床分離株においても，SMase 陽性株の割合は 89.4 % (34 / 38) であった。一方で，今回使用した ATCC27522 と以前に報告された環境由来のセレウス菌では，SMase 陽性株が無かった (0 / 4) ことから (Figure 8) [12]，SMase は，ヒトの感染に必要な毒素であると推察することができる。

SMase を産生する Group I および Group II に属するセレウス菌は，マクロファージによる食食を抑制し，これらの菌を投与させたマウスは死亡したが，Group III の菌株に感染したマウスは死亡しなかった。これらのことから，SMase は，セレウス菌の感染拡大に寄与し，重症感染症に導く可能性のある病原因子であることが示唆された。したがって，PCPLC のプロモーター領域に，Group I と Group II の PCPLC-PlcR box を持つ SMase 産生セレウス菌株を早期に検出することが，セレウス菌による感染症の重症化を防ぐために重要であると考えられる。

一方で，Group III の PCPLC-PlcR box を持つ SMase 非産生セレウス菌が検出された場合は，非病原性のセレウス菌である可能性が高く，患者への不要な抗菌薬の投与を防ぐことができる。本論文でのセレウス菌のグループ分類は，抗菌薬の適正使用に繋がり，薬剤耐性菌の発生を防ぐことにも貢献すると考えられる。

今回、マウスモデルやマクロファージ貪食能実験では、Group I と Group II の病原性の違いを観察することができなかった。今回行ったマウス実験では、Group I と Group II のセレウス菌を腹腔内注射した後、8 時間目から死亡し始めて 19 時間以内に 100 % 死亡し、セレウス菌をマクロファージに感染させた時間も 2 時間であった。しかしながら、Group I と Group II 間で SMase 活性が明確に異なる時間は、12 時間目や 16 時間目である。したがって、病原性実験での感染時間が短かったため、Group I と Group II 間での病原性の違いを観察することは困難であったと考えている。Group I と Group II の病原性の違いを検出する病原性実験の確立は、今後の課題である。

第4章 PlcR box 配列により SMase 産生が変化する要因の探索

1. 緒言

SMase に関して、DNA 配列には欠損や挿入など無く正常であり、SMase の産生量や活性が異なることを示してきた。しかし、SMase の mRNA 量は分かっていない (Figure 19)。PlcR box の配列の変化が SMase の転写か翻訳のどちらに影響を与えているか解明するために、SMase の mRNA 量を測定した。

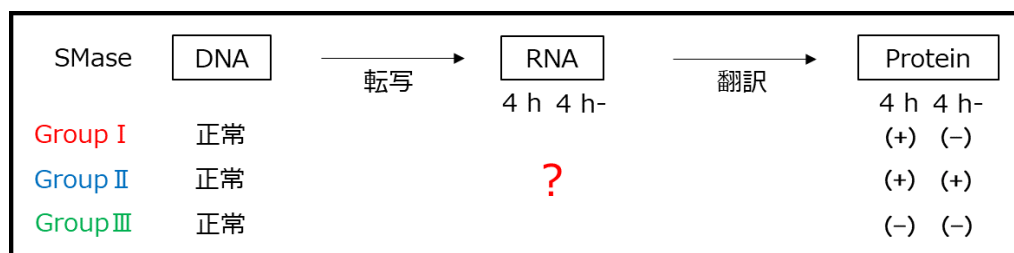


Figure 19. セレウス菌株における SMase の発現過程

ここまでの章では、PlcR 転写制御系の中でも、PlcR box の配列を中心に見てきたが、転写因子である PlcR と PapR₇ の違いが、SMase 産生に影響を与えているかは明らかになっていない (Figure 20)。本章では、PlcR と PapR₇ のアミノ酸配列を特定することで、PlcR や PapR₇ などの転写因子と SMase 産生の関係を解析した。

また、PCPLC-PlcR box や SMase-PlcR box などの転写因子結合部位の配列が変化することによって、SMase の産生パターンが変わることが示唆された。しかしながら、PlcR box の配列の違いが、SMase の産生量に与えるメカニズムは分かっていない (Figure 20)。そのメカニズムを解明するために、転写因子である PlcR-PapR₇ と各 PlcR box との結合親和性を解析した。

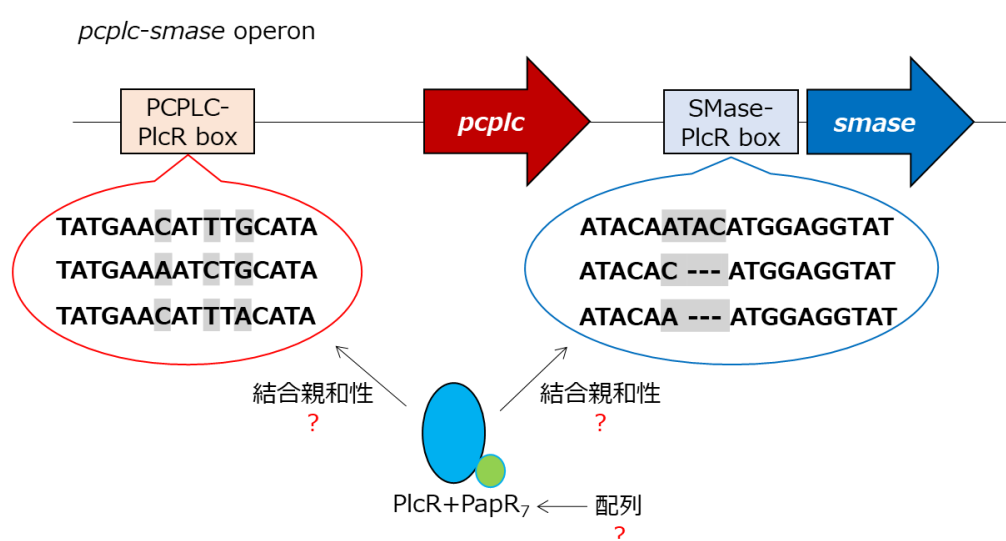


Figure 20. 転写因子と *pcplc-smase* オペロン内の PlcR box との関係

2. 方法

2-1. セレウス菌からの RNA 抽出

セレウス菌の培養開始から 4 時間目, 8 時間目, 12 時間目の培養液 1 mL を 1.5 mL チューブに移し, $20000 \times g$, 4°C の条件で 1 分間遠心し, 上清を取り除き, 350 μL の ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) に集菌した菌を溶解した.

溶解した液をガラスビーズ入りのチューブに移し, 10 分間攪拌後, 650 μL の ISOGEN を加えて $11,000 \times g$, 4°C の条件で 1 分間遠心し, 上清を回収した. 次に, 200 μL のクロロホルムを加えて, 15 秒間強く振り, 3 分間静置し, $12,000 \times g$, 4°C の条件で 15 分間遠心し, 上清を回収する工程を 2 回行った. 続いて, 240 μL のイソプロパノールを加えて, 転倒混和し, 10 分間静置し, $12,000 \times g$, 4°C の条件で 15 分間遠心し, 上清を取り除いた.

最後に, ペレットに 1 mL の 70 % エタノールを加え, $7500 \times g$, 4°C の条件で 5 分間遠心し, 上清を取り除いて, 真空乾燥を行った. ペレットは, 21 μL のジエチルピロカーボネート処理 (DEPC) 水で溶解した.

2-2. SMase の mRNA 量の測定

2-1 で回収した RNA から DNA を除去するために, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した Total RNA 1 μL , $10 \times \text{DNase I buffer}$ 5 μL , DNase I (RNase free) 0.5 μL , 滅菌水 43.5 μL を混合し, 37°C で 20 分間反応させた. その反応液に 2.5 μL の 0.5 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加し, 80°C , 2 分の条件で DNase I を失活させた.

次に, DNase I を除去するために, DNase I 処理後の RNA 50 μL , 100 % エタノール 600 μL , 3 M 酢酸ナトリウム 20 μL , 滅菌水 150 μL を混合し, 攪拌後, -80°C に 20 分間静置し, $20000 \times g$, 4°C の条件で 10 分間遠心し, 上清を取り除いた. ペレットに 500 μL の 70 % エタノールを加え, $20000 \times g$, 4°C の条件で 5 分間遠心し, チップで上清を取り除いた後, 風乾させた. 最後に, 滅菌水で RNA を溶解した.

逆転写反応を行うために, RNA 300 ng, $5 \times \text{PrimeScript RT Master Mix}$ 2 μL , 滅菌水 up to 10 μL を混合し, 37°C で 15 分, 85°C で 5 秒加熱後, 4°C まで冷却した.

次に, PCR により SMase 内の DNA 領域を増幅した. 今回, SMase の mRNA 量 (SMase-mRNA) を測定するために PCR に用いたプライマーセットは, SMase の mRNA 量 (SMase-mRNA) を測定するための SMase-193-RT-PCR-F と SMase-353-RT-PCR-R の組み合わせと, 内部コントロールとしての 16SrRNA の mRNA 量 (16SrRNA-mRNA) を測定するための *B.cereus*-16SrRNA-F と *B.cereus*-16SrRNA-R の組み合わせで行った (Table 9). なお, SMase-193-RT-PCR-F (193-209 番目の塩基配列) と SMase-353-RT-PCR-R (334-353 番目の塩基) の配列は, 全ての PlcR box group 代表株における SMase に存在している配列になるように設計した (Table 9).

PCR 反応は, 1.6 μL の 2.5 mM dNTP mix, 2 μL の $10 \times \text{Ex taq Buffer}$, 0.1 μL の Ex taq polymerase, 13.3 μL の滅菌水, 1 μL ずつの 100 pmol/ μL に調整したプライマーセット, 1 μL の逆転写反応で得た cDNA (25 ng/ μL) を混合し, 94°C で 5 分加熱後, 98°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 45 秒を 1 サイクルとする反応を SMase-mRNA のサンプルで 28

サイクル, 16SrRNA-mRNA のサンプルで 13 サイクル行い, 72 °C で 5 分経過後, 15 °C に冷却した. 得られた PCR サンプルを 2% agarose ゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマ이드で染色し, 紫外線照射下で WSE-6200H LuminoGraph II を用いて撮影した.

バンド強度は ImageJ software (National Institutes of Health) を用いて, 各バンドを手動で選択し, Magic Wand ツールを用いて実施した. SMase-mRNA の発現量は, SMase-mRNA のバンド強度を, インターナルコントロールとして使用した 16SrRNA-mRNA のバンド強度で割った値で示した [42, 43]. 群間の比較に関しては, Tukey 法を用いて検定を行った.

Table 9. SMase の RT-PCR で使用したプライマー

Primer	5'-3' sequence
SMase-193-RT-PCR-F	GGGGCGGCAGATTATA
SMase-353-RT-PCR-R	CCTAACGTTTTATCCCATTC
<i>B.cereus</i> -16SrRNA-F	CGCAATTGACGAAAGTCTG
<i>B.cereus</i> -16SrRNA-R	TAATTCCGGATAACGCTTGC

2-3. PlcR と PapR₇ のシーケンス解析

1 章 2-3 で得られたゲノム DNA を用いて, PCR により PlcR, PapR を含む DNA 領域を増幅した. PCR 反応は, 4 µL の 2.5 mM dNTP mix, 10 µL の 5×PrimeSTAR GXL Buffer, 1 µL の PrimeSTAR GXL DNA polymerase, 32 µL の滅菌水, プライマーとして 1 µL ずつの 100 pmol/µL の PlcR-368-seq と PlcR minus-1080-seq (Table 10), 1 µL のゲノム DNA を混合し, 94 °C で 3 分加熱後, 98 °C で 10 秒, 55 °C で 15 秒, 68 °C で 45 秒を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行い, 68 °C で 5 分経過後, 15 °C に冷却した.

得られた PCR 反応産物を NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up で精製し, PlcR-368-seq と PlcR-251-seq の 2 つのプライマーを用いたシーケンス解析をユーロフィンジェノミクスに依頼した.

Table 10. PlcR と PapR のシーケンス解析で使用したプライマー

Primer	5'-3' sequence
PlcR-368-seq	GGGCAAAATTGTGATCACATTCAAGG
PlcR minus-1080-seq	GGGCAAAGAAGACCGAATGTAACG
PlcR-251-seq	GGCATGATTATATCTTACCTTCAC

2-4. PlcR 発現大腸菌の作製

1 章 2-3 で得られた KPUM 8 株のゲノム DNA を用いて, PlcR 遺伝子を増幅した. PCR 反応は, 4 μ L の 2.5 mM dNTP mix, 10 μ L の 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer, 1 μ L の PrimeSTAR GXL DNA polymerase, 32 μ L の滅菌水, プライマーとして 1 μ L ずつの 100 pmol/ μ L の PlcR-BamHI-F と PlcR-XhoI-R (Table 11), 1 μ L のゲノム DNA を混合し, 94 $^{\circ}$ C で 1 分加熱後, 98 $^{\circ}$ C で 10 秒, 60 $^{\circ}$ C で 15 秒, 68 $^{\circ}$ C で 90 秒を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行い, 68 $^{\circ}$ C で 5 分経過後, 15 $^{\circ}$ C に冷却した.

Table 11. 大腸菌用の PlcR 発現プラスミド作製で使用したプライマー

Primer	5'-3' sequence
PlcR-BamHI-F	GAGAGGATCCATGCAAGCAGAGAAATTAGG
PlcR-XhoI-R	GAGACTCGAGTTATCTGCTGATTTTATTACG

* 制限酵素認識領域にアンダーラインを引いている.

得られた PCR 反応産物に, 75 μ L のフェノールと 75 μ L のクロロホルムを加えて, 攪拌後, 13000 \times g で 1 分間遠心し, 上層を回収した. 回収した溶液に, 150 μ L のクロロホルムを加え, 攪拌後, 13000 \times g で 1 分間遠心し, 上層を回収した. 次に, 375 μ L の 100% エタノールと 15 μ L の 3 M 酢酸ナトリウムを加え, 攪拌後, 20000 \times g, 4 $^{\circ}$ C の条件下で 20 分間遠心し, 上清を取り除いたペレットに 300 μ L の 70% エタノールを加え, 13000 \times g で 1 分間遠心し, 風乾させた. その後, 27 μ L の Tris-EDTA (TE) Buffer で溶解した.

次に, 先程までの工程で作製した K8 株の PlcR (insert) と pGEx-6P-1 (vector) を制限酵素処理した. 反応としては, PlcR または pGEx-6P-1 プラスミド 3 μ g, 10 \times K buffer 5 μ L, Bam HI 2.5 μ L, Xho I 2.5 μ L, 滅菌水 up to 50 μ L を混合し, 30 $^{\circ}$ C で 2 時間, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた. 制限酵素を取り除くために, 75 μ L のフェノールと 75 μ L のクロロホルムを加えて, 攪拌後, 13000 \times g で 1 分間遠心し, 上層を回収した.

回収した溶液に, 150 μ L のクロロホルムを加え, 攪拌後, 13000 \times g で 1 分間遠心し, 上層を回収した. 次に, 375 μ L の 100% エタノールと 15 μ L の 3 M 酢酸ナトリウムを加え, 攪拌後, 20000 \times g, 4 $^{\circ}$ C の条件下で 20 分間遠心し, 上清を取り除いたペレットに 300 μ L の 70% エタノールを加え, 13000 \times g で 1 分間遠心し, 風乾させた. その後, 27 μ L の TE Buffer で溶解した.

PlcR PCR 産物 (insert) と制限酵素処理した上記のプラスミド (vector) を PCR tube で混合し, 60 $^{\circ}$ C で 2 分反応させ, 氷上で冷やした後, DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) の I 液を加え, 16 $^{\circ}$ C で 1 時間ライゲーション反応を行った. このライゲーション産物と コンピテントセルである ABLE K (Agilent Technologies, California, USA) を添加し, 氷上に 30 分置いた後, 42 $^{\circ}$ C で 1 分間反応させ, 氷中で 2 分間冷やした.

その菌体に LB 液体培地を入れ, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間回復培養した後, Ampicillin (終濃度:

100 µg/mL) 入りの LB 寒天培地に撒き、一晚培養させ、正しい insert が入っているプラスミドを持つ株をセレクションした。

翌日、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Corporation, Wisconsin, USA) を用いて、作製した PlcR/pGEX-6P-1 プラスミドを抽出した。その抽出したプラスミドをタンパク質発現用のコンピテントセルである BL21 株 (Takara Bio Inc.) と混合し、氷上に 30 分置いた後、42 °C で 1 分間反応させ、氷中で 2 分間冷やした。

その形質転換した菌体に LB 液体培地を入れ、37 °C で 1 時間回復培養した後、Ampicillin (終濃度 : 100 µg/mL) 入りの LB 寒天培地に撒き、一晚培養させ、PlcR/pGEX-6P-1/BL21 株を回収し、-80 °C ストックを作製した。

2-5. PlcR の精製と PapR₇ の準備

最初に、PlcR 精製に必要な試薬や培地を作製した。① Terrific Broth (TB) medium : tryptone 12 g, yeast extract 24 g, glycerol 5 g, ② 10 × TB salts : KH₂PO₄ 23.1 g/L, K₂HPO₄ 125.4 g/L, ③ TB : TB medium 900 mL, 10 × TB salts 100 mL, ④ 5 × Lysis buffer : TritonX-100 5 mL, 2-mercapto ethanol 35 µL, 10 × PBS 50 mL, 滅菌水 45 mL, ⑤ Lysis buffer · 1mg/ml Lysozyme : 5 × Lysis buffer 4 mL, 滅菌水 14 mL, 10 mg/ml lysozyme 2.0 mL, ⑥ 10 × Cleavage buffer : 1M Tris-HCl (pH7.0) 50 mL, NaCl 8.7 g, 0.5 M EDTA 2 mL, 1M ジチオトレイトール (DTT) 1mL, 滅菌水 47 mL。

PlcR/pGEX-6P-1/BL21 株を LB 培地で 37 °C, 135 rpm の条件で一晩培養し、5 mL の培養液を 100 mL の TB が入ったバツフル付き三角フラスコに入れ、OD₆₀₀ の値が 0.50 になるまで 37 °C, 135 rpm の条件で培養した。

この培養液に、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を 終濃度が 2 mM になる量を入れ、15 °C, 135 rpm の条件で 16 時間 IPTG 誘導をかけた。誘導が終わった培養液を 6500 × g, 4 °C の条件下で 10 分間遠心し、上清を取り除いた後、20 mL の Lysis buffer · 1mg/ml Lysozyme に溶解した。超音波破碎で、菌体を破碎し、6500 × g, 4 °C の条件下で 5 分間遠心し、上清を回収した。

次に、上清に含まれるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ付き PlcR を回収するために、Lysis buffer · 1mg/ml Lysozyme で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, Massachusetts, USA) を加え、4 °C で 1 時間吸着させた。この溶液を 500 × g, 4 °C の条件下で 5 分間遠心し、上清を取り除き、PBS を加える工程を 2 回行い、3 回目の遠心後、1 × Cleavage buffer を加えた。

GST タグを切断するために、Prescission protease (GE Healthcare) を加え、4 °C で 16 時間静置した。エコノカラム (Bio-Rad Laboratories, California, USA) にビーズ溶液を入れ、0.02M Tris-HCl (PH 7.5) で PlcR を抽出し、Amicon ultra-15 centrifugal filters 30 kDa (Merck, New Jersey, USA) と Amicon ultra-0.5ml centrifugal filters 30kDa (Merck) を用いて、約 25 µL まで濃縮し、-80 °C で保存した。その後、12.5 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、クマシーブリアントブルー (CBB) で染色し、34-kDa のバンドを検出し、精製した PlcR を確認した。

また、PapR₇ のペプチド合成は、ユーロフィンジェノミクスに依頼した。

2-6. 蛍光標識による PlcR box と PlcR の結合親和性の測定

最初に、Gel shift assay (EMSA : electrophoretic mobility shift assay) に必要な試薬やゲルを作製した。① 5×Binding buffer : 1 M Tris-HCl (pH7.4) 0.5 mL, glycerol 2 mL, CaCl₂ 11 mg, DTT 3.85 mg, NaCl 146.1 mg, 滅菌水 up to 10 mL, ② 10×TBE buffer : TBE 60.55 g, ホウ酸 30 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 mL, 滅菌水 up to 1 L, ③ 非変性 5 % アクリルアミドゲル : 40 % アクリルアミド/ ビス混合液 (37.5 : 1) 2.5 mL, 80 % glycerol 625 μL, 10 % APS 200 μL, 滅菌水 up to 20 mL, TEMED 20 μL, ④ PlcR box DNA : 100 pmol/μL の EMSA-PCPLC-14579-F と EMSA-PCPLC-14579-R (Group I の PCPLC-PlcR box), EMSA-PCPLC-K25-F と EMSA-PCPLC-K25-R (Group II の PCPLC-PlcR box), EMSA-PCPLC-K40-F と EMSA-PCPLC-K40-R (Group III の PCPLC-PlcR box), EMSA-SMase-14579-F と EMSA-SMase-14579-R (Group I の SMase-PlcR box), EMSA-SMase-K25-F と EMSA-SMase-K25-R (Group II の SMase-PlcR box), EMSA-SMase-K40-F と EMSA-SMase-K40-R (Group III の SMase-PlcR box) (Table 12) をそれぞれ混合し, 55 °C, 20 分の条件でアニーリングした。

Table 12. PlcR と PapR のシーケンス解析で使したプライマー

Primer	5'-3' sequence
EMSA-PCPLC-14579-F	AAAGTTATAATGATATGAACATTTGCATATTTTAA
EMSA-PCPLC-14579-R	TTAAAATATGCAAATGTTCATATCATTATAACTTT
EMSA-PCPLC-K25-F	AAAGTTATAATGATATGAAAATCTGCATATTTTAA
EMSA-PCPLC-K25-R	TTAAAATATGCAGATTTTCATATCATTATAACTTT
EMSA-PCPLC-K40-F	AAAGTTATAATGATATGAACATTTATATATTTTAA
EMSA-PCPLC-K40-R	TTAAAATATATAAATGTTCATATCATTATAACTTT
EMSA-SMase-14579-F	TTTATCACTATACAATACATGGAGGTATGAAACG
EMSA-SMase-14579-R	CGTTTCATACCTCCATGTATTGTATAGTGATAAAA
EMSA-SMase-K25-F	CCTTTTTATTACTATACACATGGAGGTATGGAACG
EMSA-SMase-K25-R	CGTTCCATACCTCCATGTGTATAGTAATAAAAAGG
EMSA-SMase-K40-F	CCTTTTTATTACTATACAAATGGAGGTATGGAACG
EMSA-SMase-K40-R	CGTTCCATACCTCCATTTGTATAGTAATAAAAAGG

PlcR-PapR₇ 複合体と PlcR box の結合反応を行うために、本章 2-5 で準備した PlcR (30 pmol/μl) 1 μL と PapR₇ (30 pmol/μl) 1 μL, 5×Binding buffer 2 μL, 滅菌水 5 μL を混合し、10 分間静置し、2 μL の PlcR box DNA を加え、20 分間反応させた。この反応の間に、非変性 5 % アクリルアミドゲルに 200 V の定電流で 15 分間電気を流しておいた。その後、結合反応させたサンプルを 200 V, 4 °C, 40 分の条件で泳動を行った。泳動後のゲルを SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) で 20 分間染色し、紫外線照射下で WSE-6200H LuminoGraph II を用いて撮影した。

2-7. 放射性標識による PlcR box と PlcR の結合親和性の測定

最初に、Gel shift assay に必要な試薬やゲルを作製した。① 5×Binding buffer : 1 M Tris-HCl (pH7.4) 0.5 mL, glycerol 2 mL, CaCl₂ 11 mg, DTT 3.85 mg, NaCl 146.1 mg, 滅菌水 up to 10 mL, ② 10×TBE buffer : TBE 60.55 g, ホウ酸 30 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 mL, 滅菌水 up to 1 L, ③ 非変性 5 % アクリルアミドゲル : 40 % アクリルアミド/ ビス混合液 (37.5 : 1) 2.5 mL, 80 % glycerol 625 μL, 10 % APS 200 μL, 滅菌水 up to 20 mL, TEMED 20 μL。また、結合反応に使用する PlcR box DNA の準備をするために、100 pmol/μL の EMSA-SMase-14579-F と EMSA-SMase-14579-R (Group I), EMSA-SMase-K25-F と EMSA-SMase-K25-R (Group II), EMSA-SMase-K40-F と EMSA-SMase-K40-R (Group III) (Table 11) をそれぞれ混合し、55 °C, 20 分の条件でアニーリングした。

PlcR box DNA を標識するために、PlcR box DNA (3.5 pmol) 1 μL, T4 Polynucleotide Kinase 10×buffer (Takara Bio Inc.) 1 μL, [γ -³²P] ATP (3000 Ci / mmol at 10 mCi / ml) 1 μL, T4 Polynucleotide Kinase (10 U / μL) を混合し、37 °C で 90 分間反応させた。その後、0.5 M EDTA を 1 μL 加え、反応を止め、39 μL の TE buffer を加えた。次に、G-25 スピнкаラム (Merck) を使用して、取り込まれなかった標識を取り除いた。

PlcR-PapR₇ 複合体と PlcR box の結合反応を行うために、本章 2-5 で準備した PlcR (30 pmol / μL) 1 μL と PapR₇ (30 pmol / μL) 1 μL, 5×Binding buffer 2 μL, 滅菌水 5 μL を混合し、10 分間静置し、2 μL の PlcR box DNA を加え、20 分間反応させた。この反応の間に、非変性 5 % アクリルアミドゲルに 200 V の定電流で 15 分間電気を流しておいた。その後、結合反応させたサンプルを 200 V, 4 °C, 40 分の条件で泳動を行った。

泳動後のゲルをゲルドライヤーで 60 分間乾かした。その後、イメージングプレートに一晩露光させた。最後に、Amersham Typhoon scanner (GE Healthcare) を用いて、バンドを検出した。

3. 結果

最初に, SMase の産生量の違いが, 転写か翻訳のどちらの違いによるものかを調べるため, 定常期における菌体中の SMase-mRNA 発現量の時間変化を調べた. その結果, ATCC14579 と KPUM46 (Group I) の SMase-mRNA 発現量は, 4 時間目で最大となり, その後, 12 時間目には有意に減少した. KPUM25 (Group II) では, 4 時間目から 8 時間目まで有意に増加し, 12 時間目では 4 時間目と同量程度まで減少した. また, Group III では, Group I や Group II と比較して, 有意に mRNA 発現量は少なかった (Figure 21). これらの結果より, SMase-mRNA 発現量の時間変化は, 2 章で示した SMase 産生量の時間変化と相関していることが示唆された.

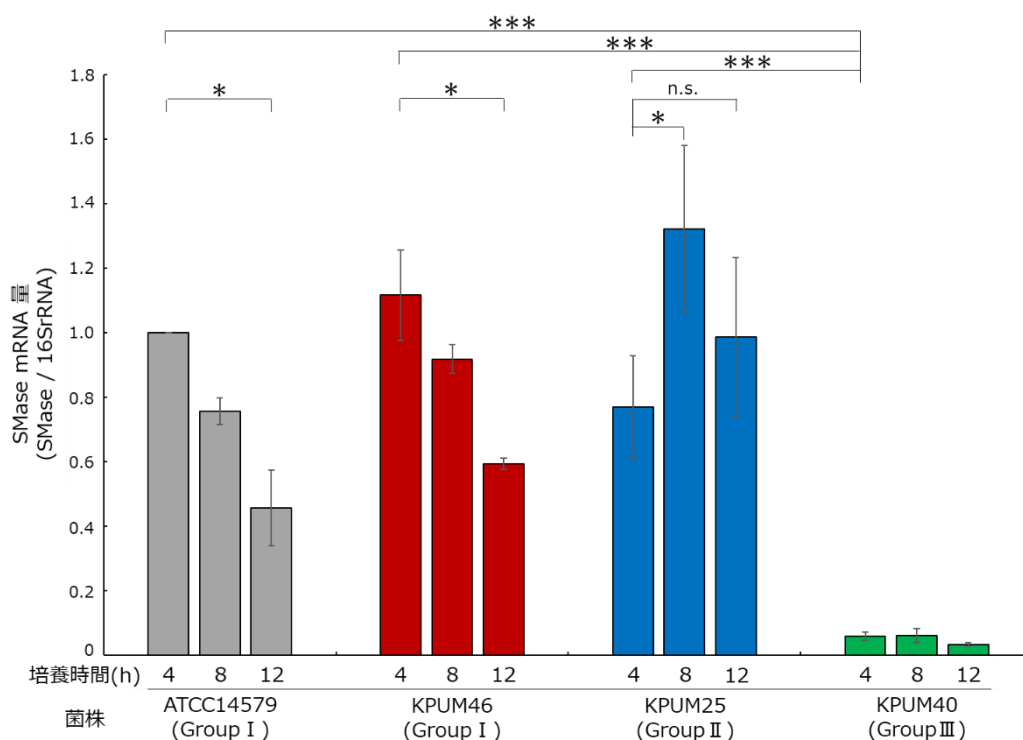


Figure 21. 定常期におけるセレウス菌の SMase-mRNA 発現量

半定量的 RT-PCR により SMase-mRNA 発現量を測定した. バンド強度は, ImageJ を用いて定量した. エラーバーは標準偏差を示している ($n=3$). * $P<0.05$, *** $P<0.005$, n.s. : non-significant.

次に, 今回使用したセレウス菌の内, 33 株 (Group I : 17 株, Group II : 13 株, Group III : 3 株) の PlcR と PapR 配列を同定した. その結果, KPUM 8 (Group I) と全く同じ配列の PlcR と PapR を持つ菌株として, KPUM39, KPUM58, KPUM65 (Group I) や KPUM1, KPUM9, KPUM20, KPUM21, KPUM34, KPUM36 (Group II) や KPUM40 (Group III) が存在した (Figure S2). このように, KPUM8 株の PlcR と PapR の配列を持つ菌株が全 PlcR box group に存在するため, 本章での結合親和性実験には KPUM8 の転写因子を用いることとした.

各 PlcR box group の PCPLC-PlcR box を用いて Gel shift assay を行ったところ, Group I や

Group II では, Group III よりも濃いシフトバンドが検出された (Figure 22). 一方で, SMase-PlcR box を用いて Gel shift assay を行ったところ, シフトバンドは検出できなかった (Figure 22).

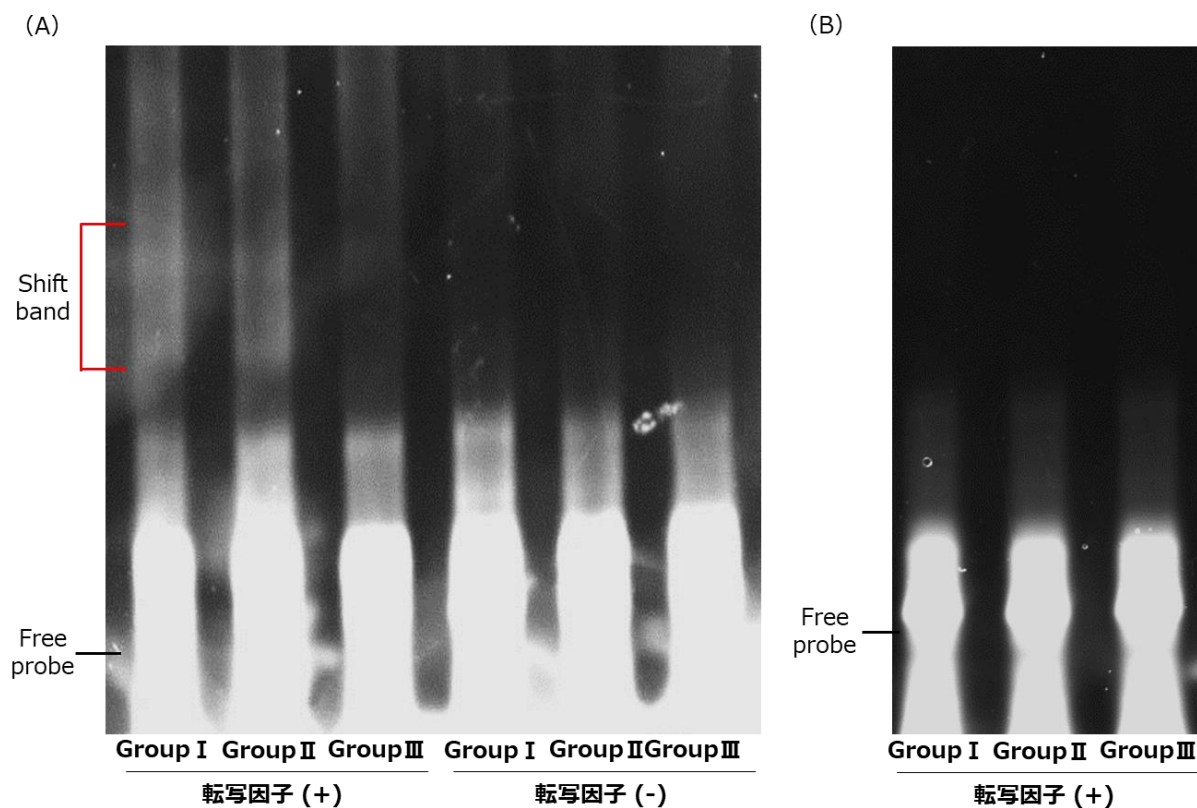


Figure 22. PlcR-PapR₇ 複合体と各 PlcR box との結合親和性

(A) 転写因子である PlcR-PapR₇ 複合体と各 PCPLC-PlcR box との結合親和性を gel shift assay 法で測定した. (B) PlcR-PapR₇ 複合体と各 SMase-PlcR box との結合親和性を gel shift assay 法で測定した.

そこで、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識した PlcR box を用いた Gel shift assay で、SMase-PlcR box と PlcR-PapR₇ 複合体との結合親和性を測定したところ、Group I の持つ配列は、Group II や Group III の持つ配列よりも濃いシフトバンドが検出された (Figure 23)。

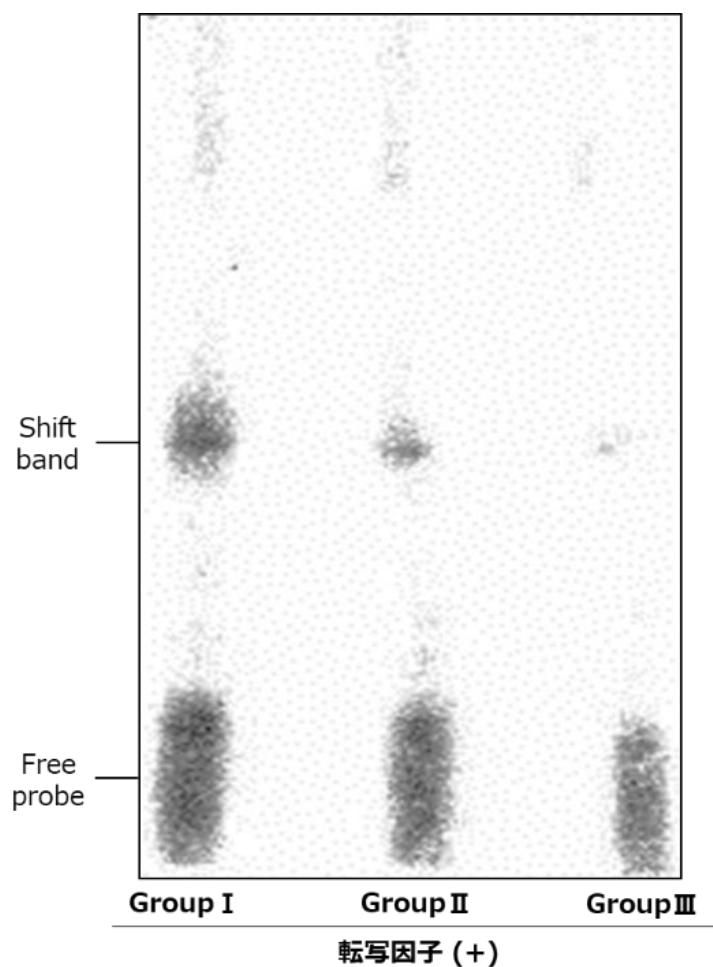


Figure 23. 放射性標識を用いた PlcR-PapR₇ 複合体と各 PlcR box との結合親和性
転写因子である PlcR-PapR₇ 複合体と各 SMase-PlcR box との結合親和性を gel shift assay 法で測定した。

以上の結果より、① SMase-mRNA 発現量の時間変化は、SMase 産生量の時間変化と相関していること、② Group I と Group II に属するセレウス菌の持つ PCPLC-PlcR box は、Group III に属するセレウス菌の持つ PCPLC-PlcR box より、転写因子との結合親和性が高い傾向にあること、③ Group I に属するセレウス菌の持つ SMase-PlcR box は、Group II と Group III に属するセレウス菌の持つ PCPLC-PlcR box より、転写因子との結合親和性が高い傾向にあることが明らかとなった。

4. 考察

SMase-mRNA 発現量の時間変化を調べた結果、全ての PlcR box group の代表株で、SMase 産生量と SMase-mRNA 発現量は相関していた (Figure 24). したがって、PlcR box 配列の違いは、SMase の翻訳ではなく、SMase の転写に影響を与えていることが示唆された。

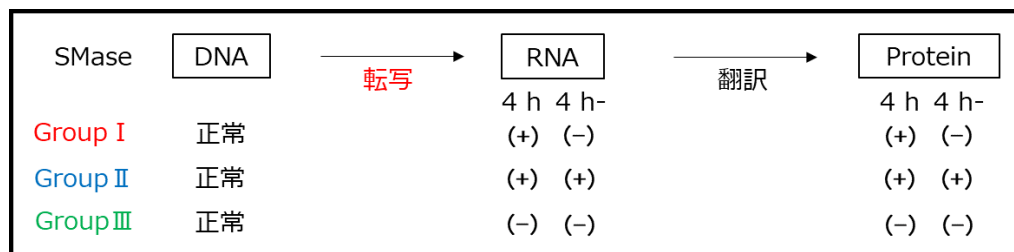


Figure 24. 各 PlcR box group における SMase の発現過程

過去の報告によると、C 末端側 5 アミノ酸である PapR₅ の配列によって、4 つの PapR グループに分類されると報告されている。PapR グループにおいて、PapR の C 末端側 5 アミノ酸 (PapR₅) が LPFE (F or Y) であるグループ 1, PapR₅ が MPFEF であるグループ 2, PapR₅ が VP (F or Y) E (F or Y) であるグループ 3, PapR₅ が LPFEH であるグループ 4 に分類される [29, 44]. 今回、KPUM12 (Group I), KPUM15, KPUM23, KPUM25 (Group II) 以外のセレウス菌株は、全てグループ 1 に分類される PapR の配列を持っていた (Table S2). また、KPUM 8 と同じ PlcR と PapR を持つ菌株が、本論文で提案した PlcR box group の全てに存在したことから (Figure S2) も、SMase の転写と産生に影響を与える要因は、PlcR box であり、PlcR と PapR は関与していないと考えられた。

PlcR-PapR₇ 複合体と各 PlcR box group の PlcR box との結合親和性を測定した結果より、Group I と Group II の PCPLC-PlcR box は、Group III の PCPLC-PlcR box よりも転写因子との結合親和性が高い傾向にあると考えられた。また、19 bp である Group I の PCPLC-PlcR box は、16 bp である Group II や Group III の PCPLC-PlcR box よりも転写因子との結合親和性が高い可能性が示唆された。

今後、非特異的競合阻害物質を添加したサンプルでの実験や、転写因子に対する抗体を添加したサンプルでのスーパーシフトアッセイなどを行い、今回の実験においても PlcR box に転写因子が特異的に結合しているかを確認する予定である。

これまで PlcR box は 16 bp で構成された転写因子結合部位であると報告されていたが [28,32], 今回の研究では 19 bp である Group I の SMase-PlcR box にも PlcR-PapR₇ 複合体が結合する可能性を示した。19 bp の PlcR box とどのように結合するかは、現在のところ不明であり、今後の研究課題である。

PlcR-PapR₇ 複合体と各 PlcR box group の PlcR box との結合親和性を測定した結果より、Group I では PCPLC-PlcR box (SMase を正に制御) と SMase-PlcR box (SMase を負に制御) が共に働き、Group II では PCPLC-PlcR box が Group I 同様に働くが、後者の働きが弱い。Group III では両者の働きが弱い事が示唆された。Group I と Group II に属する菌株では、定

常期開始点である 4 時間目までは、PCPLC-PlcR box によって SMase が正に制御されるため、SMase は産生され、Group III に属する菌株では、正に制御されないため、SMase は産生されないと考えられる。また、定常期においては、Group I に属する菌株では、SMase-PlcR box によって SMase が負に制御されるため、SMase 産生量が減少していき、Group I-II , Group I-III, Group II に属する菌株では、負に制御されないため、SMase 産生量の減少は起こらなかったと考えられる (Table 13)。そのため、今回の結合親和性を測定した結果は、これまでの SMase 産生量の挙動と矛盾しない結果であった。

上述のように、PCPLC-PlcR box が先に働き、遅れて SMase-PlcR box が働いているように SMase の産生量が時間変化をしている。今後、PCPLC-PlcR box と SMase-PlcR box 間で結合親和性を測定することで、より詳細なセレウス菌における SMase の転写制御機構が解明できると考えている。

Table 13. PlcR と PapR のシーケンス解析で使ったプライマー

PlcR box group	PlcR box in promoter of PCPLC	転写因子との親和性	PlcR box in promoter of SMase	転写因子との親和性	SMase 産生 (定常期開始点)	SMase 産生 (定常期)
Group I	TATGAACATTTGCATA	(+)	ATACAATACATGGAGGTAT	(+)	(+)	(-)
Group II	TATGAAAATCTGCATA	(+)	ATACAC --- ATGGAGGTAT	(-)	(+)	(+)
Group III	TATGAACATTACATA	(-)	ATACAA --- ATGGAGGTAT	(-)	(-)	(-)

Yokotani A. *et al. Microbiol Immunol.* “in press”. を改変.

PlcR は、非常に似た構造を持つ転写因子で構成された RRNPP family (Rap, Rgg, NprR, PlcR, PrgX) に属している [45]. 本研究では、PlcR を持つセレウス菌において、転写因子結合部位の配列が、転写因子の結合親和性に影響を与えている可能性を示唆した。一方で、セレウス菌だけではなく、Rgg を持つ *Streptococcus pyogenes* (化膿レンサ球菌) や PrgX を持つ *Enterococcus faecalis* でも同様、転写因子結合部位の配列が病原性に与えている可能性があると考えられる [45].

総括

Table 14. 本研究で解明したセレウス菌の PlcR box group 分類とその特徴

PlcR box group	PlcR box in promoter of PCPLC	転写因子との親和性	PlcR box in promoter of SMase	転写因子との親和性	SMase mRNA 量 (定常期開始点)	SMase mRNA量 (定常期)	SMase 産生 (定常期開始点)	SMase 産生 (定常期)	病原性
Group I	TATGAACATTTGCATA	(+)	ATACAATACATGGAGGTAT	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Group II	TATGAAATCTGCATA	(+)	ATACAC --- ATGGAGGTAT	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Group III	TATGAACATTTACATA	(-)	ATACAA --- ATGGAGGTAT	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

第1章では、*pcplc-smase* オペロン内の PlcR box の内、上流側に存在する PCPLC-PlcR box (SMase を正に制御) の塩基配列が、TATGAACATTTGCATA である Group I と、Group I を基準として2塩基が変化している TATGAAAATCTGCATA である Group II と、1塩基が変化している TATGAACATTTACATA である Group III といった3つの PlcR box group に分類することができた。また、Group I と Group II は、SMase 産生菌株群であり、Group III は、SMase 非産生菌株群であった (Table 14)。そのため、PCPLC-PlcR box の塩基配列から、SMase 産生量を推測できることが示唆された。

第2章では、*pcplc-smase* オペロン内の PlcR box の内、下流側に存在する SMase-PlcR box の塩基配列 (SMase を負に制御) が、4株を除いて、ATACAATACATGGAGGTAT の配列を持っていた。Group II に属する菌株では、Group I と比較して、6番目の塩基が C になり、TAC が欠損している ATACAC---ATGGAGGTAT の配列を持っており、Group III に属する菌株では、Group I と比較して、TAC が欠損している ATACAA---ATGGAGGTAT の配列を持っていた。また、Group I は、SMase の産生量と活性が、定常期開始点に最大となり、定常期中に減少する菌株群であり、Group II は、定常期中に SMase の産生・活性が維持される菌株群であった (Table 14)。さらに、Group I に属する菌株の中でも、SMase-PlcR box 配列が Group II と同じである Group I-II と、Group III と同じである Group I-III に属する菌株では、Group I と異なり、定常期中に SMase の産生・活性が維持される菌株群であったことから、Group I の SMase-PlcR box は、Group II や Group III の PlcR box よりも強く SMase 産生の抑制をすることが示唆された。

第3章では、各 PlcR box group 間におけるマウスに対する致死活性と、マクロファージに対する貪食抑制能を確認したところ、SMase 産生菌株群である Group I と Group II は、SMase 非産生菌株群である Group III より病原性が高いことが示唆された (Table 14)。また、本研究で用いたセレウス菌の臨床分離株では、SMase 陽性株の割合は 89.4% (34/38) であった一方で、環境由来のセレウス菌では、SMase 陽性株が無かった。このことから、SMase は、人への感染に必要な毒素であり、病態発症において重要であることが示唆された。PCPLC-PlcR box 配列から、SMase 産生量を推測することは、セレウス菌の病原性の迅速診断に有用である可能性が示唆された。

第4章では、全ての PlcR box group において、SMase-mRNA 発現量は、SMase 産生量と相関していたため、PlcR box 配列の違いは、SMase の翻訳では無く、SMase の転写に影響を与えている事が示唆された。また、Group I と Group II の PCPLC-PlcR box は、Group III の

PCPLC-PlcR box よりも転写因子との結合親和性が高い傾向にあることが示唆され、19 bp である Group I の PCPLC-PlcR box は、16 bp である Group II や Group III の PCPLC-PlcR box よりも転写因子との結合親和性が高い傾向が示唆された (Table 14). この結果より、PlcR box 配列によって、転写因子との結合親和性が変化し、SMase の転写に影響を与えることが、各 PlcR box group における SMase の産生量が異なる要因であることが示唆された。

本論文では、セレウス菌株間で SMase 産生量が異なるメカニズムを解明するために、SMase 産生と PlcR 転写制御系の関係を検討した。その結果、セレウス菌の臨床分離株を用いた本研究により、PlcR box の配列の違いが SMase の産生に影響を与え、その結果、病原性が変化することを明らかとした (Table 14)。本研究は、PlcR box と SMase 産生の関係を考慮したセレウス菌株の分類を報告した最初の研究である。PlcR box の塩基配列に基づく分類は、セレウス菌の高病原性株の検出だけではなく、病原性の弱いセレウス菌を検出することが、患者への不要な抗菌薬の投与を防ぐことによる抗菌薬の適正使用に貢献するものと考えられる。

結語

- (1) PCPLC-PlcR box と SMase-PlcR box の配列から、セレウス菌を 3 つのグループに分類することができる。非常に数は少ないが、このグループから外れる菌株も存在する。
- (2) PlcR box 配列が、SMase 産生量制御に関与している。
- (3) SMase 産生菌株は病原性を示すが、SMase 非産生菌株は病原性を示さない。
- (4) 転写因子 PlcR-PapR7 の PlcR box との結合親和性は、その配列に依存おり、結合親和性の高い PCPLC-PlcR box 配列を保有する菌株は SMase 産生量が高い傾向がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、丁寧かつ的確な助言をくださいました京都薬科大学 微生物・感染制御学分野 八尋錦之助教授に心から深く感謝いたします。

本研究の内容に関して的確な助言及び、実験に関して多大なる御協力を下さいました京都薬科大学 微生物・感染制御学分野 鴨志田剛助教に心から深く御礼申し上げます。

本実験を遂行する際に、的確な助言をくださいました京都薬科大学 微生物・感染制御学分野 林直樹元助教に深く感謝の意を表します。

本実験に用いたセレウス菌臨床分離株を提供下さいました京都府立医科大学附属病院 薬剤部 小阪直史先生を始めとする京都府立医科大学附属病院の皆様に厚く御礼申し上げます。

本論文を審査して下さいました京都薬科大学 細胞生物学分野 藤室 雅弘教授、臨床薬剤疫学分野 村木 優一教授に御礼申し上げます。

共に実験を遂行して下さいました微生物・感染制御学分野 高橋歩実氏、青山諒子氏、岡田知子氏に深く感謝いたします。また、4年間の研究生生活において苦しい時でも、支えて下さり、楽しく、面白く日々を過ごせる環境を生み出して下さった当分野の全ての後輩たちに厚く御礼申し上げます。

最後に、本大学院への進学を理解してくれ、支援をしてくれた両親に心から深く感謝いたします。

.

参考文献

1. Drobniewski FA. *Bacillus cereus* and related species. Clin Microbiol Rev. 1993; 6: 324-38.
2. Sasahara T, Hayashi S, Morisawa Y, Sakihama T, Yoshimura A, Hirai Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30: 219-26.
3. Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, Takano T, Isobe H, Baranovich T, et al. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. J Hosp Infect. 2008; 69: 361-7.
4. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 382-98.
5. Schaefer G, Campbell W, Jenks J, Beesley C, Katsivas T, Hoffmaster A, et al. Persistent *Bacillus cereus* Bacteremia in 3 Persons Who Inject Drugs, San Diego, California, USA. Emerg Infect Dis. 2016; 22: 1621-3.
6. Callegan MC, Kane ST, Cochran DC, Gilmore MS, Gominet M, Lereclus D. Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence. Infect Immun. 2003; 71: 3116-24.
7. Lee YL, Shih SD, Weng YJ, Chen C, Liu CE. Fatal spontaneous bacterial peritonitis and necrotizing fasciitis with bacteraemia caused by *Bacillus cereus* in a patient with cirrhosis. J Med Microbiol. 2010; 59: 242-4.
8. Rosenbaum A, Papaliadis D, Alley M, Lisella J, Flaherty M. *Bacillus cereus* fasciitis: a unique pathogen and clinically challenging sequela of inoculation. Am J Orthop (Belle Mead NJ). 2013; 42: 37-9.
9. Guillemet E, Cadot C, Tran SL, Guinebretiere MH, Lereclus D, Ramarao N. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. J Bacteriol. 2010; 192: 286-94.
10. Guinebretiere MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3053-6.
11. Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, Clybourn C, Puhar A, Moris A, et al. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. Cell Microbiol. 2011; 13: 92-108.
12. Oda M, Hashimoto M, Takahashi M, Ohmae Y, Seike S, Kato R, et al. Role of sphingomyelinase in infectious diseases caused by *Bacillus cereus*. PLoS One. 2012; 7: e38054.
13. Yamada A, Tsukagoshi N, Udaka S, Sasaki T, Makino S, Nakamura S, et al. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. Eur J Biochem. 1988; 175: 213-20.
14. Gonzalez-Zorn B, Dominguez-Bernal G, Suarez M, Ripio MT, Vega Y, Novella S, et al. The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. Mol Microbiol. 1999; 33: 510-23.
15. Chan EC, Chang CC, Li YS, Chang CA, Chiou CC, Wu TZ. Purification and characterization of neutral sphingomyelinase from *Helicobacter pylori*. Biochemistry. 2000; 39: 4838-45.
16. Tseng HJ, Chan CC, Chan EC. Sphingomyelinase of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity in AGS gastric epithelial cells via activation of JNK kinase. Biochem Biophys Res Commun. 2004;

- 314: 513-8.
17. Heffernan BJ, Thomason B, Herring-Palmer A, Shaughnessy L, McDonald R, Fisher N, et al. *Bacillus anthracis* phospholipase C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. *Infect Immun*. 2006; 74: 3756-64.
 18. Collins J, Buckling A, Massey RC. Identification of factors contributing to T-cell toxicity of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2112-4.
 19. Tajima A, Iwase T, Shinji H, Seki K, Mizunoe Y. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun*. 2009; 77: 327-34. 35.
 20. Montes LR, Ibarguren M, Goni FM, Stonehouse M, Vasil ML, Alonso A. Leakage-free membrane fusion induced by the hydrolytic activity of PlcHR(2), a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768: 2365-72.
 21. Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*. 2002; 277: 25847-50.
 22. Katayama, Y.; Baba, T.; Sekine, M.; Fukuda, M.; Hiramatsu, K. Beta-Hemolysin Promotes Skin Colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2013, 195, 1194-203.
 23. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, Sinha B, et al. Expression of delta-toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of beta-toxin. *Cell Microbiol*. 2011; 13: 316-29.
 24. Oda M, Imagawa H, Kato R, Yabiku K, Yoshikawa T, Takemoto T, et al. Novel inhibitor of bacterial sphingomyelinase, SMY-540, developed based on three-dimensional structure analysis. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014; 29: 303-10.
 25. Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, Gominet M, et al. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One*. 2008; 3: e2793.
 26. Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Salamitou S, Sanchis V. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol*. 1996; 178: 2749-56.
 27. Salamitou S, Ramisse F, Brehelin M, Bourguet D, Gilois N, Gominet M, et al. The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology (Reading)*. 2000; 146: 2825-32.
 28. Slamti L, Lereclus D. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J*. 2002; 21: 4550-9.
 29. Bouillaut L, Perchat S, Arold S, Zorrilla S, Slamti L, Henry C, et al. Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: 3791-801.
 30. Gominet M, Slamti L, Gilois N, Rose M, Lereclus D. Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Mol Microbiol*. 2001; 40: 963-75.

31. Pomerantsev AP, Pomerantseva OM, Camp AS, Mukkamala R, Goldman S, Leppla SH. PapR peptide maturation: role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 55: 361-77.
32. Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol.* 1999; 32: 1043-53.
33. Grenha R, Slamti L, Nicaise M, Refes Y, Lereclus D, Nessler S. Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 1047-52.
34. Yehuda, A.; Slamti, L.; Bochnik-Tamir, R.; Malach, E.; Lereclus, D.; Hayouka, Z. Turning off *Bacillus cereus* quorum sensing system with peptidic analogs. *Chem Commun (Camb).* 2018; 54: 9777-9780.
35. Pomerantsev AP, Kalnin KV, Osorio M, Leppla SH. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect Immun.* 2003; 71: 6591-606.
36. Tamura H, Tameishi K, Yamada A, Tomita M, Matsuo Y, Nishikawa K, et al. Mutation in aspartic acid residues modifies catalytic and haemolytic activities of *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochem J.* 1995; 309: 757-64.
37. Matsuo Y, Yamada A, Tsukamoto K, Tamura H, Ikezawa H, Nakamura H, et al. A distant evolutionary relationship between bacterial sphingomyelinase and mammalian DNase I. *Protein Sci.* 1996; 5: 2459-67.
38. Ivanna S Rolny, Silvia M Racedo, Pablo F Pérez. Fate of *Bacillus cereus* within phagocytic cells. *Int Microbiol.* 2017; 20: 170-177.
39. Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, Valenstein PN. Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129: 1222-5.
40. Gander RM, Byrd L, DeCrescenzo M, Hirany S, Bowen M, Baughman J. Impact of blood cultures drawn by phlebotomy on contamination rates and health care costs in a hospital emergency department. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1021-4.
41. Akamatsu, R.; Suzuki, M.; Okinaka, K.; Sasahara, T.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Fujikura, D.; Furuta, Y.; Ohnishi, N.; Esaki, M.; Shibayama, K.; Higashi, H. Novel Sequence Type in *Bacillus cereus* Strains Associated with Nosocomial Infections and Bacteremia, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25: 883-890.
42. Anukriti Mathur, Shouya Feng, Jenni A Hayward, Chinh Ngo, Daniel Fox, Ines I Atmosukarto, Jason D Price, Kristina Schauer, Erwin Märklbauer, Avril A B Robertson, Gaetan Burgio, Edward M Fox, Stephen H Leppla, Nadeem O Kaakoush, Si Ming Man. A multicomponent toxin from *Bacillus cereus* incites inflammation and shapes host outcome via the NLRP3 inflammasome. *Nat Microbiol.* 2019; 4: 362-374.

44. Leyla Slamti, Didier Lereclus. Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol.* 2005; 187: 1182-7.
45. Matthew B Neiditch, Glenn C Capodagli, Gerd Prehna, Michael J Federle. Genetic and Structural Analyses of RRNPP Intercellular Peptide Signaling of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Genet* . 2017; 51: 311-333.

Supplementary Files

Table S1. セレウス菌 40 株の PlcR box 配列リスト

PlcR box group	Strain	PlcR box in promoter of PCPLC	PlcR box in promoter of SMase
Group I	ATCC14579	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM2	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM8	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM12	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGGGGTAT
	KPUM17	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM18	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM22	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM27	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM30	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM35	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM39	TATGAACATTTCGCATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT
	KPUM46	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM47	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM48	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM49	TATGAACATTTCGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM58	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM62	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM63	TATGAACATTTCGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM64	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT
	KPUM65	TATGAACATTTCGCATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT
	KPUM67	TATGAACATTTCGCATA	ATACAATACATGGAGGTAT

PlcR box group	Strain	PlcR box in promoter of PCPLC	PlcR box in promoter of SMase
GroupII	KPUM1	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM7	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT
	KPUM9	TATGAAAATCTGCATA	CTACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM13	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM15	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM16	TATGAAAATCTGCATA	CTACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM20	TATGAAAATCTGCATA	CTACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM21	TATGAAAATCTGCATA	CTACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM23	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM25	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT
	KPUM26	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT
	KPUM34	TATGAAAATCTGCATA	CTACAC --- ATGGAGGTAT
	KPUM36	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT
	KPUM53	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT
	KPUM54	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT
	KPUM55	TATGAAAATCTGCATA	ATACAC --- ATGGAGGGAT

PlcR box group	Strain	PlcR box in promoter of PCPLC	PlcR box in promoter of SMase
GroupIII	ATCC27522	TATGAACATTTACATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT
	KPUM40	TATGAACATTTATATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT
	KPUM45	TATGAACATTTACATA	ATACAA --- ATGGAGGTAT

Figure S1. SMase の塩基配列・アミノ酸配列

(A) SMase 塩基配列

PlcR box group			
ATCC14579	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM8	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM12	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM27	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM30	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM39	I 1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM46	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM47	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM62	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM63	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM67	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTAGGGTTGTTGGTTTAGG	50
KPUM1	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM9	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM15	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM20	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM21	II 1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM23	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM25	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM34	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM55	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
ATCC27522	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM40	III 1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
KPUM45	1	GTGAAAGGTAAATTGCTAAAAGGTGTACTTAGCTTTTGGGATTGGTTTAGG	50
*****.*****.*****.***.*****.***.***.***.***.***.			
ATCC14579	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM8	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM12	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM27	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM30	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM39	I 51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM46	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM47	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM62	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM63	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM67	51	AGCTTTTATATAGCGGAAGGTCAGCTCAAGCAGAAGTGTCTACAAATCAAA	100
KPUM1	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM9	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM15	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM20	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM21	II 51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM23	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM25	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM34	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM55	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
ATCC27522	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM40	III 51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
KPUM45	51	AGTTTTTATACGGAGGATCTTCAGCTCAAGCAGATACGTCTACAGATCAAA	100
*.*****.***.***.***.*****.*****.***.***.***.***.			

		SMase193-RT-PCR-F		
				→
ATCC14579	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM8	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM12	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM27	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM30	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM39	I 201	AGATTATATAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM46	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM47	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM62	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM63	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM67	201	AGATTATATAAAGAATCAAGATGTTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM1	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM9	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM15	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM20	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM21	II 201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM23	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACATTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM25	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM34	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM55	201	AGATTATATTAAAGAATCAAGACGTTGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
ATCC27522	201	AGATTATATTAAAGAATCAGSATGTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM40	III 201	AGATTATATTAAAGAATCAGSATGTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
KPUM45	201	AGATTATATTAAAGAATCAGSATGTAGTTATATTAAATGAAGTGTTTGATA	250	
		*****.***.*****.***.***.*****.*****.*****		
ATCC14579	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM8	251	ATAGCGCATCAGATCGTTTATTAGGTAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM12	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM27	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGCAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM30	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGCAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM39	I 251	ATAGCGCATCAGATCGTTTATTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM46	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGCAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM47	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGCAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM62	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM63	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATACCCAAT	300	
KPUM67	251	ATAGCGCTTCAGATCGTTTATTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM1	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM9	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM15	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM20	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM21	II 251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM23	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM25	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM34	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
KPUM55	251	ATAGTGCCTTCAGATCGCTTTTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCCAAT	300	
ATCC27522	251	ATAGCGCATCAGATCGTTTGTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM40	III 251	ATAGCGCATCAGATCGTTTGTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
KPUM45	251	ATAGCGCATCAGATCGTTTGTAGGGAATTTGAAGAAAGAATATCCAAAT	300	
		*****.***.*****.***.*****.*****.*****.*****		

SMase353-RT-PCR-R

ATCC14579	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	GTGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM8	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM12	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	GTGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM27	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM30	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM39	I 301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM46	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM47	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM62	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	GTGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM63	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM67	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	GTGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM1	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM9	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM15	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM20	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM21	II 301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM23	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM25	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM34	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM55	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
ATCC27522	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM40	III 301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350
KPUM45	301	CAAAACAGCAGTATTAGGTCGTAGTAGTGGAA	CGAATGGGATAAAACGTT	350

***** . ***** . * . ***** . *****

SMase353-RT-PCR-R

ATCC14579	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM8	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM12	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM27	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM30	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM39	I 351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGG	GGGCGTTGCAATCGTGA	400
KPUM46	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM47	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM62	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM63	351	AGGTAGTTATTTCATCTTCAAC	GCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTGA	400
KPUM67	351	AGGAAATATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGTGGCGTTGC	GATTGTGA	400
KPUM1	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTTA		400
KPUM9	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGGGGCGTTGCAATCGTGA		400
KPUM15	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTTA		400
KPUM20	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGGGGCGTTGCAATCGTGA		400
KPUM21	II 351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGGGGCGTTGCAATCGTGA		400
KPUM23	351	AGGTAGTTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGGGGCGTTGCAATTGTGA		400
KPUM25	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTTA		400
KPUM34	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGGGGCGTTGCAATCGTGA		400
KPUM55	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAACTCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTGA		400
ATCC27522	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAAC	GCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTGA	400
KPUM40	III 351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAAC	GCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTGA	400
KPUM45	351	AGGTAGCTATTTCATCTTCAAC	GCCTGAAGATGGAGGCGTTGCAATCGTGA	400

*** . * . ***** . ***** . ***** . ***** . * . * . *

ATCC14579	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGT	GATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550
KPUM8	501	AAATGATCGTTTCATTCA	CGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM12	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGTACACATTTGCAAGCGGAAGATA	550	
KPUM27	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM30	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM39	I 501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM46	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM47	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM62	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM63	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM67	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	CGTGATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM1	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM9	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM15	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM20	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM21	II 501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM23	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM25	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM34	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM55	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTAATTGGGACGCATTTGCAGGCTGAAGATA	550	
ATCC27522	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTGATTGGGACACACTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM40	III 501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTGATTGGGACACACTTGCAGGCTGAAGATA	550	
KPUM45	501	AAATGATCGTTTCGTTCA	TGTGATTGGGACACACTTGCAGGCTGAAGATA	550	
*****.***.***.***.*****.***.***.*****.***.*****					
ATCC14579	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM8	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM12	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM27	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM30	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM39	I 551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAATCAGCTAAAA	600	
KPUM46	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM47	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM62	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM63	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM67	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCA	AGCATCTGTACGTACGAACCAATTAAAA	600	
KPUM1	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM9	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM15	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM20	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM21	II 551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM23	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM25	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM34	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
KPUM55	551	GTATGTGCGGAAAAACTTCACCT	GCATCTGTACGTACAAACCAGTTAAAA	600	
ATCC27522	551	GTATGTGTGAAAAA	ACTTCACCTGCATCTGTACGTACAAACCAGCTAAAA	600	
KPUM40	III 551	GTATGTGTGAAAAA	ACTTCACCTGCATCTGTACGTACAAACCAGCTAAAA	600	
KPUM45	551	GTATGTGTGAAAAA	ACTTCACCTGCATCTGTACGTACAAACCAGCTAAAA	600	
*****.*****.*****.***.***.*****					

ATCC14579	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM8	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM12	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM27	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM30	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM39	I 701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTTAAAAACATTGCATGCGTCAGTTCCA	750
KPUM46	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM47	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM62	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM63	701	GTGACTCAGAAATACGCATCAATGTTCAAAAACATTGCACGCTTCTATTCCA	750
KPUM67	701	ATGATTCAGAGTATGCATCTATGTTTAAAAACATTGAACGCTTCTGTACCA	750
KPUM1	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM9	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM15	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM20	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM21	II 701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM23	701	GTGACTCAGAAATACGCATCAATGTTCAAAAACATTGCACGCTTCTATTCCA	750
KPUM25	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM34	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
KPUM55	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTCAAAAACATTACATGCTTCTATTCCA	750
ATCC27522	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTTAAAAACATTGCATGCGTCAATTCCA	750
KPUM40	III 701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTTAAAAACATTGCATGCGTCAATTCCA	750
KPUM45	701	GTGACTCAGAGTACGCATCCATGTTTAAAAACATTGCATGCGTCAATTCCA	750

.***.*****.***.*****.*****.*****.*****.***.***.***.***.***

ATCC14579	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM8	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM12	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM27	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM30	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM39	I 751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM46	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM47	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM62	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM63	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGATGACAAACAGTATTGC	800
KPUM67	751	TCTTATACTGGACATACAGCGACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM1	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM9	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM15	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM20	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM21	II 751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM23	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM25	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM34	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM55	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCGACGACAAACAGTATTGC	800
ATCC27522	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM40	III 751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800
KPUM45	751	TCTTATACTGGGACATACAGCAACTTGGGATGCAACGACAAACAGTATTGC	800

***** *****.*****.***.***.*****.*****.*****

ATCC14579	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCATGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM8	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCATGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM12	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCGTGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM27	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCGTGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM30	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCGTGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM39	I 901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACGTA	950
KPUM46	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCGTGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM47	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCGTGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM62	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCATGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM63	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACGTA	950
KPUM67	901	CCGAAATCTCCACAATGGACTGTTACATCATGGTTCCAAAAATATACGTA	950
KPUM1	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM9	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM15	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM20	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM21	II 901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM23	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM25	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM34	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
KPUM55	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACATA	950
ATCC27522	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACGTA	950
KPUM40	III 901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACGTA	950
KPUM45	901	CCGAAATCTCCACAGTGGACTGTTACATCATGGCTCAAAAAATATACGTA	950

** .*****.*****.***.***.*****.**

ATCC14579	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM8	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM12	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM27	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM30	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM39	I 951	TGATGATTATTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM46	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM47	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM62	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM63	951	TGATGATTATTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM67	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM1	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM9	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM15	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM20	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM21	II 951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM23	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM25	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM34	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM55	951	TAATGATTACTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
ATCC27522	951	TGATGATTATTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM40	III 951	TGATGATTATTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000
KPUM45	951	TGATGATTATTCTGATCATTATCCAGTAGAGGCGACTATTTCTATGAAGT	1000

* .*****.*****.***.***.*****.

ATCC14579	1001	AG	1002
KPUM8	1001	AG	1002
KPUM12	1001	AG	1002
KPUM27	1001	AG	1002
KPUM30	1001	AG	1002
KPUM39	I 1001	AG	1002
KPUM46	1001	AG	1002
KPUM47	1001	AG	1002
KPUM62	1001	AG	1002
KPUM63	1001	AG	1002
KPUM67	1001	AG	1002
KPUM1	1001	AG	1002
KPUM9	1001	AG	1002
KPUM15	1001	AG	1002
KPUM20	1001	AG	1002
KPUM21	II 1001	AG	1002
KPUM23	1001	AG	1002
KPUM25	1001	AG	1002
KPUM34	1001	AG	1002
KPUM55	1001	AG	1002
ATCC27522	1001	AG	1002
KPUM40	III 1001	AG	1002
KPUM45	1001	AG	1002
	**		

(B) SMase のアミノ酸配列

[illegible]

Accession	Position	Sequence	Reference
ATCC14579	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM8	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM12	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTDQ LK	200
KPUM27	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM30	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM39	I 151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM46	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM47	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM62	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM63	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM67	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM1	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM9	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM15	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM20	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM21	II 151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM23	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM25	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM34	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM55	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
ATCC27522	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM40	III 151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200
KPUM45	151	GPDNLSNKG FVYTKIKKNDRFVHVIGTHLQAEDSMCGKTS PASVRTNQ LK	200

Accession	Length	Sequence	Position
ATCC14579	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM8	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENKNDSEYTSMFKTLNASVP	250
KPUM12	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENKNDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM27	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM30	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM39	I 201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASVP	250
KPUM46	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM47	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM62	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM63	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM67	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLIIGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLNASVP	250
KPUM1	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM9	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM15	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM20	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM21	II 201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM23	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM25	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM34	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVKKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM55	201	EIQDFIKNKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
ATCC27522	201	EIQDFIENKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM40	III 201	EIQDFIENKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250
KPUM45	201	EIQDFIENKNIPNDEYVLFGGDMNVNKINAENNSDSEYASMFKTLHASIP	250

ATCC14579 251 SYTGHTATW**DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM8 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM12 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM27 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM30 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM39 I 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM46 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM47 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM62 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM63 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM67 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM1 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM9 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM15 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM20 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM21 II 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM23 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM25 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM34 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM55 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 ATCC27522 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM40 III 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 KPUM45 251 SYTGHTATW DATTNSIAKYNFPDSPA EYLDYIIASKDHANPSYIENKVLQ 300
 ***** . ***** . ** . ** . ***** . *****

ATCC14579 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM8 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM12 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM27 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM30 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM39 I 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYDDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM46 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM47 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM62 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM63 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYDDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM67 301 PKSPQWTVTSWFOQKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM1 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM9 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM15 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM20 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM21 II 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM23 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM25 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM34 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM55 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYNDYS DHYPVEATISMK 333
 ATCC27522 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYDDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM40 III 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYDDYS DHYPVEATISMK 333
 KPUM45 301 PKSPQWTVTSWLKKYTYDDYS DHYPVEATISMK 333
 ***** . ***** . *****

(A) PlcR のアミノ酸配列

66

ATCC14579 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVITLCKQKRYKEIYNRVWN 100
 KPUM2 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM8 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM12 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM17 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM18 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM27 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM30 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM39 I 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM46 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM47 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM48 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM58 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM62 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM63 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM65 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM67 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM1 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM7 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVITLCKQKRYKEIYNRVWN 100
 KPUM9 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM13 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM15 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM16 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM20 II 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM21 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM23 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNRVWN 100
 KPUM25 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM34 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM36 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM55 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQIIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 ATCC27522 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVITLCKQKRYKEIYNRVWN 100
 KPUM40 III 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVIMLCKQKRYKEIYNKVWN 100
 KPUM45 51 GIAAKLQVPIIHFFYEVLIYSDIERKKQFKDQVITLCKQKRYKEIYNRVWN 100

ATCC14579 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM2 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM8 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM12 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKSDEYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM17 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKSDEYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM18 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKSDEYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM27 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM30 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM39 I 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM46 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM47 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM48 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM58 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM62 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM63 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM65 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM67 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM1 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM7 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM9 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM13 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKSDEYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM15 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKSDEYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM16 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKSDEYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM20 II 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM21 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM23 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKIDYEYCILELKKLLNQQLVGID 150
 KPUM25 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM34 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM36 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM55 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 ATCC27522 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150
 KPUM40 III 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYVLKKVDYEYCILELKKLLNQQLTGID 150
 KPUM45 101 ELKKEEYHPEFQQFLQWQYHVAAYLKKIDYEYCILELKKLLNQQLAGID 150

ATCC14579	I	151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYF ^K RK ^S IELFEGILKQL ^E SLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM2		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM8		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM12		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^G MELFE ^G ILKQL ^E ALPENKEFDVKVRH	200
KPUM17		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^G MELFE ^G ILKQL ^E ALPENKEFDVKVRH	200
KPUM18		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^G MELFE ^G ILKQL ^E ALPENKEFDVKVRH	200
KPUM27		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM30		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM39		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM46		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM47		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM48		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM58		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM62		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM63		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM65		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM67		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM1		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM7		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^S IELFEGILKQL ^E SLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM9		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM13		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^G MELFE ^G ILKQL ^E ALPENKEFDVKVRH	200
KPUM15		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^G MELFE ^G ILKQL ^E ALPENKEFDVKVRH	200
KPUM16		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^G MELFE ^G ILKQL ^E ALPENKEFDVKVRH	200
KPUM20	II	151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM21		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM23		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFENILKQL ^E ALHDNKEFDVKVRH	200
KPUM25		151	VYQ ^N SL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KAIDLFENILKQL ^E VLHDNKEFDVKVRH	200
KPUM34		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM36		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM55		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENS ^Y F ^K RK ^S IELFEDILKQL ^E VLHDNEEF ^D VKVRY	200
ATCC27522		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^S IELFEGILKQL ^E SLHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM40	III	151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENGYL ^K KGIDLFEEQILKQL ^E ALHDNEEF ^D VKVRY	200
KPUM45		151	VYQNL ^Y LIE ^N AIAI ^N IYAENG ^Y F ^K RK ^S IELFEGILKQL ^E SLHDNEEF ^D VKVRY *****	200
ATCC14579		201	NHA ^K ALYL ^D NQYE ^O ALYQVNKAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R LE	250
KPUM2		201	NHA ^K ALYL ^D NQYEE ^S LYQVNKAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R GLKLE	250
KPUM8		201	NHA ^K ALYL ^D SR ^Y EE ^S LYQVNKAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R LRKLE	250
KPUM12		201	NYAKTLL ^D LDNQYEEALYQ ^N KAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R KG	250
KPUM17		201	NYAKTLL ^D LDNQYEEALYQ ^N KAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R KG	250
KPUM18		201	NYAKTLL ^D LDNQYEEALYQ ^N KAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R KG	250
KPUM27		201	NHA ^K ALYL ^D NQYEE ^S LYQVNKAIEISCRINSMALIGQLYYQRGECLE ^R GLKLE	25

ATCC14579	251	YDEAEIEDTYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKINQ	285
KPUM2	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM8	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM12	251	YDEVESSEAYEKAYFFFDILEMHTYKEKFMKRMTK	285
KPUM17	251	YDEVESSEAYEKAYFFFDILEMHTYKEKFMKRMTK	285
KPUM18	251	YDEVESSEAYEKAYFFFDILEMHTYKEKFMKRMTK	285
KPUM27	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM30	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM39	I 251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM46	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM47	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM48	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM58	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM62	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM63	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM65	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM67	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
KPUM1	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM7	251	YDEAEIEDTYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKINQ	285
KPUM9	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM13	251	YDEVESSEAYEKAYFFFDILEMHTYKEKFMKRMTK	285
KPUM15	251	YDEVESSEAYEKAYFFFDILEMHTYKEKFMKRMTK	285
KPUM16	251	YDEVESSEAYEKAYFFFDILEMHTYKEKFMKRMTK	285
KPUM20	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM21	II 251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM23	251	CDRAEIEDAFKACFFFDILGNHELKESLIKKMKK	285
KPUM25	251	CDRAEIEDAYEKACFFFDILGNHLKESLIKKMKK	285
KPUM34	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM36	251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM55	251	YDGAEEVEDAYKKASFFFDILEMHTYKEALVNKISR	285
ATCC27522	251	YDEAEIEDTYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKINQ	285
KPUM40	III 251	YEEAEIEDAYKKASFFFDILEMHAYKEALVNKISR	285
KPUM45	251	YDEAEIEDTYKKASFFFGILEMHAYKEALVNKINQ	285
.....*.....**.....*.....*.....*.....			

(B) PapR のアミノ酸配列

ATCC14579	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLTDTALEKSQVISHNDQEVQLASDLPFEY	48
KPUM2	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM8	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM12	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLADTALEKSQVISHNDQEVQLASDMPFEF	48
KPUM17	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM18	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM27	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM30	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM39	I 1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM46	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM47	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM48	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM58	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM62	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSHIISHNDQEVQLAKDLPFEY	48
KPUM63	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLTDTALEKSQVISHNDQEVQLASDLPFEY	48
KPUM65	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM67	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM1	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM7	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLTDTALEKSQVISHNDQEVQLASDLPFEY	48
KPUM9	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM13	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM15	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSQIISHNDQEVQLAGEIPYEF	48
KPUM16	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM20	II 1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM21	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM23	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTVLEKNQIISHNDQEVQLANEVPFEF	48
KPUM25	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTALEKSQIISHNDQEVQLAGEIPYEF	48
KPUM34	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM36	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM55	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
ATCC27522	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLTDTALEKSQVISHNDQEVQLASDLPFEY	48
KPUM40	III 1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLGDTLEKSQIISHNDQEVQVAADLPFEF	48
KPUM45	1	MKLLIGSLLTLAMAWGISLTDTALEKSQVISHNDQEVQLASDLPFEY	48

***** . ***** . ***** . * . * . * . . . * . * . * . * . * . * . * . *

Table S2. PapR グループ分類

○ PapR 分類	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4
PapR ₅	LPFE(F/Y)	MPFEF	VP(F/Y)E(F/Y)	LPFEH

PlcR box group I

菌株名	PapR ₇ 配列	PapR 分類
ATCC14579	KDL PFEY	1
KPUM2	KDL PFEY	1
KPUM8	ADL PFEF	1
KPUM12	SD MPFEF	2
KPUM17	KDL PFEY	1
KPUM18	KDL PFEY	1
KPUM27	KDL PFEY	1
KPUM30	KDL PFEY	1
KPUM39	ADL PFEF	1
KPUM46	KDL PFEY	1
KPUM47	KDL PFEY	1
KPUM62	KDL PFEY	1
KPUM63	SDL PFEY	1
KPUM67	KDL PFEY	1

PlcR box group II

菌株名	PapR ₇ 配列	PapR 分類
KPUM1	ADL PFEF	1
KPUM7	SDL PFEY	1
KPUM9	ADL PFEF	1
KPUM13	ADL PFEF	1
KPUM15	GEIP YEY	-
KPUM16	ADL PFEF	1
KPUM20	ADL PFEF	1
KPUM21	ADL PFEF	1
KPUM23	NEV PFEF	3
KPUM25	GEIP YEY	-
KPUM34	ADL PFEF	1
KPUM36	ADL PFEF	1
KPUM55	ADL PFEF	1

PlcR box group III

菌株名	PapR ₇ 配列	PapR 分類
ATCC27522	SDL PFEY	1
KPUM40	ADL PFEF	1
KPUM45	SDL PFEY	1