

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)
分担研究報告書

アエロモナスの病原因子の機能解析

分担研究者 岡本敬の介 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨：

一般に細菌の菌体外毒素は、菌が生息するために、菌の周辺の物質に作用し、菌の生存条件を整える武器(あるいは道具)であると言われている。当研究室では、アエロモナスが淡水中では多数分離されるのに対し、海水中ではその生存数が減少する事に着目し、アエロモナスの毒素産生と食塩濃度の関係を調べている。本研究ではアエロモナスのメタロプロテアーゼ遺伝子の転写は 3%食塩下では阻害され、メタロプロテアーゼの産生が停止することを明らかにした。

A. 研究目的

アエロモナスの菌体外毒素としてヘモリジン(ALH)、セリンプロテアーゼ(ASP)、メタロプロテアーゼ(AMP)がよく知られている。*Aeromonas sobria* や *A. hydrophila* が産生するヘモリジンは下痢を引き起こす原因毒素であると報告されている。一方、セリンプロテアーゼは浮腫を引き起こすことが明らかにされているが、メタロプロテアーゼについてはその詳細は解析されていない。報告者らの検討では、このメタロプロテアーゼもラットの皮膚では浮腫を引き起こす。恐らくアエロモナスの皮膚感染時に発症する皮膚の浮腫はこのメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼがともに関与していると思われる。

またこの皮膚感染は、菌が腸管から移行して発症する場合と、創傷感染から発症する場合がある。創傷感染は塩分を含まない地で生じ、一般に海での感染は少ない。近年ではインドネシアの津波での怪我から、アエロモナスの皮膚感染が多発した例が報告されている。

当研究室では、アエロモナスは試験管内では海水相当の塩濃度でも適当な栄養分があれば菌は増殖できる。しかし自然界では淡水で

は多数分離されるのに対し、海水ではその菌数が減少することから、毒素産生と食塩濃度の関係に興味をいだき、検討を行った。その結果、*A. sobria* 288 株のセリンプロテアーゼの産生が食塩濃度により抑制される事を見いだし、さらにこのセリンプロテアーゼは 3%食塩中で生合成されるが、その成熟化過程が阻害され、活性体が構築できないことを明らかにした。

そこで本実験ではメタロプロテアーゼの 3%食塩中での産生を調べ、産生が抑制されることを明らかにし、更にその産生抑制機序について調べた。

B. 研究方法

1) 形質転換株の作製および培養

メタロプロテアーゼ遺伝子をクローニングしたプラスミドをエレクトロポレーションにより、*A. sobria* 104 株に形質転換した。形質転換株を 0.5%、3%の食塩を含む液体培地で 37℃、12 時間培養し、培養上清および菌体を回収した。菌体は超音波を用いて破碎し、遠心後、菌体抽出液を調製した。これらの培養上清、および菌体抽出液のプロテアーゼ活

性、または溶血活性を測定した。さらにウェスタンブロット分析で解析した。

2) プロテアーゼ活性測定

アゾカゼインを基質に用いてプロテアーゼ活性を測定した。

3) 溶血活性測定

羊赤血球に対する溶血活性で測定した。

4) 上流領域組換え遺伝子の作製

メタロプロテアーゼおよびヘモリジン遺伝子を含む各プラスミドを部位特異的変異導入法により、開始コドン部位に制限酵素 *NdeI* の切断サイトを導入した。*NdeI* 切断部位を導入したプラスミドを適当な制限酵素を用いてメタロプロテアーゼ遺伝子上流領域を切り出し、図1に示す上流領域を組換えたヘモリジン遺伝子を含むプラスミドを作製した。

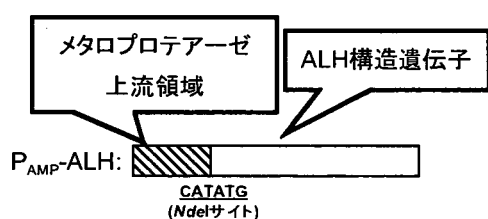


図1, AMP の上流域で産生が支配される ALH 遺伝子。AMP; メタロプロテアーゼ、ALH; ヘモリジン

作製したプラスミドから産生されるヘモリジンを、1) に示す方法で検出した。

5) mRNA の検出

各食塩濃度の培地で培養した菌体を回収し、Holmes-Bonner 試薬を用いて全 RNA を精製した。全 RNA を DNaseI 処理し、DNA を完全に分解した後、RNA をナイロン膜にス

ポットし、毒素遺伝子特異的なプローブを用いて RNA 溶液中に含まれる mRNA をドットブロットハイブリダイゼーション法を用いて検出した。

C. 研究結果

1) メタロプロテアーゼ産生に対する食塩の影響

メタロプロテアーゼを産生する下痢患者由来 *A. sobria* 288、118、124 株を 0.5%~3% 食塩を含む培地で培養し、増殖とその培養上清のメタロプロテアーゼ産生を調べた。

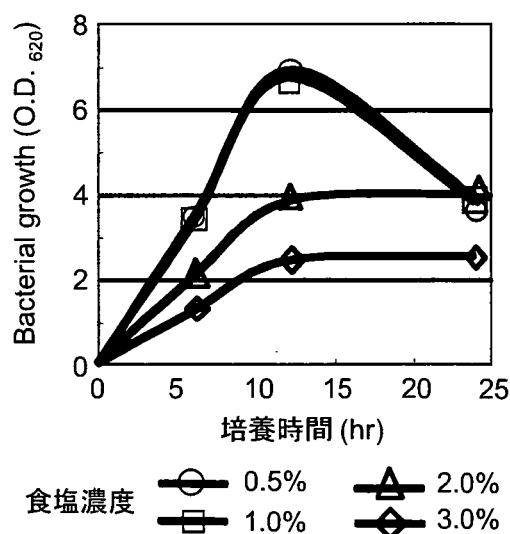


図2, 食塩含有培地中での *A. sobria* 288 の増殖

基礎培地には普通ブイヨン(栄研)を用い、食塩を 0.5%、1.0%、2.0%、3.0% になるように添加した。これらの培地で 37°C で振盪培養した。いずれの菌株も 3.0% 食塩を含む培地中でも増殖した。しかし図2の *A. sobria* 288 の増殖結果で示すように、3.0% 食塩を含む培地では増殖は、抑制されていた。また腸炎ビブリオを 3.0% 食塩を含む同培地で培養した結果、24 時間後の増殖濁度は 3.0 (620nm での濁度) 付近であり、アエロモナスのそれと

類似していた。この事はアエロモナスも3.0%食塩下でも増殖できるが、3.0%食塩では0.5%食塩下とは代謝が異なり、増殖は抑制されるが、3.0%食塩下でも生存はかろうであることがわかった。しかし生じる代謝産物はかなり異なると思われた。

次に、0.5%食塩と3.0%食塩で培養した培養液上清中のメタロプロテアーゼをウエスタンブロッティングで検出した。その結果、図3に示すように、いずれの株も0.5%食塩中では顕著なメタロプロテアーゼのバンドが検出されたのに対し、3%食塩中ではバンドは検出されなかった。一方、ヘモリジンはいずれの株も3%食塩中で産生されていた(結果は未掲載)。

Strains	<i>A. sobria</i> 288		<i>A. sobria</i> 118		<i>A. sobria</i> 124	
	0.5	3	0.5	3	0.5	3
NaCl (%)	0.5	3	0.5	3	0.5	3
34kDa	[Band]		[Band]		[Band]	

図3, 下痢患者由来 *A. sobria* の0.5%, 3%食塩中でのメタロプロテアーゼの産生

より詳細な解析を行うため、メタロプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、本遺伝子を保有するプラスミドで *A. sobria* 104 株を形質転換し、その形質転換株で解析を行った。その結果、野生株での結果と同様に、形質転換株は0.5%食塩中では、メタロプロテアーゼを産生したが、3%食塩中では産生しなかった。

また、菌体を破碎し、菌体抽出液中のメタロプロテアーゼの検出を試みたが、いずれのサンプルでもメタロプロテアーゼは検出されなかった。

これらの結果より、*A. sobria* は3%食塩中ではメタロプロテアーゼの産生は特異的に阻

害されることが確認できた。

2) メタロプロテアーゼ遺伝子発現抑制機序の解析

3%食塩中でメタロプロテアーゼが検出されなくなる原因として、3%食塩中では本遺伝子の転写が抑制されている、もしくは生合成されたタンパク質が3%食塩中では不安定で速やかに分解されることなどが考えられた。述べたようにヘモリジン遺伝子は3%食塩中でも発現する。そこで、上流がメタロプロテアーゼ遺伝子、下流がヘモリジン遺伝子を作製し、この遺伝子の3%食塩中での毒素産生を検出した。

その結果、上流領域をメタロプロテアーゼに置換したヘモリジン遺伝子では、0.5%食塩中ではヘモリジンの産生は認められるが、3%食塩中ではヘモリジンの産生は認められなかった。(図4)。また、菌体抽出液中にもヘモリジンは認められなかった。一方、野生型ヘモリジン遺伝子を含むプラスミドを持つ形質転換株は0.5%, 3%食塩中で、ともにヘモリジンを産生していた。

以上の結果より、3%食塩中ではメタロプロテアーゼ遺伝子上流領域の発現は抑制され、メタロプロテアーゼは産生されないことが明らかとなった。

次に、作製した組換え遺伝子を用いて、3%食塩中でメタロプロテアーゼ遺伝子上流領域から転写が生じているかを調べた。それぞれの食塩濃度の培地中で生育した菌体からRNAを精製し、mRNAをドットブロットハイブリダイゼーション法により検出を行った。

Plasmids	pSA19-CP-MCS		pSA-ALH		pSA-P _{AMP} -ALH	
	0.5	3	0.5	3	0.5	3
前駆体 (51kDa)						
活性体 (47kDa)						

図4 上流領域組換え遺伝子を保有するプラスミド(P_{AMP}-ALH)で形質転換した株の0.5%, 3%食塩中でのヘモリジンの産生。

pSA19-CP-MCS はベクタープラスミド、pSA-ALH は ALH 全遺伝子を挿入した pSA19-CP-MCS、pSA-P_{AMP}-ALH は、AMP 遺伝子のプロモーター領域の下流に ALH の構造蛋白遺伝子を結合した遺伝子を保有する pSA19-CP-MCS である (図1 参照)。

野生型ヘモリジン遺伝子を保有する株は、3%食塩下で培養した菌では0.5%食塩下で培養した菌よりもむしろ多くの mRNA が検出された。メタロプロテアーゼ上流領域を含む組換えヘモリジン遺伝子を保有する菌では、3%食塩培養菌では検出されるヘモリジンの mRNA 量は極度に減少していた。以上の結果から、*A. sobria* は3%食塩中ではメタロプロテアーゼプロモーターの転写は抑制されている事がわかった。

D. 考察

以上の結果より、*A. sobria* メタロプロテアーゼの発現は食塩により抑制されること、その抑制は転写制御であることが分かった。

この3%食塩中でメタロプロテアーゼの産生が低レベルであることが、菌の病原性や生態系にどのような影響を及ぼしているかは不明である。アエロモナスは海水中では菌数が低下する。しかし本菌は試験管内では3%食塩中でも増殖できる。このことは自然界では

何らかの因子が作用し、アエロモナスの菌数を減少させていると思われる。私たちは3%食塩中ではメタロプロテアーゼが産生されないことと海水中の生菌数が減少する事は何らかの因果関係があると思っている。

前年度は3%食塩中ではアエロモナスのセリンプロテアーゼの活性体が産生されなくなること示し、更にその産生抑制機構として、成熟過程の阻害であることを明らかにした。すなわちセリンプロテアーゼの成熟化にはシャペロン蛋白が関与するが(ペリプラスム中で未成熟のセリンプロテアーゼに作用し、セリンプロテアーゼは成熟化する)、その成熟化過程が食塩で阻害される事を明らかにした。

これらの研究により、アエロモナスでは3%食塩下ではメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼの2種類のプロテアーゼの活性体が産生されなくなること、しかしその産生抑制機構は異なることを明らかにした。この異なる機序でそれぞれのプロテアーゼの産生が食塩存在下で停止する事は、蛋白産生の制御を研究する上で貴重なデータを提供する。

アエロモナスは淡水魚には病原性を発揮し、養殖魚などへの被害も甚大であるが、海水魚への被害はほとんど報告されていない。またヒトにおいても淡水からの感染が主で、海水からの感染はほとんどない。これらのことも、アエロモナスの毒素産生と食塩の関係を調べる上で重要な観点であると考えている。

またアエロモナスのセリンプロテアーゼは哺乳類のセリンプロテアーゼと類縁関係にあることがわかっており、本研究は菌の分化、生命体の進化にも関連する研究であると見なされる。

E. 結論

アエロモナスにおいてメタロプロテアーゼの産生は、3%の食塩中では抑制された。この発現抑制に機構を明らかにするため、上流がメタロプロテアーゼ遺伝子、下流がヘモリジン遺伝子からなる組み替え遺伝子を作製し、この遺伝子の3%食塩中でのヘモリジン産生を調べた。野生型のヘモリジン遺伝子は3%食塩中でも発現することが確認されている。調べた結果、上流領域をメタロプロテアーゼの上流領域に置換したヘモリジン遺伝子は0.5%食塩中ではヘモリジンを産生するが、3%食塩中ではヘモリジンを産生しなかった。

次に、作製した組換え遺伝子での、3%食塩中でメタロプロテアーゼ遺伝子上流領域から転写が生じているかを調べた。異なる食塩濃度の培地中で生育した菌体からRNAを精製し、ヘモリジン mRNA をドットプロットハイブリダイゼーション法により検出を行った。その結果野生型ヘモリジン遺伝子は3%食塩中でも十分に転写されていたが、メタロプロテアーゼ上流領域で発現するヘモリジン遺伝子は3%食塩中では転写されていなかった。以上の結果から、メタロプロテアーゼ遺伝子は3%食塩中では転写されなく、従って発現も見られないと結論した。

食塩は環境を決定する重要な因子である。生物がこの食塩にいかに対応するかは、生物がいかに進化し、環境での棲み分けを決定し

たかを知る上で重要である。ここで得られた知見は菌の進化や生態を考える上で重要な知見であると考えている。

F. 健康危機情報

アエロモナス感染を防ぐには、淡水からの汚染、特に淡水中での切り傷からの感染、淡水魚の調理の際の汚染、川の水などの淡水で洗浄した食品からの汚染などに注意すべきである。

G. 研究発表

1) Khan, R., Takahashi, E., Ramamurthy, T., Takeda, Y., and Okamoto, K. Salt in Surroundings Influences the Production of Serine Protease into Milieu by *Aeromonas sobria*. *Microbiol. Immunol.* 51(10):963-976, 2007

2) Fujii, Y., Tsurumi, K., Sato, M., Takahashi, E., and Okamoto K., Fluid Secretion Caused by Aerolysin-like Hemolysin of *Aeromonas sobria* in the Intestines Is Due to Stimulation of Production of Prostaglandin E2 via Cyclooxygenase-2 by the Intestinal Cells. *Infect. Immun.*, in press

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)
分担研究報告書

プライマーカクテルを使用した多種類の下痢原性細菌のモニターと腸内菌叢の
同時定量解析

分担研究者 江崎 孝行 岐阜大学大学院教授

研究要旨：

細菌性下痢症を起こす 11 種類の病原体を同時にスクリーニングするカクテル増幅法を創世し、食材や糞便中の病原体の生死を判定しながらスクリーニングする生菌の遺伝子検査手法を作成した。また糞便内の正常細菌を市販の 96well で PCR を行い定量解析する手法をあわせて下痢症の腸内フローラの解析を遺伝子で短時間で行う基本的な手法を確立した。

A. 研究目的

下痢症の原因になる病原体を従来法による培養ですべてをスクリーニングするのは大きな労力がかかる。遺伝子検査法で網羅的な検査法を構築することは可能であるが、死菌を検出することから生きた菌の遺伝子検査法が要望されていた。生菌の遺伝子検査法を開発することで食品、腸内フローラの解析に応用することを目的とした。

B. 研究方法

1) サルモネラ、侵入性大腸菌、毒素原性大腸菌、腸管凝集性大腸菌、出血性大腸菌、リステリア、カンピロバクター、腸炎ビブリオ、コレラ菌、赤痢菌、セレウス菌の病原因子を増幅するプライマーにタグをつけ、カクテル化し、下痢便、食材を採取後、混合ガス (炭酸ガス:水素ガス:窒素ガス=10:10:80) の環境で 3 時間液体培養し、0 時間と 3 時間で mRNA の増加を測定した。

C. 研究結果

3 時間の増菌培養ですべての病原体の生死判定ができた。カクテルの標的病原体はすべて

1-10fg/assay の感度で検出できた。

D. 考察

生菌の遺伝子検査法を確立した。96 種類のフローラ構成細菌の定量 PCR とあわせることで腸内フローラの病態解析、および食材の安全性を迅速スクリーニングする手法を確立した。今後は増幅産物の識別を電気泳動やビーズアレイといった分析手法をより簡便化する核酸クロマトの開発を行うことで検査の迅速化と簡便化を目指す。

E. 結論

食材、糞便中の生きた病原体の遺伝子検査法を確立した。生菌検査法では食材の PCR 阻害物を 1000 倍以上除去できるため、あらゆる食材のスクリーニングに応用できる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Nhung PH, Shah MM, Ohkusu K, Noda M,

Hata H, Sun X, Iihara H, Goto K, Masaki T, Ezaki T: *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 309-315, 2007

2) Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, Sun XS, Ezaki T: Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59: 271-275, 2007

2. 学会発表

1) US-Japan 日米コレラ (ヒューストン, 2007) 日本臨床微生物学会総会 (東京, 2008)

研究発表一覧

A. 論文発表

1. Lee, J.C., Hwang, H.J., Sakaguchi, Y., Yamamoto, Y., Arimitsu, H., Tsuji, T., Watanabe, T., Ohyama, T., Tsuchiya, T. and Oguma, K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine, *Microbiol. Immunol.* 51:445-455, 2007
2. Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Shimizu, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Sugiyama, S., Taniguchi, K., Neri, P. and Mori, H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin, *Vaccine* 26:469-476, 2008
3. Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D, *Microb. Pathog. in press*
4. Kalnauwakul, S., M. Phengmak, U. Kongmuang, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2007. Examination of diarrheal stools in Hat Yai City, southern Thailand, for *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and PCR method. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38(5):871-850.
5. Koitabashi, T., S. Cui, K. Muhammad, and M. Nishibuchi. Isolation and characterization of the Shiga toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* O157 and non-O157 from retail meats in Shandong Province, China and characterization of the O157-derived *stx*₂ phages. *J. Food Prot.*, in press.
6. 山本達男. 小児腸管出血性大腸菌感染症とその発症メカニズム. *新潟医学会雑誌* 120:485-493, 2006.
7. Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H., Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Browne, R. R., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization *Infect. Immun.* 75(2) :604-612, 2007
8. Ooka, T., Vieira, M.A., Ogura, Y., Beutin, L., Ragione, R.L., van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Aktan, I., Cawthraw, S., Best, A., Hernandes, R.T., Krause, G., Gomes, T.A.T., Hayashi, T., and Frankel, G. Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:126-135, 2007

9. Whale, A., Hernandez, R.T., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, M.A., Ogura, Y., Phillips, A.D., Beutin, L., Gomes, T.A., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 153: 1743-1755, 2007
10. Morita, H., Kuwahara, T., Okushima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., and Takami, H. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* 22(3):214-222, 2007
11. Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H., and Hayashi, T. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8(7):R138, 2007
12. Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T., and Hattori, M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14:169-181, 2007
13. Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., Kerouredan, M., Brugere, H., Schmidt, H., Hayashi, T., and Oswald, E. Distribution, functional expression genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(1) :275-285, 2008
14. Iguchi, A., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, Nakayama, K., Frankel, G., and Hayashi, T. Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology* 154(2): 559-570, 2008
15. Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T. Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 2008; doi:10. 1093/dnares/dsm033.
16. Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., and Iida, T. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates strong correlation between presence of Vp-PAI and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 2008 :IAI.01535-07v1.

17. Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imaohji, H., Ichimura, M., Hayashi, T., and Shiota, H. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 46:527-532, 2008.
18. Hayashi T., Ooka T., Ogura Y. and Asadulghani :Genomic view on the evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. pp.407-419, Edited by Baquero, F., Nombela C., Cassell, C.H. and Gutierrez, J.A..(2007) ASM Press. Washington, D.C.
19. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Watanabe, M., Nomura, F., Moss, J., and Noda, M. (2007) Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75: 488-496.
20. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Watanabe, M., Nomura, F., Moss, J., and Noda, M. (2008) Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induced cell cycle arrest at G1 by down-regulation of cyclin D1. *Cell Microbiol.* (in press)
21. Toshima,H., Hachio, M., Ikemoto, Y., Ogasawara, J., Hase, A., Takahashi, K., Masaki, H., and Nishikawa, Y. Prevalence of enteric bacteria that inhibit growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 in humans. *Epidemiol. Infect.* 135: 110-117, 2007
22. Toshima, H., Yoshimura, A., Arikawa, K., Hidaka, A., Ogasawara, J., Hase, A., Masaki, H., and Nishikawa, Y. Enhancement of Shiga-toxin production in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7582-7588, 2007
23. Shinoda, S., Nakagawa, T., Hirakawa, N., Miyoshi, S., Arakawa, E., Tamamurthy, T., Dutta, B., Faruque, S., Nair, G. B. (2008) Molecular epidemiological studies of *Vibrio cholerae* in Bengal region. *Biocontrol Sci.*, in press.
24. Anai, S., Yasunobu Tagami,Y., Narita, T., Ikigai, H., and Oishi, Y. Morphological and mechanical studies of cholesterol monolayer on aqueous solution of *Vibrio cholerae* hemolysin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, in press, 2008.
25. D. Hamada, T. Higurashi, K. Mayanagi, T. Miyata, T. Fukui, T. Iida, T. Honda and I. Yanagihara : Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle x-ray scattering and electron microscopy. *J. Mol. Biol* 365 : 187-195, 2007.

26. G. Feng, T. Kodama, X. Chen, K. Okada, and T. Honda : A targeting approach for delivery of polymer microparticle-antibody conjugate against *Vibrio parahaemolyticus*-induced cytotoxicity to human intestinal epithelial cells. *Journal of Drug Targeting* 15(6) : 428-436, 2007.
27. B., Rabindra N., Kwon-Sam Park, X. Chen, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi, and . Akira : Translocation of VP1686 Upregulates RhoB and Accelerates Phagocytic Activity of Macrophage Through Actin Remodeling. *J.Microbiol.Biotechnol.* (in press)
28. Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arkawa, E., and Watanabe, H. Genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* In press
29. Osaki T., Hanawa T., Manzoku T., Fukuda M., Kawakami H., Suzuki H., Yamaguchi H., Yan X., Taguchi H., Kurata S. and Kamiya S. 2006. Mutation of luxS affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J. Med. Microbiol.* 55(11):1477-85.
30. Kamoda O., Anzai K, Mizoguchi J., Yanagi T., Shioiri M., Nishio T. and Kamiya S. 2006. In vitro antibacterial activity of a novel antimicrobial agent TG44 for treatment of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(9):3062-3069.
31. Yamanishi S, Iizumi T, Watanabe E, Shimizu M, Kamiya S, Nagata K, Kumagai Y, Fukunaga Y & Takahashi H: Implication of induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 74(1): 248-256, 2006.
32. Hisatsune J, Yamasaki E, Nakayama M, Shirasaka D, Kurazono H, Katagata Y, Inoue H, Han J, Sap J, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA enhances PGE2 production through induction of COX-2 expression via a p38 MAP kinase/ATF-2 cascade in AZ-521 cells. *Infect. Immun.* 75, 4472-4481, 2007.
33. Katagata Y, Hirayama T.: Unexpected expression of Hsp47, Q1 a replacement of one amino acid (Val 7 Leu) in the amino terminal region, in cultured human tumorigenic cell lines. *J Dermatol. Sci.* 49:33-38, 2008.
34. Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H. Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK, Azuma T, Yamaoka Y, Sap J, Yamasaki E, Yahiro K, Moss J, Hirayama T. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase

in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. J. Immunology. in press.

35. 平山壽哉 変貌する細菌感染症：Helicobacter pylori 感染症-その病原メカニズム. 医学のあゆみ. 223:
36. Mitobe. J., Morita-Ishihara. T., Ishihama. A., Watanabe. H., 2007 Dec 21. J. Biol. Chem. [Epub ahead of print]
37. Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nakayama, M., Shirasaka, D., Kurazono, H., Katagata, Y., Inoue, H., Han, J., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T.: Helicobacter pylori VacA Enhances Prostaglandin E2 Production through Induction of Cyclooxygenase 2 Expression via a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Activating Transcription Factor 2 Cascade in AZ-521 Cells. Infect Immun. 75:4472-4481, 2007.
38. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Jaipaew, J., Srimanote, P., Chongsa-Nguan, M., Yamasaki, S., Hayashi, H., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Virulence genes of clinical Vibrio cholerae O1 isolates in Thailand and their ribotypes. J. Infect.: 55: 557-565, 2007.
39. Hisatsune, J., Nakayama, M., Isomoto. H., Kurazono, H., Mukaida, N., Mukhopadhyay, A. K., Sap, J., Yamasaki, E., Yahiro, Y., Moss, J., and Hirayama, T.: Molecular characterization of Helicobacter pylori VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. J. Immunol. In press, 2008.
40. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Tiyasuttipan, W., Chaiyaroj, S. C., Yamasaki, S., Wongsaroj, T., Hayashi, H., Nair, G.B., Chongsa-nguan, M., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Molecular typing of Vibrio cholerae O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. J. Health Popul. Nutr. In press, 2008.
41. M. Asakura, W. Samosornsuk, A. Hinenoya, N. Misawa, K. Nishimura, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection of *cdt* genes in *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., in press.
42. W. Samosornsuk, M. Asakura, E. Yoshida, T. Taguchi, K. Nishimura, B. Eampokalap, V. Phongsisay, W. Chaicumpa and S. Yamasaki. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. Microbiol. Immunol., 51: 909-917, 2007.

43. Khan, R., Takahashi, E., Ramamurthy, T., Takeda, Y., and Okamoto, K. Salt in Surroundings Influences the Production of Serine Protease into Milieu by *Aeromonas sobria*. *Microbiol. Immunol.* 51(10):963-976, 2007
44. Fujii, Y., Tsurumi, K., Sato, M., Takahashi, E., and Okamoto K., Fluid Secretion Caused by Aerolysin-like Hemolysin of *Aeromonas sobria* in the Intestines Is Due to Stimulation of Production of Prostaglandin E2 via Cyclooxygenase-2 by the Intestinal Cells. *Infect. Immun.*, in press
45. Nhung PH, Shah MM, Ohkusu K, Noda M, Hata H, Sun X, Iihara H, Goto K, Masaki T, Ezaki T: dnaJ gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 309-315, 2007
46. Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, Sun XS, Ezaki T: Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59: 271-275, 2007

B. 学会発表

1. Kai A., Konishi N., Obata H., Shimojima Y., Uehara S., Monma C., Nakama A., Yano K.; Bacteriological analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheal disease in Tokyo, 42nd Annual Joint Panel Meeting Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, Austin, 2007.
2. 小西典子, 尾畑浩魅, 下島優香子, 上原さとみ, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美, 矢野一好. 東京都内で分離された毒素原性大腸菌の性状. 第90回日本細菌学会関東支部総会, 東京 2007.
3. Kamruzzaman, M., 小坂橋努, S. Cui, 西淵光昭. Detection of Shiga Toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* in retail meats in China and characterization of O157-derived *stx2* phages. 第60回日本細菌学会関西支部総会. 平成19年11月10日. 吹田市.
4. Kamruzzaman, M., T. Koitabashi, S. Cui, and M. Nishibuchi. Distribution of Shiga Toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* in retail meats in Qingdao, China and characterization of the *stx2* phages from the *E. coli* O157 strains. 42nd Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. テキサス州オースティン (米国). 平成19年12月5日.
5. Nishibuchi, M. *Escherichia coli* O157 carrying Shiga toxin gene 2 (*stx2*) but producing no or low-level Stx2 from Asian countries. Regional Symposium on Zoonosis and Emerging Infectious Diseases. クチン (マレーシア). 平成20年1月21日.

6. Yamamoto T, Higuchi W, Takano T. Genetic characteristics of type III secretion system-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O86:H-). p. 144-145. In abstract, 42nd US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Austin. USA. 2007
7. Yamamoto T, Dohmae S, Nishi J, Baba T, and Mori H. Molecular nature of novel, hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli* emerged in a child. p. 5560. In Abstract , 41th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Gifu, 2006.
8. Fujii, J., Yoshida, S and Obrig, T. Apoptosis induced by Shiga toxin 2 is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. U.S.-Japan cooperative medical sciences program, 42nd Annual joint panel meeting, Austin, Texas, 2007.
9. Hayashi, T. :Genomics of different enterohaemorrhagic E.coli serotypes. Genomics for Animal Health (E. coli and Salmonella workshop), 2007.6/4-8, Utrecht (Invited Speaker)
10. 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也:大腸菌における O 抗原合成遺伝子群を含む水平伝播領域の解析—O55 から O157 への入れ替わりと O55 の伝播について—. 第 11 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 2007, 8/23-24, 安曇野
11. 林哲也 (シンポジスト):病原性大腸菌 O157-ゲノム解析から見た病原細菌の多様性と適応戦略. 日本生物科学研究所 創立 60 周年記念シンポジウム「新興・再興するヒトと動物の共通感染症-その現状と対策を探る」, 2007,10/2, 東京.
12. 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, ASADULGHANI, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也:病原性大腸菌における RTX の保有状況および溶血毒素としての可能性. 第 60 回日本細菌学会九州支部総会, 2007, 10/12-13, 長崎.
13. 林哲也 (特別講演):ゲノム解読による生物学の変貌—病原細菌の場合—. 第 1 回ぜん虫研究会, 2007.11.26-27, 宮崎.
14. Hayashi T. :Comparative genomics of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. The 24th RIB International Symposium on The Frontier of Microbiology –Resources, Environment, and Genome-, 2008, 1/25, Okayama. (Invited Speaker)
15. 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也:大腸菌における O 抗原をコードする領域の組換え過程の解析. 第 2 回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.

16. 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 寺嶋淳, 渡辺治雄, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌 O157 の小規模ゲノム構造多型の形成機構に関する詳細な解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
17. Asadulghani, Ogura, Y., Nakayama, K., Iguchi, A., Ooka, T., and Hayashi, T. :A genome-wide survey on phage induction and propagation revealed defective prophages spread virulence determinants from Sakai prophage pool. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
18. 中山恵介, 黒川顕, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也 : オリエンチア・ツツガムシ株間における比較ゲノム解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
19. 小椋義俊, 大岡唯祐, 山下敦, Asadulghani, 井口純, 黒川顕, 安倍裕順, 戸邊亨, 児玉年央, 寺嶋淳, 中山恵介, 渡部治雄, 服部正平, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌 (O26, O111, O103) の全ゲノム解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
20. 小椋義俊 (シンポジスト) : 腸管出血性大腸菌の進化におけるファージの役割. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
21. 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也 : 大腸菌における O 抗原をコードする領域の組換え過程. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
22. 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 寺嶋淳, 渡辺治雄, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌 O157 の小規模ゲノム構造多型に関する詳細な解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
23. 山崎和子, 矢野貴久, Kyaw Kyaw Moe, 大岡唯祐, 林哲也, 三澤尚明 : ウシの趾乳頭腫症病変組織から分離された *Treponema phagedenis* 近縁種の分子系統解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
24. Asadulghani, Ogura, Y., Nakayama, K., Iguchi, A., Ooka, T., and Hayashi, T. :Lateral transfer of virulence or related genes by defective prophages of Sakai prophage pool. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
25. 中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也 : オリエンチア・ツツガムシ株間における比較ゲノム解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
26. 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, ASADULGHANI, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也 : EPEC O55:H7 株の溶血活性. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.

27. Naoko Moringa, Kinnosuke Yahiro, Gen Matsuura, Joel Moss, Masatoshi Noda. Inhibition of protein synthesis of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. Cholera and other bacterial enteric infections 42nd annual joint panel meeting. 2007.Dec Austin, Tex, USA
28. 盛永直子、八尋錦之助、松浦玄、野田公俊 毒素シンポジウム 2007.7 山梨。 STEC の産生する新規 AB サブユニット毒素の性状
29. 盛永直子、八尋錦之助、松浦玄、野田公俊 日本細菌学会 2007.3 大阪 STEC の産生する新規 AB サブユニット毒素 SubAB の BiP 分解活性
30. 生貝 初, 中山浩伸, 大石祐司, 山本耕一郎, 島村忠勝. 集合体形成に伴うコレラ菌溶血毒の構造変化と膜侵入, 第 53 回毒素シンポジウム, 平成 19 年 9 月, 泉佐野.
31. 生貝 初, 中山浩伸, 大石祐司, 山本耕一郎, 島村忠勝. 古典型コレラ菌 569B 株によるエルトール溶血毒様タンパク質の産生, 第 80 回日本細菌学会, 平成 19 年 3 月, 大阪.
32. 穴井 翔, 田上安宜, 成田貴行, 生貝 初, 大石祐司, コレステロール単分子膜上でのコレラ菌溶血毒の凝集化挙動, 日本化学会第 87 春季年会, 平成 19 年 3 月, 吹田.
33. Tagami, Y., Narita, T., Ikigai, H., Oishi, Y. Penetration behavior of *Vibrio cholerae* hemolysin into (DM PC / Cholesterol) mixed monolayer, 12th International Conference on Organized Molecular Films (LB12), July 2007, Krakow, Poland.
34. 大倉正稔、徳永暁彦、大澤朗「新興型 O4:K68 株の抗原性に関連する遺伝子群の解析」第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)
35. 大倉正稔、大澤朗、徳永暁彦、森田昌知、荒川英二、渡邊治雄「新興型腸炎ビブリオ O3:K6 株と O4:K68 株の O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群の比較解析」第 41 腸炎ビブリオシンポジウム (2007. 11)
36. Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arkawa, E., and Watanabe, H. Comparative and genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group O3:K6 and O4:K68 strain. 42nd U.S.-Japan Cholerae and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting. (2007. 12)
37. 大崎敬子, 松木隆宏 1, 朝原崇 1, 花輪智子, 蔵田訓, 田口晴彦, 野本康二 1, 田中隆一郎 1, 神谷茂 (1 ヤクルト中央研究所): *Helicobacter pylori* 感染スナネズミの胃内フローラ構成

細菌の解析. 第 80 回日本細菌学会総会, 大阪, 平成 19 年 3 月 26-28 日.

38. 大崎敬子、神谷茂、スナネズミの胃内フローラと *Helicobacter pylori* 感染、第 13 回日本ヘリコバクター学会、滋賀県大津市、平成 19 年 6 月 21-22 日
39. 大崎敬子、蔵田 訓、神谷 茂 Mongolian gerbil を用いた *Helicobacter pylori* 母子感染と感染経路に関する研究、第 56 回日本感染症東日本地方会、東京、平成 19 年 10 月 26-27 日
40. 大塩一郎、大崎敬子、神谷茂、スナネズミにおける *Helicobacter pylori* 母子感染と感染ルート、日本細菌学会総会、京都、平成 20 年 3 月 24-26 日
41. Toshiya Hirayama, Jyunzo Hisatsune, Hisao Kurazono, Joel Moss : Vacuolating Cytotoxin of *Helicobacter pylori* Enhances PGE2 Production Through Induction of COX-2 Expression via a p38 MAP Kinase/ATF-2 Cascade in AZ-521 Cells. 107th General Meeting of American Society for Microbiology. May 21-25, 2007, Toronto, Canada
42. Toshiya Hirayama, Jyunzo Hisatsune, Masaaki Nakayama, Joel Moss: *Helicobacter pylori* VacA induces COX-2 expression via p38 MAP Kinase/ATF-2 cascade. 14th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. September 2-5, 2007, Rotterdam, The Netherlands
43. Toshiya Hirayama, Jyunzo Hisatsune, Masaaki Nakayama, Hisao Kurazono, Joel Moss: *Helicobacter pylori* VacA Enhances PGE2 Production Trough Induction of COX-2 Expression via p38 MAP Kinase/ATF-2 Cascade in AZ-521 Cells. 42nd Annual Joint Meeting of Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. December 5-7, 2007. Austin, USA
44. Hisao Kurazono, S. Horie, H. Hoshi, Y. Seto, M. Chongsa-nguan, W. Chicumpa, G.B. Nair, S.-I. Makino, Toshiya Hirayama: Purified *Salmonella* enterotoxin expresses cytotoxic activity to CHO cells. 42nd Annual Joint Meeting of Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, December 5-7, 2007. Austin, USA
45. Hajime Isomoto, Shigeru Kohno, Ken Ohnita, Junzo Hisatsune¹, Masaaki Nakayama, Toshiya Hirayama: Pleotropic action of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA on esophageal cell types. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. December. 1-5, 2007. Washington DC, USA
46. 久恒順三、平山壽哉 : *Helicobacter pylori* VacA 毒素の毒性発現機序 : 転写因子に及ぼす影響.

細菌学・若手コロッセウム. 平成19年1月23日. 神戸市

47. 久恒順三、倉園久生、片方陽太郎、平山壽哉：H. pylori VacA による p38 MAP kinase 活性化依存 COX-2 発現誘導を介した PGE2 産生亢進作用. 第80回日本細菌学会総会. 平成19年3月26日-28日. 大阪市
48. 赤田純子、中澤晶子、倉園久生、平山壽哉、中村和行：Helicobacter pylori CagA は宿主細胞のエンドサイトーシスの開始を阻害する. 第80回日本細菌学会総会. 平成19年3月26日-28日. 大阪市
49. 磯本一、平山壽哉：空胞化毒素 VacA は食道細胞において MAPK, NF-kB signaling を活性化する. 第13回日本ヘリコバクター学会. 平成19年6月21日-22日. 大津市
50. 久恒順三、中山真彰、磯本一、倉園久生、平山壽哉 H. pylori VacA によるマクロファージ系細胞 U937 からのインターロイキン-8 産生機序の解析. 第60回日本細菌学会九州支部総会. 平成19年10月12日-13日. 長崎市
51. 平成19年3月26-28日 第80回日本細菌学会総会 大阪アジア太平洋トレードセンター
52. 2007, Dec. 5-7 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Austin Texas
53. US-Japan 日米コレラ (ヒューストン,2007) 日本臨床微生物学会総会 (東京、2008)