

白質を同定した。この中には、新規のエフェクターが多数含まれる。エフェクターのうち、TccP と TccP2 については、EHEC と腸管病原性大腸菌 (EPEC) での機能や分布の違いを明らかにした。また、O157 堺株のゲノム解析から見いだされた新規の RTX 様蛋白質コード遺伝子の O157/O55 系統における分布、O157/O55 系統で観察される溶血活性の責任遺伝子の同定、O157/O55 系統での O 抗原変換機構の解明などの成果があがった。

D. 考察

O157 EHEC のゲノム多様性解析の研究成果を基に開発した O157 迅速菌株識別システムについては、O157 IS-printing system として実用化できた。本システムは、菌株識別解像度は PFGE に劣るものの、解析に要する時間が 3 時間と短く、データをデジタル化でき、さらに O157 の主要な病原遺伝子マーカーである *stx1*, *stx2*, *eae*, *e-hly* の 4 遺伝子を同時に検出できるため、O157 のサーベイランスに、一次スクリーニング用ツールあるいは PFGE の補助ツールとして利用できると期待される。また、本研究で同定した約 400 の variable 遺伝子についても、これらの遺伝子をミニ DNA チップに搭載すれば、高解像度の菌株識別系になる可能性がある。

一方、O26・O111・O103 EHEC のゲノム多様性解析では、いずれの non-O157 EHEC にも、O157 には存在しない多数の系統・菌株特異的遺伝子群が存在することが明らかとなった。そこで、これらの non-O157 EHEC のゲノム解読を行い、多数のプロファージ、IS、菌株特異遺伝子を同定した。これらの遺伝子や遺伝子は、各 non-O157 EHEC の疫学ツールや疫学マーカーの開発に利用でき

る可能性がある。特に IS に関しては、O157 IS-printing system と同様な菌株システムの開発に直接に利用できると考えられる。なお、各 non-O157 EHEC のゲノム配列の応用としては、国立感染症研究所の寺島らによって行われている MLVA への応用も重要である。

E. 結論

O157 EHEC と主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) のゲノム多様性解析を行い、O157 EHEC 株間には予想以上に大きなゲノムの多様性が存在すること、それがプロファージおよび IS によって生じていること、O26・O111・O103 EHEC 菌株のゲノムが O157 と大きく異なることを明らかにし、さらに O26・O111・O103 EHEC の全ゲノム配列を決定した。O157 の解析では、疫学マーカーとなりうる多数の variable 遺伝子を同定し、さらに IS629 の多様性を利用した O157 EHEC の迅速菌株識別システムの開発に成功した。本システムは、O157 IS-printing system としてキット化を行い、実用化段階にまで到達した。一方、O26・O111・O103 EHEC のゲノム配列からは、これらの主要 non-O157 EHEC に対する有力な疫学マーカー候補を同定できた。そのほか、O157 の TTSS エフェクターや RTX 様遺伝子などの個別解析からも、O157 の病原性等に関する種々の新知見が得られた。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

●Tobe T., Ando H., Ishikawa H., Abe H., Tashiro K., Hayashi T., Kuhara S. & Sugimoto

- N.: Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 58 :320-333, 2005.
- Sakaguchi Y., Hayashi T., Kurokawa K., Nakayama K., Oshima K., Fujinaga Y., Ohnishi M., Ohtsubo E., Hattori M. & Oguma K.: The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 :17472-17477, 2005.
- 林哲也:細菌の病原性遺伝子システムの獲得と進化. 蛋白質 核酸 酵素 50(16):2204-2209, 2005.
- 大岡唯祐, 小椋義俊, 林哲也:大腸菌 O157 のゲノム研究とその応用. 臨床微生物迅速診断研究会誌 (JARMAM) 16(2): 179-181, 2005.
- 林哲也:ゲノムが語る細菌の病原性. 細胞工学 24(12):1302-1306, 2005.
- Ogura Y., Kurokawa K., Ooka T., Tashiro K., Tobe T., Ohnishi M., Nakayama K., Morimoto T., Terajima J., Watanabe H., Kuhara S. & Hayashi T.: Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. *DNA Res.* 13:3-14, 2006.
- Nakanishi N., Abe H., Ogura Y., Hayashi T., Tashiro K., Kuhara S., Sugimoto N. & Tobe T.: ppGpp with DksA controls gene expression in the LEE pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol. Microbiol.* 61(1):194-205, 2006.
- Tobe T., Beatson S. A., Taniguchi H., Abe H., Bailey C. M., Fivian A., Younis R., Matthews S., Marches O., Frankel G., Hayashi T. & Pallen M. J.: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:14941-14946, 2006.
- Hayashi T.: Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. *Science* 313:772-773, 2006.
- 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 RR., Hayashi T. & 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.
- 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., Hernandez R. T., Krause G., Gomes T.A.T., Hayashi T. & Frankel G.: Characterization of *tccP2* carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:126-135, 2007.
- 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. & Frankel G.: TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 153: 1743-1755, 2007

- Morita H., Kuwahara T., Okushima K., Sasamoto H., Itoh K., Hattori M., Hayashi T. & 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.
- Ogura Y., Ooka T., Asadulghani., Terajima J., Nougayrède J-P., Kurokawa K., Tashiro K., Tobe T., Nakayama K., Kuhara S., Oswald E., Watanabe H. & 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.
- 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. & Hattori M.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14: 169-181, 2007.
- Loukiadis E., Nobe R., Herold S., Tramuta C., Ogura Y., Ooka T., Morabito S., Kerouredan M., Brugere H., Schmidt H., Hayashi T. & 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.
- Iguchi A., Ooka T., Ogura Y., Asadulghani 2007.
- Nakayama K., Frankel G. & 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.
- Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imaohji H., Ichimura M., Hayashi T., Shiota H. :High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 527-532, 2008.
- Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., & 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.* 76: 1016-1023, 2008.
- Abe H., Miyahara A., Oshima T., Tashiro K., Ogura Y., Kuhara S., Ogasawara N., Hayashi T. & Tobe T.: Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 2008; doi:10. 1093/dnares/dsm033.
- Hayashi T., Ooka T., Ogura Y. & 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. & Gutierrez, J.A..2007, ASM Press. Washington, D.C.
- 内山郁夫, 林哲也: 細菌ゲノム解読の進展. 細胞工学 別冊「比較ゲノム学から読み解く生命システム」 pp153-160, 秀潤社, 東京,
- 林哲也: 微生物における比較ゲノム研究の進展. 実験医学 25(2):266-272, 2007.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成 17～19 年度 総合分担研究報告書

研究課題名：「アジアを中心に世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンの同定法に関する研究」

分担研究者	西淵光昭	京都大学 東南アジア研究所
協力研究者	西岡輔	京都大学大学院 医学研究科, 総合研究大学院大学 先導科学研究科
協力研究者	松本（真下）千穂	大阪歯科大学 細菌学講座
協力研究者	Ashrafuzzaman Chowdhury	バングラデッシュ国際下痢症研究センター
協力研究者	中口義次	京都大学 東南アジア研究所
協力研究者	Phuangthip Bhoopong	プリンス・オブ・ソンクラ大学（タイ）理学部
協力研究者	Varaporn Vuddhakul	プリンス・オブ・ソンクラ大学（タイ）理学部
協力研究者	清水理香	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	山崎渉	大阪府公衆衛生研究所感染症部細菌課

研究要旨 アジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている腸炎ビブリオ新型クローンが我が国に侵入することを防止するために、新型クローンを特異的にかつ簡便に同定するのに最も適した PCR 法を明らかにするための研究を実施した。61 菌株（新型クローンおよび関連菌株）のゲノム中の 11 種類の遺伝子（house-keeping genes）を対象にした系統発生的解析結果と PCR 法による検査結果の照合により、臨床的に重要な新型クローンの同定には GS-PCR（group-specific PCR、*toxRS* 遺伝子の特異的塩基置換を標的）陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適していると結論した。その他に、新型クローンに特異的とされる 23 kb の挿入配列および 16 kb の挿入配列を標的とする PCR 法も有用であることを示唆する結果が得られた。しかし、トランスポジション活性のある挿入配列によって一部の PCR 法の結果が影響を受けるということを示す結果も得られた（*tdh* 遺伝子が ISVpa3 によって部分欠失をおこし PCR 陰性を示す。16 kb の挿入配列を標的とする PCR では ISVpa2 の挿入により増幅 DNA のサイズが増加）。そこで、過去 12 年間に 24 カ国（推定感染国を含む）で患者から分離された 579 菌株を対象に網羅的に PCR 検査を実施し、最も適した PCR 法（上記の新型クローン同定用の遺伝マーカーを対象とした PCR 法および ORF-8[溶原化線状ファージのゲノムの一部]を標的とする PCR 法）がいずれであるかを評価した。その結果、GS-PCR 陽性を検出（必ずし

も必要ではないが、あわせて *tdh* 遺伝子陽性も検査するのが理想的) する方法が最も適していると判定された。この方法では、擬陰性を示す 1 株が検出されたが、特異性はこの方法が最も高く、23-kb 挿入配列検出 PCR 法 (擬陰性 2 株)、16-kb 挿入配列検出 PCR 法 (擬陰性 4 株)、ORF8 検出 PCR 法 (擬陰性 25 株) の順であった。以上から、本研究で有効性が確認できた GS-PCR 法をベースにした方法を用いることにより、海外からの輸入魚介類中の新型クローン菌株のモニタリング検査を実施して情報を収集し、防疫対策に資することができると考えられる。

A. 研究目的

アジアを中心に腸炎ビブリオ新型クローン (パンデミッククローン) による感染症の世界的大流行が進行中である。このパンデミッククローンによる感染症の伝播をモニターし、我が国にさらに菌が持ち込まれないように監視する必要がある。パンデミッククローンには異なる性状 (血清型など) を示すバリエーションが派生しているため、本研究ではパンデミッククローンを確実かつ迅速に同定するための遺伝学的手法を確立する。

B. 研究方法

腸炎ビブリオ被検菌株は分担研究者が現在までにアジアを中心として、世界各地における共同研究において分離あるいは入手し保存していたものおよび関西空港検疫所で分離され大阪府公衆衛生研究所で血清型別して保存されていたものである。

系統解析において、被検菌株から全 DNA を抽出し、PCR 法によって標的遺伝子の部分配列を増幅し、塩基配列を決定した。決定した遺伝子の塩基配列を連結して、Neighbor-joining 法によって解析し、系統樹を作成した。

新型クローンに特有な遺伝子マーカーの検出、*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子の検出、および被検菌株が腸炎ビブリオであることを確認するために *toxR* 遺伝子の特異配列の検出は過去に報告された PCR 法に従って行った。

サザンブロット法では、全 DNA を制限酵素 (*EcoRI* または *HindIII*) による消化後に得られた DNA をブロットし、PCR によって増幅した DNA の塩基配列を digoxigenin 標識したプローブを用いて、高ストリンジェンシー条件ハイブリダイゼーション試験を実施した。

ISVpaX および *tdh* 遺伝子上流および下流の塩基配列の決定は、site-finding PCR 法による DNA walking によって決定した。

Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法および NotI 酵素消化 DNA no. パルスフィールドゲル電気泳動解析は過去に報告した方法にしたがって実施した。

C. 研究結果

1. 系統発生的解析に基づくパンデミッククローンの定義

腸炎ビブリオ 61 菌株 (新型クローンおよび関連菌株) のゲノム中の 11 種類の遺伝子

(house-keeping genes) の塩基配列を決定し、分子系統樹を作成して、パンデミッククローンの系譜を明らかにした。その結果、GS-PCR (group-specific PCR、*toxRS* 遺伝子の塩基置換を標的) 陽性かつ *tdh* (耐熱性溶血毒) 遺伝子陽性を呈する菌株をパンデミッククローンに属する菌株 (血清型バリエーションを含む) と判定することが妥当であると結論した。

2. 系統発生とパンデミッククローン検出用 PCR 法の検討

系統発生的解析に用いた 61 菌株を対象にして、パンデミッククローン検出に有用であると報告されている PCR 法を評価した。GS-PCR 陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を呈する菌株をパンデミッククローン菌株と定義した場合、ORF-8 (溶原化線状ファージのゲノムの一部) を標的とする PCR 法の結果は擬陰性が多く (5 株)、PGS-PCR 法 (Mn^{2+}/Fe^{2+} トランスポーター遺伝子を標的) の結果は擬陽性 (4 株) および擬陰性 (2 株) を含んでいた。一方、16-kb 挿入配列または 23-kb 挿入配列を標的とする PCR 法の結果はパンデミッククローン菌株の定義とほぼ一致していた。

以上から、パンデミッククローン検出用 PCR 法の第 1 選択肢は GS-PCR と *tdh*-PCR を組み合わせる (いずれも陽性) 方法であり、第 2 選択肢としては 16-kb 挿入配列または 23-kb 挿入配列を検出する PCR 法が妥当であろうと判断された。

3. 活性のある挿入配列 (IS) がパンデミッククローンを検出する PCR 検査に与える影響

タイで同一患者から分離した菌株を比較

解析中に *tdh* 遺伝子に隣接する IS (ISVpa3 と命名) が *tdh* 配列の部分欠失をおこし、PCR 陰性菌株に変化したケースを発見した。

全ゲノム配列が解析・報告された KX-V237 株に ISVpa2 が 1 コピー存在するが、それが実際にトランスポーズ活性を持っており、subculture では最多 4 コピーの ISVpa2 が検出された。そのうちの 1 コピーが 16-kb 挿入配列中に挿入し、PCR において増幅フラグメントサイズが増加し非定型的結果を示す subclone を発見した。

4. 多数の分離株を対象にした網羅的 PCR (パンデミッククローン検出用) による検査

分離国 (24 カ国, 検疫所での推定感染国を含む) と分離年 (1995 - 2007) が異なる 579 菌株 (GS-PCR 陽性 374 株、陰性 205 株) を各種のパンデミッククローン検出用 PCR 法で検査した。GS-PCR 陽性を検出 (必ずしも必要ではないが、あわせて *tdh* 遺伝子陽性も検査するのが理想的) する方法が最も適していると判定された。この方法では、擬陰性を示す 1 株が検出されたが、特異性はこの方法が最も高く、23-kb 挿入配列検出 PCR 法 (擬陰性 2 株)、16-kb 挿入配列検出 PCR 法 (擬陰性 4 株)、ORF8 検出 PCR 法 (擬陰性 25 株) の順であった。ただし、23-kb 挿入配列検出 PCR 法では 29 菌株が擬陽性を示した

従って、パンデミッククローン検出用 PCR 法の第 1 選択肢はやはり GS-PCR 法 (必ずしも必要ではないが、*tdh*-PCR 法も併用) をする方法 (いずれも陽性) であり、理想的な検査法はさらに 23-kb 挿入配列検出用 PCR および 16-kb 挿入配列検出用 PCR も併用し確認する方法 (いずれも陽性あるいはいずれか

一方が陽性) であると結論した。

D. 考察

1. 今後さらに多くの菌株を対象に PCR 検査を継続し、より多くの菌株の検査結果に基づく網羅的解析により、各検査法の特異性の査定精度を高めたい。

2. 23-kb 挿入配列検出用 PCR および 16-kb 挿入配列検出用 PCR のそれぞれにおいて、異なる標的領域を検査して、擬陰性の比率を低下できるか否か検討する。

3. 腸炎ビブリオには、少なくとも 2 種類の活性のある IS の存在が確認されたので、今後も分離株のモニタリングを継続し、性状の変化したバリエーションの出現に注意を払うべきである。

E. 結論

系統発生的解析と PCR 法の解析結果を照らし合わせた結論と、過去 12 年間に 24 カ国の患者由来 579 菌株を対象に網羅的に PCR 検査を実施した結果に基づく結論が一致した。すなわち、新型クローンを同定するための PCR 検査法としては、GS-PCR 陽性を検出 (必ずしも必要ではないが、あわせて *tdh* 遺伝子陽性も検査するのが理想的) する方法が最も適していると思われる。その他に、GS-PCR 陽性より劣るが、23-kb 挿入配列の検出、次に 16-kb 挿入配列の検出も有用であると言えるが、前者ではある程度擬陽性が発生する可能性がある。また後者では、ISVpa2 の挿入による増幅 DNA サイズの増加がおこる可能性

があると言える。これらの PCR 法では、これらの問題がおこらないような領域内の他の標的部位の探索により特異性が改善されるかも知れない。

F. 健康危機情報

海外では新型クローンによる感染症は相変わらず猛威を振るっているが、最近我が国では、腸炎ビブリオ感染症患者数が激減している。厚労省が中心となって実施した魚介類の衛生監視を徹底する対策が功を奏した可能性が考えられる。この対策を継続するとともに、海外からの輸入魚介類中の新型クローン菌株のモニタリング検査を実施して情報を収集する必要があると考えられる。そのためには、本研究で有効性が確認できた GS-PCR 法をベースにした方法を用いることが適当であると言える。

G. 研究発表

[論文]

- 1) Vuddhakul, V., S. Soboon, W. Sunghiran, S. Kaewpiboon, A. Chowdhury, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2006. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (*Meretrix meretrix*, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with foodborne disease in southern Thailand. J. Food. Prot.

69(11):2615-2620.

- 2) Bhoopong, P., Palittapongarnpim, R., Pomwised, A., Kiatkittipong, M. Kamruzzaman, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, M. Ishibashi, and V. Vuddhakul. 2007. Variability of the properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from single patients. J. Clin. Microbiol. 45(5):1544-1550.
- 3) Muhammad, K., and M. Nishibuchi. 2008. Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in *Vibrio parahaemolyticus*. Gene 409:92-99.
- 4) Nishioka, T., M. Kamruzzaman, M. Nishibuchi, and Y. Satta. 2008. On the origin and function of an insertion element VPAl-1 specific to post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* strains. Genes & Genetic Systems, in press.

[学会発表]

- 1) Nishioka, T., Mashimo-Matsumoto, C., Chowdhury, A., Kamruzzaman, M., Nakaguchi, Y., and Nishibuchi. Phylogeny and a characteristic of the pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. 38th Joint Conference on Cholerae and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Boston, MA, USA. November 30 - December 2, 2005.
- 2) Kamruzzaman, m., P. Bhoopong, V. Vuddhakul, and M. Nishibuchi. Insertion sequences involved in *tdh* gene deletion and other genetic rearrangements in *Vibrio parahaemolyticus*. 41th Joint Conference on Cholerae and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Gifu, Japan. November 5 -7, 2006.
- 3) Wootipoom, N., P. Bhoopong, M. Nishibuchi, A. Kiatkittipong, and V. Vuddhakul. Increase in *tdh+* *trh+* strains among the *Vibrio parahaemolyticus* isolates from Hat Yai hospital, Thailand during the 2000 - 2005 period. 41st Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Gifu, Japan. November 5 -7, 2006.
- 4) Vuddhakul, V., F. Kasuga, and M. Nishibuchi. Marine environment is the source of food and potentially hazardous organisms for humans: a collaborative risk assessment study on a seafood-borne bacterial infection in southern Thailand. 8th Kyoto Univ. Intl. Symposium, , 2006. Bangkok, Thailand. November 23-25, 2006.

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行年
Matsumoto M, Suzuki Y, Nagano H, Yatsuyanagi J, Kurosawa H, Kobayashi K, Yamaoka K, Horikawa K, Kudaka J, <u>Terajima J.</u> <u>Watanabe H.</u> Miyazaki Y.	Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis analysis performed at selected prefectural institutes of public health for use in PulseNet Japan.	Jpn J Infect Dis.	58	180-3	2005
Kudaka, J., Asato, R., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Kuniyosi, H., Kinjo, Y., <u>Terajima, J.,</u> <u>Watanabe, H.,</u> Kobayashi, J., Swaminathan, B., Braden, CR., and Dunn, JR.	Escherichia coli O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation -- Okinawa, Japan, February 2004.	Morbid. Mortal. Weelky Rep.	54	40-42	2005
Liang SY, Watanabe H, Terajima J, Li CC, Liao JC, Tung SK, Chiou CS.	Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing of Shigella sonnei.	J Clin Microbiol.	45(11)	3574-80.	2007
Terajima J, Tosaka N, Ueno K, Nakashima K, Kitsutani P, Gaynor MK,	Shigella sonnei outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii.	Jpn J Infect Dis.	Aug 59(4)	282-3	2006

Park SY, Watanabe H.					
<u>J. Terajima</u> , H. Izumiya, S. Iyoda, J. Mitobe, M. Miura, H. Watanabe.	Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in Japan	Foodborne Pathogens and Disease.	3(1)	68-73	2006
KL. Cooper, CK. Luey, M. Bird, <u>J. Terajima</u> , GB. Nair, KM. Kam, E. Arakawa, A. Safa, DT. Cheung, CP Law, H. Watanabe, K Kubota, B. Swaminathan, EM Ribot.	Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of <i>Vibrio cholerae</i> .	Foodborne Pathogens and Disease.	3(1)	51-8	2006
M. Morita, K. Mori, K. Tominaga, J. Terajima., K. Hirose, H. Watanabe, H. <u>Izumiya</u> .	Characterization of lysine decarboxylase-negative strains of <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis disseminated in Japan.	FEMS Imunol. Med. Microbiol	46	381-385	2006
<u>Iyoda, S.</u> , and Watanabe, H.	ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> .	J Bacteriol.	187	4086-4094	2005
Toma, C., Higa, N., <u>Iyoda, S.</u> , Rivas M.,	The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> are present in other	Res Microbiol.	in press		2008

and Iwanaga, M:	diarrheagenic <i>E. coli</i> and in the standard <i>E. coli</i> collection of reference (ECOR) strains.				
Iguchi, A., <u>Iyoda S.</u> , Watanabe, H. and Osawa, R	O Side Chain Deficiency Enhances Sensitivity of <i>Escherichia coli</i> to Shiga Toxin 2-Converting Bacteriophages.	<i>Current Microbiology,</i>	54	14-19	2007
Tokunaga, A., Kawano, M., Okura, M., <u>Iyoda, S.</u> , Watanabe H., and Osawa, R.	Identification of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157-Specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis.	<i>Microbiology and Immunology,</i>	51	883-888	2007
<u>S. Iyoda.</u> , N. Kozumi, H. Satou, Y. Lu, T. Saitoh, M. Ohnishi, H. Watanabe.	The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> .	J Bacteriol.	188	5682-5692	2006
Y. Lu, <u>S. Iyoda</u> , H. Satou, K. Itoh, T. Saitoh, H. Watanabe.	A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> .	. Infec. Immun.	74	5747-5755	2006
G. Leotta, N. Deza, J. Origlia, C. Toma, I. Chinen, E. Miliwebsky, <u>S. Iyoda</u> , S. Sosa-Estani,	Detection and characterization of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in captive non-domestic mammals.	Vet. Microbiol	118	151-157	2006

M. Rivas.					
<u>Mitobe, J.</u> Morita-Ishihara, T., Ishihama, A., Watanabe, H.		J. Biol. Chem.	283(9)	5738-47	2008
<u>M. Morita.</u> K. Ito, K. Hirose, H. Takahashi, K. Shimuta, J. Terajima, M. Ohnishi, M. Harada, M. Matsuzaki, H. Watanabe, H. Izumiya.	Development of a real-time PCR assay for detection of <i>gyrA</i> mutations associated with reduced susceptibility to ciprofloxacin in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi and Paratyphi	A.Microbiol. Immunol	50	707-711.	2006
Okura, M., <u>Osawa, R.</u> , Tokunaga, A., Morita, M., Arakawa, E., and Watanabe, H.	Genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of pandemic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	Microbiology and Immunology	in press.		2008
Okura, M., <u>Osawa, R.</u> , Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H.	Identification of pandemic group <i>Vibrio parahaemolyticus</i> specific DNA sequence by genomic subtraction.	Journal of Clinical Microbiology	43(7)	3533 -3536	2005
Iguchi, A., Iyoda, S., Terajima, J., Watanabe, H., and Osawa, R.	Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the <i>Escherichia coli</i> O157:H7 chromosome.	Gene	10(372)	199-207	2006
J. Okuda, <u>S. Yamasaki</u> , T. Ramamruthy	The potent antibacterial activity of sitafloxacin against fluoroquinolone-resistant clinical	Microbiol. Immunol	51	467-469	2007.

K. Sato.	isolates of <i>Vibrio cholerae</i> O1.				
S. Haldar, S. Chatterjee, M. Vijayakumaran, <u>S. Yamasaki</u>	Isolation of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio cholerae</i> (Non-O1 and O139) from moribund shrimp (<i>Penaeus monodon</i>) and experimental challenge study against post larvae and juveniles.	Ann. Microbiol	57	55-60	2006
R. Chakraborty, S. Sinha, K. Mukhopadhyay, M. Asakura, <u>S. Yamasaki</u> , S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, T. Ramamurthy	Species-specific identification of <i>Vibrio fluvialis</i> by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of <i>toxR</i> gene.	J. Med. Microbiol	55	805-808	2006
A. Ghosh, D.R. Saha, K.M. Hoque, M. Asakura, <u>S. Yamasaki</u> , H. Koley, S.S. Das, M.K. Chakrabati, A. Pal.	Enterotoxigenicity of 45-kDa matured and 35-kDa processed forms of hemagglutinin protease purified from a cholera toxin gene negative <i>Vibrio cholerae</i> non-O1, non-O139 strain.	Infect. Immun	74	2937 - 2946	2006
L. Shi, K. Fujihara, T. Sato, H. Ito, P. Garg, R. Chakrabarty, T. Ramamurthy, G.B. Nair, Y. Takeda <u>S. Yamasaki</u> .	Distribution and characterization of integrons in various serogroups of <i>Vibrio cholerae</i> strains isolated from diarrheal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India	J. Med. Microbiol.,	55	573-583	2006

P. Tapchaisri, M. Na-Ubol, W. Tiyasuttipan, S.C. Chaiyaraj, <u>S. Yamasaki</u> , T. Wongsaroj, H. Hayashi, G.B. Nair, M.Chomgsa-Nguan, H. Kurazono and W. Chaicumpa.	Molecular typing of <i>Vibrio cholerae</i> O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis.	J. Health Popul. Nutr.,	in press		2008
Tobe T., Ando H., Ishikawa H., Abe H., Tashiro K., <u>Hayashi T.</u> , Kuhara S. & Sugimoto N.	Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> pathogenicity.	Mol. Microbiol.	58	320-333	2005
Sakaguchi Y., <u>Hayashi T.</u> , Kurokawa K., Nakayama K., Oshima K., Fujinaga Y., Ohnishi M., Ohtsubo E., Hattori M. & Oguma K.:	The genome sequence of <i>Clostridium botulinum</i> type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	102	17472 -17477	2005
<u>林哲也</u>	細菌の病原性遺伝子システムの獲得と進化	蛋白質 核酸 酵素	50(16)	2204-2209	2005
大岡唯祐, 小椋義俊, <u>林哲也</u>	大腸菌 O157 のゲノム研究とその応用.	臨床微生物迅速診断研究会誌 (JARMAM)	16(2)	179-181	2005
<u>林哲也</u>	ゲノムが語る細菌の病原性	細胞工学	24(12)	1302-1306	2005
Nakanishi N., Abe H., Ogura Y., <u>Hayashi T.</u>	ppGpp with DksA controls gene expression in the LEE pathogenicity island of enterohaemorrhagic <i>Escherichia</i>	Mol. Microbiol	61(1)	194-205	2006

Tashiro K., Kuhara S., Sugimoto N. & Tobe T	<i>coli</i> through activation of two virulence regulatory genes.				
T. Tobe, SA. Beatsn, H. Taniuchi, H. Abe, B. Bailey. M. Fivian, R. Younis, S. Matthews. O. Marches, G. Frankel, T. <u>Hayashi</u> . MJ. Pallen.	An extensive repertoire of type III secretion effectors in <i>Escherichia coli</i> O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination.	Proc Natl Acad Sci USA	103	14941-14946	2006
Y. Ogura, K. Kurokawa, T. Ooka, K. Tashiro, T. Tobe, M. Ohnishi, K. Nakayama, T. Morimoto, J. Terajima, H. Watanabe., S. Kuhara, T. <u>Hayashi</u> .	Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning.	DNA Res	13	3-14	2006
Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H.,	TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization	Infect. Immun.	75	604-612	2007

Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Robins-Browne, R., <u>Hayashi, T.</u> Frankel, G					
<u>T. Hayashi.</u>	Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity	Science	313	772-773	2006
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 RR., <u>Hayashi T. &</u> Frankel G.:	TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization.	Infect. Immun.	75(2)	604-612	2007
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., <u>Hayashi T. &</u> Frankel G.:	Characterization of <i>tccP2</i> carried by atypical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> .	FEMS Microbiol. Lett.	271	126-135	2007

Whale, A., Hernandes, RT., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, MA., Ogura, Y., Phillips, AD., Beutin, L., Gomes, TA., <u>Hayashi, T.</u> , Frankel, G.:	TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> .	Microbiology.	153	1743-1755	2007
Morita H., Kuwahara T., Okushima K., Sasamoto H., Itoh K., Hattori M., <u>Hayashi T.</u> & 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
Ogura Y., Ooka T., Asadulghani., Terajima J., Nougayrède J-P., Kurokawa K., Tashiro K., Tobe T., Nakayama K., Kuhara S., Oswald E., Watanabe H. & <u>Hayashi T.</u>	Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> strains of O157 and non-O157 serotypes.	Genome Biol.	8(7)	R138	2007
Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H.,	Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes.	DNA Res.	14	169-181	2007

Sharma V.K., Srivastava T.P., Taylor T.D., Noguchi H., Mori H., Ogura Y., Ehrlich D.S., Itoh K., Takagi T., Sakaki Y., <u>Hayashi T.</u> & Hattori M.					
Loukiadis E., Nobe R., Herold S., Tramuta C., Ogura Y., Ooka T., Morabito S., Kerouredan M., Brugere H., Schmidt H., <u>Hayashi T.</u> & Oswald E.	Distribution, functional expression genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> .	J. Bacteriol.	190(1)	275-285	2008
Iguchi A., Ooka T., Ogura Y., Asadulghani, Nakayama K., Frankel G. & <u>Hayashi T.</u>	Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of <i>Escherichia coli</i> O55 strains belonging to three distinct lineages.	Microbiology	154	559-570,	2008
Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imaohji H., Ichimura M., <u>Hayashi T.</u> , Shiota H	High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species <i>Corynebacterium macginleyi</i> .	J. Clin. Microbiol.	46	527-532	2008
Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., <u>Hayashi, T.</u>	Comparative genomic analysis using microarray demonstrates strong correlation between presence of Vp-PAI and pathogenicity in Kanagawa	Infect. Immun.	76	1016-1023	2008

Honda, T., & Iida, T	phenomenon-positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .				
Abe H., Miyahara A., Oshima T., Tashiro K., Ogura Y., Kuhara S., Ogasawara N., <u>Hayashi T.</u> & Tobe T.	Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of <i>Escherichia coli</i> .	DNA Res.	doi:10	1093/dnares/dsm033	2008
<u>Hayashi T.</u> , Ooka T., Ogura Y. & Asadulghani	Genomic view on the evolution of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> . (Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. Edited by Baquero, F., Nombela C., Cassell, C.H. & Gutierrez, J.A..2007)	ASM Press. Washington, D.C.		407-419	2007
内山郁夫, <u>林哲也</u>	細菌ゲノム解読の進展	細胞工学 別冊「比較ゲノム学から読み解く生命システム」秀潤社, 東京		153-160	2007
<u>林哲也</u>	微生物における比較ゲノム研究の進展	実験医学	25(2)	266-272	2007
Vuddhakul, V., S. Soboon, W. Sunghiran, S. Kaewpiboon, A. Chowdhury, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, and M. <u>Nishibuchi</u> .	Distribution of virulent and pandemic strains of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in three molluscan shellfish species (<i>Meretrix meretrix</i> , <i>Perna viridis</i> , and <i>Anadara granosa</i>) and their association with foodborne disease in southern Thailand.	J. Food. Prot	69(11)	2615-2620	2006.
Pavathi, A., H.S. Kumar, A. Bhanumathi, M. Ishibashi,	Molecular characterisation of thermostable direct haemolysin-related haemolysin (TRH)-positive <i>Vibrio</i>	Environ. Microbiol..	8(6):	997-1004	2006

M. <u>Nishibuchi</u> , I. Karunasagar,	<i>parahaemolyticus</i> from oysters in Mangalore, India.				
Gomez Gil, B., E. Llausas-Magaña, R. Romero, A. Espinoza, A. Garcia-Gasca, <u>M. Nishibuchi</u> , H.Cabanillas-Beltra n, M. Ishibashi	Outbreak of Gastroenteritis Caused by the pandemic <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> O3:K6 in Mexico.	FEMS Microbiol. Lett	265(1):	76-80.	2006
Bhoopong, P., Palittapongarnpim, R., Pomwised, A., Kiatkittipong, M.Kamruzzaman, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, M. Ishibashi, and V. Vuddhakul.	Variability of the properties of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains isolated from single patients.	J. Clin. Microbiol.	45(5)	1544-1550	2007
Muhammad, K., and M. Nishibuchi.	Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> .	Gene	409	92-99	2008
Nishioka, T., M. Kamruzzaman, M. Nishibuchi, and Y. Satta.	On the origin and function of an insertion element VPAl-1 specific to post-1995 pandemic <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> strains.	Genes & Genetic Systems,	in press		2008