

病原細菌のゲノム生物学：病原微生物の生存戦略

太田敏子

近年の高度に構築されたゲノム解読の工程により、約200種類の微生物ゲノムが解読され、主たる病原微生物のゲノム配列が明らかになった。病原微生物の病原性は、菌種により多種多様であり、菌種によっては遺伝学的な解析が難しくブラックボックスである部分も多くあったが、ゲノム解読から病原体側の病原性を分子レベルで見通すことができるように理解が進んだ。感染症は、病原微生物の生存戦略との闘いである。その巧妙な生存戦略には、接着システム、毒素や耐性因子の付加・取り込みシステム、輸送系システム、分泌システム、ゲノムDNAの再編システムなどがあり、病原微生物はこれらを発達させることにより生き残ってきている。本稿では、ゲノムから見えてきた病原微生物の生物像と生存戦略について、筆者らの最近の知見を交えて概観する。

はじめに

微生物がヒト（宿主）に寄生して増殖し、宿主細胞にその病原性を発揮することを「感染」という。この病原微生物とヒトとの戦いは、古代から現代に至るまで気の遠くなるような長い歴史がある。古代エジプト人が傷の治療に黴びたパンを用いたこと、16世紀には経験的に鎮痛剤としてヤナギの芽の抽出物をマラリアの治療にキナノキを用いたことなど、その時代の人間との攻防戦が垣間見える。19世紀後半になってパスツールとコッホらにより病原細菌が次々に発見されて病気の実体が明らかになっていく。そして、1929年のペニシリンの発見は、感染症を征圧したかに見えた。しかし、そのわずか数年後には抗生物質に対する耐性菌が見出され、多剤耐性菌の全盛時代を迎えることになる。これはβラクタマーゼを初めとするプラスミド上の酵素の仕業であった。世界中の研究者はこぞって薬剤耐性のしくみを研究し、新たな抗生物質を開発して耐性菌の制圧に立ち向かった。しかしながら、新薬の開発と耐性菌の出現はイタチごっこであった。こうして現在まで60年もの間、各種の抗生物質は10年を単位として耐性菌に

制覇されていった。そして、現在は、院内感染、日和見感染、新興・再興感染症など新しい形の感染症で、細菌は人類を苦しめている。

分子生物学は、多くの生物科学の分野に非常に大きな影響を及ぼしたが、病原微生物学の分野も例外ではない。この分子生物学とめざましい先端技術の開発は、100～500万塩基対をもつ1種類の微生物全ゲノムをわずか1、2ヶ月で解読することを可能にした。このことは、病原細菌の病原性を細胞生物学の分子のレベルで語り、従来の薬剤にないコンセプトの創薬の考え方を創出できるように変えた。

生物の生命現象は遺伝情報により設計されるが、その遺伝情報を担っている分子全体をゲノムとよんでいる。原核細胞から真核細胞にいたるまで生物細胞の設計情報は、ゲノムDNAの塩基配列に織り込まれていることはいまや誰でも知っている常識である。ワトソン・クリックによるDNAの発見がわずか50年あまり前の1953年のことであるのが信じられない感がある。DNAがもつ特徴である二重らせん構造と可逆性により、大腸菌細胞を宿主としてさまざまな人為的操作を加えることが可能となり、いわゆる組換えDNA技術が飛躍的に展開し現在に至っている。

しかしながら、各種の病原性を発揮する一般の病原微生物は、それらがもつ病原性と簡単に外来DNAを受け入れない性質のために、細胞遺伝学的な解析が遅れた。もっとも感染症を起こす病原体は駆逐すればよかったので、個の生物学というより「制圧」の研究に偏ったのは当然のこと

であろう。20世紀末から21世紀初頭のゲノム時代からポストゲノム時代に入った今、われわれは病原細菌も丸ごと1個の細胞として捉え、病原性を制圧する方策を創出しなければならない。それは病原性細菌のゲノム解析に携わった研究者としての責務かもしれない。

本稿では、この数年で解読された200種類を超える微生物のうち、病原細菌に絞ってそのゲノムと病原戦略について概観してみたい。

1. ゲノムの基本構造

細菌のゲノムは多くの場合、1個の環状二本鎖DNAであり、その長さは80~800万塩基対である(表1)。ゲノム上にコードされる遺伝子の数も700個~7,900個と菌種によってかなり幅がある。また、1個のゲノムに加えて付加的な遺伝情報である3~5万塩基対のプラスミドを併せもっているものが多い。しかし、これまで細菌は1個の核様体(染色体)をもっていると考えられていたが、驚くべ

きことにコレラを起こすビブリオ属の一種であるコレラ菌(*Vibrio cholerae*)には296.1万塩基対と107.3万塩基対の二つの環状核様体があることを、米国グループがゲノム解析で明らかにした²⁸⁾。2000年のことである。この報告に少し遅れて、同じビブリオ属である食中毒を起こす腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)も328.8万塩基対と187.7万塩基対の二つの核様体をもっていることが日本のグループにより明らかにされた²⁹⁾。その後の解析で、ビブリオ属の菌種はどれも二つの核様体を保持していることが解明されたものの、海洋細菌であることが共通している数あるビブリオ属において、複数の核様体の生物学的意義はなお不明のままである。

細菌ゲノムの基本構造においてコードされている遺伝子の位置とその方向性を見ると、とくに、筆者らが解析した281.4万塩基対の比較的小さなゲノムをもつ黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)では、ゲノムの輪のちょうど半分まで複製される遺伝子の数が顕著に片鎖に偏っている

表1 病原細菌のゲノム比較

病原細菌の種類	ゲノムサイズ (塩基対)	遺伝子数 (個)	GC含量 (%)	読枠密度 (%)	rRNA (個)	tRNA (個)	文献	
<i>Bacillus subtilis</i> (168)	4,214,630	4,225	43.5	88.3	32	87	1)	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CWL029)	1,230,230	1,122	40.6	90.9	3	38	2)	
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar D)	1,042,519	940	41.3	91.3	6	39	3)	
<i>Clostridium perfringens</i> (13)	3,031,430	2,786	28.6	85.2	27	98	4)	
<i>Clostridium tetani</i> (E88)	2,799,251	2,460	28.7	87.2	19	53	5)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (V583)	3,218,031	3,333	37.5	92.0	12	68	6)	
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7 EDL933)	5,528,445	5,453	50.4	88.4	22	107	7)	
<i>Haemophilus influenzae</i> (Rd KW20)	1,830,138	1,788	38.1	90.2	18	62	8)	
<i>Helicobacter pylori</i> (26695)	1,667,867	1,630	38.9	92.0	7	36	9)	
<i>Lactococcus lactis</i> (IL1403)	2,365,589	2,425	35.3	87.2	18	61	10)	
<i>Leptospira interrogans</i> (serovar Lai 56601)	4,332,241	4,401	35.0	78.4	5	36	11)	
<i>Listeria monocytogenes</i> (EGD-e)	2,944,528	2,940	38.0	90.3	18	67	12)	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37Rv)	4,411,532	4,048	65.6	91.5	3	47	13)	
<i>Mycobacterium leprae</i> (TN)	3,268,203	2,770	57.8	77.0	3	47	14)	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (M129)	816,394	733	40.0	89.4	19	62	15)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA01)	6,264,404	5,651	66.6	89.8	13	58	16)	
<i>Rickettsia prowazekii</i> (Madrid E)	1,111,523	886	29.0	77.2	3	34	17)	
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	4,857,432	4,622	52.2	88.4	19	85	18)	
<i>Shigella flexneri</i> (2a2457T)	4,599,354	4,577	50.9	87.4	22	100	19)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (N315)	2,814,816	2,669	32.8	84.6	16	62	20)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	2,499,279	2,495	32.1	84.8	16	60	21)	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (JCS1435)	2,685,015	2,753	32.8	87.1	16	60	22)	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305)	2,516,575	2,527	33.2	85.0	20	61	23)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (TIGR4)	2,160,842	2,303	39.7	88.6	12	58	24)	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SF370, M1)	1,852,441	1,805	38.5	87.0	12	57	25)	
<i>Streptomyces coelicolor</i> (A3(2))	8,667,507	7,912	72.1	89.7	16	70	26)	
<i>Treponema pallidum</i> (pallidum Nichols)	1,138,011	1,095	52.8	95.1	6	45	27)	
<i>Vibrio cholerae</i> (El-Tor N16961)	2,961,149	2,889	47.7	90.9	25	94	28)	
	Genome-2	1,072,315	1,119	46.9	87.1	0	4	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Genome-1	3,288,558	3,223	45.4	88.5	31	122	29)
(RIMD2210633)	Genome-2	1,877,212	1,769	45.4	87.4	3	14	
<i>Yersinia pestis</i> (CO92)		4,653,728	4,043	47.6	85.4	19	78	30)

() 内は菌株名を示す。

表の数値は、すべての種について現在のゲノムデータを元に論文の数値を改訂してある。また、数値はゲノム本体のみの情報であり、菌が保有しているプラスミドデータは除いてある。

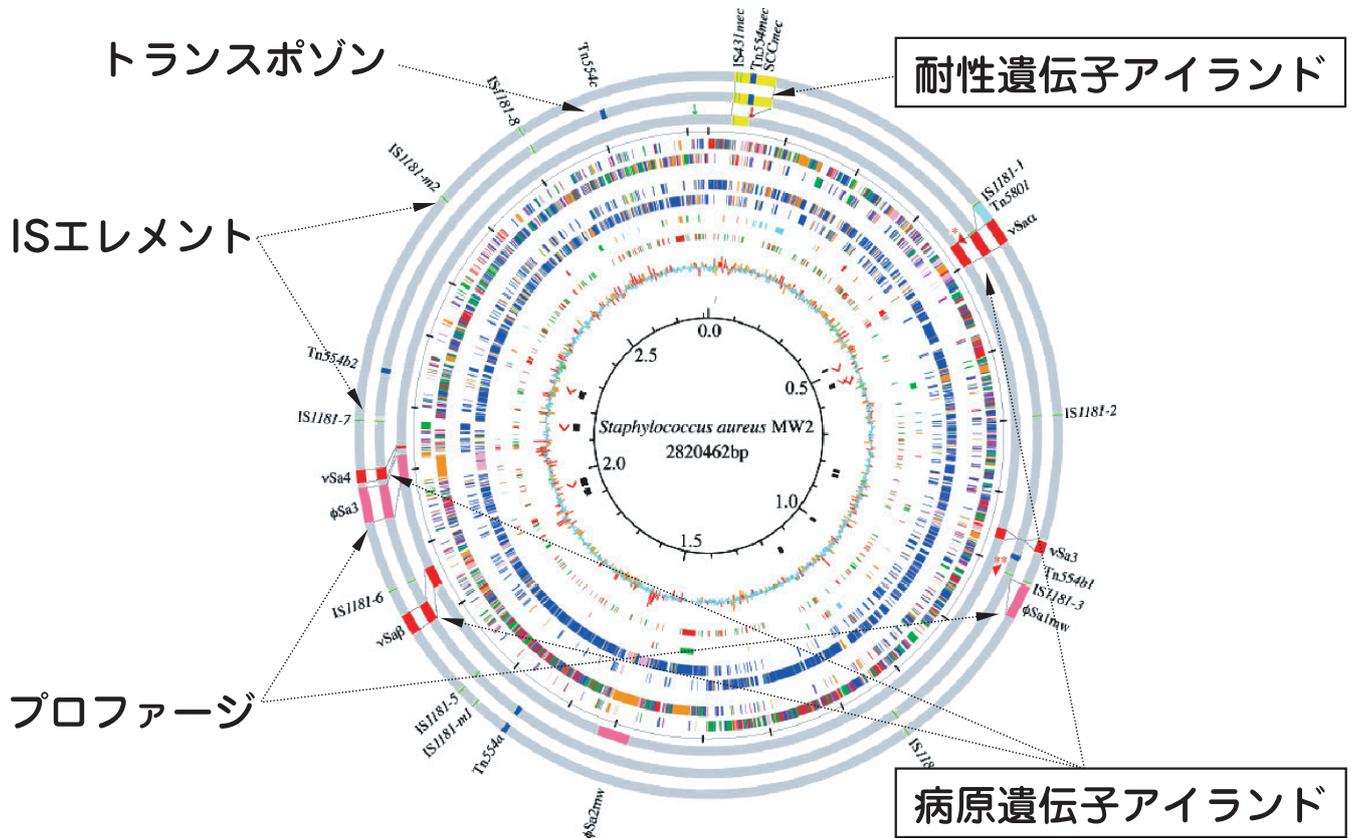


図1 黄色ブドウ球菌のゲノム³¹⁾より改変

基本構造の随所に可動性エレメント（トランスポゾン，ISエレメント，プロファージ）を保有している。毒素遺伝子や薬剤耐性遺伝子はクラスターで存在しており，それぞれ「病原遺伝子アイランド」や「耐性遺伝子アイランド」と命名されている。輪は外側からそれぞれ，最外1番目：MRSA Mu50株ゲノムアイランドの位置，2番目：MRSA N315株ゲノムアイランドの位置，3番目：MRSA MW2 315株ゲノムアイランドの位置，4番目：ORF数100個ずつの目盛り，5番目：ORF（+鎖）の位置，6番目：ORF（-鎖）の位置，7番目：BLASTのベストヒット（+鎖），8番目：BLASTのベストヒット（-鎖），9番目：病原因子ORFの位置，10番目：病原因子ORFのベストヒット，11番目：GCスキュー（赤矢じり）：rRNAの位置，黒バー：rRNAの位置，最内12番目：塩基対番号，を示す。

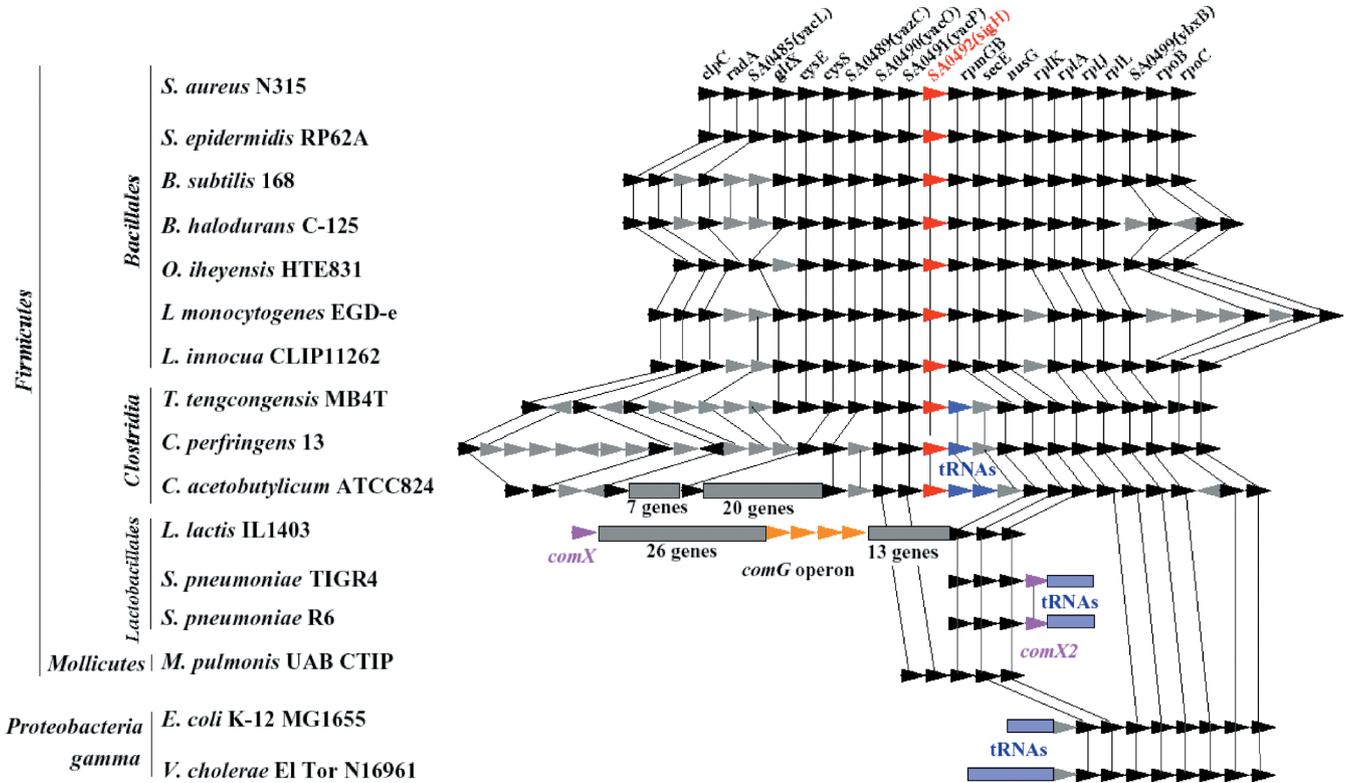


図4 SigH 遺伝子の進化³⁹⁾より
 黄色ブドウ球菌 *S. aureus* のゲノム上にコードされた遺伝子の並びとグラム陽性菌属の遺伝子の並びを比較しオーソログを線で結んだ。 *S. aureus* の機能未知遺伝子 SA0492 (赤矢じり) が他の菌種の *sigH* 遺伝子に相当する。

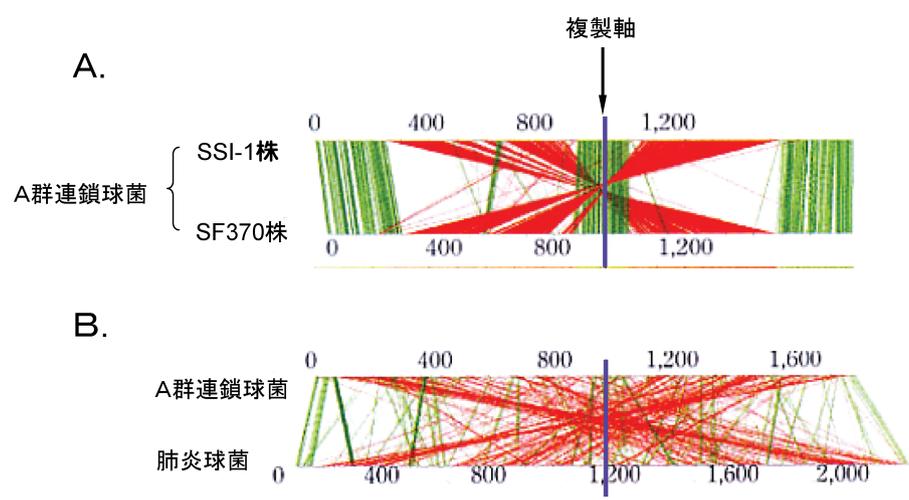


図10 ゲノム DNA の逆位⁵⁰⁾より
 (A) A 群連鎖球菌 *Streptococcus pyogenes* の菌株間における遺伝子の位置の比較。(B) A 群連鎖球菌 *S. pyogenes* と肺炎球菌 *S. pneumoniae* 間の遺伝子の位置の比較。赤い線で結んだものは複製軸 (矢印) の反対側に位置が変わっている遺伝子を示し、緑の線で結んだものは位置が保存されている遺伝子を示す。

(図1, 外側から5, 6番目の輪)^{20,31)}. このことは, 方向性が異なるリーディング鎖とラギング鎖が鋳型となって複製起点 (*oriC*) から時計回りと反時計回りの同時進行で複製が行われていることを如実に示しており, 複製の同時進行性を納得できる.

一般的に細菌のゲノムは, 表1に示すような構成で, 遺伝子のコード領域の占める割合は非常に高く, およそ85~87%である. 真核生物のゲノムではわずか5%がコード領域で, 非コード領域のほうが圧倒的に多く占めているのとはずいぶん異なっている. これは遺伝子の構造の違いによるものである. すなわち, 細菌の遺伝子は, インترون構造, 偽遺伝子 (*pseudogene*) (例外的にライ菌 *Mycobacterium leprae* とリケッチアは多くの *pseudogene* を保有する), インバーテドリピート構造などの進化過程の痕跡をもたないことに加えて, 機能関連遺伝子が単一転写産物にまとまっているオペロン構造をとっている. 約15%の非コード領域には, 機能性RNAを除けば調節領域, プロモーター領域, Shine-Dalgarno配列 (SD配列) があるのみである. この遺伝子のコード領域の占める割合が高いことにより, 菌種間で全ゲノムを比較するいわゆる「比較ゲノム」の手法で病原性など表現型の違いに関わる標的遺伝子を絞り込むことができる. 薬剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や病原性大腸菌 O157 がそのよい例である^{20,7)}. このように, 種間で共通点と相違点を解析することにより, 菌細胞を1個の生物体として理解することができる. 多くの種内菌株がゲノム解読されているブドウ球菌を例にとってみよう.

ブドウ球菌には代表的な三種の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*), 表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*), 腐性ブドウ球菌 (*S. saprophyticus*) がよく知られている. ところが, これらは形態的には全く同じブドウの房状の球菌であるにもかかわらず, ヒトに対する病原性は全く異なっている. 黄色ブドウ球菌は各種の毒素を産生して食中毒や化膿性疾患を起こし, 腐性ブドウ球菌は尿路感染症を起こすが, 表皮ブドウ球菌はほとんど病原性を示さない. 近年, この三種のブドウ球菌について, 病原性のある黄色ブドウ球菌と腐性ブドウ球菌のゲノムは筆者らのグループで^{20,23)}, 表皮ブドウ球菌のゲノムは中国上海のグループにより解読された²¹⁾. そこで, 菌の「病原性」を分子で捉えるために, それら三種間のゲノムを比較してみると, 図2Aに示すように2,400~2,600個の遺伝子のうち1,640個が共通の遺伝子で, 約500~600個がそれぞれの種特異的な遺伝子であった. 機能未知である約3分の1の遺伝子を除いて, 全遺伝子を三種間で機能別に比較してみると, さらに病原性関連遺伝子が特定されてくる (図2B). 図に示されるように, 黄色ブドウ球菌には100個近い数の病原性関連遺伝子があることが解る. これは驚くべき数字である. 通常, これらが全部発現しているとは限らないが, 微妙に異なるそれぞれの発動条件が揃ったときはかくも多様な病態が予測されるわけである.

2. ゲノムの多様性と可動性

前項で述べたように細菌のゲノムは80~800万塩基対と菌種によりかなりの幅があり, 非常に多様性に富んでい

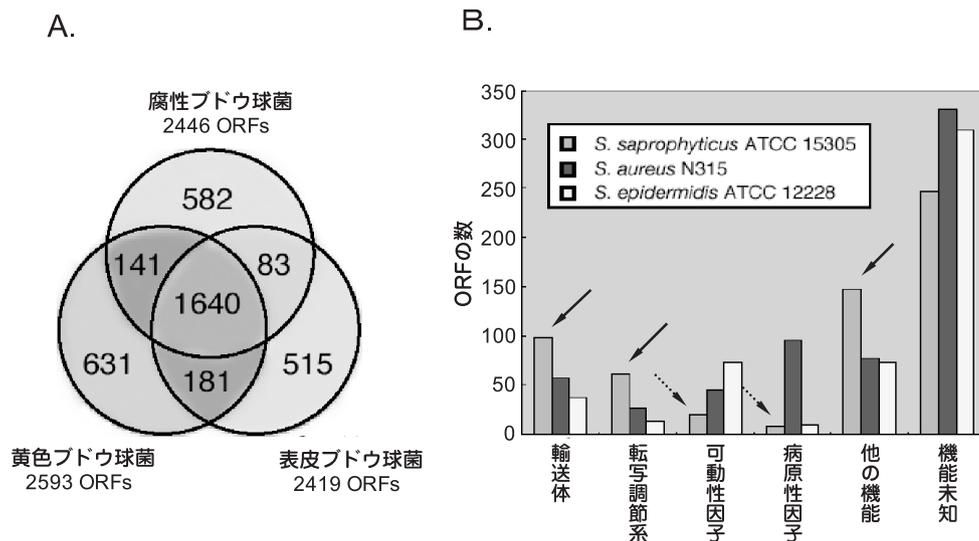


図2 ブドウ球菌属三種のゲノム比較²³⁾より改変

(A) 共通な遺伝子と菌種特異的な遺伝子 (B) 三種のブドウ球菌におけるオルソログの機能分類. 黄色ブドウ球菌は多くの病原因子と可動性エレメントを保有している. 腐性ブドウ球菌は病原因子が少ない (点線の矢印). 尿路環境に適応している腐性ブドウ球菌は輸送系や他の機能の遺伝子, 調節系が強化されている (実線の矢印) が, 病原因子や可動性エレメントが少ない.

る。このうち細菌細胞の生存に必須な遺伝子は271個相当であることが、枯草菌において遺伝子破壊株を作成することにより明らかにされた(表2)³²⁾。大まかにいうと、この数は全遺伝子数の1割にすぎない。では、たった271個の遺伝子で細菌細胞の生命が成り立つかというそうではない。残りの9割の遺伝子は、単細胞がいろいろな過酷な環境に曝されたとき、生き残るための「あの手この手のシステム」として保有しているのである。病原細菌では、このオルタナティブな生存手段こそ「病原性」にほかならず、

その病原性は種によって多種多様であり、ヒトに多様な疾患を引き起こす。

異なったゲノム間で相同遺伝子を比較する場合、注意しなければならないことがある。それは、細菌では同一ゲノムの中にDNA配列が類似している多数(数個~数十個)の遺伝子があることである。これらを類似遺伝子(パラログ)とよび、DNA配列が類似していて種分化の過程において種間で同一遺伝子と考えられるものを直系遺伝子(オルソログ)とよんで区別している。多くの場合、パラログは外来性である。薬剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の臨床分離株のようにヒトの体を通ってきた菌株のゲノムを比較すると、分離された年次経過に沿ってパラログが付加されていることが解る(図3)²²⁾。このような多様性は、MRSAに限らず病原性がなかった菌株が突如として強い病原性を発揮して社会不安を引き起こすような病原菌に見られる。大腸菌O157株³³⁾、コレラ菌O1株³⁴⁾、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌³⁵⁾、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)³⁶⁾、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)³⁷⁾などがそのよい例である。それぞれ標準株と標的株のゲノムを比較すると、顕著なゲノムの多様性が観察できる。

一方、異種間の細菌ゲノムの多様性からは、ゲノムの進

表2 枯草菌の必須遺伝子

必須機能	遺伝子数(個)
DNA代謝	27
RNA代謝	14
タンパク質合成	95
細胞膜合成	16
細胞壁合成	28
細胞分裂	10
解糖系	8
呼吸系	22
核酸合成系	10
補助因子	15
その他の機能	15
機能不明	11
合計	271

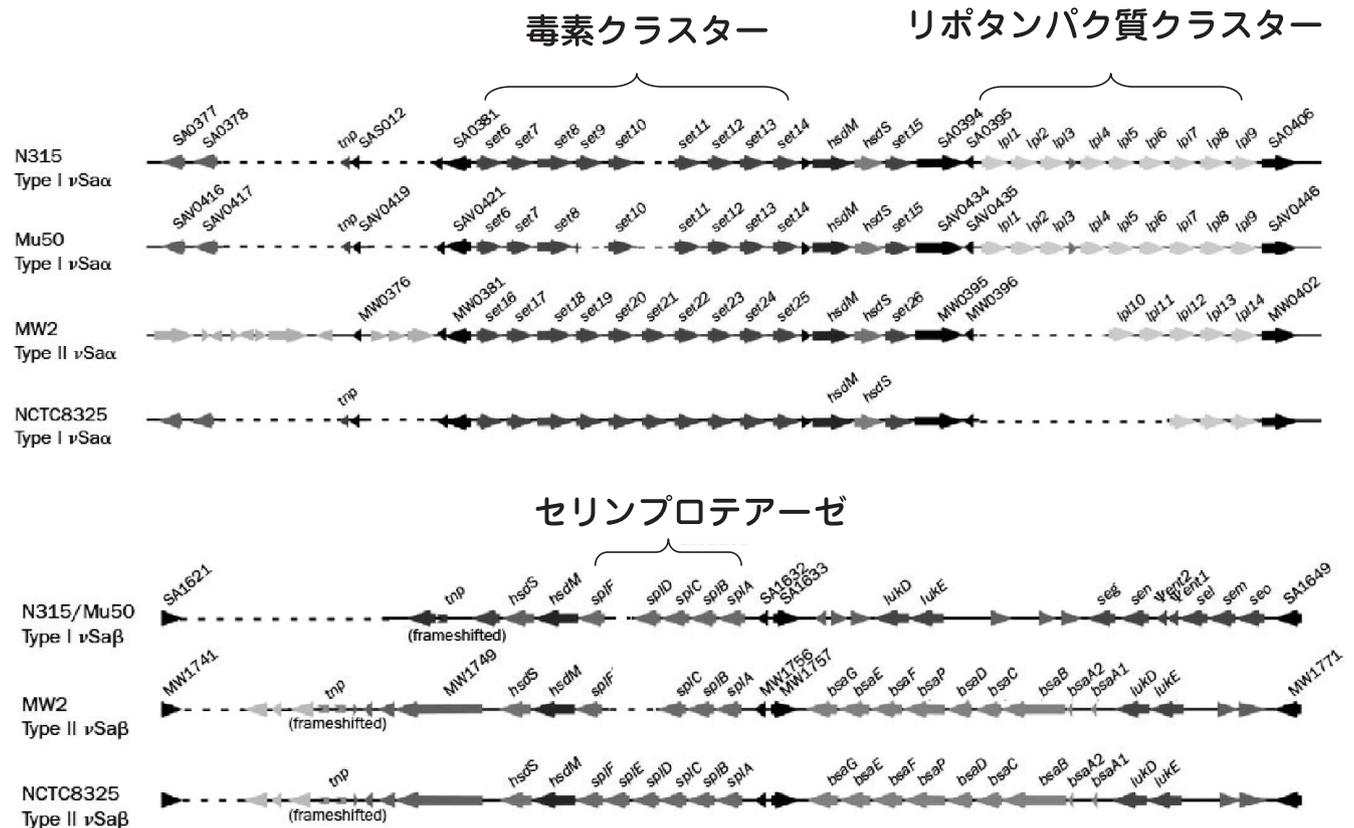


図3 黄色ブドウ球菌の菌株間における病原遺伝子アイランドのパラログの付加³¹⁾より
臨床分離MRSA株であるN315株, Mu50株, MW2株, 標準株NCTC8325株の病原遺伝子アイランドのパラログを比較している。毒素, リポタンパク質, セリンプロテアーゼなどの病原因子はクラスターをなして, 菌株間で付加されている。

化が見えてくる。筆者らのグループにおけるゲノム進化の研究の一端を紹介しよう。細菌の核様体は酸化ストレスに曝されると DNA 分子がコンパクトな高次構造を形成する。この現象に関与するのが Dps 遺伝子であることが解った³⁸⁾。各種の細菌の Dps 遺伝子の存在と核様体の構造変化の関係を調べると、菌の進化過程が解る。このようにたった 1 個の遺伝子の追跡からも菌種の進化の過程が推測される。また、相同性が低く機能未知であった遺伝子の機能を、ゲノム上の遺伝子の並びから類推することにより生化学的方法を利用してその機能を証明することも可能にした (図 4)³⁹⁾。このように多くの病原細菌のゲノムが解読されると、新規の対病原戦略が明らかになることは必定で、新たな感染症の流行を予測することができるのもそう遠くはない。つぎに病原細菌のゲノムを概観して得られる代表的な生存戦略を紹介する。

3. ゲノムに刻まれた病原細菌の生存戦略

各種の病原細菌のゲノム解析から、菌の生存戦略の概要が明らかになってきた。これらの戦略には、それぞれ多くのタンパク質分子が関与しており、各種のナノ分子装置 (ナノマシーン) の実体が浮き彫りにされた。これらは病原細菌の病原性の要になる部分である。ゲノム上の遺伝子の詳細を見て気がつくことは、グラム陰性菌とグラム陽性菌ではその生存戦略が大きく異なることである。これは菌細胞と環境を隔てる膜構造の違いによるものであると思われる。グラム陰性菌は、外膜構造があり薄い細胞壁 (2~3 層のペプチドグリカン層) は外膜の内側にあって環境との直接の接点の外膜である。一方、グラム陽性菌は、内膜のみでその外側にある厚い細胞壁 (40 層ものペプチドグリカン層) が環境との接点になっている。この膜構造の違いは宿主細胞との攻防のコミュニケーションに大きく関わ

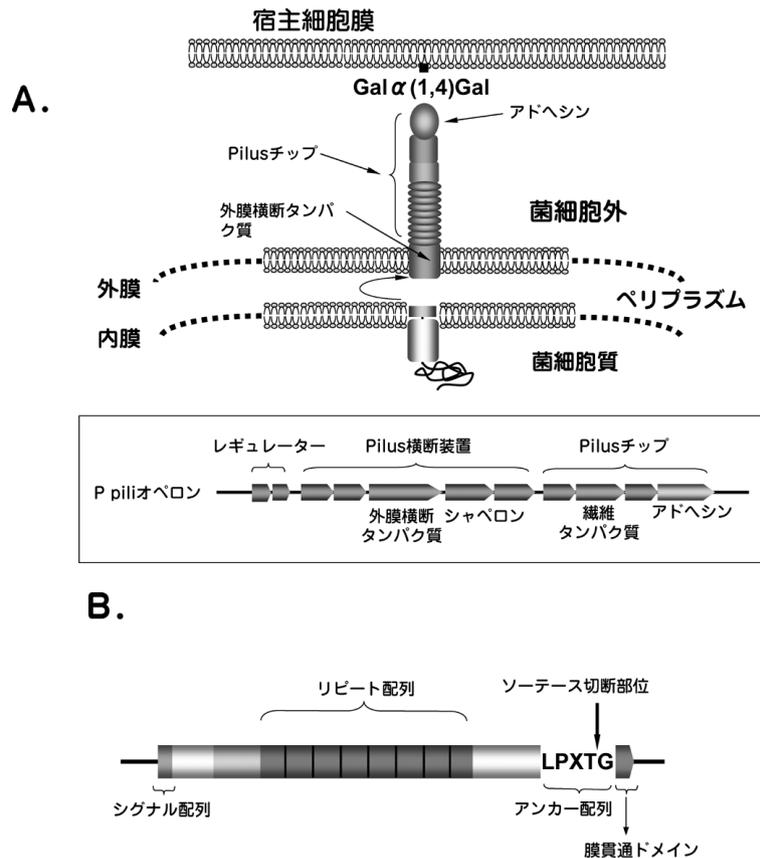


図 5 グラム陰性菌とグラム陽性菌の表層タンパク質の基本構造

(A) グラム陰性菌では、P pili オペロン (*pap* オペロン) 内にレギュレーターに続いて、ロッドタンパク質、アンカータンパク質、外膜横断タンパク質、シャペロン、アダプタータンパク質、繊維タンパク質、アドヘシンタンパク質が一連の構成でコードされており、pilus 横断装置を形成している。新生外膜横断タンパク質は内膜の *sec* システムを通過後、外膜に pilus 横断装置を形成して表層にアドヘシンを含む pilus チップ構成タンパク質を輸送する。アドヘシンは宿主細胞膜にあるグリコリビッドの Gal α (1,4)Gal に結合する。

(B) グラム陽性菌の表層タンパク質は、1 個の ORF の N 末端に分泌シグナル配列、C 末端にアンカー配列 LPXTG (ソーテース切断部位) と隣接して膜貫通ドメイン、ほぼ中央にアミノ酸の繰り返し配列が存在する。このリピートの長さは表層タンパク質の種類により異なる。タンパク質は膜内在のソーテースにより切断された後、アンカー部位でペプチドグリカンモノマーの Gly 架橋に結合する。

ていく。同じ原核細胞ではあるものの、グラム陰性菌とグラム陽性菌は別の生物であるかのような印象さえもたれる。そこで、グラム染色性の異なる菌種を対比させながら、その生存戦略について述べる。

(1) 接着因子群を発達させて生き残りを謀る戦略 (大腸菌, ブドウ球菌)

多くの細菌は、自然環境の海、河川、土壌、動植物など、どこにでも生息している。病原細菌も例外ではない。ヒトには何と300種類以上の細菌が常在細菌叢として共生している。皮膚の表面には、常時10⁶個/cm²以上ものブドウ球菌類があり、ヒトの分泌物を栄養源として生息している。また、腸内には、大腸菌をはじめ100種類以上の腸内細菌が常在している。しかも、ブドウ球菌のうち表皮ブドウ球菌は皮膚に、黄色ブドウ球菌はおもにヒトの粘膜表層に、腸内細菌は大小腸というように住む場所が決まっている。では、これらはどんな時、どのように病原性を発揮して病原細菌化するのだろうか？ この答えの鍵となるのが接着因子 (定着因子, 付着因子も含まれる) と呼ばれる細胞膜表層に分布するタンパク質群である。

接着因子は、宿主細胞への定着に貢献し、初期感染の最初のステップとなる。大腸菌に代表されるグラム陰性菌で

は、P pili とよばれる線毛性接着システムが知られている⁴⁰⁾。これを駆動するのが *pap* オペロンである。*pap* オペロンは、ロッドタンパク質, アンカー, 外膜横断タンパク質, シャペロン, 先端チップタンパク質, アダプタータンパク質, および接着タンパク質本体 (アドヘシン, P pili) で成り立っており, pilus 装置を形成する (図 5A)。P pili は、尿路上皮細胞の膜にあるグリコリピドの Gal α (1,4)Gal (α -D-galactopyranosyl-(1,4)- β -D-galactopyranoside) に結合して接着する。ゲノム解析から、大腸菌には、非線毛性接着因子をも含めると接着に関係するタンパク質が相当数存在し、接着システムが非常に発達していることが明らかにされた。

一方、接着様式が不明瞭であったグラム陽性菌では、ブドウ球菌や連鎖球菌において20種類以上の表層タンパク質の存在が明らかになった。この表層タンパク質の基本構造は、図 5B に示されるように特異なアミノ酸配列のモチーフとアンカー配列 LPXTG (ソーテース切断部位) が目印となっている。すなわち、N 末端にシグナル配列、C 末端にアンカー配列と隣接して膜貫通ドメイン、ほぼ中央に B リピートと呼ばれる1単位百数十アミノ酸の8~40回の繰り返し構造があるのが特徴である⁴¹⁾。しかしながら、アンカー部位で表層タンパク質が細胞壁のペプチドグ

表 3 三種のブドウ球菌属の表層タンパク質の比較

遺伝子名	機 能	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>spa</i>	プロテイン A	Spa		
<i>sdrC</i>	フィブリノーゲン, シアロプロテイン結合タンパク質	SdrC	SdrC	
<i>sdrD</i>	フィブリノーゲン, シアロプロテイン結合タンパク質	SdrD		
<i>sdrE</i>	フィブリノーゲン, シアロプロテイン結合タンパク質	SdrE	SdrE	
<i>clfA</i>	フィブリノーゲン結合タンパク質 A, クランピングファクター	ClfA		
<i>clfB</i>	クランピングファクター B	ClfB		
<i>isdB</i>	保存されている推定タンパク質	IsdB		
<i>isdA</i>	細胞表層タンパク質	IsdA		
<i>isdC</i>	保存されている推定タンパク質	IsdC		
<i>harA</i>	推定タンパク質	HarA		
<i>sasA</i>	連鎖球菌ヘムアグルチニン類似タンパク質	SasA		
<i>sasC</i>	FmtB 類似タンパク質	SasC		
<i>sasB</i>	FmtB タンパク質	SasB	SasB	
<i>sasD</i>	推定タンパク質	SasD		
<i>sasF</i>	保存されている推定タンパク質	SasF	SasF	
<i>sasK</i>	推定タンパク質	SasK		
<i>aap</i>	蓄積関連類似タンパク質	Aap	Aap	
<i>fnbB</i>	フィブロンекチン結合タンパク質ホモログ	FnbB		
<i>fnbA</i>	フィブロンекチン結合タンパク質ホモログ	FnbA		
<i>pls</i>	メチシリン耐性表層タンパク質	Pls		
<i>cna</i>	コラーゲン接着タンパク質前駆体			
SA0022	5'-nucleotidase 類似タンパク質			
SE0828	リポタンパク質 VsaC			
SE1500	推定タンパク質			
SE1501	推定タンパク質			
SE1628	推定タンパク質			
SE2152	推定タンパク質			
<i>uafA</i>	尿路上皮細胞接着因子			UafA
	計	21	10	1

リカン構造ユニットのグリシンと結合することが解っているものの、その装置の詳細な分子機構は、今後の研究を待たなければならない。

ゲノムが解読されている三種のブドウ球菌属の間で、定着に関わる表層タンパク質を比較してみると、同属の菌でもその数も種類も非常に異なっている(表3)。黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌は、それぞれ21種類と10種類の表層タンパク質をもつが、腐性ブドウ球菌はたった1種類の表層タンパク質 UafA しかない。このことは、同属でも菌種の定着細胞が異なっていることと密接に関係している。この1種類の表層タンパク質 UafA を、凝集能のない腐性ブドウ球菌変異株や本来宿主細胞との凝集能をもたない黄色ブドウ球菌細胞内で過剰発現させると強い細胞凝集能をもつようになることから、UafA は細胞接着能に貢献することが明らかになった²³⁾。このことから黄色ブドウ球菌は人体のほぼすべての組織に感染し得る能力を保有するが、尿路感染ブドウ球菌は病原性が尿路感染のみであることが説明できる。次に、尿路感染ブドウ球菌と同じ尿路感染症を起こす大腸菌との間で表層タンパク質を比較してみると、大腸菌は7種類の表層タンパク質を保有している。この7種類は腸管・尿管接着能とさらなる病巣拡大に寄与しているのであろう。しかしながら、圧倒的大多数の尿路感染症起因菌である大腸菌に混じって、わずか0.5~1%の腐性ブドウ球菌が尿路感染症を起こすことは、この表層タンパク質 UafA がいかに高い尿管接着特異性をもつかということを示す。また、菌が接着しただけでは尿中という高濃度尿素、高濃度カリウムイオン、高アルカリ環境で生存していくことは難しく、この環境に適応するために腐性ブドウ球菌は、同時に尿素を分解するウレアーゼや各種の排出系(後述)を発達させていることがゲノムの比較から明らかにされた²³⁾。事実、三種のブドウ球菌のウレアーゼ活性を調べてみると顕著にその違いがあることが解る。このように、細菌は、環境に適応する遺伝子を自身のゲノムに取り込んで、生存戦略を立てていることがどの細菌ゲノムでも覗える。この能力こそ、細菌感染症の征圧が人類にとって永遠の課題となる所以でもある。

(2) 毒素や耐性因子を付加させて生き残りを謀る戦略(ブドウ球菌, 大腸菌)

黄色ブドウ球菌(MRSA株)や大腸菌(O157株)の臨床分離株ゲノムの一つの大きな特徴は、外来性の遺伝子断片がゲノムの基本構造のいたるところに挿入されていることである^{20,7)}。遺伝子が35%前後の低いGC含量をもつ黄色ブドウ球菌では、三つの臨床分離株、N315株、Mu50株、およびMW2株のどのゲノムを見てもGC含量が50%相当の領域がゲノム上のあちこちに見受けられた。大きなものは、その1領域の大きさが約30キロから50キロ塩基

対に及び、相当するものが5箇所も存在した。これらの遺伝子の構成をよくみると、図3に示すように、古くから知られていた腸管毒素(entero toxin, ET)とDNA配列が類似している数個~数十個の相同遺伝子(類似遺伝子(パラログ))の束であったり、リポプロテインやセリンプロテアーゼのパラログの束であったり、それぞれのパラログの組合わせの複合の束であったりする。これらはゲノム上に3箇所に分散して存在し、「病原遺伝子アイランドPI」と命名された。TSST-1アイランドには毒素性ショック症候群毒素(TSST-1)と新規毒素遺伝子群が、外毒素アイランドには15種類におよぶ外毒素群と9個のリポタンパク質群が、腸管毒素アイランドにはロイコシジン毒素を含む9個の腸管毒素群とセリンプロテアーゼ群が見出され、その大きさはそれぞれ14~15キロ塩基対である。このアイランドの両端にはインテグラーゼ(*int*)やトランスポザゼ(*imp*)などのリコンビナーゼ、およびファージ挿入部位やトランスポゾン挿入部位である同じ向きの17塩基対のダイレトリピート(*att*部位)があり、ブドウ球菌ファージやトランスポゾンにより外来遺伝子がゲノムに挿入されたことが解る。また、*mecA* 薬剤耐性遺伝子を含む外来性の大きな領域(約50キロ塩基対)がリコンビナーゼとともにゲノムに取り込まれている。これが院内感染起因菌である耐性菌(MRSA)を創っている本体である。この外来遺伝子の獲得に大きく貢献しているのが可動性遺伝子に含まれるリコンビナーゼと相同配列 *att* 部位のセットによる相同組換え装置である(図6)。このことは、以前からNovick⁴²⁾らにより示唆されていたが、ゲノム解析がこれを確定した。また、他の2箇所はプロファージ由来の遺伝子で構成されており、この外来DNA領域には *att* 部位が複数個あること、 $\phi 13$ 、 $\phi 80\alpha$ や $\phi 40$ などのブドウ球菌ファージの遺伝子配列が断片的に繰り返して存在することから、組換えファージが挿入されてさらに大きな領域を形成していると考えられる。

一方、大腸菌においても、病原性のない標準株K12株と腸管出血性大腸菌O157株のゲノムを比較すると、O157ゲノム(5,498,450塩基対)はK12ゲノム(4,639,221塩基対)より859,229塩基対も大きい^{7,43)}。この中にはK12特異遺伝子が含まれるため単純に長さだけでは比較できないが、O157特異配列の約3分の2がプロファージあるいはファージ様のエレメントである。18種類のプロファージと6種類のファージ様エレメントが同定されており、新規毒素遺伝子や溶血毒素遺伝子、プロテアーゼなどが見出され、PIを形成しているように見える。

このように病原遺伝子群は、DNAが複製されるときにファージが挿入されたり切り出されたりしていく過程で付加されていくことが解明した。このように、可動性因子はゲノム上のわずかな相同配列を切り口にして、自身のもつ

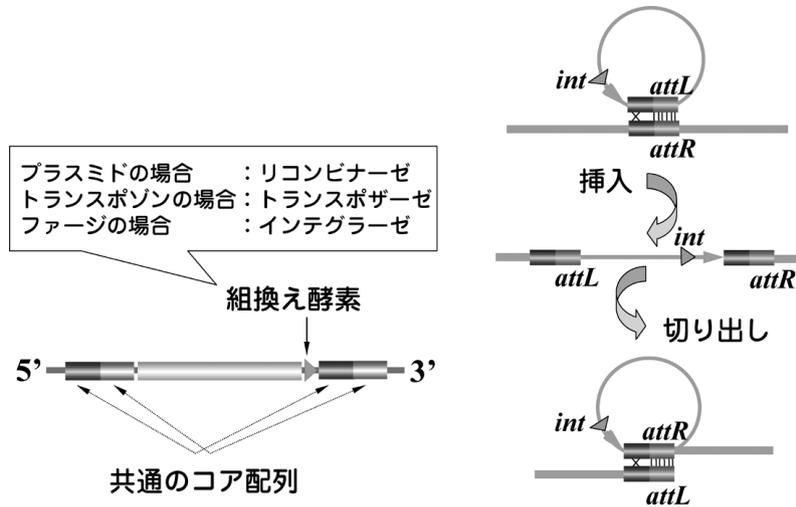


図6 外来 DNA 挿入の相同組換え機構
 黄色ブドウ球菌では、ゲノム情報の組換え酵素の位置から毒素遺伝子はファージが、薬剤耐性遺伝子はプラスミドが運んでいることが判明した。

リコンビナーゼというハサミとノリを駆使してゲノムに情報を拡大している。つまり、ファージやトランスポゾン、IS エlement などの可動性因子は、病原細菌に新たな病原性を発現させる「運び屋」になっている。

(3) 輸送系を発達させて生き残りを謀る戦略 (ブドウ球菌, 大腸菌)

細菌細胞は単細胞であるため、その環境で生き残るのに必要な物質を直接細胞内に取り込み、不要な物質や外敵を排除するタンパク質を細胞外に輸送する手段を発達させている。イオン、糖、アミノ酸のように小さな分子は、チャンネル、トランスポーター、PTS システムとよばれる膜タンパク質の輸送システムにより輸送されるが、タンパク質や DNA などの生体高分子は、別の六つのシステムによって輸送されることが知られている (後述)。病原細菌が組織に侵入して環境変化に対応するときは、まず前者の輸送システムが関与する。

ブドウ球菌属は通常、皮膚に常在しているが、腐性ブドウ球菌は若年女性の急性尿路感染症の起原菌として知られている。尿路環境は、体液と比べると高濃度の豊富なイオン類 (H^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-})、高濃度の尿素、その他の有機酸など特徴的な組成をもっている。しかも定期的な排尿によりその環境は劇的に変化する。このような環境下で腐性ブドウ球菌はどのように増殖するのであるか? 本菌のゲノム解読はこの問いに如実に答えてくれた。つまり、腐性ブドウ球菌には、黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌と比べて、浸透圧調節系やイオン輸送系のトランスポートシステムのパラログ遺伝子が重複して存在したことであり²³⁾ (表4)。腐性ブドウ球菌は、同属の黄色ブドウ球菌の2倍の数の浸透圧やイオン輸送体を保有してい

表4 腐性ブドウ球菌の発達した輸送システム

輸送体の種類	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
浸透圧トレランス関連		
プロリンベタイン輸送体 ProP	1	2
高親和性プロリン permease PutP	1	2
グリシンベタイン/コリン輸送体	3	5
プロリン・グリシンベタイン ABC 輸送体		
ATPase 構成要素 OpuCA/CB/CD	2	4
ペリプラズム構成要素 OpuCC	1	2
水チャンネル AqpZ	0	2
無機イオン輸送体		
二価陽イオン輸送体 NRAMP	2	3
Na^+/H^+ アンチポーター NhaC	2	4
Na/硫黄シンポーター	2	3
硫黄シンポーター	0	2
合計	14	29

る。劇的なイオン濃度の変動に迅速に対応するために、パラログ遺伝子はおそらく外来性に獲得したものがゲノムに取り込まれ、さらに浸透圧の変動に対応するために、二つの水チャンネル遺伝子 *aqpZ* がプラスミドにより補填されたのであろう。また、高濃度 Na^+ 存在下で増殖するために、大腸菌と同じように Na^+ 依存 Fe イオン獲得輸送系が複数個存在し強化されている^{23,43)}。これらのことから、腐性ブドウ球菌はブドウ球菌属でありながら、大腸菌やコレラ菌のような腸内細菌の機能を備えた菌に進化していると考えられる。このように、細菌はその環境に適応するために自身のゲノムを進化させる戦略に富んでいることが解る。

(4) 分泌装置を発達させて生き残りを謀る戦略（大腸菌，赤痢菌，サルモネラ菌，腸炎ビブリオ，緑膿菌，セラチア菌）

病原細菌のゲノムが解読されプロテオーム解析データが蓄積したことにより，どの病原細菌でも，これまで特定されていたタンパク性の病原因子のほとんどが細胞表層や細胞外に分泌されることが明らかになった。グラム陰性菌，グラム陽性菌ともに細菌の細胞膜にはイオンや高分子を輸送するシステムが百数十個以上備わっている（表 5）が，外膜構造をもつグラム陰性菌ではいくつかの菌種で特異的な分泌システムが発達している。

とくに病原性大腸菌をはじめとして，赤痢菌，サルモネラ菌，ビブリオ菌などのグラム陰性菌では，巧妙な分泌輸送システムであるⅢ型分泌システム^{44,45)}とよばれる経路が

発達している。これはグラム陰性菌に特異的なもので，図 7 に示すように内膜と外膜のタンパク質を含む 25 種類以上のタンパク質により構築されているニードル様の装置であり，菌が産生した毒素タンパク質を宿主細胞に直接打ち込むことができる。これにより菌細胞は宿主細胞を襲撃して病巣を拡大していく。

同じグラム陰性菌でも緑膿菌やセラチア菌は，内膜・外膜タンパクを利用したまったく別のシステムの RND 型輸送システム^{46,47)}（図 8）を発達させている。面白いことに，緑膿菌ゲノムには，内膜にある輸送システムと共同して機能する外膜の *tolC* 遺伝子のパラログが多数存在し，これらと内膜タンパク質輸送システムとの組み合わせを多数作ることで排出する物質の種類を拡げている。ゲノム解析から緑膿菌には少なくとも 10 個の RND 型輸送システム

表 5 細菌の分泌輸送システム

菌種	分泌輸送システム	機能
グラム陰性菌	RND 型システム	Resistance-Nodulation-Cell Division 経路
	MATE 型システム	Multi drug and Toxic compound Extrusion 経路
	ABC 型システム	ATP binding Cassette 経路
	SMR 型システム	Small Multi drug Resistance 経路
	MFS 型システム	Major Facilitate Super family 経路
	Ⅲ型システム	ニードル型毒素，エフェクター経路
グラム陽性菌	Sec 型システム	Sec family による一般的な分泌経路
	Holin 型システム	peptidoglycan-degraded endolysin 経路
	Tat 型システム	Twin-arginine Translocation 経路
	Com 型システム	Pseudopilin-specific SPase システム
	ABC 型システム	ATP binding Cassette 型バクテリオシン経路
	ESAT-6 型システム	Early secreted antigen target 経路

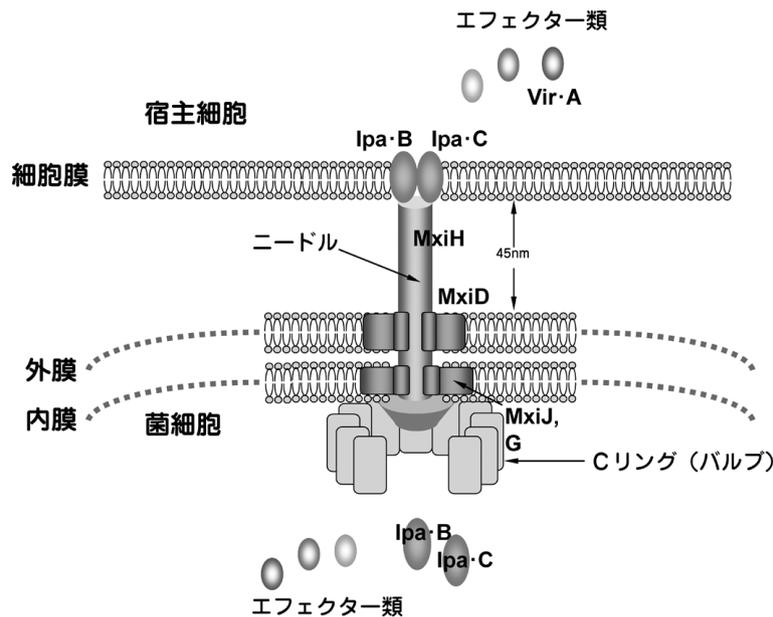


図 7 グラム陰性菌のⅢ型分泌システム

全体は 20 数種のタンパク質より構成され，大腸菌には細胞当たり 50～60 個ある。細菌は，この装置をマクロファージ T 細胞へ差し込み，必要に応じて発現したエフェクターを注入して貪食作用を促し侵入する。

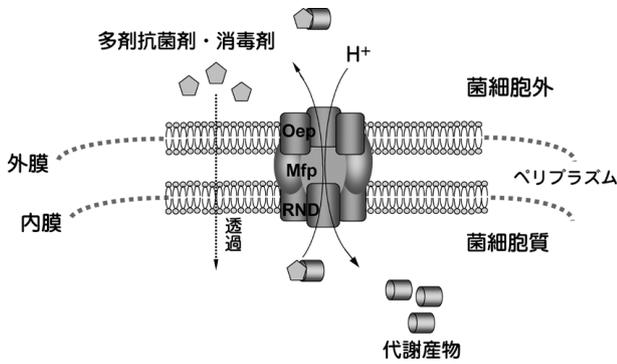


図8 緑膿菌のRND型多剤輸送システム
 内膜にあるRNDタンパク質は、抗菌剤や消毒剤の化合物を輸送する本体で、外膜タンパク質のOepを繋いでいるMfpタンパク質と協調しながらプロトンの濃度勾配のエネルギーを使って細胞外に排出する。このシステムが発達している緑膿菌やセラチア菌は各種の抗菌剤や消毒剤に対する耐性を獲得する。

があり、他の輸送系（ABC型、SMR型、MFS型、MATE型）（図9A）を含めると細胞当たり計34個の輸送システムを備えて、菌細胞にとって有害な物質を外に排出している¹⁶⁾。この発達した輸送システムにより、菌は各種抗生剤や消毒剤に曝されてもどんどん細胞外に排出してしまい、緑膿菌は多剤耐性菌として院内感染の元凶となるのである。第三の院内感染起因菌のセラチア菌も同様にゲノム解析から多剤排出システムを発達させていることが明らかになった。

一方、Dijlらは、二次元電気泳動を用いてブドウ球菌属の分泌タンパク質の詳細な比較解析を行い、多種多様な病原毒素を産生するブドウ球菌の分泌システムの全容を示した（図9B）⁴⁸⁾。グラム陽性のどの細菌種にも六つの分泌システム、Sec経路、Tat経路、Com経路、ABC輸送体、ホリン、およびESAT6経路、を構築するそれぞれタンパク質群の全部ないしその一部が保存されていることが明らか

にされている。毒素類や酵素類は、Sec輸送経路が分泌の役割を担っている。

(5) ゲノムDNAの再編により新型化して生き残りを謀る戦略（サルモネラ菌、赤痢菌、A群連鎖球菌、溶血性ブドウ球菌、クラミジア、リケッチア）

細菌はゲノムを大幅に入れ替えたり、重複させることで新型菌に進化することにより生き残ることができる。このゲノム再編の現象は、すでに病原細菌のサルモネラ菌や赤痢菌で明らかにされていた⁴⁹⁾。しかしながら、ゲノム解析の進展から比較的小さな細菌であるA群連鎖球菌⁵⁰⁾、溶血性ブドウ球菌²²⁾、クラミジア²⁾、リケッチア¹⁷⁾などにこのようなゲノム進化が多く起こっていることが明らかになった。劇症型A群連鎖球菌が新たに出現し、“人食いバクテリア”として世界を震撼させたのは記憶に新しい。このA群連鎖球菌がなぜ劇症型化したのかという原因究明のためにアメリカでゲノムの解読が進められたのであるが、ファージ領域を除けばゲノム配列にはほとんど違いはなかった。日本で分離された劇症株のゲノムでもその配列はほとんど変わらなかったのだが、面白いことに塩基配列がゲノムの複製軸を境にして対象方向に移動していることが解った。Streptococcus種間または種内菌株間比較ゲノムの手法で詳細な解析を行った日本のグループは、このような逆位が複製開始点または複製終了点（細菌ゲノムを円とすると、複製開始点と複製終了点は両極に位置する）から対称的な等位置にある相同性の高いリボソームRNAオペロン（*rrn*）やファージ挿入部位で起こり、しかも繰り返し起こっていることを報告している（図10）⁵⁰⁾。また、ブドウ球菌属の溶血性ブドウ球菌 *S. haemolyticus* でも約2.5M塩基対という広い範囲でゲノムの移動が起こっている²²⁾。小さな細菌は、4,500個以上の遺伝子をもつ大腸菌と比べると、遺伝子数も約1,000個~1,900個と非常に少ない

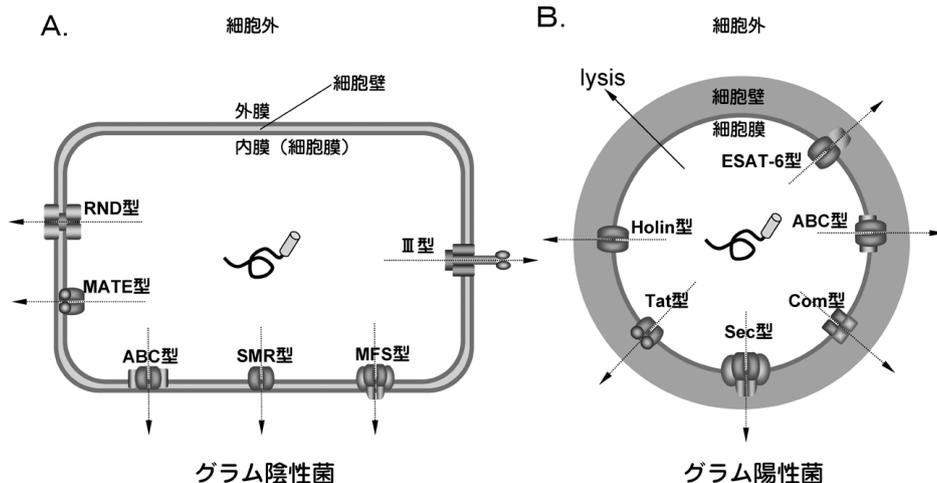


図9 グラム陰性菌とグラム陽性菌の分泌輸送システム

(表1). 連鎖球菌の場合, 同じ劇症株でもアメリカの劇症株はゲノム再編が起こっていないことから, このゲノムの大規模な逆位と劇症化との関連性は不明であるが, これらゲノムの構造変化は, 小さなゲノムをもつ菌が新型菌に進化して生存する方策なのであろう.

おわりに

ゲノム解析により, 病原性を1個の菌細胞の生命の営みの一環として捉えることができるようになり, これまで, 断片的にしか捉えられなかった菌側のブラックボックスの中の戦略が見えてきた. このことは, 臨床医学の領域から出ることをためらっていた感染症研究を大きく見直すことになり始めた. そのような意味において, 1個の細菌細胞の遺伝子が丸ごと見えるゲノム解析の果たした役割は非常に大きい. こうして, 細菌が病原性を発揮するには様々な分子装置に裏打ちされた戦略があることが解ってきたわけであるが, われわれはそれらを熟知した上で細菌の「野望」に立ち向かわなければならない. この病原細菌のナノ分子装置こそ, 抗生物質による制圧にとって代わる創薬の標的になるに違いない. しかしながら, 戦略の分子装置(ナノマシン)は, まだモデルの段階であり, 今後のさらなる研究が期待される. そのためには, いろいろな分野の研究者の連携が必要とされる.

併せて, これからの感染症研究は, 病原細菌が打つ弾(シグナル)をどのような役者がどのように宿主細胞へ伝え, どのように防御するのかが問われることになり, 今度は宿主側の新たなブラックボックスの解明へと展開していかなければならないであろう.

最後に現在のゲノムデータの検索を助けてくれた京都大学大学院生命科学研究所大庭良介氏に感謝したい.

文 献

- Kunst, F., Ogasawara, N., Danchin, A., *et al.* (1997) *Nature*, 390, 249-256.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W., & Stephens, R.S. (1999) *Nat. Genet.*, 21, 385-389.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchel, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., & Davis, R.W. (1998) *Science*, 282, 754-759.
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., & Hayashi, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 996-1001.
- Bruggerman, H., Baumer, S., Fricke, W.F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A., & Gottschalk, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 1316-1321.
- Paulsen, I.T., Banerjee, L., Fraser, C.M., *et al.* (2003) *Science*, 299, 2071-2074.
- Perna, N.T., Plukett III, G., Burland, V., *et al.* (2001) *Nature*, 409, 529-533.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., Venter, J.C., *et al.* (1995) *Science*, 269, 496-512.
- Alm, R.A., Ling, L.-S.L., & Trust, T.J. (1999) *Nature*, 397, 176-180.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, D., & Sorokin, A. (2001) *Genome Res.*, 11, 731-753.
- Shuang-Xi, R., Gang, F., Zhao, G.-P., *et al.* (2003) *Nature*, 422, 888-893.
- Glaser, P., Frangeul, L., Cossart, P., *et al.* (2001) *Science*, 294, 849-852.
- Cole, S.T., Brosch, R., Barrell, B.G., *et al.* (1998) *Nature*, 393, 537-544.
- Cole, S.T., Eglmeier, K., Barrell, B.G., *et al.* (2001) *Nature*, 409, 1007-1011.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.-C., & Herrmann, R. (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24, 4420-4449.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Olson, M.V., *et al.* (2000) *Nature*, 406, 959-964.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, S., Andersson, J.P., Sicheritz-Ponten, T., Alsmak, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., & Kurland, C.G. (1998) *Nature*, 396, 133-140.
- McClelland, M., Kenneth, E., Wilson R.K., *et al.* (2001) *Nature*, 413, 852-856.
- Wei, J., Goldberg, M.B., Burland, V., Venkatesan, M.M., Deng, V., Fournier, G., Mayhew, G.F., Plunkett III, G., Rose, D.J., Darling, A., Mau, B., Perna, N.T., Payne, S.M., Runyen-Janecky, L.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., & Blattner, F.R. (2003) *Infect. Immun.*, 71, 2775-2786.
- Kuroda, M., Ohta, T., Hiramatsu, K., *et al.* (2001) *Lancet*, 357, 1225-1240.
- Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang Y.X., Fu, G., Yang J., Qin, Z.Q., Miao, Y.G., Wong, W.Y., Chen, R.S., Shen, Y., Chen, Z., Yuan, Z.H., Zhao, G.P., Qu, D., Danchin, A., & Wen, Y.M. (2003) *Mol. Microbiol.*, 49, 1577-1593.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J.C., & Hiramatsu, K. (2005) *J. Bacteriol.*, 187, 7292-7308.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M., & Ohta, T. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13272-13277.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Fraser, C.M., *et al.* (2001) *Science*, 293, 498-506.
- Ferretti, J.J., MxShan, W.M., Ajdic, D., Savic, D.J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A.N., Kenton, S., Lai, H.S., Lin, S.P., Qian, Y., Jia, H.G., Najjar, F.z., Ren, Q., Zhu, H., Song, L., White, J., Yuan, X., Clifton, S.W., Roe, B. A., & McLaughlin, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4658-4663.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., & Hopwood, D.A. (2002) *Nature*, 417, 141-147.
- Fraser, C.M., Norris, S.J., Venter, J.C., *et al.* (1998) *Science*, 281, 375-387.
- Heldelberg, J.F., Eisen, J.A., Fraser, C.M., *et al.* (2000) *Nature*, 406, 477-484.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M.,

- Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., & Iida, T. (2003) *Lancet*, **361**, 743-749.
- 30) Parkhill, L., Wren, B.W., Barrell, B.G., *et al.* (2001) *Nature*, **413**, 523-527.
- 31) Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., & Hiramatsu, K. (2002) *Lancet*, **359**, 1819-1827.
- 32) Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Ogasawara, N., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4678-4683.
- 33) Cohen, M.B. & Giannella, R.A. (1992) *Adv. Intern. Med.*, **37**, 173-195.
- 34) Faruque, S.M., Albert, M.J., & Mekalanos, J.J. (1998) *Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1301-1314.
- 35) Okonogi, K., Noji, Y., Kondo, M., Imada, A., & Yokota, T. (1989) *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 637-645.
- 36) CDC (2002) *MMWR*, **51**, 565-567.
- 37) Evers, S., Quintiliani Jr., R., & Coulvalin, P. (1996) *Microbiol. Drug Res.*, **2**, 219-223.
- 38) Ohniwa, R.L., Morikawa, K., Kim, J., Ohta, T., Ishihama, A., Wada, T., & Takeyasu, K. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5591-5602.
- 39) Morikawa, K., Inose, Y., Okamura, H., Maruyama, A., Hayashi, H., Takeyasu, K., & Ohta, T. (2003) *Genes Cells*, **8**, 699-712.
- 40) Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., Geme III, J. W.St., & Normark, S. (1993) *Cell*, **73**, 887-901.
- 41) Ton-That, H., Labischinski, H., Berger-Bächi, B., & Schneewind, O. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 29143-29149.
- 42) Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., & Novick, R. (1998) *Mol. Microbiol.*, **29**, 527-543.
- 43) Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C. K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., & Shao Y. (1997) *Science*, **277**, 1453-1462.
- 44) Rosqvist, R., Magnusson, K.-E., & Wolf-Watz, H. (1994) *EMBO J.*, **13**, 964-972.
- 45) Rosqvist, R., Håkansson, S., Forsberg, Å., & Wolf-Watz, H. (1995) *EMBO J.*, **14**, 4187-4195.
- 46) Westbrock-Wadman, S., Sherman, D.R., Hickey, M.J., Coulter, S.N., Zhu, Y.Q., Warren, P., Nguyen, L.Y., Shawar, R.M., Folger, K.R., & Stover, C.K. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2975-2983.
- 47) Nikaido, H. (1998) *Clin. Infect. Disease*, **27**, S32-S41.
- 48) Sibbald, M.J.J.B., Ziebandt, A.K., Engelmann, S., Hecker, M., Jong, A., Haemsen, H.J.M., Raangs, G.C., Stokroos, I., Arends, J.P., Dubois, J.Y.F., & Dijn, J.M. (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 755-788.
- 49) Liu, S.L. & Sanderson, K.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1018-1022.
- 50) Nakagawa, I., Kurokawa, S., Yamashita, A., Nakata, M., Tomiyasu, T., Okahashi, N., Kawabata, S., Yamazaki, K., Shiba, T., Yasunaga, T., Hayashi, H., Hattori, M., & Hamada, H. (2003) *Genome Res.*, **13**, 1042-1055.
-