大腸菌ゲノムの多様性に関する研究

大 西 真

宮崎大学医学部 感染症学講座 微生物病学分野
〒 889-1692 宮崎県宮崎郡清武町木原 5200

同一の細菌種においても、菌株間によって形質が異なる場合がしばしば存在する。このような多様性はそれぞれの菌株のゲノム情報の違いに由来すると推測されるが、その実体は必ずしも明らかではなかった。本研究では腸管出血性大腸菌 O157 Sakai 株の全ゲノム配列を決定し、非病原性大腸菌 K-12 ゲノムとの比較解析から大腸菌ゲノムの菌種内多様性の実体とその多様化のメカニズムの解明を試みた。Sakai 株の染色体は非病原性大腸菌 K-12 株に比べて約 1 Mb 大きい。染色体基本骨格は高度に保存されていることを明らかにした。さらに、サンプルシーケンシングの手法を用いて、Sakai 株には予想以上に大量の菌株特異的 DNA が存在すること、そしてその多くが外来性遺伝子である可能性を示した。続いて、ゲノム全塩基配列の決定および K-12 との比較解析から大腸菌染色体の基本骨格と考えられる 4.1 Mb の共通領域と 1.4 Mb におよぶ O157 特異配列を同定し、大量の外来性遺伝子の水平伝達による獲得が O157 の出現に大きな役割を果たしたことを明確にした。また、バクテリオファージが菌種内進化において主要な役割を果たしている可能性や O157 が自然界に存在する多様なファージの生産場所となっている可能性を示した。さらに、全ゲノム PCR スキャンニング法により O157 菌株間には高度のゲノム構造の多様性が存在することを明らかにした。特に Stx ファージを含むプロファージ領域に顕著な多様性が存在することを見だし、O157 の Stx ファージにも様々なタイプが存在することをはじめで示した。

1. は じ め に

一つの細菌種が遺伝的に必ずしも均一な集団ではないことは、様々な形質が菌株間で異なることから明らかである。菌株ごとの病原性の強弱の違いあるいは質的な違いなどはその代表的なものであろう。このような多様性はそれぞれの菌株のゲノム情報の違いに由来するものであろうが、その実体、つまり「菌株によって何が異なるのか」は必ずしも明らかではなかった。

塩基配列決定作業の劇的な効率化とコンピュータによる情報処理法の発展は、ランダムシーケンシングを基礎とした新しい配列決定手法を生み出し、時間およびコストの両面において全ゲノム配列決定を比較的容易に行うことを可能にした。全ゲノム塩基配列決定は 1995 年の *Haemophilus influenzae* の (4) を皮切りに爆発的に進行し、現時点 (2004 年 5 月) において 147 の真性細菌のゲノム配列が報告されている (<http://www.genomesonline.org/>)。

大腸菌株間の遺伝的多様性は一般に認識されている以上に高く、その良い例が様々な病原性大腸菌の存在である (13, 22)。大部分の大腸菌は腸管常在菌であるのに対して、特定の菌株のみが病原性をもつ。また、病原性をもつ大腸菌においても質的に多様であり、このような多様性の実体を明らかにすることは病原細菌学研究において重要な視点であるとともに、現存する多様な大腸菌の成立過程を考える上でも重要である。

筆者は学術振興会未来開拓事業「病原微生物ゲノムプロジェクト」に参画し、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 菌株 (1996 年に堺市を中心に発生時に分離された EHEC O157:H7; RIMD0509952; ATCC BAA-460 以下 Sakai 株) の全ゲノム配列を決定する機会を得た。既に報告されていた非病原性大腸菌 K-12 ゲノム配列との比較解析から大腸菌ゲノムの多様性がどの程度存在するのかを明らかにするとともに、EHEC O157 の病原性の解明を目指して研究を行ってきた。本稿では、Sakai 株の全ゲノム配列と K-12 ゲノム配列との比較解析から明らかになった知見および EHEC O157 菌株間の多様性について紹介したい。

Makoto OHNISHI
Genomic diversity of *Escherichia coli*
Department of Microbiology, Miyazaki Medical College, University of
Miyazaki, 5200 Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan

2. 大腸菌の染色体基本構造—Sakai 株と K-12 との比較

大腸菌の研究は広範かつ詳細に行われ、様々な菌株の収集とその系統解析が行われてきた (7, 9, 21, 25)。EHEC O157 は他の病原性大腸菌あるいは非病原性大腸菌 K-12 とは異なる、ひとつの系統を形成していることが報告されていたが (21, 25)、そのゲノムの詳細は明らかにされていない。そこで、全ゲノム解読に向けてゲノムサイズの同定、詳細な制限酵素地図の作成、大規模な遺伝子マッピングおよびサンプルシーケンシングの手法を用いて染色体の基本構造を明らかにした (15)。

1) ゲノムサイズ

制限酵素 *Xba*I および *Bln*I 切断断片のパルスフィールドゲル電気泳動による解析から、Sakai 株ゲノムサイズは 5.5–5.6 Mb であることが示された。様々な大腸菌株の染色体サイズは、4.5 Mb から 5.5 Mb の範囲で多様であることが示されているが (1, 2)、Sakai 株の染色体は最大規模のゲノムを所持し、K-12 株の染色体 (4.6 Mb) に比べて約 1 Mb 大きいことが示された。

2) リボソーム RNA (*rrn*) 骨格を含む染色体基本骨格の解析

I-CeuI による解析および制限酵素地図へのマッピングから *rrn* オペロンの数、染色体上での相対的な位置および転写方向に関しては K-12 と同一であり、*rrn* 骨格は保たれていることが示された。さらに、染色体制限酵素地図と 147 種類のプローブを用いた大規模な遺伝子マッピング実験を行った。その結果、各プローブの Sakai 株染色体上での位置関係は K-12 の染色体上での位置関係と一致することが示され、大きな逆位および転位は存在しないことが示唆された。

3) 菌株特異配列の分布の推定

Sakai 株と K-12 に共通して存在する 13 か所の *Xba*I 認識部位間の距離から、Sakai 株の染色体大部分は染色体全体に散在しているという結果が得られ、大腸菌の染色体には共通の基本骨格上の様々な位置に菌株特異的配列が存在していることが示唆された。

4) 菌株特異配列の量の推定

ランダムクローニングされた染色体由来の 3570 クローンから得られた塩基配列、全長 1.58 Mb のうち、1.14 Mb (72.2%) が K-12 に対して相同であることが示された。Sakai 株のゲノムサイズとこの割合から Sakai 株および K-12 の共通配列は約 4 Mb であり、各々約 1.5 Mb および 0.6 Mb の菌株特異的配列を持つことが推測された。これらのクロンの塩基配列の GC 含有量と K-12 との相同性との関係を解析すると興味深い知見が得られた。図 1 に示すように、K-12 との相同性の高いクロンの GC 含有率の度数分布は 52–54% を中心に鋭敏なピークを示すが、O157 特異的なクロンにおいて明瞭なピークが形成されず幅広い分布が示された。このことは、O157 菌株特異的配列の多くが外来性である可能性を示唆した。

図 1. O157 Sakai 株のサンプルシーケンシング
A: ランダムクローニングされた染色体由来の 3570 クローンから得られた DNA 配列の K-12 と相同領域の割合。B: 相同領域の長さから 3 つのグループ (<20%, 20%–80%, 80%<) に分けそれぞれのクロンの GC 含有率の分布を示した。

一方、*rrn* オペロンに関しては、様々な大腸菌株に応用可能な *rrn* オペロン塩基配列決定システムを考案し、7 コピー存在する Sakai 株の *rrn* オペロンの全塩基配列を決定した。K-12 の *rrn* オペロンとの詳細な比較解析から、DNA 配列レベルでは *rrn* オペロンが菌株ごとに均一化の方向に変化していることが初めて示された (16)。これに関する分子機構については不明であるが、Sakai 株と K-12 が系統的に異なる菌株であることを支持する。

3. Sakai 株の全ゲノム配列の決定と K-12 とのゲノム比較

全ゲノムランダムショットガン法によるゲノム解読にとって最も大きな障害は反復配列の存在である。反復配列の存在は最終的にはミスアッセンブルを引き起こす原因になりうる。

Sakai 株ゲノムには多様な反復配列が多数存在し、個別の決定が必要となった。さらに、筆者らによって明らかにされていた遺伝子マッピングの結果を参照したミスアッ

センブルの検出, そして PCR を用いた確認作業および制限酵素地図との比較による確認作業を経て, 環状の 5,498,450 bp からなる染色体の全塩基配列が決定された(5)。

決定された全ゲノム配列と K-12 ゲノム配列との比較解析によって, 先に述べたゲノム構造の全体像, 特異配列の分布および量の推定が正しかったことが示されたと同時に, 4.1 Mb の共通領域と Sakai 株および K-12 特異配列 (S-loop および K-loop) を DNA 配列レベルで同定することができた。さらに, S-loop 上に存在する多くの病原因子候補を見いだすことに成功し, O157 の病原性研究の基盤を提供することになった (5, 6, 18)。

なお, S-loop および K-loop の位置情報は以下で (<http://genome.gen-info.osaka-u.ac.jp/cgi-bin/o157/loop.pl?table=loop>), さらに塩基配列抽出ツール (<http://genome.gen-info.osaka-u.ac.jp/bacteria/o157/retrieve.html>) を用いて個別の配列を入手することが可能である。

大腸菌の染色体構造は, 図 2A で簡略化して示したように, 菌株特異配列 (loop) の見かけ上の挿入によって共通配列が分断されていることがゲノム比較解析から明瞭に示された。ここでは「見かけ上の」挿入と述べたが, 一方の株における欠失によっても同様の形に見えるためである。いずれにせよ, 全長で 4.1 Mb におよぶ共通配列部分においては極めて高い相同性 (98.31%) が示され, 各遺伝子の順序も保存されている (5)。そのために, 図 2A で示す形で共通配列を単純に繋ぎあわせて染色体基本骨格とも呼べる配列を図示し, そこに loop の位置および大きさの情報を

重ねあわせた挿入 / 欠失図を描くことが出来る。その一部を図 2B において示したが, 様々な大きさの loop が両株において至る所に存在する様子を理解して頂けると思う。S-loop および K-loop はそれぞれ 296 および 325 個存在し, それぞれの全長は 1393 kb および 537 kb になる。重要な点は loop の多くは外来性 DNA であり, S-loop には多数の病原性関連遺伝子がコードされていることである。K-12 に特異的な遺伝子で直接病原性と関係すると思われる遺伝子はほとんどない (5)。

もう一つ注目されることは, Sakai 株染色体上には多数のプロファージ (Sp1-18) あるいはプロファージ様配列 (SpLE 1-6) が存在し, S-loop 全長の約 60% を占めることである (4)。一方, K-12 においても, K-loop 全長に対するファージ関連配列の占める割合は 38% であり, 様々なファージが溶原化することにより個々の大腸菌のゲノムが特徴付けられているという現象は Sakai 株に特有のことではないことが示された。

Sakai 株に存在するファージに関しては, 志賀毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*) 以外にも様々な病原性関連遺伝子がファージゲノム上に存在していることから, O157:H7 という病原菌が出現する過程でファージが非常に重要な役割を果たしたことは間違いない (3, 5)。また, Sakai 株に存在する 13 種類のラムダ様ファージのうち 7 種類は K-12 には存在しないユニークな tRNA 遺伝子をゲノム上にコードしている。コドン使用頻度解析の結果, 病原因子を含む Sakai 株特異的遺伝子においてこれらの tRNA が対応するコドンが高頻

図 2. 大腸菌のゲノム構造と挿入 / 欠失図

A: 大腸菌の染色体は共通配列のなかに様々な菌株特異的配列特異配列が存在する。そのため共通配列 (A-D) を繋ぎあわせ水平方向に, 一方特異配列を垂直方向に示すことでゲノム構造を図示する。

B: Sakai 株の染色体の一部 (1310000-1860000 の 550 kb) に対応する挿入 / 欠失図を示した。

度に使われている傾向があることから、特異的遺伝子の翻訳効率に選択的に影響している可能性が示唆されている(5)。

4. 大腸菌の菌種内進化における バクテリオファージの役割

Sakai 株ゲノムにおける多量のファージの存在、さらには病原性に関する役割の大きさとともに、ラムダ様ファージの類似性の高さは大変興味深い知見である(図 3)(5, 17)。どのようにしてこのような非常に類似した、かつ多様なファージが一つの細胞の中に集積することになったのだろうか？

異なる菌株から独立して単離されたラムダファージ様ファージのゲノム配列がお互いに類似しているケースから(8), O157:H7 の祖先菌株に類似ファージが独立して感染を繰り返し、現在のような集積が認められるようになったシナリオが考えられる(図 4a)。しかしながら、ファージ間の詳細な相同性解析の結果、Sakai 株に存在する 2 つのファージ, Sp4 と Sp14, において同一の欠失が認められた(17)。このことは、O157:H7 系統内でファージの倍化がおこったことを推測させるものである。さらに、これらのファージゲノムは高度にモザイク状の構造を示していることから、非常に頻繁に類似ファージ間で組み換えがおこってきたと考えられる。現在、筆者らは類似ファージ間の組み換えを基本にした多様性の増幅(図 4c)と同一系統の菌株(図 4b)あるいは他の系統の菌株(図 4d)由来の類似ファージが重感染することによって集積してきたのではないかと考えている。これらの類似ファージが全く異なる環境に生息する異なる系統の菌株由来(図 4e)であれば、新

図 4. ファージの多様性と集積に関するモデル
異なるファージが独立して感染する場合 (a), および単一細胞内あるいはファージ誘発時の組み換え (b-d) によって多様性が生み出され、系統内 (b) あるいは他の系統の菌株 (d) を介しての再感染, あるいは外部からのファージの溶原化 (e) を通じて類似ファージが集積したモデルを示した。

たな遺伝子が導入される可能性を持つであろう。ここに想定したような多様性の増幅と類似ファージの蓄積がおこれば、逆にこのような菌株はさらに多様なファージを産生し、さらなる多様化を引き起こしていくのではないかと考えている。

このようなファージの多様化・増幅がおこった機構を実験的に証明していくことは非常に困難であることが予想されるが、O157:H7 の成立過程を理解するために重要な課題と考えられる。

5. 全ゲノム PCR スキャンニング法の開発と O157 菌株間におけるゲノム多様性

従来、O157 は比較的均一な菌株集団であると考えられていたが、O157:H7 の成立過程でファージの多様化および増幅が起こったのであれば、現在単離される O157:H7 菌株間にも多様性が存在していることになるであろう。

そこで Sakai 株全ゲノム配列を利用した全ゲノム PCR スキャンニング法を開発し O157 菌株間のゲノムの多様性の解明を試みた。PCR スキャンニング法は、Nakayama らによって開発された PCR 法を用いた類似ゲノムの比較解析手法である(12)。基本的には図 5 で示したように、基準株の DNA 配列情報をもとに PCR プライマーを設計し、基準株と解析対象株からの PCR 増幅産物の有無とサイズの違いから、多様性部位を検出していくものである。今回は、染色体および大型プラスミド (pO157) をそれぞれ 549 および 11 セグメントに分割することでこの手法をゲノム全体に拡張し、異なる制限酵素切断パターンを示す 8 株の O157 株のゲノム構造を解析した。全ゲノム PCR スキャンニングの結果は図 6 に示したが、全部で 4392 セグメントの約 6%にあたる 387 セグメントで、PCR 増幅産物が得られな

図 3. Sakai 株に存在する 13 種類のラムダ様ファージ間の DNA 相同性解析

A. プライマーの設定

B. PCR 反応および電気泳動

C. 多様性部位の同定

図 5. PCR スキャンニング法の概略

いかあるいはサイズが異なっていた。これらの多様性領域の量は菌株によって異なるが(図 6), O157 菌株間には予想以上に激しいゲノム構造の多様性が存在することが明らかになった。さらに, この結果を多様性部位と S-loop との関連に着目して解析すると, S-loop を含まないセグメントの 90%は全ての株で保存されている一方で, ファージ関連セグメントでは 7%のみしか保存されていないことが明らか

かにされた(19)。つまり, ファージが O157 菌株のゲノムの多様性に大きく影響を及ぼしていることを示すと同時に, それぞれの菌株が持つファージが非常に多様である可能性を示唆するものである。

なお, 全ゲノム PCR スキャンニングの結果は <http://genome.gen-info.osaka-u.ac.jp/bacteria/o157/pcrscan.html> において公表している。

6. Stx ファージの多様性

全ゲノムPCRスキャンニング法によって菌株間におけるファージの劇的な多様性が示されたが, 個々のファージにおいてその詳細が明らかにされつつある。Mu-like ファージ (Sp18) では菌株ごとのコピー数 (0 ~ 2) や溶原部位の多様性が示された(19)。また, O157 以外の EHEC 株にも共通して存在し, その病原性への関与が示唆されている SpLE1 ではそのコピー数 (1 ~ 2) や内部配列の多様性が示されてきた(11, 19, 27)。

最も注目すべき点は, stx ファージにおける多様性の存在である(図 7)。Sakai 株の stx-2 ファージ (Sp5) は *wrbA* 遺伝子に溶原化しているが, Sp5 領域のスキャンニング結果からは, 8 株のうち 6 株 (no. 2, 3, 4, 6, 7, 8) においてこの位置にファージは溶原化していないことが明らかになった。そこで, stx-2 遺伝子特異的 PCR プライマーと全ゲノム PCR スキャンニングに用いたプライマーを利用して stx-2 遺伝子のゲノム上での位置を検索すると, no2 株の

図 6. O157 菌株の全ゲノム PCR スキャンニングの結果

それぞれの菌株のスキャンニング(上段)と様々なプライマーを用いた確認後の結果(下段)を示した。Sakai 株の増幅産物と同一サイズおよび異なるサイズの増幅産物が得られたセグメントは白色および灰色で示し, 増幅産物の得られないセグメントは黒色で示した。

図 7. O157 菌株のファージ溶原部位の多様性
stx ファージおよび SpLE1 の各菌株の溶原部位を示した。現時点では no 3 および no 7 株の stx-2 ファージと no 7 株の stx-1 ファージ溶原部位は不明である。

stx-2 ファージ溶原部位は Sakai 株の stx-1 ファージ (Sp15) と同一であることが明らかになった。一方, no2 株の stx-1 ファージは ECs2813 (*sbcB*) 遺伝子の 5 末端領域に溶原化していることが示された。さらに注目すべき点は, no 4, no 6 および no8 株の stx-2 ファージは no 2 の stx-1 ファージと同一の位置に溶原化していることが明らかにされた (19)。このような stx ファージの溶原部位の多様性は, 他の菌株においても明らかにされてきているので, 筆者らの解析した菌株に特有のことではない (26)。さらに, これらの新規 stx-1 および stx-2 ファージのゲノム配列は, これまで報告されているいずれの stx ファージ (5, 10, 20, 23, 24) のものとは大きく異なることから (論文未発表), これまで考えられてきた以上に stx ファージは多様であると考えなければならない。これらの stx ファージ間および他のラムダ様ファージとの間の比較解析から stx ファージの多様性形成過程に関する知見が得られることが期待される。

おわりに

筆者らが行ってきた研究により, 高度に保存された大腸菌ゲノムの基本骨格が同定されるとともに, その驚くべき多様性の実体を明らかにすることができた。また, 多様化の過程における外来性遺伝子の獲得, 特にファージの役割を明確にした。このような菌株間でゲノムの多様性が様々な細菌種に広く認められることを腸球菌のゲノム解析からも明らかにしているが (14), これからの細菌病原性の研究においてはゲノムの多様性を十分に考慮しなくてはならないと思われる。本稿においては, ゲノム解析における有効な手段の一つであるサンプルシーケンシングの活用法, さらにゲノム情報を用いた菌株間の多様性解析に威力を発揮する全ゲノム PCR スキャンニング法の紹介をした。筆者らが今回用いた全ゲノム PCR スキャンニング法のプライマーセットは K-12 との共通領域に対応するサブセットと

S-loop に対応するサブセットの 2 つから構成されていて, O157 以外の大腸菌にも利用できるように設計してある。実際に O157 以外の EHEC 菌株のゲノムの多様性解析が宮崎大学の小椋らによって進められている。さらに, これらの方法が今後様々な菌種のゲノム解析に応用されていくことが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 大阪大学遺伝情報実験センターの黒川 顕博士をはじめ, 学術振興会未来開拓事業「病原微生物ゲノムプロジェクト」においてお世話になった多くの共同研究者, 寺脇良郎名誉教授をはじめ信州大学医学部細菌学講座の元教室員の方々, そして黒屋奨学賞に御推薦いただいた宮崎大学教授 林 哲也博士をはじめとする宮崎大学医学部微生物学講座の教室員の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Bergthorsson, U., Ochman, H. (1995): Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **177**, 5784–5789.
- 2) Bergthorsson, U., Ochman, H. (1998): Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. Mol. Biol. Evol. **15**, 6–16.
- 3) Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., Finlay, B.B. (2004): Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 3597–3602.
- 4) Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelly, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.D., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.D.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C. (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science **269**, 496–512.
- 5) Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H. (2001): Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA Res. **8**, 11–22.
- 6) 林 哲也, 大西 真 (2001): 腸管出血性大腸菌 O157:H7. 臨床と微生物 **28**, 751–758.
- 7) Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., Whittam, T.S. (1990): Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**, 6175–6181.
- 8) Juhala, R.J., Ford, M.E., Duda, R.L., Youton, A., Hatfull, G.F., Hendrix, R.W. (2000): Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. J. Mol. Biol. **26**, 27–51.
- 9) Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., Denamur, E. (1998):

- Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol. Biol. Evol. **15**, 1685–1695.
- 10) Miyamoto, H., Nakai, W., Yajima, N., Fujibayashi, A., Higuchi, T., Sato, K., Matsushiro, A. (1999): Sequence analysis of Stx2-converting phage VT2-Sa shows a great divergence in early regulation and replication regions. DNA Res. **6**, 235–240.
 - 11) Nakano, M., Iida, T., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Takahashi, A., Tsukamoto, T., Yasunaga, T., Hayashi, T. and Honda, T. (2001): Association of the urease gene with enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains irrespective of their serogroups. J. Clin. Microbiol. **39**, 4541–4513.
 - 12) Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H., Hayashi, T. (2000): The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. Mol. Microbiol. **38**, 213–231.
 - 13) Nataro, J.P., Kaper J.B. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **11**, 142–201.
 - 14) Oana, K., Okimura, Y., Kawakami, Y., Hayashida, N., Shimosaka, M., Okazaki, M., Hayashi, T., Ohnishi, M. (2002): Physical and genetic map of *Enterococcus faecium* ATCC19434 and demonstration of intra- and interspecific genomic diversity in enterococci. FEMS Microbiol. Lett. **207**, 133–139.
 - 15) Ohnishi, M., Tanaka, C., Kuhara, S., Ishii, K., Hattori, M., Kurokawa, K., Yasunaga, T., Makino, K., Shinagawa, H., Murata, T., Nakayama, K., Terawaki, Y., Hayashi, T. (1999): Chromosome of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; comparative analysis with K-12 MG1655 revealed the acquisition of a large amount of foreign DNAs. DNA Res. **6**, 361–368.
 - 16) Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Hattori, M., Kurokawa, K., Yasunaga, T., Yokoyama, K., Makino, K., Shinagawa, H., Hayashi, T. (2000): Comparative analysis of the whole set of rRNA operons between an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai strain and an *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. Syst. Appl. Microbiol. **23**, 315–324.
 - 17) Ohnishi, M., Kurokawa, K., Hayashi, T. (2001): Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? Trends Microbiol. **9**, 481–485.
 - 18) 大西 真, 黒川 颯, 林 哲也 (2001): 腸管出血性大腸菌 O157 全ゲノム配列決定の意義. 蛋白質 核酸 酵素 **46**, 1862–1866.
 - 19) Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., Hayashi, T. (2002): Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 17043–17048.
 - 20) Perna, N.T., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R. (2001): Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature **409**, 529–533.
 - 21) Pupo, G.M., Karaolis, D.K., Lan, R., Reeves, P.R. (1997): Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. Infect Immun. **65**, 2685–2692.
 - 22) Russo, T.A., Johnson, J.R. (2003): Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes. Infect. **5**, 449–456.
 - 23) Sato, T., Shimizu, T., Watarai, M., Kobayashi, M., Kano, S., Hamabata, T., Takeda, Y., Yamasaki, S. (2003): Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages. Gene. **24**, 35–48.
 - 24) Sato, T., Shimizu, T., Watarai, M., Kobayashi, M., Kano, S., Hamabata, T., Takeda, Y., Yamasaki, S. (2003): Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. J. Bacteriol. **185**, 3966–3971.
 - 25) Selander, R.K., Caugant, D.A., Whittam, T.S. (1987): In: Drlica, K., Riley, M. (eds), The bacterial chromosome. ASM Press, Washington, D.C., 1625–1648.
 - 26) Shaikh, N., Tarr, P.I. (2003): *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. J. Bacteriol. **185**, 3596–3605.
 - 27) Taylor, D.E., Rooker, M., Keelan, M., Ng, L.K., Martin, I., Perna, N.T., Burland, N.T., Blattner, F.R. (2002): Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. J. Bacteriol. **184**, 4690–4698.