

これからの細菌のゲノムタイピングとしてのMLST法

New genomic typing method MLST

き 村 凡
木 村 凡
Bon KIMURA

要 旨

病原菌や食中毒菌の感染ルートの把握には、精度の高い鑑別法 (fingerprinting) が求められる。これまでに細菌の株レベルのゲノムタイピングは主としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE法) に代表されるフラグメント解析が主流であった。このような解析法技術は、ある特定の限定された地域での疫学には極めて有効であったが、世界の複数研究室でのデータの互換性という観点からみるとかならずしも大きな力を発揮してきたとはいえない。世界のインターネット化がますます加速する中で、今後、細菌の株レベルのタイピング法は、これまでのようなフラグメント解析ではなく、DNA配列解析が主流になっていくことが予想される。これまで細菌のゲノムタイピングにフラグメント解析が広く用いられてきた理由は、配列解析では多数の菌株の解析を迅速に行うことができず、また、分析費用も高コストであったという理由からである。ところが、最近のDNAシーケンサーの飛躍的解析能力の向上と分析コストの低下により、細菌のゲノムタイピングは、もはやフラグメントではなく配列解析を日常的に実施できるところまできている。

本稿では、最近登場してきた multilocus sequence typing (MLST) 法について解説を加えた。本手法では菌株毎に複数遺伝子の配列の差異をパターン化して (alleles に分別)、それらを統合遺伝子解析ソフトにより総合的に解析することにより、PFGE法以上の解像度で株の識別能を達成する技術である。MLSTは、今後、多くの病原細菌や食中毒菌のゲノ

ムタイピング技術として普及していくことが予想される。

はじめに

1990年代にPCR法が登場し細菌学のゲノム科学が急速な発展をとげる前までは、病原菌や食中毒菌の感染ルートの把握には血清型が広く用いられてきた。しかし、血清型の識別能には限界があり、多くの病原菌や食中毒菌の疫学解析で、血清型より解像度が高く、かつ、簡便、正確な菌株識別データが求められている¹⁾。フラグメント解析とは、ゲノムを制限酵素で切断する、あるいは、ゲノム中の特定の領域をPCR法などで増幅することにより、一定の長さのDNA断片の出現パターンを電気泳動上で比較する技術である。本来、細菌を株レベルで識別するには、細菌のもっている全ゲノムからの情報の比較が基本となるので、PFGE法は現場レベルでこの目的を達することのできる数少ない方法の1つとして普及してきた。しかし、PFGE法は実験操作が煩雑であり、解析に長時間を要するという欠点がある。このため、より簡便迅速な手法が求められる臨床検査や食中毒菌検査の現場では、RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 法²⁾やAFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法³⁾、Ribotyping⁴⁾などの簡便法も開発され、一部の臨床検査や食中毒菌検査の現場で活用されてきた。

本稿では、病原細菌や食中毒菌の疫学解析を目的として、今後、細菌の株タイピングの主流になることが予想される multilocus sequence typing (MLST) 法⁵⁾について、解説をすることとする。

I. これまでに普及してきた ゲノムタイピング技術

これまで細菌の株レベルのタイピング法としては、PFGE法が主として普及してきた。PFGE法⁷⁾は臨床検査や食中毒菌検査の現場に最も広く普及している技法であるので、原理の解説については本稿の読者には必要はないと思うが、フラグメント解析の代表的な技術であるので、ここでは一応簡単にその原理を述べておく。PFGE法は細菌のゲノムを制限酵素（遺伝子の特別な配列だけを認識してその部位で切断する酵素）処理をして、切断された断片の長さの違いを解析する手法である。パルスフィールド電気泳動という巨大DNA分子専用の電気泳動により切断断片を分離し、異なる分子量の断片の数の違いにより株の分別をする方法である。細菌の持っている遺伝子（約 10^6 塩基）の全塩基配列を読むことが可能なら、株の分別はおろか1クローンの分裂にともなう突然変異をも識別できることになる。PFGE法では、最近の全ゲノムの塩基配列を読むより解像度は落ちるが、全ゲノムを対象とした解析手法なので、例えば16S rDNAやその他のタンパク質コード遺伝子の全長の塩基配列（通常、1000～2000塩基）を読むよりは、はるかに高い解像度が得られる。PFGE法は病原菌や食中毒菌の疫学解析に広く用いられており、1996年には、PulseNetと呼ばれる国際ネットワークもCDCを中心に設立されている⁸⁾。これはPFGE法によるタイピング法を標準化し、得られた遺伝子パターンをデータベース化するもので、ネットワークにアクセスする研究室では食中毒発生時に、CDCのデータベースと照合を行えるようになっている。

さて、PFGE法の欠点は、実験操作が煩雑であり、解析に長時間を要するという点である。このような欠点を補うために、RAPD法³⁾やAFLP法⁴⁾、Ribotyping⁵⁾法などのゲノムタイピング法も病原菌や食中毒菌の株の識別に用いられている。ここでは、紙面の都合上、これらの手法の説明は省略するが、RAPD法は再現性に問題があり、多くの研究者の共通データとなりにくい欠点がある。また、Ribotyping法については、リボプリンターなどの全自動装置も販売されており簡便性という点では優れている

が⁹⁾、装置やランニングコストも高いという欠点があり、また、株識別の解像度はPFGE法より劣る。さらに、RAPD法の低い再現性を解消すべく開発されたAFLP法も、操作は決して簡便とはいえない。

PFGE法、RAPD法、AFLP法、リボプリンター法の共通の技術的特徴は、これらがすべてフラグメント解析技術であるという点である。これらフラグメント解析技術は、すべて、原則として電気泳動ゲル上での遺伝子断片の数や移動度を解析するものである。このようなフラグメント解析の最大の欠点は、解析するフラグメントの採否をめぐるバンドの濃さの閾値や移動度の微細な差異に関する判断などについて実験者や研究者ごとの違いが生じ、国際的に複数の研究室でのデータの互換性が乏しいという点である。PFGE法におけるPulseNetもその例外ではなく、実験者や研究室での解析技術によるフラグメントデータの標準化を達成するためには煩雑な手間を要する。また、フラグメント解析の本質的な欠点として、同一サイズのフラグメントが同一遺伝子とは限らない点があげられる。つまり、フラグメント解析は、本質的には系統解析（菌株間の進化的距離の解析）には向いていない技術といえる。

これまでフラグメント解析が広く用いられてきた理由は、「配列を読む技術がない」「配列を読むと時間がかかる」「配列を読むとコストがかかる」といった技術的、経済的理由からである。歴史的にみると、例えば、1990年代初頭、PCR法が生物学の領域に登場し、生物のDNA配列が研究者にとって身近になった頃、細菌学の分野では種の同定を16S rDNA配列で決定する技術が導入された。しかし、当時は、DNAシーケンサーは高価な装置であり、大学や研究機関に1装置導入するのがやつの時代であったため、手元の細菌の16S rDNA配列を簡単に読むことはできなかった（わずか、1500塩基であっても！）。そこで、当時専ら行われたことは、16S rDNA増幅断片の全塩基配列を読むかわりに、これらを制限酵素で切断し、出現するフラグメントパターンでおよその細菌の同定やグルーピングを行う手法であった。16S rDNAに限らず、当時は、1500塩基程度の塩基配列を読むことも、時間的、経済的に、研究者にとって大変敷居が高く、上記のようなフラグメント解析が盛んに行われた。しかし、

このような1遺伝子レベルのフラグメント解析は1990年代の後半になると、DNA配列解析技術の迅速化、低コスト化にともない、ほとんど行われなくなった。さらに、2000年代になり、DNAシーケンサ装置や分析コストも大幅に下がり、今では1研究室レベルで数個の遺伝子の全長の塩基配列を1日で読むこともそれほど難しくなくなっている。

さて、細菌の株の識別タイピングは、種の同定とは異なり、1500塩基程度のDNAから抽出される遺伝的情報では、解像度の点から、とても十分な識別の目的を達することはできない。細菌の持っている全ゲノムは約 10^6 bpであるが、株レベルの識別には全ゲノムから抽出される遺伝情報が必要となる。残念ながら、いくら塩基配列を読む技術が進歩し、コストが低下したとはいえ、2006年現在でも、複数の細菌の全ゲノム(10^6 塩基)を1研究室で読むことは不可能である。そこで、ちょうど1990年代前半に1500塩基程度のDNA断片で盛んに行われていた制限酵素処理による断片解析を全ゲノム対象に実施している技術こそPFGE法であるといえる。

II. 時代は配列解析へ—新しい株タイピング法として期待されるMLST法

上述したようにPFGE法は、1990年代から現在までの細菌のゲノム科学の発展とともに株タイピングの主役を務めてきた。しかし、今、インターネットによる世界レベルの菌株情報共有時代へむけて、そろそろその役目を終え、次の技術にバトンを渡す時期がきているといえる。

本来、世界で共通のデータを共有しようとするなら、遺伝子配列情報に勝るものはない。ATGGT…といった配列情報は、世界のどの研究室で解析しても同じであり、正確で共通なデータがインターネット上で交換できる(図1)。上述したように、これまでも、ある特定の遺伝子配列(16S rDNA、*gyrB*など)による微生物の種レベルの識別は行われてきた。しかし、株レベルの識別には1つや2つの遺伝子(通常1000塩基程度)の配列情報の解像度では、とてもその目的を達成することができない。このため、遺伝子配列情報で株の識別をすることはこれまで行われてきていなかった。ところが、最近のDNAシーケンサーの飛躍的解析能力の向上とコ

ストの低下により、細菌の株タイピングの世界においても、もはやフラグメントではなく、配列解析を日常的に実施できるところまでできている。生物・医学領域におけるDNA塩基配列決定のペースはあっと驚くようなものである(図2)。10年ほど前には科学者がその位置を知っている人間の遺伝子の数はいくつもなかった。2002年までにヒトゲノム計画が計画当初よりもはるかに速いスピードで達成されたことは記憶に新しいし、今後、私たちが決定することのできるDNA配列決定スピードは約2年間で倍の速度になるであろうとの予測もされている¹⁰⁾。21世紀医学の想像の姿として、親から受け継いだ自分自身のDNA配列遺伝子と将来発病する危険性についての情報の入ったCDを自分のマッキントッシュで分析できる世界すらリアルな近未来の姿として予測されている¹⁰⁾。

このようなDNA解析の高速化、低コスト化潮流の中で、細菌のDNA解析においても多数の菌株についてそれぞれ5~6遺伝子領域を同時に数百塩基ずつを日常的に解析することが可能となった。そこで、登場してきたのがmulti locus sequencing typing (MLST)⁶⁾法である。本手法は、複数の遺伝子領域(通常7領域以上)のそれぞれ400塩基程度の配列

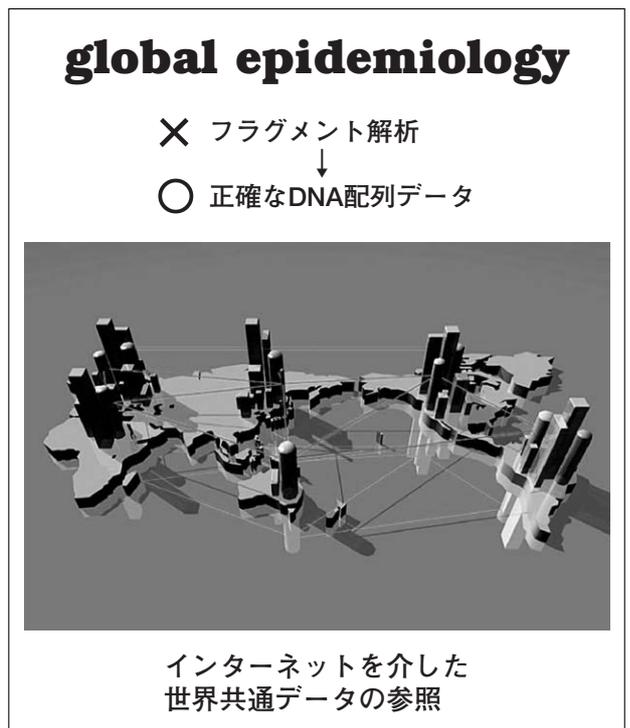


図1 これからの菌株識別は、インターネットを介した世界共通データの参照が普通になる

を読み、それらをもとに菌のタイピングを行う方法である。菌株ごとに複数遺伝子の配列の差異をパターン化して (alleles に分別)、それらを統合遺伝子解析ソフトにより総合的に解析することにより、PFGE法以上の解像度での株識能を達成することが可能となる。これまでの多くの遺伝子解析による系統樹の作成の仕方と異なるのは、各遺伝子の配列そのものから系統樹を書くのではなく、各遺伝子の配列の差異をグループ化して、そのグループ番号から系統樹を書くものである (図3)。つまり、ある遺伝子で、A株、B株、C株の間に遺伝子配列の違いがあればすべて異なるグループ (alleles) に分類される。しかし、これまでの遺伝子配列をもとにした系統樹作成法と異なり、A株とB株との間の遺伝子配列の異なる塩基数は問題とならない。例えば、A株B株の間に1塩基のみの差異があり、A株とC株の間に10塩基に差異があった場合、これまでの遺伝子配列による系統樹ではA、B株は近く、C株は遠い位置に系統樹が作成された。しかし、MLST法ではA,B,C株の差

異は均等に扱われる。この理由は、4. で述べる。

MLST法ではPFGE法と異なり、操作は遺伝子配列を決定するという単純な操作で実施できる。その後の配列編集や系統解析なども、便利なソフトが市販 (Applied-Maths社のBioNumerics™が最も広く用いられている) されているので、難しい作業ではない。また、最近普及の著しいマルチキャピラリーシーケンサーを用いれば、操作のかなりの部分が自動化されている。また、最大の利点は遺伝子配列情報に基づくため、世界中の研究室で電子データの交換が可能であるという点である。本技術は、これまですでに多くの食中毒菌や病原菌で活用され始めており¹¹⁻¹⁷⁾、今後、さらに多くの細菌のゲノムタイピング技術として普及していくことが予想される。

Ⅲ. なぜ複数遺伝子配列 (Multi Locus)なのか?

ここでMLST法が登場してきた理論的背景につ

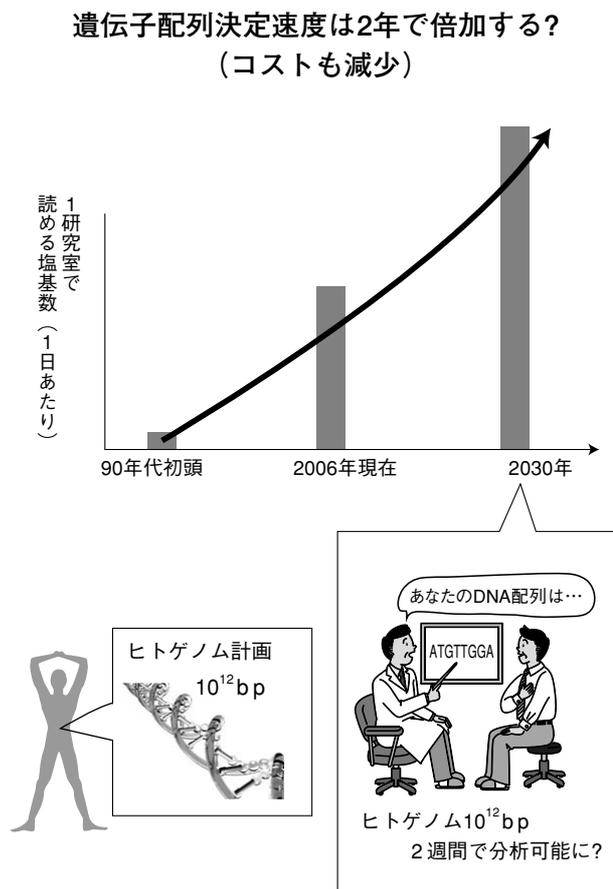


図2 遺伝子配列読速度の進歩はめざましい

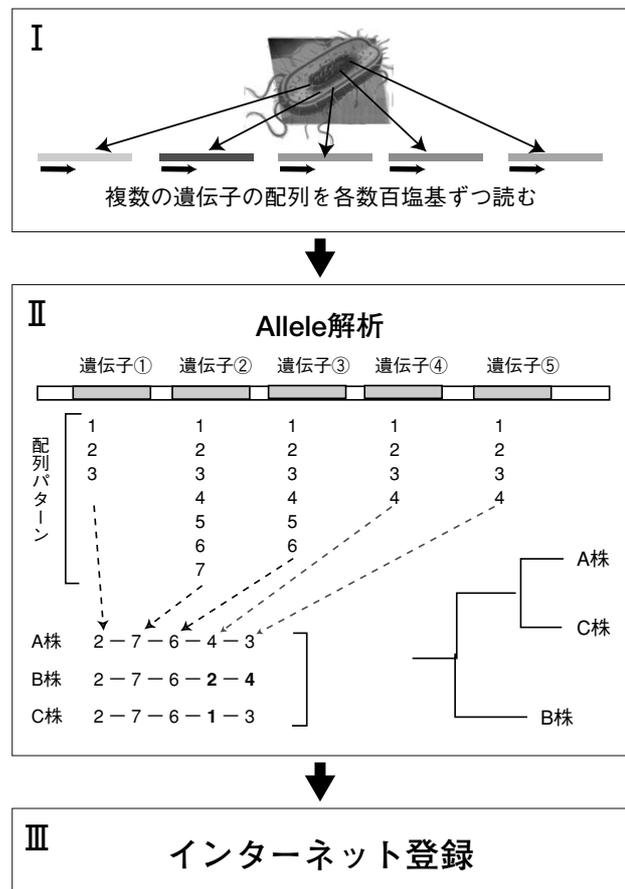


図3 2005～2015年の菌株識別として主流となると予測されるMLST解析の手順

いて改めて解説しておく。前述したように MLST 法登場は、DNA 解析の高速化、低コスト化への潮流の中で自然の成り行きとして登場してきた。しかし、もう1つの理由として、細菌の系統に対する私たちの認識がこの15年間での大きく変化した点もあげられる。この15年間で、細菌のゲノム進化に対するわれわれの認識は、細菌集団を clonal population ととらえることから、nonclonal population ととらえる方向に変化した¹⁸⁾。1990年代、私たち研究者の間で自分の扱う細菌の遺伝子配列（多くの場合 16S rDNA）を読むことができるようになった時点では、細菌遺伝子の進化は主に点変異によって起き、それが子孫に伝わっていくという考え方が主流であった。ところが、この15年の間で、世界中の種々の細菌のさまざまな遺伝子配列が明らかにされると、細菌遺伝子の進化は必ずしも点変異だけではなく、水平伝播などによる大きな遺伝子断片の相同組み換えが私たちの想像していた以上に頻繁に起きていることが次第に明らかとなってきた^{18~20)}。

細菌遺伝子の進化が、点変異の蓄積のみが子孫に伝わっていく結果と考える場合、私たちはその細菌集団を clonal population と呼ぶ¹⁸⁾。一方、相同組み換えなど大きな遺伝子断片の交換が頻繁に起きている

と考えられる集団を nonclonal population と呼ぶ¹⁸⁾。clonal population であったなら、その細菌の系統はたった1つの遺伝子の配列からつくられた系統樹でもほぼ正しく系統を反映することができる。しかし、nonclonal population の場合、ひとつの遺伝子だけで系統樹を書くと、仮にその遺伝子内で1回大きな遺伝子断片の相同組み換えが起きていたとすると、その組み換えを起こした株のみは、他の株に比べて系統的に遠くかけ離れたところに置かれてしまう。

一方、大きな断片の相同組み換えを起していないものの、点変異を複数回おこした株は、本来、上記A株より系統的（つまり進化時間的に）にはるかにかけ離れている存在であるが、上記A株より元株に近い位置に系統樹が書かれてしまう。このように、相同組み換えが頻繁に起きる nonclonal population の場合、たった1つの遺伝子で系統樹を書くのは系統を誤る可能性が高い（図4）。本稿で述べる MLST では、1) 複数の遺伝子配列情報を元に系統を書く、2) 遺伝子配列そのものを元に系統を書くのではなく、遺伝子配列の差異（alleles）に基づいて系統樹を書くため、nonclonal population についても実際におきた進化的時間軸を正しく反映した系統樹が書けるわけである。

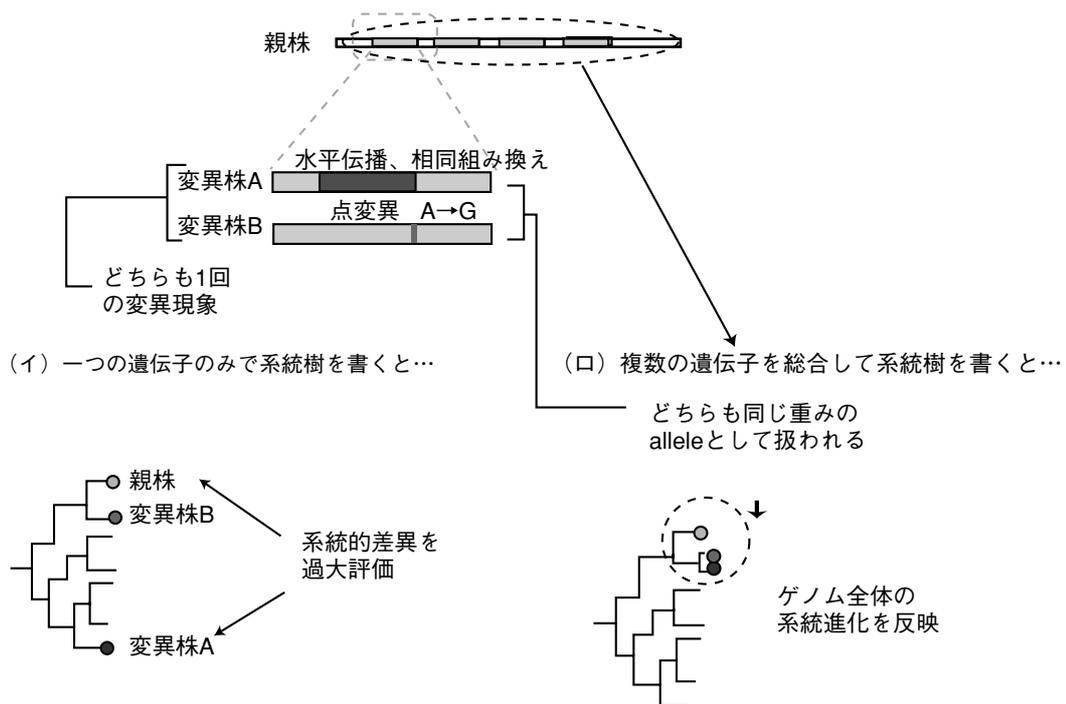


図4 なぜ、multilocus sequence typing 解析か？ Nonclonal population では複数の遺伝子に allele 解析が必要となる。

IV. MLST 解析に用いる遺伝子は?

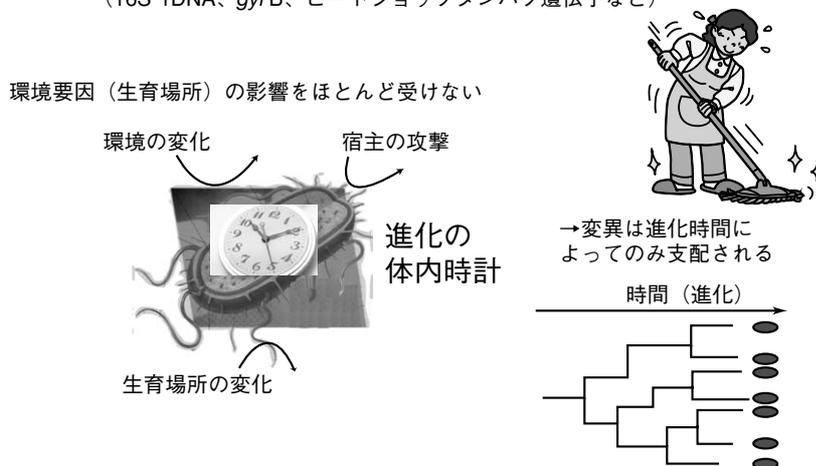
次に、MLST 解析に用いるべき遺伝子について述べることにする。細菌のタイピングに用いる遺伝子を大別すると、housekeeping 遺伝子とその他の変化しやすい遺伝子に2分できる(図5)。housekeeping 遺伝子とは、細菌の生存の根幹にかかわる遺伝子であり、たとえばリボゾームの遺伝子(16S rDNA)²¹⁾やDNAの複製に関与するジャイレース遺伝子(*gyrB*)²²⁾、ヒートショックタンパクなどのストレスタンパク遺伝子²³⁾などがこれにあたる。housekeeping 遺伝子の変異は細胞にとって根幹的な作用に影響を与えるため、ほとんどの場合、変異を起こした細胞

は死滅するか、少なくとも、集団の中で淘汰されてしまうため、遺伝子の進化速度は遅い²⁴⁾。また、これらの遺伝子の変異が子孫に残るか否かについては、細菌のおかれた環境要因の影響はほとんど受けない。いわば、これらの housekeeping 遺伝子の進化は、「進化の体内時計」として捉えることができる。

一方、細菌は、housekeeping 遺伝子以外に、細胞の生存の根幹にかかわらない遺伝子も多くもつ。例えば、ある糖を代謝する遺伝子とか、鞭毛の遺伝子などはこれにあたる。病原細菌の場合、血清型を決める遺伝子や病原性遺伝子そのものも、菌自体の生存の根幹にかかわらないので(偏性病原体の場合は別)、こちらのグループに分類できる。このような、遺伝子群は、環境の変化に応じて比較的变化し

●housekeeping遺伝子

(16S rDNA、*gyrB*、ヒートショックタンパク遺伝子など)



●変異しやすい遺伝子

(病原性因子、血清型決定遺伝子、鞭毛遺伝子、糖の利用性に関する遺伝子など)

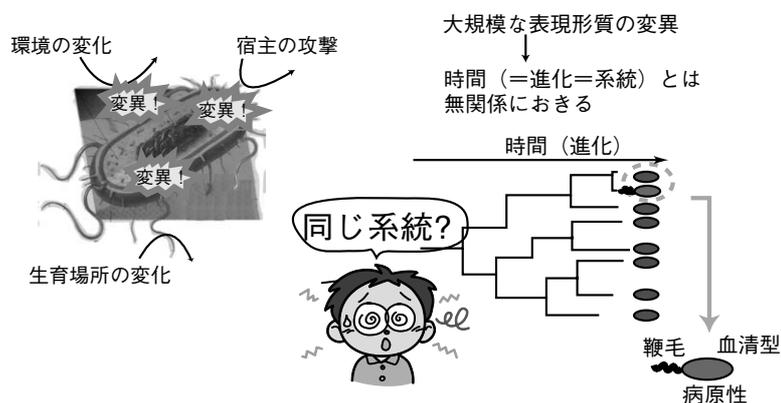


図5 細菌の系統を調べる場合、housekeeping 遺伝子を使うと進化時間を反映した系統が得られる。一方、変異しやすい遺伝子は、近い過去の環境変化を反映するが、真の進化時間を反映した系統は得られない場合が多い。

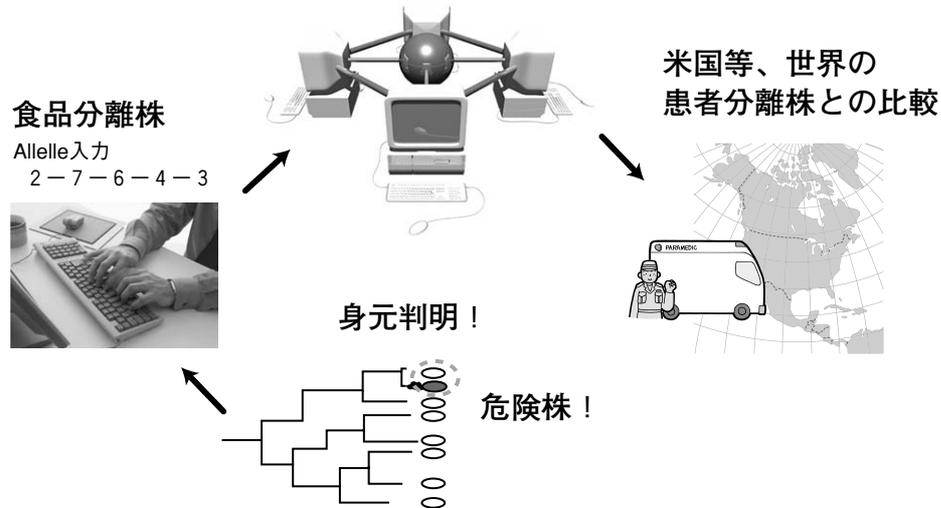


図6 今後の臨床微生物や食中毒細菌検査における MLST 解析の活用イメージ

やすい^{6, 25)}。つまり、変異が致命的なマイナスでない場合は、長い進化の過程でこれらの遺伝子の変異は、housekeeping 遺伝子に比べると子孫に伝えられやすい。このような変化しやすい遺伝子は、鞭毛の有無や病原性、血清型、糖の発酵性など、それを検査する人間から見ると一見して大変大きな差異を生じる場合が多いので、分子生物学的な系統では極めて近縁であっても、表現形質からみると、全くの別種に分類されてしまっていたケースも多い。これらの株を housekeeping 遺伝子により本来の進化の歴史時間から細菌の系統を解析してみると、しばしばひとつの種内のきわめて近縁な株であることが明らかとなっている。これらの株は、進化時間的にいえば、ごく最近に、変わりやすい遺伝子の変異が起き、環境の変化により選択淘汰され、わたしたち人間から見ると随分違う菌のようになったものと考えられる。例えば、*Photobacterium damsela* (日和見感染菌)と *Pasteurella piscicida* (魚病菌)などは、鞭毛の有無やさまざまな生化学性状の違いから別種として長く扱われてきたが、16S rDNA 解析により同一種に統合された²⁶⁾。また、大腸菌と赤痢菌などは、リジン脱炭素酵素の有無などの表現形質に差異はあるが、分子系統的には同種といってよい²⁷⁾。

以上、細菌の系統樹を書く場合に housekeeping 遺伝子を用いると、系統を正しく反映するが、その他の遺伝子を用いると系統を反映しない場合があるという欠点について述べた。したがって、細菌の系統を正しく反映させたい場合、言い換えると、進化的

時間通りに系統樹を書きたい場合は、housekeeping 遺伝子を用いる必要がある。事実、MLST では、housekeeping 遺伝子を用いることが基本的考え方になっている^{6, 25)}。

この場合、病原細菌の疫学的株の識別を目的とする場合、株の識別解像度が問題となる。上述したように、MLST 解析に用いる遺伝子は housekeeping 遺伝子を用いるのが基本であるが、housekeeping 遺伝子を用いると、株の識別解像度が低下してしまうという欠点もある²⁸⁾。そこで、病原細菌の場合、あえて変異の多い病原遺伝子を用いて解析する場合もある²⁹⁾。このように変異の多い遺伝子を用いた解析は、高い解像度が要求される特定エリアでの疫学解析では便利である。ただし、用いる遺伝子の進化的特性（水平伝播の可能性の高さ）を十分把握した上で解析を行う必要がある。

おわりに

本稿では、病原菌の株の識別方法として、PFGE 法にかわって今後世界的な標準法になっていく可能性のある MLST 法について解説した。遺伝子配列の解析技術やその活用分野の発展速度は目を見張るものがある。今後、日常検査の現場で、より簡便で低コストで遺伝子配列の解析が行われ、そのデータ活用がインターネットを介して世界的に瞬時に行われるようになることが期待される (図6)。

文 献

- 1) van Belkum, A. et al.: Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **14** : 547-560, 2001.
- 2) Arens, M.: Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** : 612-626, 1999.
- 3) Bingen, E. et al.: Randomly amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcus bacteremia isolates in pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* **33** : 1657-1659, 1995.
- 4) Keim, P. et al.: Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J. Bacteriol.* **179** : 818-824, 1997.
- 5) Faruque, S. et al.: Molecular epidemiology of toxigenic *Vibrio cholerae* in Bangladesh studied by numerical analysis of rRNA gene restriction patterns. *J. Clin. Microbiol.* **33** : 2833-2838, 1995.
- 6) Maiden, M. C., et al.: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 3140-3145, 1998.
- 7) Wallace, R. J. et al.: DNA large restriction fragment pattern of sporadic and epidemic nosocomial strains of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *J. Clin. Microbiol.* **31** : 2697-2701, 1993.
- 8) Swaminathan, B. et al.: PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **7** : 382-389, 2001.
- 9) Clermont, O. et al.: Automated ribotyping provides rapid phylogenetic subgroup affiliation of clinical extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39** : 4549-4553, 2001.
- 10) Kaku, M.: *Visions : How science will revolutionize the 21st century*, Oxford University Press, New York, 1998
- 11) Miller, W. G. et al.: Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J. Clin. Microbiol.* **43** : 2315-2329, 2005.
- 12) Curran, B. et al.: Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **42** : 5644-5649, 2004.
- 13) Kotetishvili, M. et al.: Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40** : 1626-1635, 2002.
- 14) Zadoks, R. N. et al.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene *pauA*. *J. Clin. Microbiol.* **43** : 2407-2417, 2005.
- 15) Salcedo, C. et al.: Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.* **41** : 757-762, 2003.
- 16) Smith, E. M. et al.: Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43** : 4737-4743, 2005.
- 17) Adiri, R. S. et al.: Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **222** : 199-203, 2003.
- 18) Urwin, R., Maiden, M.C.: Multi-locus sequence typing : A tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.*, **11** : 479-487, 2003.
- 19) Maynard Smith, J. et al. : Localized sex in bacteria. *Nature* : **349**, 29-31, 1991
- 20) Maynard Smith, J. et al. : How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4384-4388, 1993.
- 21) Clarridge, J. E., III. : Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17** : 840-862, 2004.
- 22) Yamamoto, S., Harayama, S.: PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1104-1109, 1995.
- 23) Gupta, R. S. et al.: Sequencing of heat shock protein 70 (DnaK) homologs from *Deinococcus proteolyticus* and *Thermomicrobium roseum* and their integration in a protein-based phylogeny of prokaryotes. *J. Bacteriol.* **179** : 345-357, 1997.
- 24) Palys, T. et al.: Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** : 1145-1156, 1997.
- 25) Cai, S. et al.: Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **40** : 3319-3325, 2002.
- 26) Gauthier, G. et al.: Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Sargalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** : 139-144, 1995.
- 27) Pupo, G. M. et al.: Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* **65** : 2685-2692, 1997.
- 28) Noller, A. C. et al.: Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157 : H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **41** : 675-679, 2003.
- 29) Zhang, W. et al.: Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 913-920, 2004.