

*H. pylori*のquorum sensing シグナル分子 AI-2をコードする遺伝子*luxS*変異が細胞寿命に及ぼす影響

Effects of *luxS* mutation encoding quorum sensing signaling molecule, AI-2 on the cellular life span in *H. pylori*.

溝手 朝子、佐藤 貴子
Tomoko Mizote, Takako Sato

細菌の共通言語とされているAI-2は、種を超えて互いの細胞数を感知するコミュニケーション言語として知られている。*H. pylori*の持つquorum sensing機構の*luxS*/AI-2 systemが*H. pylori*自身への成長因子に直接応答し、AI-2に依存する細胞密度依存的な増殖制御を行っている可能性を検証するため、AI-2を利用した過剰増殖過程を制御する細胞間シグナリングの有無を明らかにしようとした。

*H. pylori*の*luxS*遺伝子は、ATCC43504のORF HP0105に設計されており、AI-2を生産するとされるS-ribosylhomocysteinaseをコードする。PCRにより*luxS*遺伝子を増幅し、pUC4K由来のKMカセットを挿入したpTLKを作製した。これをATCC43504に自然形質転換し*luxS*欠損突然変異株のHPT105を作成した。

野生株とHPT105の増殖曲線を作成したところ、本培養開始時点から36時間までの対数増殖期において、野生株とHPT105の増殖曲線に明確な差は見られなかった。しかし、いくつかの興味ある知見が得られた。(1) 定常期に入り、55時間以降の時点で、HPT105に対し、野生株は約3倍の傾きで濁度が減少した。つまり、HPT105は長い寿命を持つ細胞が多く存在する。(2) 野生株とHPT105の培養液上清みの添加培養では、野生株の上清みを添加した培養液に明確な濁度の減少見られた。つまり、野生株培養上清には細胞増殖後期の制御をおこなう物質が含まれている。(3) HPT105は長期培養すると螺旋形状を長時間維持できる。

AI-2 is well known molecule as the inter-bacterial communication signal which enables the bacteria to co-ordinate their behavior to function. We assumed that *luxS*/AI-2 system involved in quorum sensing in *H. pylori* might play an important role to affects directly to the own growth factor, which would reflect the cell density-dependent growth regulation. In this study, we showed the inter-cellular signaling system which regulate over growth phase by AI-2.

HP0105, *luxS* gene of *H. pylori* which encodes S-ribosylhomocysteinase catalyzes the production of AI-2. The *luxS* mutant HPT105 was isolated by allele exchange technique with *luxS* disrupted by KM cassette derived from pUC4K, pTLK.

There was no apparent growth curve difference between wildtype strain and *luxS* mutant strain from the beginning of the culture until late-log phase, 36 hours. However, some interesting evidences were found through this study. (1)The turbidity co-efficiency of wild type strain was one third of its HPT105 from 55 hours onwards, which meant *luxS* mutant lived longer than wildtype strain. (2) The addition of cell culture supernatant of wildtype strain to the fresh cell culture of HPT105 showed more gentle reduction of turbidity than addition of culture supernatant to the wildtype cells. (3) HPT105 cells could maintain spiral form longer even in the decline phase.

多くの細菌は細胞外へ拡散する分子シグナルを生産、放出し、細胞間の情報伝達を行うシステムを持っている。放出されたシグナル分子の濃度に応答し、細胞数を感知する現象は、1994年Fuqua *et al.*により発見され、quorum sensing と呼ばれている⁽¹⁶⁾。細菌同士の分子シグナルとして使われる物質は、autoinducer (AI) と呼ばれる。1970年Nealson *et*

*al.*により、海洋グラム陰性共生細菌 *Vibrio fischeri* がAIによってluminescence生産をコントロールしていることが明らかにされた⁽¹⁷⁾。AIには、グラム陽性・陰性細菌それぞれに特有なhomoserine lactone誘導体から構成されるAI-1と、種を越えて共有するfuranone誘導体から構成されるAI-2の2種類が存在する(図1)^(2,4,7)。

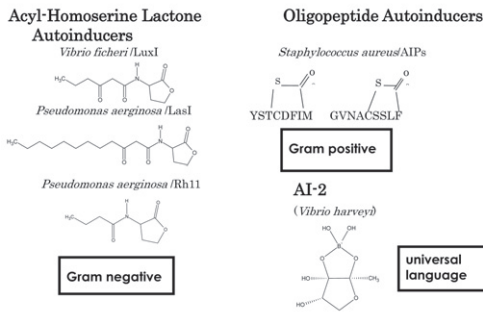


図1 代表的な autoinducer (AI)

グラム陽性細菌は、AIとして oligopeptide を合成し、ABC 輸送複合体 (ATP-Binding Cassette transporter complexes) を介して菌体外に輸送される。細胞密度が上昇し、環境中の oligopeptide 濃度が閾値に達すると、two-component sensory transduction system により oligopeptide が直接細胞表面にある sensor kinase へ結合することで、response regulator のリン酸化を介して病原遺伝子の発現や Biofilm 形成などが行われる⁽¹⁵⁾。さらに、homology 検索により、*V. harveyi* の *luxS* 遺伝子が *S. aureus* や *B. subtilis* などのグラム陽性細菌の遺伝子と高い homology を持つことから、グラム陽性細菌の *luxS* 遺伝子の存在が明らかになった⁽¹⁵⁾。

グラム陰性細菌の quorum sensing 機構は、*V. fischeri*、*V. harveyi* の機構がよく知られている。*V. fischeri* では、autoinducer 合成酵素 (LuxI) によって acyl-homoserine lactone (AHL) を合成し、自由拡散する。細胞密度が高くなるにつれて AI の濃度が高くなり、AI が閾濃度に達すると、細胞質内にある LuxR と結合し AI を感知する。AI と AI receptor (LuxR) は種によって特異的な組み合わせがあり、同じ AI と AI receptor を持つ種は同様にシグナルを感知し、応答する。

一方 *V. harveyi* では、AI の生成と感知の違いによって 2 つの quorum sensing system (AI-1 system、AI-2 system) を持ち、同時に細胞密度依存的に bioluminescence (*lux operon*) をコントロールすることが明らかになっている (図2)。

AI-1 system を司る AI-1 は acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) からアシル基部分を S-adenosyl-methionine (SAM) の homocysteine へ結合させる酵素 (LuxLM) によって合成される。LuxLM は LuxI family と共通の homology は見られないが LuxI-type の酵素を合成する。AI-1 の感知は two-component sensor の kinase-response regulator

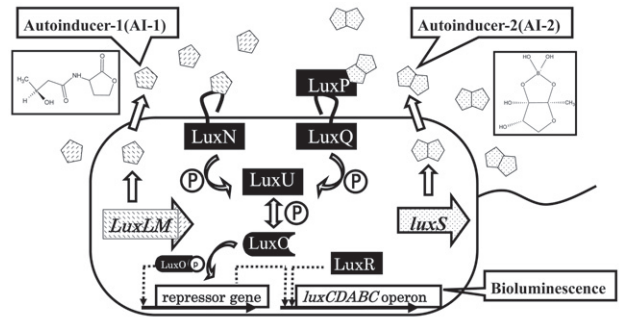


図2 *V.harveyi* の Quorum-sensing 機構

(LuxN) のリン酸化 / 脱リン酸化によって起こる。AI-2 system の AI-2 の生成と吸収の経路は現在のところ次のように示されている。一般的な代謝経路内の methyl 基供与体である S-adenosyl-methionine (SAM) は methyl transferase (CheR) によって methyl 基を転移させ、S-adenosylhomocysteine (SAH) を合成する。SAH は、nucleosidase (Pfs) によって S-ribosylhomocysteine (SRH) に変換され、産物として アデノシンを放出する。SRH は、LuxS によって 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) と homocysteine を合成し、DPD が AI-2 に変換され、細胞外へ拡散する。しかし DPD から AI-2 への変換および輸送については解明されていない。さらに細胞外へ拡散した AI-2 は、Lsr ABC transporter によって細胞内に輸送、感知される。その吸収は glucose 依存的であることが分かっているが、その制御機構は未解明である⁽¹⁶⁾。LuxP は AI-2 と結合し、LuxP-AI2 複合体を形成する。その後、two-component system sensor kinase (LuxQ) と response regulator (LuxN) で感知し、LuxPQ と LuxN から phosphotransferease である LuxU に伝達し、LuxU は下流の response regulator (LuxO) にシグナルを伝達する。*V. harveyi* では Phospho-LuxO は luminescence をコードする *luxCDABE operon* (*lux operon*) を抑制する。一方、*lux operon* の転写は LuxR によって活性化し、luminescence を生成する。この *V. harveyi* の機構を利用して、1990年代初めから多くの異なった細菌種で *luxI* の homolog が発見され、*V. fischeri* の *luxI/luxR*-type quorum sensing system が細菌の cell-to-cell communication の概念となった^(15,25)。さらに、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の両方に見られる *luxS* 遺伝子の homolog は、*V. harveyi* の bioluminescence biosensor を用いて検出が試みられてきた⁽¹⁷⁾が、*E. coli*、*S. typhimurium*、*H. pylori*、*V. cholerae*、*S. aureus*、*B. subtilis* などの細菌で種

を超えた共通の言語とされている AI-2 の生産が明らかにされた⁽¹⁴⁾こともその一例である。

H. pylori ATCC43504 のゲノムには、quorum sensing 系に關与する acylhomoserinelactone synthase のコード遺伝子 *luxIR* の homolog は検出できないが、AI-2 を生産するとされる S-ribosylhomocysteinase をコードする *luxS* 遺伝子の homolog が、ORF HP0105 に設計されていることが1999年、Surette *et al.* により発見された⁽²¹⁾。その後、2000年にElizabeth *et al.* らが *V.harveyi* (BB170 (AI-1 sensor⁻, AI-2 sensor⁺), BB886 (AI-1 sensor⁺, AI-2 sensor⁻)) を用いて *H. pylori* の培養上清と *S. typhimurium* の培養液上清を bioluminescence assay で比較した結果、AI-2 のみを生産することが明らかになった⁽⁶⁾。つまり *H. pylori* は、他の細菌種と cell-to-cell communication を行う AI-2 シグナル分子を有していることになる。しかし、AI-2 のシグナル伝達に必要な特異的なタンパク質 (LuxN) の homology 検索では高い相同性は見られず、AI-2 を取り込み、転写制御を行う遺伝子も発見されていない。したがって、*H. pylori* の *luxS* が他の細菌と同等な機能を持っているかどうかは不明である。*H. pylori* の AI-2 のシグナル分子活性は、細胞密度依存的に log-phase (対数増殖期) から stationary-phase (定常期) にかけて最も高まり、定常期後期から decline-phase (減退期) にかけて減少することが報告されている⁽¹³⁾。その他の知見としては、*luxS* を破壊による AI-2 生成の減少を始め、*flaA* 発現の欠如⁽¹²⁾、Swarm 能の低下⁽¹¹⁾などが報告されている。

E. coli の *luxS* 欠損株を用いた実験により、*luxS* / AI-2 の system によって細胞分裂、運動性、代謝、病原性、type III の遺伝子発現などが制御される、という報告がある^(3,19,23)。つまり *luxS* / AI-2 system は、細胞分裂とそれに伴う細胞増殖に關与し、AI-2 が細胞分裂を停止させるシグナルの一つとなっている可能性はないだろうか。

多くの細菌において、quorum sensing 機構により growth-phase の移行が起こると立証されてきた⁽²⁰⁾。*E. coli* は、growth-phase における対数増殖期から定常期への変化に伴って細胞分裂に關連する形態変化や基本的な cell cycle に重要な代謝変化及び定常期特異的遺伝子の発現を共同させている。主に定常期に入ると細胞密度変化に応答し、sigma factor である RpoS の存在により、細胞密度増加やべ

ん毛の減少、細胞の凝集、ヌクレオシド緊密化、細胞壁組成変化、貯蔵物質の蓄積などがみられ^(8,20)、*rpoS* を欠損させることで細胞密度増加の抑制、定常期特異的遺伝子発現の制御、べん毛形成の抑制制御を起こすことが報告されている^(1,3,22)。また、中隔形成に關与する cell division 關与遺伝子 (*ftsQA*) は、growth-phase に依存して2種類の promoter (promoter1 (P1)、promoter (P2)) によって転写制御されている。P1 は growth-rate を制御する“gear box”に属する *rpoS*-stimulate promoter で、P2 は *luxR* family 遺伝子 (*sdiA*) の *sdiA*-stimulate promoter である。*SdiA* の活性は quorum sensing の AI (N-acylhomoserine lactone) によって増強される。細胞密度が低い場合には、P1、P2 から一定レベル転写されるが、対数増殖期中期に入ると P1 からの転写の誘導が増加し始める。さらに定常期に入り細胞密度が高くなると、P1 からの転写は一定になり、AI の増加に伴って *SdiA* 依存の P2 の転写活性も増加し、P1 からの *ftsQA* の発現を制御する。*E. coli* において RpoS および *SdiA* は、異なった環境や物理的变化によって cell division 遺伝子 (*ftsQA*) の転写制御をコントロールし、定常期へ進行させる二峰性のメカニズムの存在も示唆されている⁽⁶⁾。一般的に P1 は、定常期での遺伝子発現を制御するための sigma factor であることが証明されており、P2 のような AI 依存 promoter の成長遺伝子の制御に關与は、細胞増殖過程においても重要な因子となる可能性がある。

H. pylori において、*E. coli* の RpoS のような対数増殖期から定常期へのスイッチングを行う sigma factor の存在は不明であり、homology 検索でも高い相同性は見られない。さらに、対数増殖期から定常期への移行機構も不明である。しかし、定常期後期、死滅期にかけて、spiral から coccoid への細胞形態変化⁽⁹⁾やべん毛の減少、運動能低下などの生理的变化が起こっている⁽¹¹⁾。したがって *H. pylori* では、細胞密度変化が直接、対数増殖期から定常期への移行をコントロールし、その細胞密度をコントロールしているとされる quorum sensing 系關与遺伝子 *luxS* が直接細胞増殖に影響を与えていることが考えられる。

そこで本研究では、RpoS が存在しない *H. pylori* において、胃内環境に適應し長期にわたって形態変化や生理的变化をせず持続感染するために、*luxS* が生産する AI-2 が細胞分裂を停止させる等の成長

因子に直接応答し、AI-2 に依存する細胞密度依存的な増殖制御を行っているものと仮定し、AI-2 を利用した過剰増殖過程を制御する細胞間シグナリングの有無を明らかにしようとした。

材料及び方法

使用菌株及び培養条件：*H. pylori* ATCC43504 を野生株として用いた。培養には Brucella 培地に 3% 非動物馬血清、AmphotericinB 2 μg/ml 及び Vancomycin 10 μg/ml を加え、微好気条件下 (CO₂ %, N₂85%, O₂5%) で、37℃ で培養した。必要に応じて 25 μg/ml の kanamycin を添加した。遺伝子操作に用いた菌株およびプラスミドは表 1 に示した。

表 1 菌株及びプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	source or reference
Strain		
<i>H. pylori</i>		
ATCC43504	Typed laboratory strain	NCTC11637
HPT105	Km ^r <i>H. pylori</i> ATCC43504 <i>luxS</i> mutant	This study
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue		lab collection
Plasmids		
pUC4K	km ^r	lab collection
pTL	pGEMT vector plus 1.1kb PCR gene fragment of <i>H. pylori luxS</i>	This study
pTLS	pTL4 at blunted site of <i>SalI</i>	This study
pTLK1	pTLS plus KM(Forward) <i>SalI</i> fragment from pUC4K	This study
pTLK10	pTLS plus KM(Reverse) <i>SalI</i> fragment from pUC4K	This study

luxS 変異株の作成および同定方法：*H. pylori* ATCC43504 の染色体 DNA を鋳型とし、GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) を用いて PCR (95℃ 30sec, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35cycle) を行

表 2 PCR に使用した primer sequences

Primer name	Primer sequences
LuxSlongF	5' - GAAAACACCCTAAAGTGGAAAGGG - 3'
LuxSlongR	5' - CTGCCAATCGCATAATCATATGAA - 3' <i>NdeI</i> (Designed)
luxinvertF2Sal (Forward)	5' - GTTGTGTCGACTAACCACT - 3' <i>SalI</i> (Designed)
luxinvertR2Sal (Reverse)	5' - GAATGTCGACTAGGCATGTC - 3' <i>SalI</i> (Designed)

った。HP0105 (*luxS*) の上流 366bp および下流 261bp を含む 1145bp DNA 断片を pGEM-T vector (Promega, 3000bp) に挿入し、pTL4 を作製した。pTL4 の *SalI* 切断部位を T₄ DNA polymerase (TOYOBO) で平滑化し、pTLS を作製した。pTLS の *luxS* 挿入部分から primer (*lux invert F*, *lux invert R*) を用い invert PCR (95℃ 30sec, 50℃ 1min 30sec, 72℃ 5min, 35cycle) で増幅した。得られた 4145bp の PCR 産物を用い、primer に設計した *SalI* 部位を切断した。さらに、pUC4K から *SalI* KM カセットを取り出し、ligation を行い、*luxS* 遺伝子破壊を行ったものを pTLK1、pTLK10 とした (図 3)。ATCC43504 と pTLK1 を接触させ、

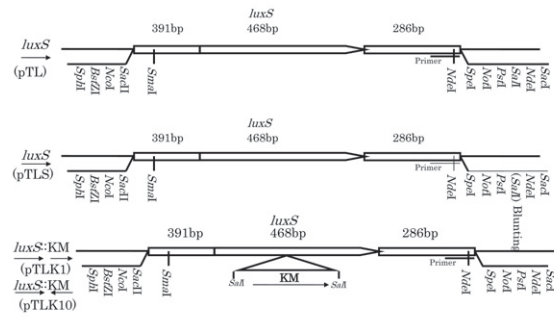


図 3 *H. pylori* の KM 遺伝子挿入による *luxS* 遺伝子破壊

自然形質転換を行った。KM 添加 Brucella 培地に生育した菌株を分離し、ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham) を用いて southern hybridization および PCR で変異株を同定した。

H. pylori の経過的増殖変化測定法：Brucella 培地 20ml に前培養液を OD₆₀₀0.1 になるように添加した。微好気条件下 37℃、0.8min⁻¹ で振とう培養を行った。本培養開始 (0 時間) の後、6 時間時間経過毎に OD₆₀₀ を測定し、Colony forming unit (CFU) 法を用いて生菌数を計測した。

ATCC43504 及び HPT105 培養液上清みの添加培養における経過的増殖変化測定法：前培養液添加し OD₆₀₀0.1 としたものを微好気条件下 37℃、0.8min⁻¹ で振とう培養した。本培養開始後、0 時間、24 時間、42 時間、135 時間経過した時点で培養液を回収し、8 krpm、4℃、10 分間遠心し、cell をすべて取り除き上清みを精製した。この上清に前培養液を加え OD₆₀₀0.1 とし、微好気条件下 37℃、0.8min⁻¹ で振とう培養を行った。本培養開始 (0 時間) の後、24 時間以降は 6 時間ごとに CFU を計測した。

培養時間および培養上清添加による形態変化：形態観察には、暗視野顕微鏡 OLYMPUS BX50 および光学顕微鏡 OLYMPUS CH40 を用いて CCD で撮影・記録した。

結果

luxS 欠損突然変異株の同定：pTLK1 (*luxS*::KM) を野生株 ATCC43504 に自然形質転換し、KM 培地に成育したものを HPT105 とし、ATCC43504 と HPT105 の PCR および Southern hybridization により確認を行った。PCR では、野生株より KM カセット挿入分の 1.2kb 大きな DNA 断片が確認された (図 4)。

H. pylori の経過的増殖変化：野生株と HPT105 を培養

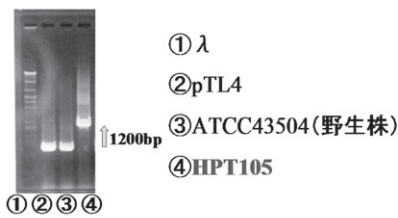


図4 luxS欠損変異株のPCRによる同定

した結果、本培養開始時点から36時間までの対数増殖期において、野生株とHPT105の増殖曲線に明確な差は見られなかった(図5a)。しかし定常期に入り、55時間以降の時点で、野生株とHPT105に濁度変化が見られたため、36時間経過以降の変化を近似曲線で比較したところ、HPT105が $y = -0.0057x + 1.0632$ に対し、野生株は $y = -0.0162x + 0.8787$ と約3倍の傾きで濁度が減少した(図5b)。

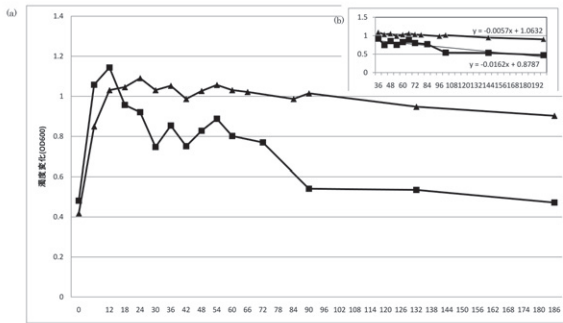


図5 ATCC43504とHPT105の経時的増殖変化と近似曲線(OD600)の比較

上清みの添加培養における経過的増殖変化：野生株とHPT105に野生株の上清みを添加し156時間培養した結果、野生株に培養上清を添加した場合は、培養上清調整時の時間に関わらず未添加培養と類似の増殖曲線を示した(図6a)。一方HPT105に野生株の培養上清を添加した場合は、本培養開始して42時間以降から、明確な差が生じた。培養上清未添加培養と24時間の上清みを添加した培養②では増殖曲線が近似し、次いで135

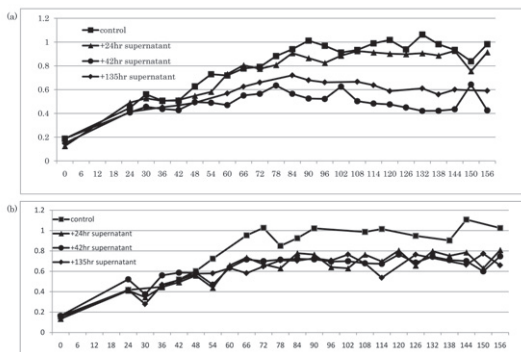


図6 野生株培養上清添加時の経時的増殖変化

時間の培養上清添加した培養④、42時間の培養上清添加した培養③となった(図6b)。つまり、関係としては、 $① \approx ② > ④ > ③$ と推測される。

増殖後期における形態変化：野生株とHPT105において細胞増殖後期の菌体を比較すると、本培養開始4日以降から、野生株ではcoccoidや螺旋数が多く長い細胞が見られたのに対し、HPT105では正常螺旋形の割合が多く観察された(図7)。

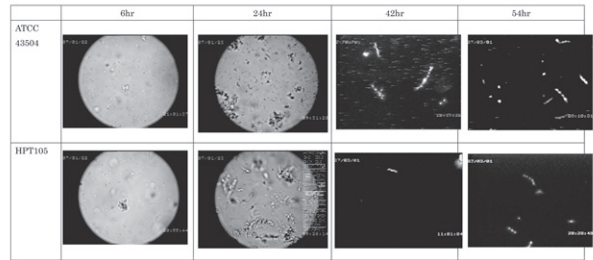


図7 細胞増殖経過と形態変化

考察

*H. pylori*は胃三大疾患の原因菌であり、その持続感染能力は胃疾患に大きな影響を与えている。持続感染に重要な因子として細胞数を感知するコミュニケーション能力が挙げられる。細菌はquorum sensingにより、自身の細胞数をコントロールだけでなく、それに付随し、定常期特異的遺伝子の発現や形態変化、代謝変化がおきる。Quorum sensing機構の1つである、菌非特異的なluxS/AI-2 systemは、細菌叢において自分の種の生存を高めるための応答機構と考えられている。

本研究では、*H. pylori*のQuorum sensing系関連遺伝子であるluxSを欠損させたluxS欠損突然変異株、HPT105を作成した。luxSが欠損することによって*H. pylori*自身の成長因子に何らかの影響を及ぼし、それに伴って経過的増殖に変化が見られると考えた。この変異株を野生株ATCC43504と比較することにより、菌種非特異的なAI-2の胃環境内で*H. pylori*の持続感染への影響を解明できると推測し、実験を行った。

野生株とHPT105の増殖過程の比較では、対数増殖期後期から定常期にかけて生菌数の差は見られず、濁度のみ差が見られた。増殖曲線を近似曲線で比較するとHPT105と比較して野生株は、本培養開始から55時間以降に約3倍の傾きで濁度が減少した。これは、HPT105と比較して野生株が細胞増殖後期において菌体の溶解など、死滅期特有の現象を先に起こしていると推察される。また生菌数に差が見ら

れなかったのは、植菌時における HPT105 の状態や菌液を希釈する作業の不均一さが増殖曲線に現れた可能性が高い。もしくは、細胞増殖後期において液体培地には生存できるが、固体培地には生存できない成育不良細胞の出現の可能性もある。

野生株及び HPT105 培養液上清み添加培養の結果から、*H. pylori* の野生株の上清みには自身の増殖を阻害する物質が含まれていることが明らかとなった。さらに増殖阻害の影響度合は *H. pylori* の AI-2 の growth-phase 特異的活性に依存しており、AI-2 の分子活性が最も高い対数増殖後期の上清みが最も増殖を阻害することが推察された。

以上の研究を通して、HPT105 における経過的増殖過程は、quorum sensing 系分子 AI-2 により制御されていること、及び AI-2 を分泌、感知、応答する機構の存在が示唆された。*H. pylori* において、菌種特異的な AI-1 の存在は見られない。しかし、菌種非特異的な AI-2 を介して環境中での自身の細胞濃度を感知するとともに、環境内に存在する細菌叢全体で自身のおかれている状況を察知、応答しているとすれば AI-1 の存在の必要性は低いと考えられる。胃の粘膜に定着する特定の種である *H. pylori* が AI-1 でなく AI-2 の機能を得たのは、自身の定着を永続させるためだけでなく、まだ知られていない胃環境内に存在する他のターゲットもしくはヒトの免疫機構に瞬時に応答する能力、それに伴い病原遺伝子の発現や Biofilm 形成などを引き起こし、胃環境内を変化させる能力を持つためではないかと推察する。

AI-2 を感知する機構の分子レベルでの解析及び AI-2 分子を活性化する転写活性因子を明らかにすることは、*H. pylori* の持続感染、発病機構のメカニズムの解明に寄与するところが大きく、解明されるべき課題である。今後、AI-2 の発現に影響する遺伝子発現の解明等が必要である。

参考文献

1. A. M. CHEVILLE, K. W. ARNOLD, C. BUCHRIESER, C.-M. CHENG, AND C. W. KASPAR. (1996) *rpoS* of Acid, Heat, and Salt Tolerance in *Escherichia coli* :H7. *AAND*, Vol. 62, No. 5 p. 1822-1824
2. Chen, X., S. Schauder, N. Potier, A. van Dorsselaer, I. Pelczar, B. Bassler, and F. M. Hughson. (2002) . Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. *Nature* 415 : 545-549.
3. DeLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (2001) . DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183 : 5239-5247
4. Dmitry M. Sitnikov, Jeffrey B. Schineller ,and Thomas O. Baldwin (1996) Control of cell division in *Escherichia coli*: Regulation of transcription of *ftsQ*A involves both *rpoS* and SdiA-mediated autoinduction. *Microbiology*, Vol. 93, Issue 1, 336-341,
5. Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Neelson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. 1981 Apr 28;20 (9) :2444-2449.
6. Elizabeth A Joyce, Bonnie L Bassler, and Andrew Wright. (2000) . Evidence for signaling system in *Helicobacter pylori*: Detection of a *luxS*-Encoded Autoinducer. *Journal of bacteriology*, p3638-3643.
7. Engebrecht, J., Neelson, K., Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32: 773-781.
8. Hideki Makinoshima, Shin-Ichi Aizawa, Hideo Hayashi, Takeyoshi Miki, Akiko Nishimura, and Akira Ishihama. (2003) Growth Phase-Coupled Alterations in Cell Structure and Function of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, No. 4 p. 1338-1345.
9. J.G. Kusters, M.M. Gerrits, J.A.G. Van Strijp, and C.M.J.E. Vandebroucke-Grauls. (1997) Coccoid Form of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* 65 p.3672-3679
10. Jun Li, Liang Wang, Yoshifumi Hashimoto, Chen-Yu Tsao, Thomas K Wood, James J Valdes, Evangelos Zafiriou and William E Bentley. (2006) A stochastic model of *Escherichia coli* AI-2 quorum signal circuit reveals alternative synthesis pathways. *Molecular Systems Biology* 2.

11. Lee, W.-K., Ogura, K., Loh, J. T., Cover, T. L., Berg, D. E. (2006) . Quantitative Effect of *luxS* Gene Inactivation on the Fitness of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6615-6622
12. Loh, J. T., Forsyth, M. H., Cover, T. L. (2004) . Growth Phase Regulation of *flaA* Expression in *Helicobacter pylori* is *luxS* Dependent. *Infect. Immun.* **72**: 5506-5510
13. Mark H. Forsyth and Timothy L. Cover (2000) Intercellular Communication in *Helicobacter pylori*: *luxS* Is Essential for the Production of an Extracellular Signaling Molecule. *Infect Immun*, Vol. **68**, No. 6 p. 3193-3199.
14. Michael G. Surette, Melissa B. Miller, and Bonnie L. Bassler. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *National Academy of Sciences*, **96** (4) : 1639-1644.
15. Michal J.Federle and Bonnie L.Bassler (2003) Interspecies communication in Bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, Vol**112**,No.9
16. Miller,m.B,and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 165-199
17. Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* **104**: 313-322.
18. Shirley Yang, Christopher R. Lopez, and E. Lynn Zechiedrich. (2006) Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. **103**, no. 7, 2386-2391
19. Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. (1999) . Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:15196-15201.
20. Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A., and Kaper, J.B. (2001) . Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **183**:5187-5197.
21. Surette M G, Miller M B, Bassler B L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA*; **96**:1639-1644.
22. Talukder Ali Azam,^{1,2} Akira Iwata,³ Akiko Nishimura,⁴ Susumu Ueda,³ and Akira Ishihama¹ Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid (1999) *J. Bacteriol.* **181** (20) : 6361-6370.
23. Vanessa Sperandio,Alfredo G. Torres,Jorge A. Girón,and James B. Kaper. (2001) Quorum sensing Is a Global Regulatory Mechanism in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Bacteriol* Vol. **183**, No. 17 p. 5187-5197,
24. Wang Y, Kim KS. Effect of *rpoS* mutations on stress-resistance and invasion of brain microvascular endothelial cells in *Escherichia coli* K1. (2000) *FEMS Microbiol Lett.* **182** (2) :241-7.
25. W. CLAIBORNE FUQUA,¹ STEPHEN C. WINANS,¹ AND E. PETER GREENBERG (1994) Quorum sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst
26. 日本細菌学会(2005) 日本細菌学会雑誌,vol.60 No.4

