

有用細菌（乳酸菌等）の全ゲノム塩基配列決定、 比較ゲノム解析および有用遺伝子の機能解明

Complete genomic, comparative genomic and post-genomic analysis of lactic acid bacteria

森田英利¹, 政岡俊夫¹, 茅根士郎¹, 和田恭則¹, 有嶋和義¹, 木内明男¹, 坂田亮一¹,
紫野正雄¹, 内藤博之¹, 斉藤康秀¹, 西田利穂¹, 印牧信行¹, 滝沢達也¹, 加藤行男¹,
村上 賢¹, 福山正文², 岸川正剛², 久松 伸², 吉村哲彦³, 柴 忠義⁴, 服部正平⁵

¹麻布大学獣医学部

²麻布大学健康環境科学部

³(財)山形県企業振興公社生物ラジカル研究所

⁴北里大学理学部

⁵北里大学北里生命科学研究所/理研ゲノム科学総合研究センター

Hidetoshi Morita¹, Toshio Masaoka¹, Shiro Chinone¹, Yasunori Wada¹, Kazuyoshi Arishima¹,
Akio Kiuchi¹, Ryoichi Sakata¹, Masao Shino¹, Hiroyuki Naito¹, Yasuhide Saito¹, Toshiho Nishita¹,
Nobuyuki Kanemaki¹, Tatsuya Takizawa¹, Yukio Kato¹, Masaru Murakami¹, Masafumi Fukuyama²,
Seigo Kishikawa², Shin Hisamatsu², Tetsuhiko Yoshimura³, Tadayoshi Shiba⁴, Masahira Hattori⁵

¹School of Veterinary Medicine, Azabu University

²School of Environmental Health Sciences, Azabu University

³Institute of Life Support Technology, Yamagata Public Corporation for the Development of Industry

⁴School of Science, Kitasato University

⁵Kitasato Institute for Life Science, Kitasato University/Human genome research group, Genomic Sciences Center, RIKEN
Yokohama Institute

Abstract: *L. fermentum* and *L. reuteri* were separated from *L. fermentum* by polyacrylamide gel electrophoresis but not physicochemical phenotypes in 1980. On the other hand, *L. fermentum* is generally isolated from plant origin fermented foods and silage, whereas *L. reuteri* is typically isolated from mammalian intestinal tract and feces. Probiotics have recently been the focus of intense lactic acid bacterial researches interest. Although *L. fermentum* is phenotypically similar to *L. reuteri*, many research data of probiotics concentrate on *L. reuteri* not but on *L. fermentum*.

The present studies are aimed at sequencing complete genomes of *L. fermentum* and *L. reuteri*, and analyzing those comparative genomes. We have sequenced the complete genomes of these species, and each genome contains approximate 1.8-Mb. The circular chromosomes of *L. fermentum* and *L. reuteri* have the average G+C contents of 52% and 39%, respectively. Five 23S rDNAs and six 23S rDNAs exist in the chromosomes of *L. fermentum* and *L. reuteri*, respectively. The numbers of insertion sequence (IS) elements and transposons (Tn) of *L. fermentum* are more than those of *L. reuteri*. *L. reuteri* possesses the structural genes determining reuterin (3-hydroxypropionaldehyde), an antimicrobial substance, production, but *L. fermentum* does not possess this operon.

目 的

乳酸菌は、産業上、最も有用な細菌の総称の一群である。乳酸菌とは、1種類の属や種を示すものではなく、慣用的な細菌群の呼び方であって、分類学上の呼び名ではない。乳酸菌として構成する細菌を定義すると、糖からの発酵代謝産物は主に乳酸で、グラム陽性、カタラーゼ活性陰性、無芽胞生であり、菌体脂肪酸は直鎖型であり、DNAのG+C含量は約53%以下であると特徴づけられる。

上記に当てはまるのは、現在12属 (*Lactobacillus* 属, *Pediococcus* 属, *Tetragenococcus* 属, *Carnobacterium* 属, *Vagococcus* 属, *Leuconostoc* 属, *Weissella* 属, *Oenococcus* 属, *Atopobium* 属, *Streptococcus* 属, *Enterococcus* 属, *Lactococcus* 属) に分類されており、それらに属する菌種で構成される。乳酸菌は古来人類が発酵食品を通じて体内に入れてきた細菌群であり、経験的にみて安全性が高いとみなされることから、「GRAS (Generally Recognized As Safe) Bacteria」と呼ばれており、後述する保健上重要なプロバイオティクスの筆頭に挙げられている。多くの微生物でゲノムレベルの解析が進められているが、細菌の中でモデル的に位置づけられている大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) とは異なり、乳酸菌の場合、属や種というより発酵食品の製造やその他の応用 (プロバイオティクス効果など) においての菌株レベルでのゲノム解析、遺伝子の機能という部分に興味をもたれている。

我々は、乳酸菌の中でも *Lactobacillus* 属細菌にターゲットを絞り、さらに次のような観点から *Lactobacillus fermentum* と *Lactobacillus reuteri* の全ゲノム塩基配列決定、比較ゲノム解析および有用遺伝子の機能解明を行うこととした。

L. fermentum と *L. reuteri* は、分類学上の生理生化学的諸性状がまったく一致することから、両者は同一菌種 (*L. fermentum*) に分類されていた。1980年に *L. fermentum* より細胞壁画分のメチオニンの有無とG+C含有などにより上記2菌種に分類された。*L. fermentum* は、植物性の発酵食品から多く分離されるのに対し、*L. reuteri* は、哺乳動物の腸管内や糞便から主に分離されるという点が特徴的である。乳酸菌において、プロバイオティクス効果は昨今、大変注

目されている特性であるが、分類学上の生理生化学的諸性状が一致するにのみかかわらず、プロバイオティクス効果の知見は *L. reuteri* に集中している。そこで、両菌種の全ゲノム (両者とも約1.8 Mb) 塩基配列を決定し比較ゲノムにより両菌種の遺伝的な特徴づけを行い、プロバイオティクス効果と遺伝的な背景を考察することを目的とした。

方 法

L. fermentum と *L. reuteri* のゲノムの推定を行うために、Dudezら¹⁾の方法に準じてパルスフィールドゲル電気泳動を行った。その際の制限酵素には、Not I と I-CeuI をそれぞれ用いた。

両菌株の染色体DNAを、平均2.0 kbとなるよう物理的に切断し、ショットガンクローニングベクターpUC118に導入し、DH5 α を形質転換させたゲノムライブラリーを構築した。一方、新たな染色体DNAをBam HIでパーシャルな条件で消化後、アガロースゲル電気泳動にて約10 kbとなる断片をファージベクターに連結したゲノムライブラリーも構築した。各クローンに対して、TaqポリメラーゼにExTaq酵素を加えたカクテルポリメラーゼを用いたコロニーダイレクトPCRを行い、それを鋳型としてDYEnamic ET Terminator (Amersham Biosciences社)によるシーケンス反応を行い、キャピラリーDNAシーケンサー (Amersham Biosciences社)を用いて解析を行った。得られたデータは、Phred/Phrapによるアッセンブルと、アノテーションはGenome Gambler (MKI社)により行った。

結果と考察

ゲノム解析に用いた *L. fermentum* と *L. reuteri* は、それぞれ公的な菌株分譲機関より入手し、さらに当方で16S rRNAのシーケンスにより菌種を確認して以下の実験に供した。なお、プラスミドは両菌株共に存在しなかった。

L. fermentum と *L. reuteri* のゲノムのパルスフィールドゲル電気泳動写真 (Fig. 1) より、ゲノムサイズは両菌株とも約1.8 Mbではほぼ同様であったが、両菌株のゲノムの制限酵素による切断パターンはかなり異なっていた。Fig. 1より、*L. fermentum* と *L. reuteri* の23S (= 16S) の数はそれぞれ5個と6個であった。

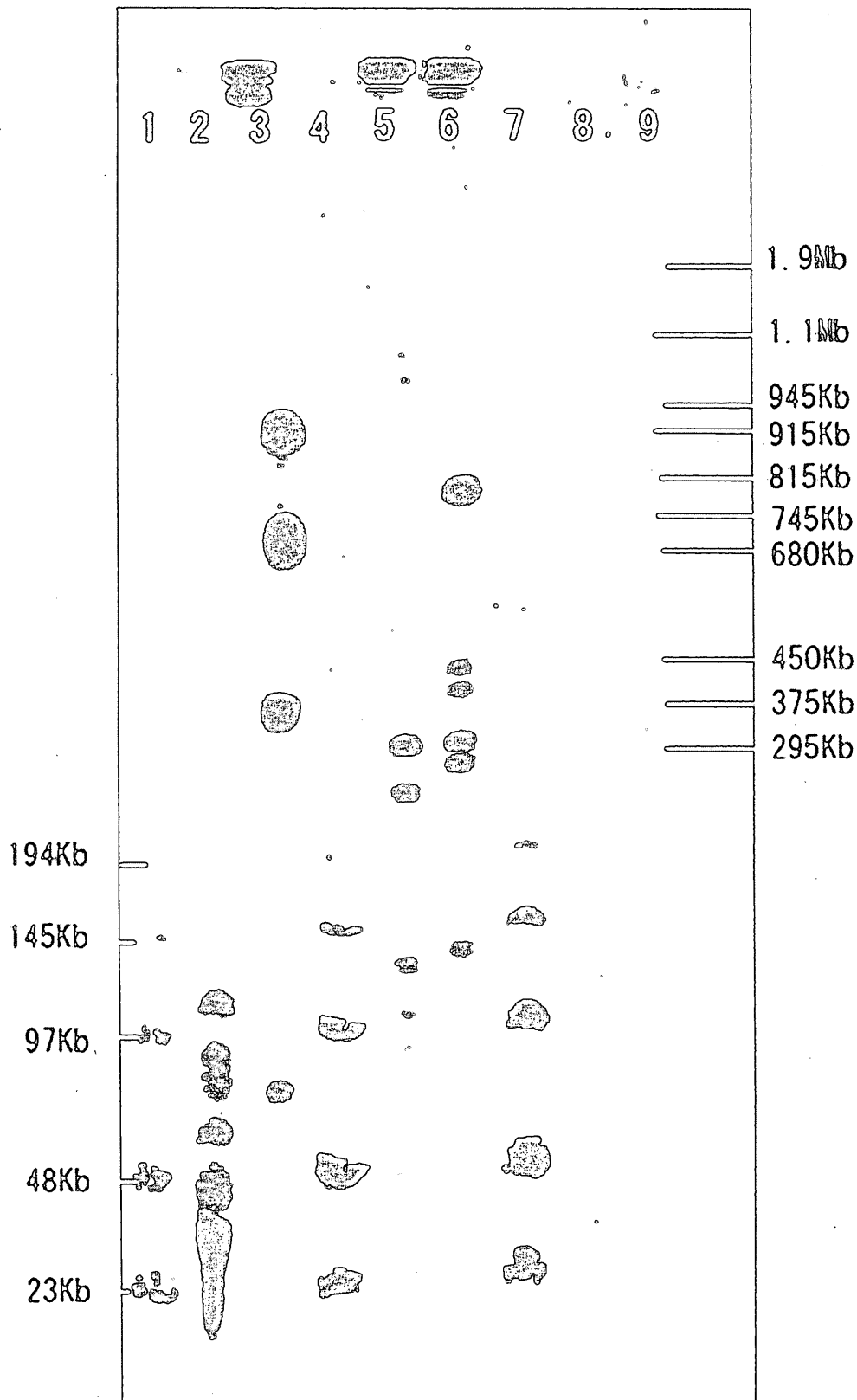


Fig.1 Pulsed-field gel electrophoresis patterns of Not I or I-Ceu I-digested *Lactobacillus fermentum* or *Lactobacillus reuteri*, respectively. Lane 2, Not I-digested *L. fermentum*; lane 3, I-Ceu I-digested *L. fermentum*; lane 5, Not I-digested *L. reuteri*; lane 6, I-Ceu I-digested *L. reuteri*; lanes 1, 4, 7, 8 and 9, markers.

Table 1 Comparative genomes between *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus reuteri*

	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>
Genome length	1.8 Mb	1.8 Mb
16S rDNA	5	6
Plasmid	None	None
G+C content	52%	39%
ORF	Approx. 1,600	Approx. 1,600
Auto-inducer	1	1
Two-component signal transduction system		
Histidine kinase	6	8
Response regulator	8	10
tRNA	50	60
Insertion sites (IS)	—	> — ¹⁾
Transposons (Tn)	—	> — ¹⁾
Cell or sugar binding proteins	—	< — ¹⁾
Reuterin synthase	None	Operon formation

1) Comparison of two strains, although exact numbers are not shown.

Table1に公表できる両菌株の比較ゲノムデータを示した。文献的に *L. fermentum* の G+C 含量は 51 ~ 54 %, *L. reuteri* の G+C 含量は 39 ~ 42 % である。本研究に用いた *L. fermentum* の G+C 含量は 51.8 %, *L. reuteri* は 39.0 % で、上記範囲内に収まっている。

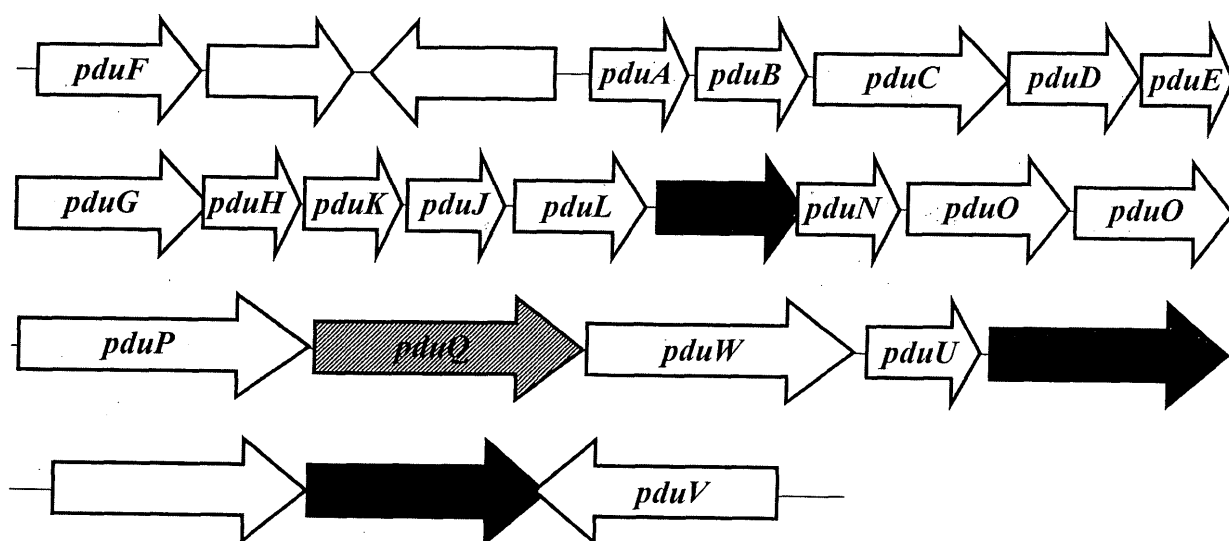
現在までのシーケンシングによって、ORF の数やコードされている全遺伝子に関する情報はほとんど得られる状態にある。細菌の場合、ゲノムサイズと推定 ORF 数は概ね相関的であるが、両菌株ともゲノムサイズが似ているので、ORF もそれぞれ 1,600 ぐらいで輸送、エネルギー代謝に分類される遺伝子が多い。

病原性細菌の場合、挿入配列 (IS) とトランスポゾン (Tn) の数はかなり多く、毒素遺伝子、感染に関するシステム遺伝子、多剤耐性遺伝子を、IS や Tn を用いたゲノムへの組み込み (水平伝播) により獲得していることが明らかにされている。IS や Tn の多さは乳酸菌の特徴でもあるようだ^{2,3)}。原材料の殺菌が滅菌工程を経る場合が多く、その後のスターターの添加は有意なフローラ形成を促し、多くの生物種との接触はそれほどあるとは考え難く、環境適応のためにその機会を逃さないためのシステムかもしれない。*L. lactis* NCDO712 株を同一の合成培地で数年間にわたり継代した場合、染色体内にインテグレートさせたプラスミドやプロファージの欠失、また染色体内での大規模な逆位の現象が認められてい

る。正確な数はまだ確定ではないが、IS、Tn 共にこれらの数は *L. reuteri* に比べて *L. fermentum* の方が多い。

近年、発がんに対する腸内細菌の影響が明らかにされてきており、大腸内にはいくつかの発がん酵素が見つかっている。 β -グルクロニダーゼはその一つである。生体は、発がん物質を体内に吸収した際、肝臓でグルクロン酸抱合し解毒したものを腸管内に放出するが、 β -グルクロニダーゼが存在すると抱合された発がん物質を再活性化させる。大腸菌やウエルシュ菌などの腸内細菌がこの酵素活性を持つが、乳酸菌やビフィズス菌はこの酵素活性は示さないと考えられている。本研究で得られた両菌種のゲノムシーケンスについて、*Escherichia coli* と *Clostridium perfringens* の β -グルクロニダーゼ遺伝子のシーケンスで解析したが、相同性のあるものは検出されなかった。したがって、両菌種は β -グルクロニダーゼを持たないものと考えられ、ヒトへの積極的な摂取がこの点において問題ないことが示された。

Lactobacillus reuteri は非ペプチド性の抗菌性物質であるロイテリン (3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド) を産生することが知られている。ロイテリンはグラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌、酵母、真菌および原虫に対しても抗菌活性を示す。*L. reuteri* のプロバイオティクス効果に特徴的であると考えられ、ロイテリン産生系に関する構造遺伝子は、

Fig. 2 Reuterin operon in *Lactobacillus reuteri*.Table 2 Comparison of amino acid sequence homology between the α , β , γ subunits of glycerol dehydratase in *Klebsiella pneumoniae* and those of reuterin synthase in *Lactobacillus reuteri*

α subunit	β subunit	γ subunit
Identities=61%	Identities=59%	Identities=45%
Positives=77%	Positives=71%	Positives=66%

*L. reuteri*においてオペロンとしてコードされていることが確認されたが，*L. fermentum*ではそのオペロンは存在しなかった。それぞれのシーケンスはデータ公開前なのでここでは明らかにしないが，オペロンの様子はFig. 2のとおりで，グリセロールからのロイテリン合成酵素遺伝子 (*pduCDE*)，複数の免疫系に関与する遺伝子 (Fig. 2の黒く塗りつぶした矢印)，ロイテリンを菌体外へ放出する遺伝子 (*pduQ*) はインフォマティクスにより推測している。

Table2のとおり，すでに報告されている *Klebsiella pneumoniae* に存在する glycerol dehydratase の α , β , γ サブユニットと *L. reuteri* の *pduCDE* 遺伝子のDNAシーケンスとアミノ酸シーケンスとの相同性検索から，*pduCDE* 遺伝子は同じ機能を示すと考えられる。*pduCDE* を続けての配列でクローニングを試みたが，*pduCDE* が発現することで宿主大腸菌に対して致命的に働き，形質転換体を得ることができなかった。そこで，*pduC, D, E* を別々にベクターにクローニングし，大腸菌の無細胞系タンパク質合成システムである Rapid Translation System 100 *E. coli*

High Yield Kit (Roche 社) に供し，ロイテリン合成酵素の生成を行った。各タンパク質の産生をウエスタブロットング法により確認した。

同じくプロバイオティクス効果においてヒト腸管付着因子の存在は重要であり，*L. reuteri* において MapA や Scbp 遺伝子をコードするいくつかの細胞付着性遺伝子も確認された。

乳酸菌の定義とは先に記述したとおりであるが，乳酸菌関連微生物として *Bifidobacterium* 属 (ビフィズス菌) や *Brevibacterium* 属がある。これら微生物群について現在 (2003年5月) のところ世界中で約50を越えるプロジェクトが進行しているが非公開のものも含めて完全な解読の終了したものは，乳酸菌で2菌株 (*Lactococcus lactis*²⁾ と *Lactobacillus plantarum*³⁾) のみである。これら2菌種とも，基本的にはプロバイオティクス効果がない，もしくは少ない菌種に分類されており，今後，本研究の比較ゲノム解析によってプロバイオティクス効果が明らかになってくるものと考えられる。

要 約

L. fermentum と *L. reuteri* は、分類学上の生理生化学的諸性状が一致することから同一菌種とされていたが、*L. reuteri* が独立する分類がなされた。分類学上の諸性状が一致するにもかかわらず、プロバイオティクス効果の知見は *L. reuteri* に集中している。そこで、プロバイオティクス効果と遺伝的な背景を考察するために、両菌種の全ゲノム塩基配列を決定し比較ゲノムによる両菌種の遺伝子な特徴づけを行った。

パルスフィールドゲル電気泳動法により両菌株のゲノムサイズを推定した。プラスミドは両菌株共に存在しなかった。染色体 DNA の平均 2.0 kb と約 10 kb 断片のゲノムライブラリーを構築した。各クローンに対して DYEnamic ET Terminator (Amersham Biosciences 社) によるシークエンス反応を行い、キャピラリー DNA シークエンサーで解析した。得られたデータは、Phred/Phrap によるアッセンブルと、アノテーションは Genome Gambler (MKI 社) により行った。

ゲノムサイズは両菌株とも約 1.8Mb でほぼ同様であったが、両菌株のゲノムの制限酵素地図的にはかなり異なっていた。ORF の数はそれぞれ 1,600 ぐらいで、輸送、エネルギー代謝に分類される遺伝子が主であった。両菌株より β -グルクロニダーゼ遺伝子は見つからなかった。ロイテリン (抗菌性物質) 産生系は、*L. reuteri* においてオペロンとしてコードされていたが、*L. fermentum* には存在しなかった。プロバイオティクス効果においてヒト腸管付着因子の存在は重要であり、*L. reuteri* でいくつかの細胞付着性遺伝子が確認された。

文 献

- 1) Dudez AM, Chaillou S, Hissler L, Stentz R, Champomier-Verges MC, Alpert CA, Zagorec M. Physical and genetic map of the *Lactobacillus sakei* 23K chromosome.
- 2) Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.*, 11: 731-753, 2001.
- 3) Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 1990-1995, 2003.

この申請内容に関する成果報告

日本農芸化学会 (2003年3月) (1演題)

日本畜産学会 (2003年3月) (2演題)

日本乳酸菌学会 (2003年7月) (シンポジウム2演題)

日本生物工学会 (2003年9月) (シンポジウムへの招待講演)

ゲノミクス・プロテオミクスの新展開 ～生物情報の解析と応用～

今中忠行 監修, (株) エヌ・ティー・エス, 東京

森田英利・政岡俊夫 (麻布大学獣医学部)

第4編 応用一産業・医学における展開

1章 産業における展開

第7節 畜産, 食品の例

1. 「乳酸菌」