

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

—第2報—

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)山形県企業振興機構・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 and Masahira Hattori⁵

¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University, ² School of Environmental Health Sciences, Azabu University,

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

⁴ School of Science, Kitasato University, Institute of Life Support Technology,

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

Abstract. We attempted to determine the complete genome sequences of *Lactobacillus reuteri* JCM1112 (type strain) and *Lactobacillus fermentum* IFO3956. Production of antibacterial substances and adhesion factors for attachment to human intestinal cells largely influences contributed to the probiotic effects of lactic acid bacteria on the physiology. *L. reuteri* is known to produce a non-peptidic antibacterial substance, reuterin. Different from unlike bacteriocins, reuterin shows has an the antimicrobial activity against not only Gram-positive bacteria but also Gram-negative bacteria, yeasts, fungi and protozoans. An operon in *L. reuteri* JCM1112 was found to encode the reuterin production system, whereas no orthologous counterpart was found in *L. fermentum* IFO3956. We analyzed a group set of genes involved in the reuterin synthesis in *L. reuteri* JCM1112, and found that the *pdu* cluster contained a class of genes responsible for polyhedral organelle formation, which were not present in the *dha* regulon, but lacked structural genes with the domain structure common to the NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase family. In other bacteria that possess the *dha* regulon, the expressions of glycerol dehydratase and 1,3-propanediol dehydrogenase are subjected to synchronous transcriptional regulation to prevent the excessive production of cytotoxic reuterin. *L. reuteri* was shown to have a different regulatory system. Glycerol dehydrogenase conserved in *L. reuteri* might contribute to the maintenance of the intracellular oxidation-reduction balance when 1,3-propanediol dehydrogenase is being expressed. The *pdu* cluster of *L. reuteri* contained the structural genes homologous to propanol dehydrogenase (*pduQ*), propionaldehyde dehydrogenase (*pduP*) and propionate kinase (*PduW*) of *S. typhimurium*. This indicates that *L. reuteri* possesses an oxidation pathway to produce 3-hydroxypropionic acid from glycerol as well as a reduction pathway from glycerol to 1,3-propanediol via reuterin.

A group of structural genes highly homologous to the genes involved in the biosynthesis of adenosylcobalamin (AdoCbl), a coenzyme of dehydratase was found in the downstream of the pdu cluster of *L. reuteri*. This is the first discovery for of the genes for the presence of AdoCbl biosynthesis in lactic acid bacteria. The *hemABCL*, *cobACD* and *cysG* genes were all found within the *cob/cbi* cluster in *L. reuteri*, while they are distantly located at different genomic loci in other bacterial species. The G+C content of the *cob/cbi* cluster, as well as the *pdu* cluster, was markedly lower than that of the other regions, which suggests that the gene cluster might have been acquired from other organisms through horizontal transmission. Thus, *L. reuteri* is able to transcribe almost all enzymes essential for the biosynthesis of AdoCbl from L-glutamate by a single transcription unit, indicating suggesting that *L. reuteri* could may produce AdoCbl more efficiently than any other bacteria. Our results also suggest that AdoCbl produced by *L. reuteri* might act may serve as a source of vitamin B₁₂ in the intestine of humans incapable of synthesizing the substance. These genetic characteristics are specific only to *L. reuteri* in *Lactobacillus*, and are the causes for the production of reuterin in large quantities. In addition, it is considered that the efficient energy-production system and the inhibitory activity on the growth of other bacteria are importantly required for the contribution of probiotic lactic acid bacteria should contribute to the survivability in mammalian intestines, which is an important requirement for probiotic lactic acid bacteria.

1. 目的

L. reuteri は当初、*L. fermentum* biotype II と分類されていたが、細胞壁ペプチドグリカンの構成 (*L. reuteri* : Lys-D-isoAsn 型, *L. fermentum* : Orn-D-isoAsn 型), GC 含量 (*L. reuteri* : 40 ~ 42 %, *L. fermentum* : 52 ~ 54 %), DNA-DNA 相同性, lactase dehydrogenase の電気泳動法における移動度, および糖の資化性の違いから 1980 年に *L. fermentum* より独立した乳酸菌である。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。哺乳動物の腸内フローラを構成する lactobacilli としては、*L. acidophilus* グループ, *L. animalis*, *L. intesinalis*, *L. salivarius*, *L. agilis*, *L. ruminis*, *L. vitulinus*, *L. hamsteri*, *L. aviarius*, *L. casei*, *L. brevis* および *L. reuteri* が分離されるが、*L. reuteri* は lactobacilli の中で、ヒトを含めたほとんどの哺乳動物から優勢に分離される唯一の細菌である^{1,2)}。

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、*L. reuteri* JCM1112^T と *L. fermentum* IFO3956 の比較ゲノム解析を行った。ゲノムサイズは両菌株とも約 1.9 Mb 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 1,700 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。また、*L. reuteri* にはロイテリン産生能、すな

わちグリセロール代謝に関与している *pdu* (propanediol utilization) cluster が存在しているのに対して、*L. fermentum* にはグリセロール代謝に関与する遺伝子を存在していなかった。ロイテリンは広い抗菌スペクトルを示すことから、腸内細菌叢のバランス改善や腸管感染症防御において *L. reuteri* のロイテリン産生は非常に重要な性質と考えられている。ロイテリンは、glycerol dehydratase と 1,3-propanediol dehydrogenase が関与する反応系の中間産物として発見され、この反応経路が存在することにより *L. reuteri* は発酵過程において、グリセロールを電子受容体の代替として利用することができる。その結果、ATP をより多く産生することができ、高い増殖収率を得ることが可能となる。ロイテリン産生系は抗菌物質の産生だけでなく、エネルギー代謝系にも関与し、生育上も非常に重要な反応系である。以上の観点から、本報告では *L. reuteri* JCM1112^T におけるロイテリン産生系の分子機構の解明を目的として、本菌株の全ゲノム解析データからロイテリン産生に関与する遺伝子群を検索し、機能予測、パスウェイ解析および比較ゲノム解析を行った。

2. 方法

L. reuteri JCM1112^T と *L. fermentum* IFO3956 の染色体 DNA より約 2.0 kb と約 10 kb のゲノムライブラリーを構築した。各クローンに対して、コロニーダイレクト PCR を行い、キャピラリー DNA シークエン

サー (AmershamBiosciences 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 GenomeGambler (MKI 社) により行った。

3. 結果と考察

L. reuteri は, glycerol dehydratase (GD; EC 4.2.1.30) によってグリセロールからロイテリンを産生している。表1のとおり, JCM1112^T株からも GD をコードした *pduCDE* がアノテーションされた³⁻⁶⁾。本遺伝子を, クローニングし, その酵素活性の確認を行った (データ省略)。本菌株のグリセロール代謝は, グリセロールを GD によってロイテリンに変換し, 1,3-

propanediol dehydrogenase (EC 1.1.1.202) によって 1,3-プロパンジオールに還元する還元反応系と, グリセロールを glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6) によってジヒドロキシアセトンに変換する酸化反応系の2つの酸化還元反応系で構成されていると考えられる。グリセロール代謝に関与する遺伝子群は *dha* (dihydroxyacetone) regulon と呼ばれるレギュロンを形成することが報告されているが, *L. reuteri* では *dha* regulon ではなく, 1,2-プロパンジオール代謝に関与する *pdu* cluster のみを保持していた。従来, *L. reuteri* は GD によってグリセロールからロイテリンを産生していると報告されてきたが, ゲノム解析の結果から, GD ではなく diol dehydratase (DD; EC

Table 1 Amino acid homologies of *pdu* operon and *dha* regulon between *L. reuteri* and several bacteria

Gene name of <i>L. reuteri</i> * ¹	<i>L. collinoides</i> ⁴⁾		<i>S. typhimurium</i> ⁵⁾		<i>C. freundii</i> ⁶⁾		<i>Cl. perfringens</i> ⁷⁾		Putative function
	Gene name* ¹	Identity* ²	Gene name* ¹	Identity* ²	Gene name* ¹	Identity* ²	Gene name* ¹	Identity* ²	
<i>pduF</i> (235)	—	—	<i>pduF</i> (264)	31 %	—	—	<i>glpF</i> (234)	44 %	Glycerol uptake facilitator and related permeases
<i>pocR</i> (359)	<i>pocR</i> (317)	32 %	<i>pocR</i> (303)	13 %	—	—	—	—	T ranscriptional regulator
<i>pduA</i> (93)	<i>pduA</i> (97)	77 %	<i>pduA</i> (94)	65 %	—	—	—	—	Po lyhedral organelles
<i>pduB</i> (238)	<i>pduB</i> (274)	64 %	<i>pduB</i> (233)	56 %	—	—	—	—	Po lyhedral organelles
<i>pduC</i> (558)	<i>pduC</i> (558)	73 %	<i>pduC</i> (554)	64 %	<i>dhaB</i> (555)	62 %	<i>dhaB1</i> (554)	63 %	AdoCbl-dependent dehydratase large subunit
<i>pduD</i> (236)	<i>pduD</i> (230)	66 %	<i>pduD</i> (224)	58 %	<i>dhaC</i> (194)	50 %	<i>dhaB2</i> (190)	56 %	AdoCbl-dependent dehydratase medium subunit
<i>pduE</i> (172)	<i>pduE</i> (173)	67 %	<i>pduE</i> (173)	45 %	<i>dhaE</i> (142)	40 %	<i>dhaB3</i> (141)	51 %	AdoCbl-dependent dehydratase small subunit
<i>pduG</i> (616)	<i>pduG</i> (610)	80 %	<i>pduG</i> (610)	65 %	<i>dhaF</i> (603)	59 %	<i>orfZ</i> (616)	63 %	Dehydratase reactivation factor large subunit
<i>pduH</i> (119)	<i>pduH</i> (116)	52 %	<i>pduH</i> (123)	34 %	<i>dhaG</i> (117)	23 %	<i>orfX</i> (116)	42 %	Dehydratase reactivation factor small subunit
<i>pduK</i> (189)	<i>pduK</i> (231)	38 %	<i>pduK</i> (160)	32 %	—	—	—	—	Po lyhedral organelles
<i>pduJ</i> (96)	<i>pduJ</i> (94)	78 %	<i>pduJ</i> (91)	74 %	—	—	—	—	Po lyhedral organelles
<i>pduL</i> (214)	<i>pduL</i> (215)	57 %	<i>pduL</i> (210)	50 %	—	—	—	—	U nknown fuction
<i>pduM</i> (167)	<i>pduM</i> (167)	41 %	<i>pduM</i> (163)	15 %	—	—	—	—	U nknown fuction
<i>pduO</i> (202)	<i>pduO</i> (192)	65 %	<i>pduO</i> (337)	21 %	<i>orfW</i> (176)	38 %	<i>orfW</i> (170)	42 %	Adenosyltransferase
<i>pduO_{bis}</i> (157)	<i>pduO_{bis}</i> (164)	68 %	<i>pduO</i> (337)	17 %	<i>orfY</i> (142)	28 %	<i>orfY</i> (142)	31 %	Adenosyltransferase
<i>pduP</i> (477)	<i>pduP</i> (481)	69 %	<i>pduP</i> (477)	44 %	—	—	—	—	Propionaldehyde dehydrogenase
<i>pduQ</i> (379)	<i>pduQ</i> (373)	61 %	<i>pduQ</i> (370)	40 %	<i>dhaT</i> (387)	31 %	<i>dhaT</i> (385)	31 %	Propanol dehydrogenase
<i>pduW</i> (395)	<i>pduW</i> (395)	60 %	<i>pduW</i> (399)	44 %	—	—	—	—	Prop ionate kinase
<i>pduU</i> (115)	<i>pduU</i> (114)	86 %	<i>pduU</i> (116)	57 %	—	—	—	—	Po lyhedral organelles
<i>pduV</i> (142)	—	—	<i>pduV</i> (150)	39 %	—	—	—	—	U nknown function

*¹ The figures in () show the lengths of amino acid sequence of the domains.

*² Identity shows amino acid homologies of each domain against those of *L. reuteri*.

4.2.1.28)に近い遺伝子構成であると言える。*pdu* clusterの *dha* regulonと異なる遺伝子構造上の特徴として、polyhedral organelles形成に関与している構造遺伝子群が存在していることが上げられる。polyhedral organellesは、1,2-propandiol代謝の際に生じるアルデヒド類を隔離することにより、アルデヒド類の有する細胞毒性を最小限に抑制していると推測される。この遺伝子構造は *dehydratase* 遺伝子を有する他の *lactobacilli* (*L. collinoides*, *L. hilgardii*, *L. diolivorans*, *L. brevis*) においても共通にみられた。特に、*L. reuteri*において特徴的だったのは、*L. collinoides*と *L. brevis*では保存されている NADH: flavin oxidoreductase / NADH oxidase familyのドメイン構造を有する構造遺伝子が欠損している点であった。また、ロイテリン産生を考える上で重要な遺伝子である glycerol dehydrogenaseと 1,3-propanediol dehydrogenaseは、*L. reuteri*では *pdu* clusterとは異なるゲノム上の離れた位置に存在していた。*dha* regulonを有する他の細菌では、細胞毒性を發揮するロイテリンが多量に産生されないように glycerol dehydrataseと 1,3-propanediol dehydrogenaseの発現が同調的な転写制御を受けていると考えられる。しかし、*L. reuteri*では 1,3-propanediol dehydrogenaseが *dehydratase*とは異なるゲノム上の離れた位置に存在することから、別々の制御系により両遺伝子の転写

が調節されていると推測される。つまり、*dehydratase*とは別の制御系によって調節されている 1,3-propanediol dehydrogenaseが、環境要因を感知し転写が抑制され、その結果、*L. reuteri*においてロイテリンが多量に産生されるものと考えられる。

*L. reuteri*の *pdu* cluster内にはサルモネラ菌の propanol dehydrogenase (PduQ), propionaldehyde dehydrogenase (PduP) および propionate kinase (PduW)に相同性を示す構造遺伝子が存在していた。このことから、*L. reuteri*にはグリセロールからロイテリンを経て1,3-プロパンジオールを産生する還元反応系だけでなく、グリセロールから3-ヒドロキシプロピオン酸を産生する酸化反応系が存在していると推察される。このような遺伝子構成は *L. reuteri*がロイテリン産生と同時に3-ヒドロキシプロピオン酸を産生しているとの報告と一致するものである。

図1に示したとおり、グリセロールからロイテリンが産生される際に、AdoCblが必要である。次にGDの補酵素であるアデノシルコバラミン (AdoCbl) 生合成系について検索を行った。その結果、他の細菌で確認されている AdoCbl 生合成に関与する遺伝子群と高い相同性を示す構造遺伝子群を *L. reuteri*の *pdu* cluster 下流で検出し、*cob/cbi* clusterとアノテーションした。*L. reuteri* CRL1098株では AdoCblの産生が証明されており⁷⁾、JCM1112^T株においても同様

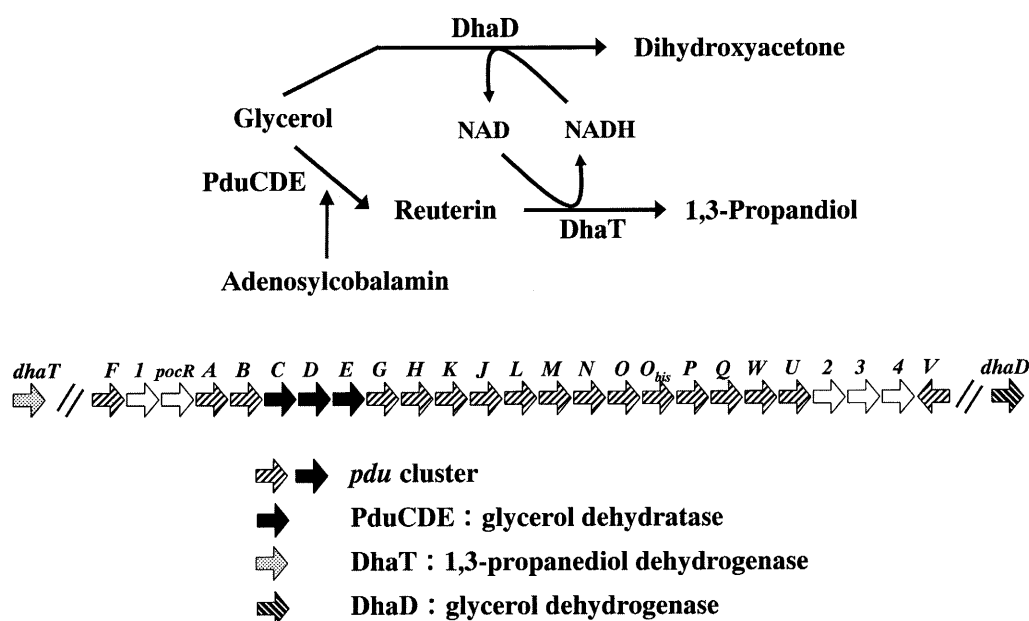


Fig. 1 Glycerol metabolism and its related gene cluster of *Lactobacillus reuteri* 1112^T.

に AdoCbl は産生されていた。 *L. reuteri* と同様にグリセロールを電子受容体として利用すると報告されている *L. brevis* からは、現在登録のデータベース上では AdoCbl 生合成に関与する遺伝子群を検出することはできなかった。すなわち、 *L. reuteri* 以外の乳酸菌で AdoCbl 生合成は確認されていないことから、他の lactobacilli では、細胞外のコバラミンが存在している場合のみ GD が機能するのに対し、 *L. reuteri* は細胞外にコバラミンが存在しない場合でも、 AdoCbl を生合成し、ロイテリン産生が可能であると考えられる。 *L. reuteri* の GD は、他の lactobacilli で確認されている GD よりも AdoCbl に対する親和性が高いことが実験的に確認されているが、この性質も、 *L. reuteri* が AdoCbl 生合成系を有することに起因するものと考えられる。ロイテリン産生系の存在が腸管内で生育する上で有利に働く *L. reuteri* では、 AdoCbl に対する親和性が高くなるような変異が GD に蓄積したと推察される。以上、述べてきた *L. reuteri* の pdu cluster の遺伝子構造、 dehydratase の特徴および AdoCbl 生合成系の存在が、 *L. reuteri* のみでロイテリンが多量に産生される原因であると推察した。本研究は *L. reuteri* の示す高いプロバイオティクス効果の分子機構を解明する上で重要な知見である。

4. 要約

L. reuteri は、 glycerol dehydratase (GD; EC 4.2.1.30) によってグリセロールからロイテリンを産生している。本菌株のグリセロール代謝は、グリセロールを GD によってロイテリンに変換し、 1,3-propanediol dehydrogenase (EC 1.1.1.202) によって 1,3-プロパンジオールに還元する還元反応系と、グリセロールを glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6) によってジヒドロキシアセトンに変換する酸化反応系の2つの酸化還元反応系で構成されていると考えられる。従来、 *L. reuteri* は GD によってグリセロールからロイテリンを産生していると報告されてきたが、ゲノム解析の結果から、 GD ではなく diol dehydratase (DD; EC 4.2.1.28) に近い遺伝子構成であると言える。この遺伝子構造は dehydratase 遺伝子を有する他の lactobacilli においても共通にみられた。特に、 *L.*

reuteri において特徴的だったのは、 *L. collinoides* と *L. brevis* では保存されている NADH: flavin oxidoreductase / NADH oxidase family のドメイン構造を有する構造遺伝子が欠損している点であった。また、ロイテリン産生を考える上で重要な遺伝子である glycerol dehydrogenase と 1,3-propanediol dehydrogenase は、 *L. reuteri* では pdu cluster とは異なるゲノム上の離れた位置に存在していた。つまり、 dehydratase とは別の制御系によって調節されている 1,3-propanediol dehydrogenase が、環境要因を感知し転写が抑制され、その結果、 *L. reuteri* においてロイテリンが多量に産生されるものと考えられる。

L. reuteri の pdu cluster 下流でアデノシルコバラミン (AdoCbl) 生合成系を検出した。 *L. brevis* からは、 AdoCbl 生合成に関与する遺伝子群を検出することはできなかった。すなわち、 *L. reuteri* 以外の乳酸菌で AdoCbl 生合成は確認されていないことから、他の lactobacilli では、細胞外のコバラミンが存在している場合のみ GD が機能するのに対し、 *L. reuteri* は細胞外にコバラミンが存在しない場合でも、 AdoCbl を生合成し、ロイテリン産生が可能であると考えられる。

以上、 *L. reuteri* の pdu cluster の遺伝子構造、 dehydratase の特徴および AdoCbl 生合成系の存在が、 *L. reuteri* のみでロイテリンが多量に産生される原因であり、 *L. reuteri* の示す高いプロバイオティクス効果の分子機構を解明する上で重要な知見である。

文献

- 1) Casas, I.A. et al.: Microecology and Therapy, 26, 221 (1997).
- 2) Casas, I.A. et al.: Microb. Ecol. Health. Dis., 12, 247 (2000).
- 3) Sauvageot, N. et al.: Int. J. Food. Microbiol., 55, 67 (2000).
- 4) McClelland, M. et al.: Nature, 413, 852 (2001).
- 5) Sun, J. et al.: Biotechnol Prog., 19, 263 (2003).
- 6) Shimizu, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99, 996 (2002).
- 7) Taranto, M. P. et al.: J. Bacteriol., 185, 5643 (2003).