

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5報—

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

—No. 5—

森田英利¹, 大島健志朗², 藤 英博³, 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⁴, 岸川正剛⁴, 久松 伸⁴, 吉村哲彦⁵,
柴 忠義⁶, 服部正平²

¹麻布大学獣医学部, ²東京大学大学院新領域, ³理化学研究所ゲノム科学総合研究センター,
⁴麻布大学健康環境科学部, ⁵(財)山形県産業技術振興機構, ⁶北里大学理学部

Hidetoshi Morita¹, Kenshiro Oshima², Hidehiro Toh³, 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 Fukuyama⁴, Seigo Kishikawa⁴,
Shin Hisamatsu⁴, Tetsuhiko Yoshimura⁵, Tadayoshi Shiba⁶ and Masahira Hattori²

¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University,

² Graduate School of Frontier Science, The University of Tokyo,

³ Human genome research group, Genomic Sciences Center, RIKEN Yokohama Institute,

⁴ School of Environmental Health Sciences, Azabu University,

⁵ Yamagata Promotional Organization for Industrial Technology,

⁶ School of Science, Kitasato University, Institute of Life Support Technology

Abstract: It is interested in Genus *Bifidobacterium* shows the probiotic effects and as the model case of taxonomy. The nine species of *Bifidobacterium* and the closest related species of the type strains isolated from human origin were obtained from the Microbe Division, Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center. We have started sequencing of the complete genome of nine species. We have done the complete genome sequencing of *B. bifidum*, *B. breve* and *B. catenulatum*. The contigs of *Parascardovia denticolens*, *Scardovia inopinata* and *Gardnerella vaginalis* is less than fifteen. The draft sequences of *B. dentium* genomes have been obtained, and the shotgun library of the *B. scardovii* and *B. longum* genomes were prepared. We are going to widely comparative genomics in the Family *Bifidobacteriaceae*, when all the genomes will be finished.

1. 目 的

Bifidobacterium 属は“ビフィズス菌”の俗称もち、健康なヒト腸内フローラにおいて優勢な菌属で

ある。また、*Bifidobacterium* 属の多くの菌種（菌株）は、整腸作用、免疫賦活効果、アレルギー低減効果など有効なプロバイオティクスとして、乳酸菌と同様に注目されている。*Bifidobacterium* 属のG+C含

量は57～67%であり、グルコースからモル比3:2の割合で酢酸とL(+)-乳酸に変換するのは、乳酸菌 (*Firmicutes* 綱, *Lactobacillales* 目) と区別される特徴である。

1900年にパスツール研究所の Tisser¹⁾ によって *Bifidobacterium* 属として初めて *Bifidobacterium bifidum* が健康な母乳栄養児の糞便から分離され、当時は *Bacillus bifidus communis* と命名された。その菌種は、1919年に *Bacteroides bifidus* と属が変更になった。1924年には、Oral-Jensen によって *Bifidobacterium* 属が提唱されるも受け入れられず、1933～1934年には、Weiss and Rettger が *Lactobacillus acidophilus* の変種であるとし、その後 *Bacteroides bifidus* から *Lactobacillus bifidus* と属変更がなされている。1958年頃から多くの研究者によって、その菌種は *Lactobacillus* 属ではなく *Bifidobacterium* 属であることが提案された。そして、時間も経過したが1974年の Bergey's Manual の第8版で、*Bifidobacterium* 属が記載された。

Stakebrandt et al.²⁾ は、1997年に16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく階層分類体系により、*Bifidobacterium* 属は、*Actinobacteria* 綱, *Bifidobacteriales* 目, *Bifidobacteriaceae* 科に分類され、2002年には、32菌種(2亜種)が承認された。その後、*Bifidobacterium* 属は新菌種が発見される一方、種レベルでの統合が行われながら36菌種に分類されている。

Bifidobacterium 属の中にはプロバイオティクス効果の非常に高いものが存在し、それらを研究する上でゲノム情報は不可欠な基盤と考えられる。また、上述のとおり *Bifidobacterium* 属の分類は、歴史的にも非常に混乱し、今もその状態が続いていると思わ

れる。本来、種の区別はDNA-DNAハイブリダイゼーション解析のように、全ゲノム配列から論ずべきものである。*Bifidobacterium* 属のゲノム情報の現状は、森田・藤³⁾ が著書「乳酸菌の保健機能と応用」の中で総説しているが、*B. longum* NCC2705株(2005年に一部配列の修正があった)⁴⁾ と *B. adolescentis* ATCC 15703株⁵⁾ の2株が一般データベースに公開され、ゲノムサイズは、それぞれ2,260,266 bpおよび2,089,645 bpであった。それ以外にも、ゲノム解析中あるいは論文投稿中の菌種(菌株)もあると推察されるが、*Lactobacillus* 属などの乳酸菌と比べると、比較的ゲノム解析されている菌種は少ない。

細菌の分類学は、16S rRNA 配列の概念を導入したことで飛躍的な進歩を遂げたが、一方で、グラム陽性である *Bifidobacterium* 属の16S rRNA 配列の相同性90%以上の近縁クラスターに、グラム陰性菌 (*Gardnerella vaginalis*) が位置する結果もまねいている。従来からの分類学では、グラム陽性とグラム陰性の区別は最初に行われる作業であり、他のクラスターでは一般に区別できるグラム陽性細菌とグラム陰性細菌の菌種が、*Bifidobacterium* 属周辺ではなぜ近縁に位置するのか興味をもたれる部分である。Table 1に示した菌種(菌株)の全ゲノム情報とその解明に役立ち、プロバイオティクス効果の分子レベルでの解明のみならず、細菌の分類学に貢献する知見も提供できると考えている。

2. 方法

全ゲノム解析の対象菌種は、(独)理化学研究所バイオリソースセンター 微生物材料開発室 (JCM) に

Table 1 Genus *Bifidobacterium* and the closest related species of the type strains isolated from human origin deposited to the Microbe Division, Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center

Genus	Species	Human origin (source)	Estimated G+C content (%)	Estimated genome length (Mb)	See the number in Fig. 1
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>	Feces of breast-fed infant	62.7	2.21	(1)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	Intestine of infant	58.9	2.27	(2)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>catenulatum</i>	Human feces	56.1	2.08	(3)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	Intestine of adult		Preparation of shotgun library	(4)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>dentium</i>	Dental caries	58-60	2.6	(5)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>scardovii</i>	Human blood, Sweden		Preparation of shotgun library	(6)
<i>Parascardovia</i>	<i>denticolens</i>	Human dental caries	57-59	1.9	(7)
<i>Scardovia</i>	<i>inopinata</i>	Human dental caries	48-50	1.8	(8)
<i>Gardnerella</i>	<i>vaginalis</i>	Human genital tract	40-42	1.7	(9)

保存されている *Bifidobacterium* 属およびその近縁種で、ヒトを分離源とする基準株とした。その結果、Table 1 に示した 9 株が候補としてあげられた。web 情報と私信から、これら 9 株は菌株レベルで全ゲノム配列が決定されていないと考えられたので、本プロジェクトと次に引き継がれるプロジェクトとして全ゲノム解析を開始した。

まず、各菌株から高分子量の DNA を精製し断片化する。アガロースゲル電気泳動法にて、2~3 kb 程度の DNA 断片を切取する。得られた DNA 断片を大腸菌/プラスミドベクター系にクローニングし、大腸菌コロニーによるショットガンライブラリを作製する。ショットガンライブラリから、任意のコロニーをピックアップし、PCR にてインサートを増幅し、鋳型 DNA を調製する。その鋳型 DNA について、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いてシーケンス反応を行い、ABI 3730 シークエンサー (アプライドバイオシステムズ) にて塩基配列の決定を行う。得られたリード配列を phred/phrap/consed 等のソフトウェアを用いてアセンブルし、続いてフィニッシングにより全ゲノム配列を決定する。

以上、各菌株の培養とゲノム精製は麻布大学で行ない、その後、東京大学大学院新領域の服部研究室においてシーケンスし、アセンブルによりコンテイング、ドラフト配列、そしてフィニッシングする。得られた全ゲノム配列データから、遺伝子領域予測と機能予測、パスウェイ解析は理化学研究所で行い、菌種間の比較ゲノム解析は麻布大学も加わって詳細に解析する。

3. 結果と考察

Miyake et al.⁶⁾ は、1998 年に *Bifidobacterium* 属の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行い、*Bifidobacterium* 属は、Stakebrandt et al.²⁾ の分類した 31 菌種のうち、29 菌種が 90% 以上の相同性のクラスターを形成し、その 29 菌種と *Gardnerella vaginalis* (旧分類 *Bifidobacterium vaginalis*, グラム陰性桿菌で G+C 含量が 42~44%) で構成されるサブクラスター 1 および *Scardovia inopinata* (旧分類 *Bifidobacterium inopinatum*) と *Parascardovia denticolens* (旧分類 *Bifidobacterium denticolens*) で構

成されるサブクラスター 2 に分かれることを示した。現在は、その提唱のとおり、それらの菌種は別の属として独立している (Fig. 1)。*Bifidobacterium* 属のほとんどは健常な哺乳動物の消化管から分離されるが、*G. vaginalis* は炎症の女性生殖器官、*P. denticolens* と *S. inopinata* はヒトの歯カリエスから分離されるなど分布 (エコロジー) も異なる。

Table 1 の 9 菌種について、7 菌種についてはほぼ同時進行でシーケンスを行なった。ゲノムサイズやアセンブルのしやすさなどの条件により、すでに *B. bifidum*, *B. breve* および *B. catenulatum* は全ゲノム配列を得た。この 3 菌種については、引き続き遺伝子領域予測と機能予測、パスウェイ解析を開始する。*B. dentium*, *P. denticolens*, *S. inopinata* および *G. vaginalis* は、ドラフトシーケンスでコンテイングが 15 前後になっており、フィニッシング作業に入った。残りの *B. longum* および *B. scardovii* については、ショットガンライブラリーの作製を終えたので、ドラフトシーケンスの作業を行なっている。

以上で 5 年間のこのプロジェクトは終了するが、その間の *Lactobacillus* 属細菌の全ゲノム解析とプロバイオティクスのメカニズム解明などの業績に対し、文科省からの 2 名の評価委員より審査され「A」と「A」の評価を受け、引き続き「ヒト腸内細菌のゲノム情報に基づく機能解析と生体影響」のテーマに関連のプロジェクトが継続採択された。現在、上述のとおり *Bifidobacterium* 属とその近縁種について、大規模なシーケンスプロジェクトを開始し、世界的にもインパクトのある成果にしていく予定である。

4. 要約

Bifidobacterium 属は、高いプロバイオティクス効果および細菌の分類学のモデルケースとして興味深い状況にある。(独)理化学研究所バイオリソースセンター 微生物材料開発室 (JCM) に保存されている *Bifidobacterium* 属およびその近縁種で、ヒトを分離源とする基準株を検索したところ、9 菌種 (菌株) が候補としてあげられ、その全ゲノム解析を開始した。その菌種は、Table 1 に示したとおりであるが、*B. bifidum*, *B. breve* および *B. catenulatum* の 3 菌種は全ゲノム配列を決定し、*B. dentium*, *P. denticolens*, *S. inopinata* および *G. vaginalis* の 3 菌種は、コンテイ

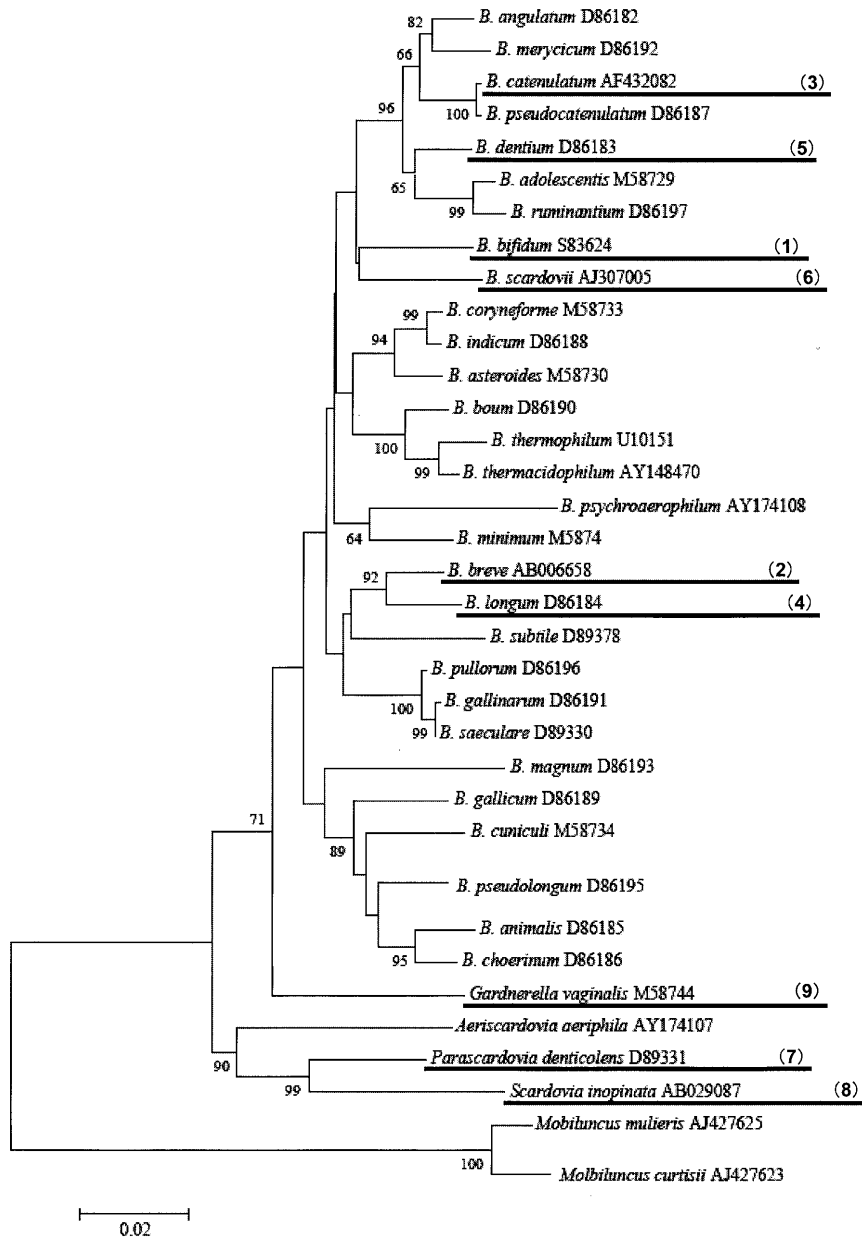


Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among species of the Family Bifidobacteriaceae. Bar indicates number of nucleotide substitution per site. See the sequence progress of (1)-(9) species in Table 1.

グが15前後になっており, *B. longum* および *B. scardovii* については, ショットガンライブラリの作製を完了した。各菌株について引き続きシーケンシング作業を進め, 全ゲノム解析後は, 大規模な *Bifidobacterium* 属の比較ゲノム解析を行う予定である。

文 献

- 1) Tissier, H.: Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson, These de Paris, 253, 1990.
- 2) Stakebrandt, E. *et al.*: Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 479-491, 1997.
- 3) 森田英利・藤 英博, 乳酸菌の保健機能と応用, 95-106, シーエムシー出版, 東京, 2007.
- 4) Schell, M.A. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 14422-14427, 2002. Erratum in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 9430, 2005.
- 5) Suzuki, T. *et al.*: published in online database, 2006.
- 6) Miyake, T. *et al.*: Microbiol. Immunol. 42, 661-667, 1998.